

## مقاله پژوهشی

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

مرتضی صادقی<sup>۱</sup>، مهران میراولیایی<sup>۲\*</sup>، زهرا شرکائی<sup>۳</sup>

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

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۱۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۰۷

### چکیده

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

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

**نتایج:** نتایج این پژوهش نشان داد که از میان ترکیبات فلاوانونی انتخاب‌شده، ترکیب Naringenin از لحاظ ویژگی‌های دارو همانندی و خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب‌تر بود. همچنین نتایج داکینگ مشخص کرد که ترکیب Naringenin با انرژی اتصال ۴/۹- کیلوکالری بر مول بالاترین اثر مهارى بر آنزیم آلفاآمیلاز داشت. **نتیجه‌گیری:** از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب Naringenin به دلیل جاگیری مناسب در جایگاه فعال آنزیم آلفاآمیلاز و اینتراکشن با آمینواسیدهای کلیدی، توانایی مهارکنندگی بیش‌تری از خود نشان می‌دهد. با بررسی بیش‌تر این ترکیب طبیعی در دو محیط *In vivo* و *In vitro* می‌توان از این ترکیب به‌عنوان یک مهارکننده طبیعی در مهار آلفاآمیلاز و در نتیجه جلوگیری از پیشرفت دیابت استفاده نمود.

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

### مقدمه

دیابت ملیتوس یک اختلال مختلط است که به خاطر نقص در تولید و مکانیسم اثر انسولین ایجاد می‌شود (۱). یکی از راهکارهای پیشگیری دیابت ملیتوس، به کار بردن داروهای مناسب به‌منظور کنترل قند خون پس از صرف غذا است (۲).  
از لحاظ بالینی دیابت‌ها به انواع دیابت ملیتوس نوع I، دیابت ملیتوس نوع II، دیابت ملیتوس بارداری و سایر انواع دیابت‌ها تقسیم‌بندی کرد. معمول‌ترین دیابت، نوع I است با ۵ تا ۱۰ درصد کل بیماران و همچنین دیابت نوع II با ۹۰ تا ۹۵ درصد کل بیماران را شامل می‌شود (۳). با ادامه دیابت در طولانی‌مدت، میزان آسیب به شبکه چشم، گلومرول‌های کلیوی و اعصاب محیطی افزایش می‌یابد (۴).

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

\*نویسنده مسئول: مهران میراولیایی، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mmiroiaei@yahoo.com  
https://orcid.org/0000-0003-0916-3757

Naringin به مقدار فراوان در گریپ‌فروت‌ها یافت می‌شوند و هم‌چنین مسئول طعم بهتر در این میوه‌ها می‌باشند. Hesperidin در پوست مرکبات مختلف مانند نارنج و پرتغال وجود دارد. چندین مشاهده نشان می‌دهد که این ترکیبات فلاوانونی از طریق مسیرهای متابولیکی متنوع و هدف‌های مولکولی مختلف، اثر مهار بر روی رشد انواع سلول‌های سرطانی دارند. این ترکیبات می‌توانند به‌آسانی به غشای سلول متصل شوند و به سلول‌های کشت داده‌شده در محیط *In vitro* نفوذ کنند و فعالیت‌های متابولیکی سلول را تعدیل کنند. کاهش آسیب‌های اکسیداتیو، غیرفعال شدن کارسینوزن، مهار تکثیر سلولی، تحریک تمایز، آسیب به رگ زایی تومور و فعال شدن مسیرهای ضد سرطانی از جمله فعالیت‌های ترکیبات فلاوانونی می‌باشند (۲۱-۱۸).

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

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

### مواد و روش‌ها

#### داندلود ترکیبات و آنزیم

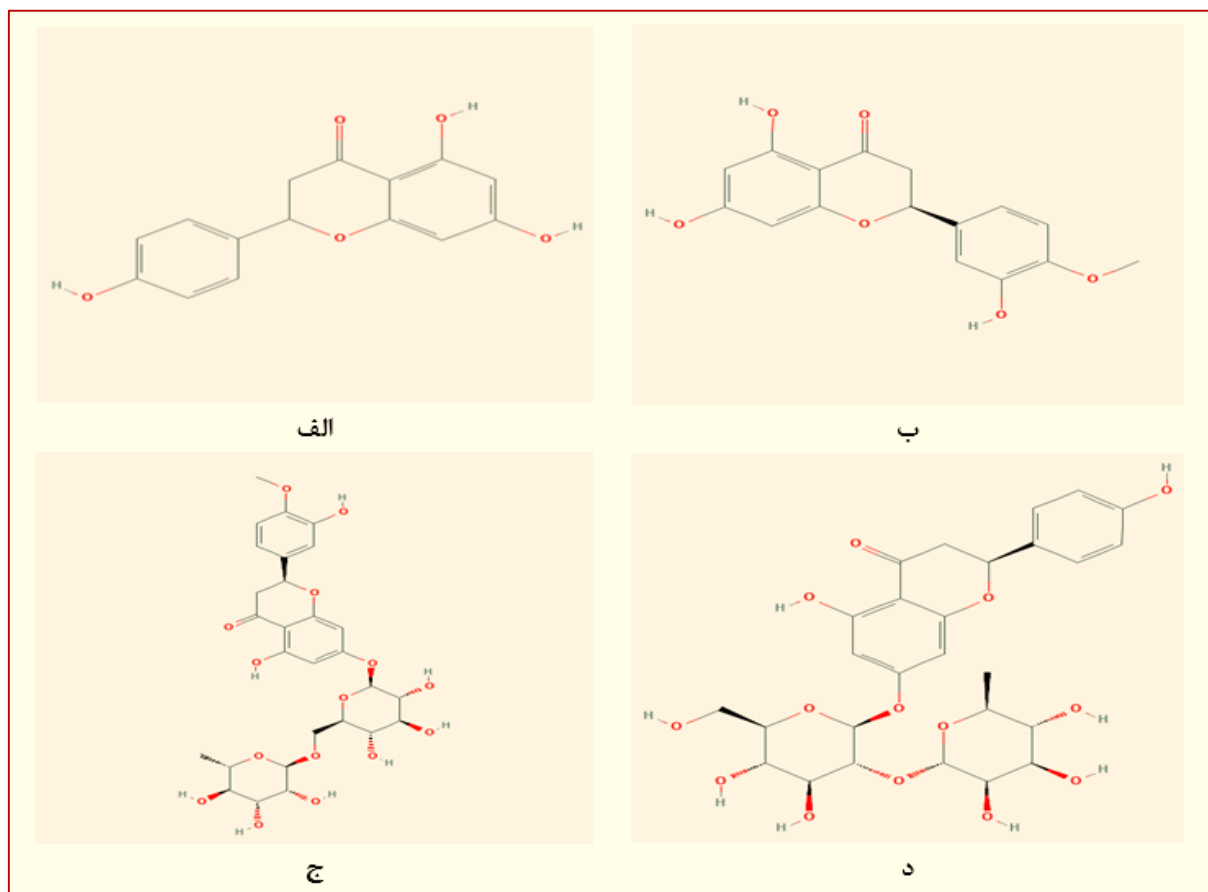
این پژوهش به‌صورت توصیفی-تحلیلی صورت گرفت. ابتدا ترکیبات مهم فلاوانونی (شامل Naringenin, Hesperetin, Hesperidin و Naringin) و هم‌چنین ترکیب آکاربوز (مهارکننده استاندارد) به‌صورت SDF از پایگاه داده ترکیبات شیمیایی

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

ترکیبات فلاونوئیدی به‌وفور در بعضی میوه‌ها و گیاهان یافت می‌شوند و برخی از آن‌ها توانایی مهار آلفاآمیلاز را نشان داده‌اند. بسیاری از فلاونوئیدها به‌عنوان رژیم تنظیمی انسان در نظر گرفته می‌شوند. اگرچه آن‌ها جزء فاکتورهای رژیمی غیرضروری می‌باشند اما به‌عنوان ترکیبات طبیعی نقش مهمی در پیشگیری از اختلالات کرونیک دارند (۱۴). فلاونوئیدها به گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند (۱۷-۱۵). یکی از این گروه‌ها، ترکیبات فلاوانون هستند که اصلی‌ترین این ترکیبات شامل Hesperidin, Naringenin, Hesperetin, Naringenin و Hesperidin می‌باشند. Naringenin در بعضی مرکبات (گریپ‌فروت‌ها، پرتقال)، گوجه‌فرنگی و گیاه *Salvia leriifolia* وجود دارد. Hesperetin در میوه‌ها و سبزی‌های مختلف؛ پیاز، کرفس و اسفناج.

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

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



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

فایل‌ها به صورت PDBQT ذخیره شدند. گرید باکس‌ها برای ترکیبات مختلف بسته به اندازه ترکیبات تنظیم شدند (پارامترهای X، Y و Z برای هر ترکیب تعریف شد). پارامتر داکینگ به صورت Genetic algorithm و خروجی Lamarkian GA2 در نظر گرفته شد. در نهایت برای تحلیل اینتراکشن میان آلفاآمیلاز و هر کدام از ترکیبات، از نرم افزار Discovery Studio Visualizer استفاده شد.

#### خواص دارو همانندی ترکیبات

ترکیبات فلاونونی از لحاظ پارامترهای لیپینسکی (دهندگان و پذیرندگان پیوند هیدروژنی، وزن مولکولی، میزان چربی دوستی

#### مراحل داکینگ مولکولی

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

### نتایج

#### بررسی ترکیبات فلاوانونی از لحاظ پارامترهای دارو همانندی و فیزیوشیمیایی

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

و باندهای قابل چرخش) ارزیابی شدند (جدول ۱). برای ویژگی‌های موردبررسی از پایگاه ZINK به آدرس ([zink.docking.org](http://zink.docking.org)) استفاده شد.

#### پارامترهای فیزیوشیمیایی ترکیبات

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

جدول ۱- پارامترهای دارو همانندی ترکیبات فلاوانونی. ترکیب آکاربوز به‌عنوان مهارکننده استاندارد در نظر گرفته شده است.

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

جدول ۲- تعیین پارامترهای فیزیوشیمیایی و سمیت ترکیبات فلاوانونی (آکاربوز به‌عنوان کنترل آورده شده است).

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

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

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

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

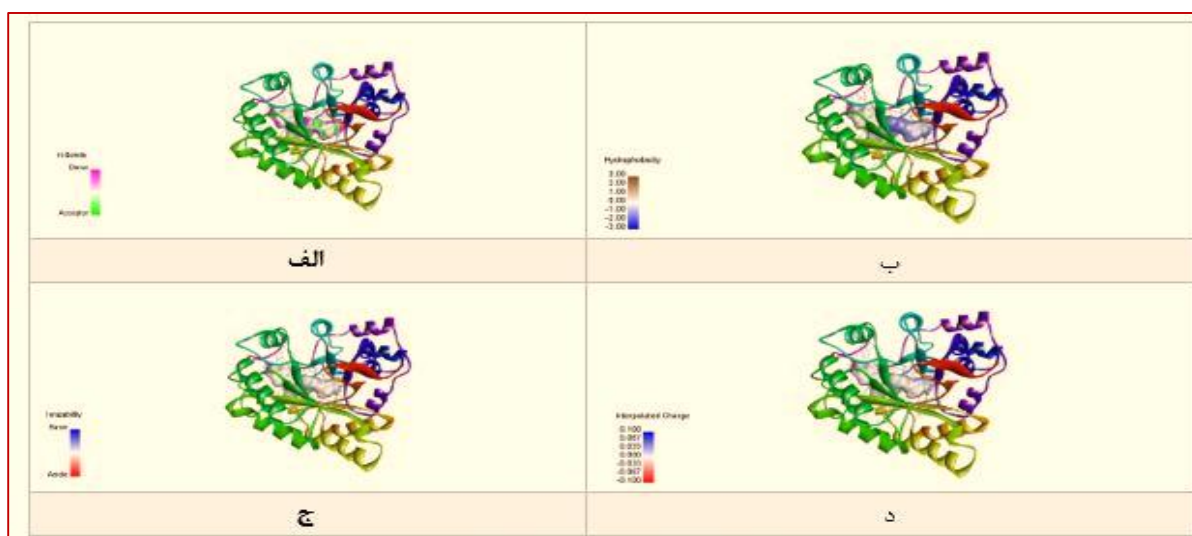
میزان قطبیدگی ترکیبات رابطه مستقیمی با تعداد دهندگان و پذیرندگان پیوند هیدروژنی دارد هر چه این تعداد بیش‌تر باشد به نسبت میزان قطبیدگی نیز بیش‌تر خواهد بود. از میان ترکیبات فلاوانونی، ترکیب Hesperidin بیش‌ترین قطبیدگی را دارد. مشاهده می‌شود که همه ترکیبات فلاوانونی حلالیت خوبی از خود نشان دادند هر چند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

### نتایج حاصل از داکینگ مولکولی

انرژی حاصل از داکینگ میان آنزیم آلفاآمیلاز و ترکیبات فلاوانونی و هم‌چنین آمینواسیدهای درگیر در این میانکنش در

جدول ۳- انرژی حاصل از داکینگ و آمینواسیدهای درگیر در واکنش کمپلکس آنزیم-ترکیب (آکاربوز به‌عنوان کنترل آورده شده است).

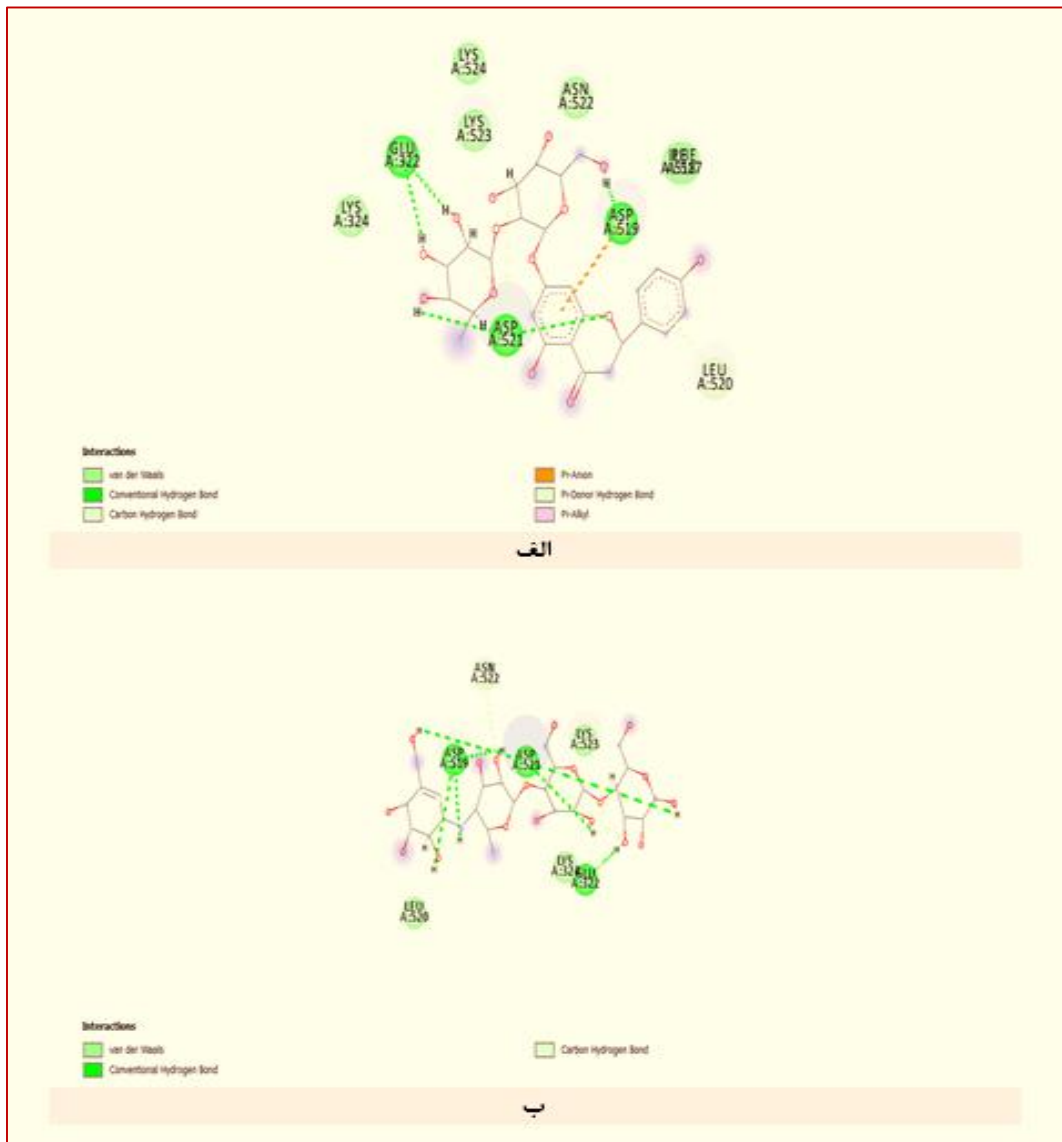
نام ترکیب	انرژی داکینگ (کیلوکالری بر مول)	اسیدهای آمینه درگیر در واکنش
Naringenin	-۴/۹	Glu322-Lys324-Asp519-Asp521-Asn522-Lys523-Lys524
Hesperetin	-۳/۵	Gln225-Lys324-Asp519-Asp521-Asn528
Naringin	-۳/۷	Phe273-Arg281-Asp519-Asp521-Asn522
Hesperidin	-۳/۹	Glu322-Lys324-Asp519-Asp521-
Acarbose (Control)	-۴/۷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



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

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

آمینو درگیر در اینتراکشن، نمایش دوبعدی اینتراکشن کمپلکس آلفا آمیلاز با Naringenin و نمونه کنترل آورده شد (شکل ۳).



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

Naringenin، اتصال قوی تری نسبت به آکاربوز (مهارکننده استاندارد) ایجاد می‌کند و بنابراین تمایل بیش تری برای اتصال به آمینواسیدهای جایگاه فعال آلفا آمیلاز دارد. میزان هم‌پوشانی ترکیب Naringenin با آکاربوز نشان داد که نقاط اتصال مشترکی میان هر دو ترکیب در جایگاه فعال آلفا آمیلاز مشاهده می‌شود. با توجه به پژوهش‌های قبلی نشان داده شده که مهم‌ترین آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم آلفا آمیلاز شامل Glu322- Lys524- Lys523- Asn522- Asp521- Asp519 است و این آمینواسیدها نقش فعالی در برهم‌کنش میان کمپلکس آنزیم و

### بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که همه ترکیبات فلاوانونی توانایی مهار آنزیم آلفا آمیلاز را دارند و میزان این مهار از ۳/۵- تا ۴/۹- کیلوکالری بر مول متغیر است. هر چه میزان امتیاز داکینگ منفی تر باشد، نشان می‌دهد که اتصال قوی تری میان کمپلکس آنزیم و مهارکننده برقرار است و همچنین ترکیب موردنظر با آمینواسیدهای جایگاه فعال اینتراکشن بیش تری داشته‌اند. از میان ترکیبات فلاوانونی انتخاب شده در این پژوهش،



صورت گرفت، مشخص شد که ترکیب Caempferol بانرژی اتصال ۴/۸- کیلوکالری بر مول بیشترین توان مهاری را داشت (۳۶). Wang و همکاران (۲۰۱۴) بامطالعه آنالوگ‌های Curcumin و رابطه ساختار با فعالیت این آنالوگ‌ها به این نتیجه رسیدند که این آنالوگ‌ها در محیط *In silico* اثر مهاری قابل توجهی بر آلفاآمیلاز داشتند (۳۷). Kim و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی اثر مهاری فلاونوئیدها و داکینگ مولکولی آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ترکیباتی که با آمینواسیدهای Asp519- Asp521-Asn522-Lys523-Lys524 اینتراکشن بیش‌تری دارند، اثر مهاری بیش‌تری از خود نشان دادند (۳۸). از این‌رو در این پژوهش نیز ترکیب Naringenin به خاطر اینتراکشن با آمینواسیدهای مذکور که در جایگاه فعال آنزیم حضور دارند، اثر مهاری و توانایی اتصال بیش‌تری نسبت به سایر ترکیبات فلاوانونی از خود نشان داد.

### نتیجه‌گیری

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

### تشکر و قدردانی

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

### تعارض منافع

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

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

تحقیقات گسترده‌ای نشان داده است که بعضی ترکیبات طبیعی (گیاهان و سایر میکروارگانیسم‌ها) موجب مهار آنزیم آلفاآمیلاز در محیط‌های *In vitro*، *In vivo* و *In silico* می‌شوند (۳۲، ۳۳). Jhong و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی داکینگ مولکولی تعدادی از ترکیبات طبیعی در محیط *In silico* نشان دادند که از میان این ترکیبات فنولی، ترکیب‌های لوتئولین و کوئرستین با امتیاز داکینگ به ترتیب ۴/۶-، ۴/۳- کیلوکالری بر مول توانایی مهار آلفاآمیلاز را داشتند (۳۱). در مطالعه دیگری، Yang و همکاران در ۲۰۱۲ با شناسایی ترکیبات فنولیک از گیاه *Bidens bipinnata* و اثر مهاری این ترکیبات بر آنزیم آلفاآمیلاز به روش بیوانفورماتیکی نشان دادند که از میان ترکیبات فنولیک، ترکیب ایزوکانین بانرژی داکینگ ۳/۶- کیلوکالری بر مول بیش‌ترین اثر مهاری را دارا بود (۳۴). Nair و همکاران (۲۰۱۳) با انتخاب ترکیبات فلاونوئیدی در محیط *In vitro* اثبات کردند که این ترکیبات با  $IC_{50}$ های متفاوت توانستند اثر مهاری قابل توجهی بر آلفاآمیلاز داشته باشند (۳۵). تحقیقی که توسط Tadera و همکاران (۲۰۰۶) بر روی اثر مهاری فلاونوئیدها بر آلفاآمیلاز



## References

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



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

## Original Article

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

Sadeghi M<sup>1</sup>, Miroliaei M<sup>2\*</sup>, Shorakai Z<sup>3</sup>

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

Received: 28 Aug 2020

Accepted: 09 Nov 2020

### **Abstract**

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

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

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

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

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

\*Corresponding Author: Miroliaei M, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Email: mmiroliaei@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0003-0916-3757>