

مقایسه‌ی مهارپذیری ترکیبات فعال مریم گلی با داروهای ضد دیابتی voglibose و

miglitol در سرکوب آنزیم آلفاگلوکوزیداز به روش *in silico*

معصومه شجاعی برجوانی^۱، سمیه نوروزی^۱، پارسا برنوس^۱، کیمیا مختاری^۱، عزیزه اسدزاده^{۱*}

چکیده

مقدمه: دیابت ملیتوس به گروهی از اختلالات متابولیکی اطلاق می‌شود که با افزایش سطح خونی گلوکز به علت اختلال در ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو همراه است. با توجه به این که آلفاگلوکوزیداز یک آنزیم کلیدی در هیدرولیز کربوهیدرات‌ها و افزایش سطح قند خون است. هدف از این پژوهش بررسی بیوانفورماتیکی مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز به وسیله‌ی ترکیبات اصلی گیاه مریم گلی است.

روش‌ها: این پژوهش به روش توصیفی-تحلیلی صورت گرفت. جهت مطالعه‌ی نحوه‌ی برهم کنش و میزان انرژی اتصال ترکیبات در جایگاه فعال آنزیم، ساختار سه بعدی ترکیبات و پروتئین مورد بررسی به ترتیب از پایگاه‌های PubChem و PDB به دست آمد. پس از بهینه‌سازی انرژی توسط نرم‌افزار Hyperchem، مطالعات داکینگ به وسیله‌ی نرم‌افزار AutoDock 4.2 انجام گرفت و برای به دست آوردن پارامترهای لیپینسکی و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ترکیبات از سرور Swiss ADME استفاده شد.

یافته‌ها: ترکیبات مورد مطالعه از نظر انرژی اتصال و نحوه‌ی برهم‌کنش مشابه با دو ترکیب کنترل مثبت و گلیبوز و میگلینتول بودند، بهترین نتایج داکینگ مربوط به ترکیب کامفور است. در حقیقت این ترکیب با منفی‌ترین سطح انرژی اتصال ($-3/95$ Kcal/mol) تمایل بیشتری برای اتصال به آمینواسیدهای کلیدی جایگاه فعال آنزیم آلفاگلوکوزیداز دارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به برهم‌کنش‌های مناسب ترکیبات مریم گلی با آنزیم می‌توان پس از تأیید نتایج در شرایط برون تنی و درون تنی از این گیاه به عنوان یک کاندید مناسب دارویی در درمان دیابت استفاده کرد.

واژگان کلیدی: دیابت، آلفاگلوکوزیداز، مهارکننده، آنزیم، بیوانفورماتیک، داکینگ

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 الکترونیک: az.asadzadeh@yahoo.com

مقدمه

هیپرگلیسمی وضعیت افزایش غیر طبیعی سطح گلوکز خون است که در بیماران دیابتی به دلیل عدم جذب سلولی قندخون، ناشی از کاهش ترشح انسولین یا مقاومت سلول‌های بدن در برابر انسولین ایجاد می‌شود [۱، ۲]. نارسایی قلبی-عروقی، کلیوی و کاهش فعالیت عصبی، ادرار مکرر، تشنگی و پُرخوری از علائم بیماری دیابت ملیتوس است. دیابت نوع اول یا دیابت وابسته به انسولین اغلب در کودکان و جوانان رخ می‌دهد. در این نوع دیابت سلول‌های بتای لوزالمعده که وظیفه‌ی ساخت هورمون انسولین در بدن را بر عهده دارند، به‌طور کامل از بین رفته یا غیرفعال می‌شوند [۳-۵]. دیابت نوع دو یا دیابت غیروابسته به انسولین اغلب در سنین بالا و بعد از ۴۰ سالگی رخ می‌دهد. در این نوع دیابت غالباً میزان انسولین خون بیماران افزایش یافته که حاکی از کاهش حساسیت سلول‌های بدن به انسولین است. با توجه به آنکه اکثر مبتلایان به دیابت نوع دوم افراد چاق هستند ادعا شده است که چاقی عامل کاهش حساسیت سلول‌های بدن به انسولین است [۳-۶]. مدیریت سطح قند خون یک راهبرد حیاتی در کنترل دیابت و عوارض آن است. مهارکننده‌های آنزیم‌های هیدرولیز پُلی‌ساکاریدی به‌عنوان داروهای خوراکی برای کنترل هیپرگلیسمی در بیماران مبتلا به دیابت مفید هستند [۷]. آلفا-گلوکوزیداز (مالتاز، ایزومالتاز، سوکراز) مهم‌ترین آنزیم هیدرولیز کننده در این مسیر است. این آنزیم در سلول‌های شانه‌ای حاشیه‌ی روده‌ی کوچک قرار دارد. دی‌ساکاریدها و اولیگوساکاریدهای ناشی از هیدرولیز کربوهیدرات‌های غذا توسط آن به مونوساکاریدهای قابل جذب تبدیل می‌شوند. این آنزیم هیدرولیز پیوندهای (۴ → ۱)-آلفا پیوند گلیکوزیدی را با آزاد کردن آلفا گلوکز کاتالیز می‌کند و از این طریق باعث تسهیل جذب گلوکز توسط روده‌ی کوچک می‌شود [۸-۱۰]. مریم گلی (*Salvia officinalis*) گیاهی است علفی که متعلق به خانواده‌ی نعناعیان است و دارای بیش از ۹۰۰ گونه است. این گیاه از روزگاران کهن مورد توجه خاص بوده و به عنوان یکی از گیاهان دارویی برای کنترل دیابت و قند خون استفاده می‌شود. عصاره و ترکیبات شیمیایی خاص موجود در این گیاه تأثیر و عملکردی مشابه با داروهای ضد دیابت دارد. مصرف

مریم گلی موجب تنظیم و مهار انتشار گلوکز کبدی می‌شود. گیاه مریم گلی از نوسانات سطوح قند خون در بدن جلوگیری می‌کند و خطر ابتلا به دیابت نوع دو را کاهش می‌دهد و همچنین عصاره‌ی این گیاه به کاهش علائم دیابت نوع دو نیز کمک می‌کند. از دیگر خواص مریم گلی این است که التهاب در بدن افراد مبتلا به دیابت را از طریق بهبود حساسیت به انسولین کاهش می‌دهد [۱۴-۱۱]. امروزه بیوانفورماتیک در تعامل با سایر رشته‌ها نظیر علوم زیستی، کامپیوتر، شیمی و فیزیک به‌عنوان یک علم چندرشته‌ای در شاخه‌های مختلف علوم نقش چشم‌گیری دارد. بررسی برهم کنش بین مولکول‌ها در سطح اتمی، مدل‌سازی و پیشگویی عملکرد سیستم ایمنی، طراحی دارو و واکنش‌های جدید به راحتی با استفاده از روش‌های *In silico* امکان‌پذیر است. اصلی‌ترین مطالعات محاسباتی در طراحی و کشف مهارکننده‌های جدید، به دو بخش تقسیم می‌شود که شامل مطالعات براساس ساختار پروتئین که با مدل‌سازی برهم‌کنش‌های لیگاند-گیرنده از طریق داکینگ انجام می‌گیرد و یا مطالعات تعیین کمی روابط ساختار فعالیت (QSAR) که ضرورتاً شامل یک سری دانسته‌ها در مورد گیرنده‌ی هدف نیست اما به‌صورت ضمنی یک سازگار بیوشیمیایی از عمل لیگاند را بیان می‌کند در روش‌های QSAR یکی از مهم‌ترین مشکلات چشم‌پوشی از کنفورمسیون لیگاند در جایگاه فعال است بنابراین در این تحقیق از روش مولکولار داکینگ استفاده شد [۱۵، ۱۶]. هدف از این پژوهش مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی اثرت مهارکنندگی ترکیبات اصلی موجود در گیاه مریم گلی بر روی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، بررسی خواص فیزیکیوشیمیایی و خواص لپینسکی ترکیبات در مقایسه با داروهای معمول دیابت *voglibose* و *miglitol* است.

روش‌ها

این پژوهش به شیوه‌ی توصیفی - تحلیلی انجام شد. در این پژوهش، با هدف بررسی و شناسایی دقیق نحوه‌ی اتصال مهارکننده‌ها به جایگاه فعال آنزیم آلفاگلوکوزیداز، روش داکینگ مولکولی اجرا و نتایج به‌دست آمده از آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس با استفاده از سرور Swiss ADME خصوصیات

برهم کنش‌های هیدروژنی، برهم کنش‌های π بین مهارکننده‌ها و آنزیم معلوم گردد. در این نرم‌افزار با استفاده از دستور monitor Hbond تمامی پیوندهای هیدروژنی محتمل که بیشترین فاصله‌ی گیرنده و دهنده‌ی هیدروژن ۲/۵ آنگستروم به‌دست آمد. به‌منظور بررسی برهم کنش‌های هیدروفوبی بین مهارکننده‌ها و آنزیم از نرم افزار Ligplot تحت سیستم عامل ویندوز، استفاده شد. در واقع Ligplot برنامه‌ای است که به‌طور خودکار نمایش‌های شماتیک دوبعدی از کمپلکس پروتئین-لیگاند تولید می‌کند خروجی این نرم‌افزار یک فایل با فرمت drw است که نمایش ساده از برهم کنش‌های بین مولکولی از جمله برهم کنش‌های آبگریز، و دسترسی اتمی را ارائه می‌دهد.

پیش‌بینی میزان جذب و خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیگاندها
در سال ۲۰۰۱ Lipinski و همکاران از طریق تعریف قانون ۵، راهکاری برای پیش‌بینی قابل جذب بودن ترکیبات ارائه کردند [۱۷]. به این ترتیب که جذب یا نفوذ کم در مواردی اتفاق می‌افتد که مولکول مورد نظر وزن مولکولی بیش از ۵۰۰ دالتون، تعداد اتم‌های پذیرنده‌ی پیوند هیدروژنی بیش از ۱۰، تعداد اتم‌های دهنده‌ی پیوند هیدروژنی بیش از ۵ و فاکتور چربی دوستی محاسبه شده (ClogP) بیش از ۵ باشد. از طرفی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات از جمله موارد مهم و مؤثر در بررسی‌های کاندید دارویی است، لذا در این تحقیق میزان قطبیدگی ترکیبات (TPSA)، حالیت (LogS) و میزان جذب گوارشی مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور پیش‌بینی میزان جذب و خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ساختار سه بعدی لیگاندها با استفاده از نرم‌افزار GaussView 5.0 به فرمت مناسب تبدیل شدند و سپس به‌عنوان ورودی سرور SwissADME موجود در آدرس <http://www.swissadme.ch> مورد استفاده قرار گرفتند. (جدول ۱ و ۲).

فیزیکوشیمیایی و میزان جذب ترکیبات مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی انرژی‌ها و برهم کنش‌های ترکیبات

برای انجام روش داکینگ از نرم‌افزار Autodock4.2 استفاده شد. این نرم‌افزار یک برنامه‌ی پُرکاربرد با دقت زیاد است. که با حساسیت زیاد، بار جزئی برای جستجوی ساختار دقیق را محاسبه کرده و انرژی اتصال را تخمین می‌زند. بدین‌منظور نرم‌افزار اتوداک در کامپیوتر core i5 با سیستم عامل ویندوز نصب شد. ساختار سه بعدی ۱۱ ترکیب اصلی موجود در عصاره‌ی گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis*) از پایگاه <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> با فرمت SDF دانلود و پس از تبدیل به فرمت pdb، توسط الگوریتم Polak-Ribiere در نرم‌افزار هایپرکم از نظر انرژی بهینه شدند و بعد با استفاده از گزینه ی گستیگر در برنامه‌ی اتوداک بار جزئی برای مولکول‌ها محاسبه شد، هیدروژن‌های غیر یونیزه ادغام گردید و بعد از مشخص کردن مرکز ثقل لیگاندها تمامی باندهای قابل چرخش تعیین گردید. به منظور آماده‌سازی پروتئین برای عملیات داکینگ، ساختار کریستالوگرافی مناسب از آنزیم آلفا گلوکوزیداز از سایت <http://www.rcsb.org/pdb> انتخاب و دانلود شد و با استفاده از نرم‌افزار DS Visualizer 3.5 جهت ورود به نرم‌افزار اتوداک آماده شد. بار کلی آنزیم با استفاده از کلمن شارژ تعیین گردد سپس هیدروژن‌های غیر یونیزه در اتم کربن مجاور ادغام شدند. پس از انجام Autogrid با استفاده از از ژنتیک الگوریتم لامارکین موجود در نرم‌افزار اتوداک، داکینگ تمامی لیگاندها در فولدرهای جداگانه انجام گردید. جهت انتخاب بهترین خوشه‌ها (Clusters) فایل خروجی عملیات داکینگ مورد بررسی بیشتر قرار گرفت و اطلاعاتی راجع به تعداد خوشه‌ها، پایین‌ترین سطح انرژی در هر خوشه، تعداد کنفورماسیون‌ها در هر خوشه (جمعیت خوشه‌ها) و آرایش فضایی با منفی‌ترین سطح انرژی در هر خوشه بررسی شد. سپس خوشه‌های دارای منفی‌ترین سطح انرژی با تعداد جمعیت زیاد جهت ارزیابی بیشتر انتخاب شدند. در انتها از نرم افزار دیسکاوری DS Visualizer 3.5 که در شبیه‌سازی مولکول‌های کوچک و ماکرومولکول‌ها کاربرد زیادی دارد، استفاده شد و برهم کنش‌های لیگاند - پروتئین مورد آنالیز قرار گرفت تا انواع

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات مورد مطالعه

جذب گوارشی	حلالیت		میزان قطبیدگی	شناسه Pubchem	فرمول مولکولی	ترکیبات
	LogS	Class				
زیاد	-۲,۲۵	حلالیت بالا	۹,۲۳	۲۷۵۸	C ₁₀ H ₁₈ O	۱-۸-سینثول
زیاد	-۱,۲۱	قابل حل	۱۷,۰۷	۷۵۰۸	C ₇ H ₁₀ O	۳-سیکلو هگزن-۱-کربوکسالدئید
زیاد	-۳,۲۸	قابل حل	۲۶,۳۰	۱۰۷۲۱۷	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	آلفا- فنچیل استات
کم	-۳,۵۱	قابل حل	۰,۰۰	۶۶۵۴	C ₁₀ H ₁₆	آلفا پینن
زیاد	-۲,۱۵	حلالیت بالا	۱۷,۰۷	۹۱۴۵۶	C ₁₀ H ₁₆ O	بتا توجان
زیاد	-۰,۷۶	قابل حل	۱۷,۰۷	۵۴۹۳۱۸	C ₆ H ₈ O	بی سیکلو(۳,۱,۰) هگزان-۳- اون
زیاد	-۲,۵۱	قابل حل	۲۰,۲۳	۱۲۰۱۵۱۸	C ₁₀ H ₁₈ O	بورنتول ال
کم	-۳,۳۴	قابل حل	۰,۰۰	۶۶۱۶	C ₁₀ H ₁₆	کامفن
کم	-۳,۸۷	قابل حل	۰,۰۰	۵۲۸۱۵۱۵	C ₁₅ H ₂₄	کاریوفیلن
زیاد	-۲,۱۶	قابل حل	۱۷,۰۷	۲۵۳۷	C ₁₀ H ₁₆ O	کامفور
زیاد	-۳,۵۷	حلالیت بسیار بالا	۲۰,۲۳	۱۱۹۹۶۴۵۲	C ₁₅ H ₂₆ O	ویریدی فلورول
کم	۱,۱۵	حلالیت بسیار بالا	۱۱۰,۳۸	۵۷۹۳	C ₆ H ₁₂ O ₆	لیگاند کوکریستال
کم	۱,۴۱	حلالیت بسیار بالا	۱۵۳,۶۴	۴۴۴۰۲۰	C ₁₀ H ₂₁ NO ₇	وگلیبوز
کم	۰,۶۹	حلالیت بالا	۱۰۴,۳۹	۴۴۱۳۱۴	C ₈ H ₁₇ NO ₅	میگلیتول

جدول ۲- پارامترهای لیپینسکی ترکیبات

ترکیبات	میزان چربی دوستی	وزن مولکولی	پذیرندگان پیوند دهندگان پیوند	
			هیدروژنی	هیدروژنی
۱-۸-سینثول	۲,۷۴	۱۵۴,۲۵	۱	۰
۳-سیکلو هگزن-۱-کربوکسالدئید	۱,۲۰	۱۱۰,۱۵	۱	۰
آلفا- فنچیل استات	۳,۷۴	۱۹۶,۲۹	۲	۰
آلفا پینن	۴,۴۸	۱۳۶,۲۳	۰	۰
بتا توجان	۲,۲۷	۱۵۲,۲۳	۱	۰
بی سیکلو(۳,۱,۰) هگزان-۳- اون	۰,۵۱	۹۶,۱۳	۱	۰
بورنتول ال	۲,۲۷	۱۵۴,۲۵	۱	۱
کامفن	۴,۲۲	۱۳۶,۲۳	۰	۰
کاریوفیلن	۴,۳۸	۲۰۴,۳۵	۰	۰
کامفور	۲,۱۹	۱۵۲,۲۳	۱	۰
ویریدی فلورول	۳,۷۴	۲۲۲,۲۷	۱	۱
لیگاند کوکریستال	۰,۳۵	۱۸۰,۱۶	۶	۵
وگلیبوز	-۴,۰۹	۲۶۷,۲۸	۸	۸
میگلیتول	-۲,۵۷	۲۰۷,۲۲	۶	۵

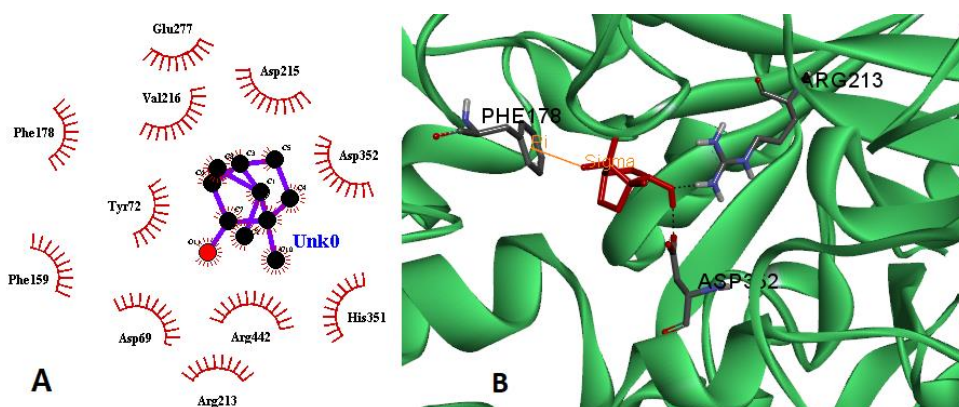
یافته‌ها

پیش‌بینی میزان جذب و خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیگاندها طبق جدول خصوصیات فیزیکوشیمیایی (جدول ۱) تمامی ترکیبات از نظر حلالیت در کلاس محلول تا خیلی محلول هستند. TPSA میزان قطبیدگی را نشان می‌دهد که با نفوذپذیری هم در ارتباط است ترکیباتی که TPSA بزرگتر از ۱۴۰ آنگستروم دارند فاقد نفوذپذیری مناسب هستند که در بین ترکیبات تمامی ترکیبات به‌جز وگلیبوز میزان قطبیدگی کمتر از ۱۴۰ داشتند. براساس نتایج به‌دست آمده که مطابق قانون لیبینسکی مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). به‌جز ترکیب وگلیبوز که تعداد دهندگان پیوند هیدروژنی بیشتر از ۵ داشت. تمامی ترکیبات مورد بررسی از قانون لیبینسکی تبعیت کرده و وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون، تعداد اتم‌های پذیرنده‌ی پیوند هیدروژنی کمتر از ۱۰، تعداد اتم‌های دهنده‌ی پیوند هیدروژنی کمتر از ۵ و فاکتور چربی دوستی محاسبه شده (ClogP) کمتر از ۵ داشتند.

نتایج بررسی انرژی‌ها و برهم‌کنش‌های ترکیبات

در ابتدا مولکول کوکریستال گلوکز از جایگاه فعال آنزیم آلفاگلوکوزیداز برآشته شد و مجدداً مورد داکینگ قرار گرفت به این منظور عملیات داکینگ مقدماتی با گرید باکس‌ها و مرکز گریدهای مختلف تکرار شد و بهترین آرایش فضایی با موقعیت

ترکیب کوکریستال در جایگاه فعال که از سایت pdb به‌دست آمده بود، مقایسه شد. لازم به ذکر است بهترین شکل فضایی زمانی حاصل می‌شود که ترکیب کوکریستال و ترکیب داک شده توسط کاربر در یک جهت بوده و بیشترین همپوشانی را داشته باشد. اسید آمینه‌های Arg442, His351, Arg213, His112, Asp215, Asp69, Asp352, Glu277 در تشکیل پیوند هیدروژنی و اسید آمینه‌های Glu277, Asp215, Asp352, Arg442, Glu411, His112, Tyr72, Tyr158, Phe303, Gln279, Phe178, Phe159, در برقراری پیوند هیدروفوبی مولکول کوکریستال با آنزیم آلفا گلوکوزیداز نقش داشتند. بعد از اعتبار سنجی پروتکل داکینگ، ساختار 3D ترکیبات مهارکننده به داخل جایگاه فعال آنزیم آلفا گلوکوزیداز داک شدند. داده‌های مربوط به تغییرات انرژی آزاد، انرژی درون مولکولی، انرژی الکترواستاتیک، انرژی کل درونی و انرژی پیچشی در جدول ۳ آورده شده است. منفی‌ترین سطح انرژی ترکیب کامفور با انرژی اتصال 3.95- بود نتایج بررسی‌ها نشان داد که ترکیب کامفور با اسید آمینه‌های Arg213, Asp352 پیوند هیدروژنی و Phe178 برهم‌کنش پای - سیگما می‌دهد (شکل A) اسید آمینه‌های Phe178, Arg442, Phe159, Asp352, Arg213, Asp69, Glu277, Val216, Tyr72 در تشکیل پیوند هیدروفوبی شرکت دارند (شکل B). در جدول ۴ کلیه برهم‌کنش‌های لیگاندها شامل پیوندهای هیدروژنی، برهم‌کنش‌های هیدروفوبی، انواع برهم‌کنش‌های π ذکر شده است.



شکل ۱- A بررسی برهم‌کنش‌های هیدروفوبی لیگاند کامفور با جایگاه فعال آنزیم آلفاگلوکوزیداز
B پیوند هیدروژنی (خط چین سیاه)، پیوند π -Sigma (خط نارنجی)

جدول ۳- تغییرات انرژی اتصال، انرژی درون مولکولی، انرژی الکترواستاتیک، انرژی کل درونی و انرژی پیچشی

انرژی درون مولکولی	انرژی الکترواستاتیک	انرژی کل درونی	انرژی پیچشی	تغییرات انرژی آزاد اتصال	ترکیبات
-۳,۱۴	-۰,۰۳	۰,۰	۰,۰	-۳,۱۴	۱-۸-سینتول
-۳,۹۲	-۰,۳۹	-۰,۰۲	۰,۶	-۳,۳۲	۳-سیکلوهگزن-۱-کربوکسالدئید
-۴,۲۵	-۰,۴۲	-۰,۲۱	۰,۸۹	-۳,۳۵	آلفا- فنچیل استات
-۳,۲۴	۰,۰۱	۰,۰	۰,۰	-۳,۲۴	آلفا پینن
-۴,۲۷	-۰,۰۵	-۰,۰۸	۰,۶	-۳,۶۷	بنا توجان
-۳,۴۸	-۰,۳۴	۰,۰۱	۰,۳	-۳,۱۹	بی سیکلو (۳,۱,۰) هگزان ۳- اون
-۳,۸۴	-۰,۳۵	۰,۰۲	۰,۳	-۳,۵۴	بورنتول ال
-۳,۰۱	-۰,۰۲	۰,۰	۰,۰	-۳,۰۱	کامفن
-۳,۶۵	-۰,۰۱	۰,۰	۰,۰	-۳,۶۵	کاریوفیلن
-۴,۲۵	-۰,۳۳	۰,۰۳	۰,۳	-۳,۹۵	کامفور
-۳,۹۷	-۰,۳۱	۰,۰	۰,۳	-۳,۶۷	ویریدی فلورول
-۶,۹۹	-۱,۷۴	۱,۱۸	۱,۷۹	-۵,۲۰	لیگاند کوکریستال
-۵,۲۱	-۴,۵۵	-۰,۲۲	۱,۱	-۴,۱۱	وگلیبوز
-۵,۲۷	-۶,۵۴	-۰,۳۳	۱,۱	-۴,۱۷	میگلیتول

جدول ۴- بررسی تمامی برهم‌کنش‌های موجود بین ترکیبات مورد مطالعه و اسید آمینه‌های جایگاه فعال آنزیم آلفاگلوکوزیداز

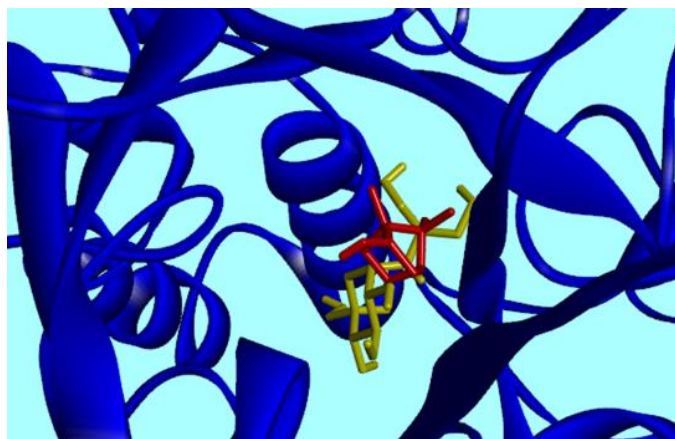
اسید آمینه‌های درگیر در تشکیل برهم‌کنش‌ها			ترکیبات
برهم‌کنش‌های هیدروژنی	برهم‌کنش‌های Pi	برهم‌کنش‌های هیدروفوبی	
Arg442	-	Phe178, Arg442, Phe159, Asp352, His351, Arg213, Asp69, Glu277, Asp215, Val216	۱-۸-سینتول
Arg213, His351, Asp352	Phe178	Tyr72, Phe178, Arg442, Asp352, His351, Arg213, Asp69, Asp215, Val216	۳-سیکلوهگزن-۱-کربوکسالدئید
Arg442, Asp69	-	Gln279, Glu411, Tyr158, Phe178, Arg442, Phe159, Asp352, Asp69, Glu277, Val216	آلفا- فنچیل استات
-	-	Val216, Tyr72, Phe178, Arg442, Phe159, Asp352, His112, Asp69, Glu277, Asp215	آلفا پینن
Arg442, Asp69	-	Tyr72, His112, Gln279, Phe303, Gln279, Tyr158, Phe178, Arg442, Phe159, Asp69, Glu277, Asp215, Val216	بنا توجان
Arg213, His351, Asp352	-	Phe178, Arg442, Asp352, His351, Arg213, Asp69, Glu277, Asp215, Val216, Tyr72	بی سیکلو (۳,۱,۰) هگزان ۳- اون
Arg213, Asp215	-	Phe178, Arg442, Tyr72, Phe159, Asp352, His351, Arg213, Asp69, Glu277, Asp215, Val216	بورنتول ال
-	-	Glu277, Asp215, Phe178, Phe159, His112, Asp69, Val216, Asp352, Tyr72, Arg442	کامفن
-	-	Arg315, Gln279, Glu411, Tyr158, Gln353, Phe178, Arg442, Phe159, Asp352, Glu277, Val216	کاریوفیلن
Arg213, Asp352	Phe178	Phe178, Arg442, Phe159, Asp352, Arg213, Asp69, Glu277, Val216, Tyr72	کامفور
Asp352, Arg442	-	Gln279, Phe303, Glu277, Arg442, Asp352, Tyr158, Phe178, Phe159, Glu411	ویریدی فلورول
His112, Arg213, His351, Arg442,	Phe178	Val216, Glu277, Asp215, Phe178, Asp69, Phe159, Asp352, Tyr72	لیگاند کوکریستال

Asp215, Asp69, Asp352, Glu277 His112, Asp69, Glu277, Arg442 Gln279, Glu411 His351, Asp215, Asp69, Asp351, Glu277, Arg442	Phe17 8 -	Glu277, Asp215, Asp352, Arg442, Glu411, His112, Tyr72, Tyr158, Phe303, Gln279, Phe178, Phe159, Asp352, Arg442, Tyr72, Gln279, Phe178, Phe159, Asp69, Glu277, Asp215, Val216, Phe303	وگلیبوز میگلیتول
---	---------------------	--	-------------------------

بحث و نتیجه‌گیری

مهارکننده‌های آنزیم آلفاگلوکوزیداز تنوع وسیعی دارند و شامل مهارکننده‌های طبیعی و سنتزی هستند. گیاهان دارویی به دلیل نقش درمانی آنها و نداشتن عوارض جانبی از گذشته‌ی دور مورد توجه خاص بوده است. در سال‌های اخیر، تحقیق در مورد گیاهان دارویی برای مدیریت دیابت، علاقه متخصصان را به خود جلب کرده است. تعداد زیادی از گیاهان شناخته شده است که فعالیت ضد هیپرگلیسمی خود را از طریق مهار آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی ساکارید اعمال می‌کنند. این دسته از مهارکننده‌های طبیعی یک راهبرد بسیار خوب برای کنترل هیپرگلیسمی پس از صرف غذا ارائه کرده‌اند. با توجه به نتایج خوب مطالعات قبلی در زمینه‌ی مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز در شرایط *in vivo*

و *insilico* [۱۹، ۱۸]. با در نظر گرفتن تشابه ساختاری لیگاند‌ها و مقالاتی که حاکی از اثر مریم گلی بر کاهش سطح گلوکز خون داشت [۲۰، ۲۱]. در تحقیق حاضر اثر ترکیبات اصلی عصاره‌ی مریم گلی در مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. در شکل ۲ تصویر هم‌پوشانی این ترکیب همراه با وگلیبوز در جایگاه فعال آنزیم آورده شده است. هر دو ترکیب با اسید آمینه‌های Phe178, Arg442, Phe159, Asp352, Asp69, Glu277, Tyr72 Arg213, Asp352 و Phe178 به‌طور مشترک برهم‌کنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبی برقرار می‌کنند. با توجه به این که این اسید آمینه‌ها از رزیدوهای کلیدی جایگاه فعال آنزیم هستند. بنابراین با اشغال این رزیدوها توسط مهارکننده از اتصال سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم جلوگیری می‌شود.



شکل ۲- بررسی میزان هم‌پوشانی ترکیب کامفور (لیگاند قرمز) با کنترل مثبت وگلیبوز (لیگاند زرد)

داد که مهارکننده‌ها با اتصال به اسید آمینه‌های Tyr72, His112, Phe178, Arg315 اثر مهاری خوبی نشان دادند که بیشتر ترکیبات مریم گلی با این رزیدوها برهم‌کنش داشت [۲۴]. در سال ۲۰۱۴، نحوه‌ی اتصال و اثر مهاری مشتقات استیلین بر آنزیم α -گلوکوزیداز توسط Lee و همکاران را به روش داکینگ مولکولی مورد آنالیز قرار داده شد. در نتیجه‌ی این مطالعه، ترکیبات می‌توانند در محل جایگاه فعال آنزیم با آمینو اسیدهای Arg442, Asp352, Glu277, His351, و His112 پیوند هیدروژنی

علاوه بر ترکیب کامفور بقیه‌ی ترکیبات موجود در مریم گلی با قرارگیری در موقعیت‌های مشابه با مهارکننده‌های استاندارد (وگلیبوز و میگلیتول) و برهم‌کنش با اسید آمینه‌های یکسان در جایگاه فعال نتایج خوبی را نشان دادند. نتایج حاصل از داکینگ این پروژه با مقالاتی که با گد آنزیمی مشابه کار شده بود، مقایسه گردید. در سال ۲۰۲۱، Peytam و همکاران بر روی دسته‌ای از مشتقات 3-amino-2,4-diarylbenzo pyrimidines [1,2-a] imidazo [4,5] کار کردند نتایج تحقیق آنها نشان

که ترکیب نویلین بیشترین تأثیر مهاری را بر آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشته است در این پروژه به برهم‌کنش این ترکیب با Arg442 Glu411، Asp352، Gln353 و Glu277 اشاره شده است [۳۰]. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه داکینگ مولکولی و بررسی برهم‌کنش‌های جایگاه‌های فعال آنزیم‌های مختلف با لیگاندها توسط این گروه تحقیقاتی انجام شده است [۳۱-۳۴]. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که بیشتر ترکیبات فعال مریم گلی با پیروی از قانون لیپینسکی میزان جذب خوبی را نشان دادند و از انرژی اتصال مناسبی برخوردار هستند در بین ترکیبات، کامفور با سطح انرژی اتصال منفی‌تر به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود لذا احتمال می‌رود که مهارکننده‌ی قوی‌تری نسبت به دیگر ترکیبات مریم گلی باشد، با مقایسه‌ی ساختار این ترکیب با ساختار بهترین ترکیب مهارکننده در مطالعه‌ی قبل [۱۸] می‌توان به این نتیجه رسید که ترکیبات با ساختار بی‌سیکلو و دارای یک بخش قطبی در مولکول قدرت مهاری خوبی را دارند. حضور گروه کتونی در camphore و ترکیب موجود در گیاه آویشن باغی که در مطالعات قبلی به‌عنوان مهارکننده‌ی خوب اشاره شد (Caryophyllene) [۱۸] باعث ایجاد برهم‌کنش‌های هیدروژنی در جایگاه فعال آنزیم می‌شود. البته برای تکمیل نتایج نیاز است تا ترکیب مذکور پس از تأیید بررسی‌های شبیه‌سازی مولکولی از گیاه مریم گلی استخراج، و مورد بررسی‌های *In vitro* و *In vivo* قرار گیرد.

سپاسگزاری

پژوهشگران این مطالعه مراتب تشکر و سپاس خود را از جناب آقای دکتر فصیحی عضو هیئت علمی دانشگاه اصفهان اعلام می‌دارند.

تشکیل دهند [۲۵]. ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق نیز به‌طور مشابه با این آمینواسیدها پیوند برقرار می‌کند. همچنین طی پژوهش انجام شده توسط Sadeghi و همکاران با موضوع بررسی پتانسیل مهارکنندگی *Allium sativum* L بر روی همین گد آنزیمی به روش داکینگ مولکولی گزارش شد که مهارکننده‌ها در جایگاه فعال آنزیم پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی با اسید آمینه‌های Glu277, Asp352, Tyr72, Arg442, Phe178, Asp215, Val216 برقرار می‌کند [۲۶]. مطالعه‌ی جهت بررسی پتانسیل مهاری ترکیبات مشتق شده از ۲،۳،۶-۴،۵-تری‌برومو-۲،۳،۶-دی‌هیدروکسی‌بنزیل بر اساس روش‌های بیوانفورماتیکی توسط Pradeep و همکاران انجام گرفت. نتایج داکینگ و تجزیه و تحلیل این ترکیبات نشان داد که رزیدوهای Tyr72, Phe178, Val216، Glu411، Gln353، Arg315، Gln279 در برهم‌کنش‌ها مهم است [۲۷]. Nokhala و همکاران که تحقیقی در ارتباط با متابولیت‌های بازدارنده‌ی آلفا گلوکوزیداز در برگ‌های *tetracera scandens* انجام دادند و مشاهده کردند که ترکیب منویالمیتین با رزیدوهای Glu182، Arg442، Asp69، His112 تشکیل پیوند هیدروژنی می‌دهد که به‌جز گلوتامین ۱۸۲ بقیه‌ی رزیدوها در برهم‌کنش ترکیبات مهارکننده‌ی این پژوهش مشاهده شد [۲۸]. در سال ۲۰۱۹ Wagle و همکاران روی دسته‌ی از ترکیبات موجود در گیاه دارویی *Cirsium japonicum* انجام دادند. نتایج مطالعه‌ی این گروه نشان داد ترکیب لوتولین در جایگاه فعال آنزیم با اسید آمینه‌های آسپارتیک ۶۹، هیستیدین ۲۸۰، آسپارتیک ۲۴۲، آرژنین ۴۴۲ پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند. پیوند با رزیدوهای آرژنین موقعیت ۴۴۲ و آسپارتیک ۶۹ در بیشتر ترکیبات مریم گلی نیز مشاهده شد [۲۹]. نتایج تحقیقی که در سال ۲۰۲۰ بر روی اثر مشتقات مختلف فلاون در مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز انجام شد، نشان می‌دهد

مآخذ

- Campos C. Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. *Postgrad Med* 2012; 124(6):90-97.
- Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications* 2001; 15(1):44-54.
- Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* 2015; 6(6):850-867.
- Blair M. Diabetes Mellitus Review. *Urol Nurs* 2016; 36(1):27-36.
- Rizvi SM, Shaikh S, Naaz D, et al. Kinetics and Molecular Docking Study of an Anti-diabetic Drug Glimepiride as Acetylcholinesterase Inhibitor: Implication for Alzheimer's Disease-Diabetes Dual Therapy. *Neurochem Res* 2016; 41(6):1475-1482. .
- Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal* 2012; 27(4):269-273.
- Gong L, Feng D, Wang T, Ren Y, Liu Y, Wang J. Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase: Potential linkage for whole cereal foods on prevention of

- hyperglycemia. *Food science & nutrition* 2020; 8(12):6320-6337.
8. Dirir AM, Daou M, Yousef AF, Yousef LF. A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes [published online ahead of print, 2021 Aug 16]. *Phytochem Rev* 2021;1-31.
 9. Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, van de Lisdonk EH, Rutten GE, van Weel C. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2005;28(1):154-163.
 10. Kalra S. Alpha glucosidase inhibitors. *The Journal of the Pakistan Medical Association* 2014; 64(4):474-476.
 11. Abu-Darwish MS, Cabral C, Ferreira IV, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Al-bdour TH, Salgueiro L. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed research international* 2013; 2013:538940.
 12. Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jašić M, Babić J, Jukić H, Banjari I. Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L. Preparations. *Plants (Basel)* 2019; 6;8(3):55.
 13. Lima CF, Azevedo MF, Araujo R, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Metformin-like effect of *Salvia officinalis* (common sage): is it useful in diabetes prevention?. *Br J Nutr* 2006; 96(2):326-333.
 14. Abdollahi A, Adelibahram F, Ghassab-Abdollahi N, Araj-Khodaei M, Parsian Z, Mirghafourvand M. The effect of *Salvia officinalis* on blood glycemic indexes and blood lipid profile in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis [published online ahead of print, 2022 Jan 25]. *J Complement Integr Med* 2022; 10.1515/jcim-2021-0425.
 15. Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *British medical journal* 2002; 324(7344):1018-1022.
 16. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews* 2017, 9(2), 91-102.
 17. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:3-26.
 18. Rahnama Falavarjani S, Asadzadeh A, Heidarian Naini F. Bioinformatic studies of the Effect of *Thymus vulgaris* on Alpha-Glucosidase Enzyme Inhibition for treating Diabetes. *ijddd* 2019; 18 (1) :19-28.
 19. Rahnama falavarjani Saeedeh, Asadzadeh Azizeh, Heidarian Naini Fatemeh. In vitro study of the effect of *thymus vulgaris* on alpha glucosidase enzyme inhibition for treating Diabetes. *ijddd* 2019; 18 (4) :173-178.
 20. Eidi, Maryam & Eidi, Akram & Zamanizadeh, Hamidreza. (2005). Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 100. 310-3.
 21. Behradmanesh, S., Derees, F., & Rafieian-Kopaei, M. Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients. *Journal of renal injury prevention* 2013; 2(2), 51-54.
 22. Pantsar T, Poso A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules* 2018; 23(8):1899.
 23. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2011; 7(2):146-57.
 24. Peytam, F., Takalloobanafshi, G., Saadattalab, T. et al. Design, synthesis, molecular docking, and in vitro α -glucosidase inhibitory activities of novel 3-amino-2,4-diarylbenzo [4,5] imidazo [1,2-a] pyrimidines against yeast and rat α -glucosidase. *Sci Rep*.2021; 11911.
 25. Lee Y, et al., Binding mode analyses and pharmacophore model development for stilbene derivatives as a novel and competitive class of α -glucosidase inhibitors. *PloS one* 2014; 9(1): e85827.
 26. Sadeghi M, Moradi M, Madanchi H, Johari B. In silico study of garlic (*Allium sativum* L.)-derived compounds molecular interactions with α -glucosidase. *In Silico Pharmacol* 2021; 9(1):11.
 27. Paudel, Pradeep; Su, Hui Seong; Hye Jin Park; Hyun Ah Jung; Choi, Jae Sue. Marine . Anti-Diabetic Activity of 2,3,6-Tribromo-4,5-Dihydroxybenzyl Derivatives from *Symphycladia latiuscula* through PTP1B Downregulation and α -Glucosidase Inhibition. *Drugs. Basel* 2019 (17), Iss. 3:166.
 28. Nokhala A, Siddiqui MJ, Ahmed QU, Ahamad Bustamam MS, & Zakaria A. Investigation of α -Glucosidase Inhibitory Metabolites from *Tetracera scandens* Leaves by GC-MS Metabolite Profiling and Docking Studies. *Biomolecules* 2020; 10(2), 287.
 29. Wagle A, Seong SH, Shrestha S, Jung HA, & Choi JS. Korean Thistle (*Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum.): A Potential Dietary Supplement against Diabetes and Alzheimer's Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2019; 24(3), 649.
 30. Sadeghi M, Zarei MA. Molecular docking studies of some flavone analogues as α -Glucosidase inhibitors. *J. Med. Plants* 2020; 19 (75) :55-6.
 31. Asadzadeh A, Sirous H, Pourfarzam M, Yaghmaei P, Afshin F. In vitro and in silico studies of the inhibitory effects of some novel kojic acid derivatives on tyrosinase enzyme. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2016 Feb;19(2):132.
 32. Naderi Kotaki M, Asadzadeh A, Heidaryan F. study the effect of *thymus vulgaris* in inhibiting acetylcholinesterase enzyme in order to treat Alzheimer's disease. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2020 Dec 21;27(5):594-602.
 33. Ghaffari S, Asadzadeh A, Seyedhosseini Ghaheh H, Sholehvar F. Docking Study on salicylaldehyde Derivatives as Anti-melanogenesis Agents. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2018 May 10;8(1):618-27.
 34. Zolghadri S, Ghanbariasad A, Fallahian F, Rahban M, Kalavani M, Bahman Jahromi E, Asadzadeh A, Hajjani M. Anticancer activity of N-heteroaryl acetic acid salts against breast cancer; in silico and in vitro investigation. *Molecular Biology Reports*. 2022 Jan;49(1):363-72.

Comparison of the Inhibitory Activity of Bioactive Compounds of *Salvia officinalis* with Antidiabetic Drugs, Voglibose and Miglitol, In Suppression of Alpha-Glucosidase Enzyme by In Silico Method

Masoumeh Shojaei Barjouei¹, Somayeh norouzi¹, Parsa Bernoos¹, kimia mokhtari¹, Azizeh Asadzadeh^{1*}

1. Department of biology, faculty of science, Nour Danesh institute of higher education, Meymeh, Isfahan, Iran

ABSTRACT

Background: Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders that are associated with elevated blood glucose levels due to impaired insulin secretion, insulin function, or both. alpha-glucosidase is a key enzyme in hydrolyzing carbohydrates and raising blood sugar levels. This study aimed to investigate the bioinformatics of inhibition of the alpha-glucosidase enzyme by the main constituents of *Salvia officinalis*.

Methods: This research was done by descriptive-analytical method. To study how the compounds interact and the amount of binding energy in the active site of the enzyme, the three-dimensional structure of the compounds and proteins were obtained from PubChem and PDB database, respectively. After energy optimization by Hyperchem software, docking studies were performed by AutoDock 4.2 software and the Swiss ADME server was used to obtain Lipinski parameters and physical and chemical properties of the compounds.

Results: The studied compounds were similar to the two positive control compounds, Voglibose and miglitol, in terms of binding energy and how they interact. The best docking results are related to the camphor . In fact, this compound with the most negative binding energy level (-3.95 Kcal / mol) has a greater tendency to bind to key amino acids in the active site of the alpha glucosidase enzyme.

Conclusion: Due to the appropriate interactions of *Salvia officinalis*.compounds with enzymes, after confirming the results in vitro and in vivo, this plant can be used as a suitable drug candidate in the treatment of diabetes.

Keywords: Diabetes, alpha-glucosidase, inhibitor, enzyme, Bioinformatic, Docking

* Nourdanesh Institute of Higher Education, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Danesh St., Isfahan Square, Meime, Isfahan, Iran. ZIP code: 8351765851, Tel: +983145427600. E-mail: az.asadzadeh@yahoo.com

