پنجمین همایش ملی توسعه علوم فناوریهای نوین در گیاهان دارویی، شیمی و زیست شناسی ایران
5th National Conference on Modern Research in Medicinal plants, chemistry and biology of Iran
www.dpconf.ir

عنوان مقاله : بررسی بیوانفورماتیکی اثر ترکیبات نیاسین، تیروزین، ویتامینB6، اسید پانتوتنیک و اسید اولئیک در مهار آنزیم آلانین آمینوتراسفراز

نام نویسنده : محدثه گزلی زاده

فارغ التحصیل کارشناسی زیست شناسی سلولی و مولکولی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز

Email: avysa.24@gmail.com

چکیده:

سیروز کبدی (Liver cirrhosis) یا التهاب شدید کبد، نوعی بیماری است و در واقع بافت سالم کبد دچار آسیب و تخریب شدید میشود.مصرف برخی داروها،انسداد طولانی مدت مجاری صفراوی،مصرف الکل،هپاتیت ب و... از عوامل متعدد بروز این بیماری است. این مطالعه قصد دارد با هدف بررسی بیوانفورماتیکی اثر ترکیبات نیاسین،پرولین،ویتامین ب6،اسید پانتوتنیک و اسید اولئیک در مهار آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) بپردازد. روش ها: در این مطالعه برای بررسی نحوه ی اتصال ترکیبات به جایگاه فعال آنزیم ،ترسیم ساختار شیمیایی ترکیبات،بهینه سازی انرژی،مطالعات داکینگ و تجزیه و تحلیل های نهایی به ترتیب از سروز آنلاین Hdock و نرم افزارهای : Hyperchem؛ Discovery،Chimera و سرور Pdb sum generate استفاده شده است. یافته ها: ترکیبات مورد مطالعه قادر به اشغال جایگاه فعال آنزیم میباشند و سطح انرژی اتصال در نیاسین 89.46-، در تیروزین 128.19-، در ویتامین B6 134.35-، در اسید پانتوتنیک 123.56- و در اسید اولئیک 115.22- میباشند.
نتیجه گیری: با توجه به اثر بخشی ترکیبات در مطالعه ی بیوانفورماتیکی، برای بررسی های تکمیلی میتوان اثر این ترکیب را در شرایط In vitro و In vivo مورد آنالیز قرار داد.

کلمات کلیدی : آلانین آمینو ترانسفراز، داکینگ مولکولی، سیروز کبدی، نیاسین، تیروزین و...

1.مقدمه:

سیروز کبدی در واقع مرحله پایانی و غیرقابل برگشت تعدادی از بیماری های مزمن کبدی است که غالبا بدون هر گونه علائم مشهود در بیمار فعال شده، سپس با گسترش پروسه فیبروز کبدی موجب نارسایی شدید عملکرد کبدی میشود و در صورت عدم پیشگیری، به مرگ بیمار می انجامد. در بیماری های مزمن کبدی مبتلایان علائمی را مانند درد در اطراف کبد،تهوع، بی اشتهایی،خستگی،زردی پوست و ادرار پررنگ را مشاهده میکنند. نوع و پیشرفت بیماری را میتوان با آزمایش خون و بیوپسی کبد

تشخیص داد . [1,2] آگاهی و درمان بیماران مبتلا به بیماری های مزمن کبدی که نهایتاً منجر به سیروز میشوند متفاوت است و در مرحله پیشرفته آن ، پیوند کبد مدنظر قرار میگیرد که دارای شرایط سخت و هزینه های بسیار زیادی است .[2] نیاسین یکی از ویتامین های گروه ب است.این ویتامین در تنفس سلولی و در ازاد کردن انرژی از کربوهیدرتها،چربی ها، و پروتئین ها دخالت دارد. گلیکوژن ماده کربوهیدراتی ذخیره ای موجود در کبد و عضلات است که نیاسین در سنتز ان نقش دارد.[3] نیاسین به عنوان یکی از راه های درمان کلسترول بالای خون استفاده میشود.[3,4] نیاسین نقش چربی سوزی دارد و باعث متابولیسم چربی میشود با این حال مقدار بالای نیاسین باعث چرب شدن کبد میشود و از طریق کبدی (انزیم درگیر در سنتز چربی) باعث مهار DGAT2 و باعث کاهش تجمع چربی در کبد میشود و استئوز کبدی جلوگیری میکند ، لذا درمان با نیاسین باعث از بین بردن واکوئل ها و در نتیجه بازسازی سلول های کبدی میشود. [5] تیروزین یکی از بیست و دو اسید آمینهٔ اصلی یاخته های زنده است. این اسید آمینه حاصل اثر آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز بر روی اسید آمینه فنیل آلانین است.[6,7] ویتامینB6 ویتامین‌های محلول در آب بوده و به حرارت و اسید مقاوم است، البته اکسیداسیون، قلیا و نور فرابنفش به ویتامین B6 آسیب می‌رساند. کمبود ثانوبه ویتامین B6ممکن است در اثر سوء جذب اورمی، سرطان، نارسایی قلبی و سیروز ایجاد گردد.[8] اسید پانتوتِنیک یکی از ویتامین‌های گروه ب است. این ویتامین محلول در آب است .اسید پانتوتنیک برای متابولیسم کربوهیدراتها ، چربی‌ها و پروتئین‌ها ضروری است و در سنتز هورمون‌ها نقش دارد. به علاوه، این ویتامین موجب رشد و مقاومت پوست و غشاهای مخاطی میشود.[9] اسید اولئیک یک اسید چرب اشباع شده است که به طور طبیعی در بسیاری از منابع گیاهی و محصولات حیوانی یافت می شود. این ماده اسید چرب امگا 9 است و به عنوان یکی از منابع سالم چربی در رژیم غذایی به شمار می آید. اسید اولئیک غالبا قسمتی از درمان‌های هومیوپاتی برای کاهش کلسترول می‌باشد.[10] آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز: اولین گام در تشخیص آسیب کبدی ، انجام آزمایش ساده خون و استفاده از چندین آزمون بیوشیمیایی میباشد. مهم ترین این آنزیم ها میزان فعالیت آنزیم آمینوترانسفراز میباشد.ALT آنزیمی است برای تشخیص آسیب کبدی.در افراد سالم سطح الانین امینو ترانسفراز در خون پایین است. زمانی که کبد آسیب دیده است، معمولاً قبل از آن که علائم بارزتر آسیب کبدی مانند زردی رخ دهد. الانین امینو ترانسفراز داخل جریان خون آزاد می شود. میزان طبیعی آن به ترتیب برای زن ها و مردها 9 تا 25 واحد بر لیتر و 10 تا 40 واحد بر لیتر می باشد. لازم به ذکر است آلانین آمینوترانسفراز در کبد، کلیه و به مقدار کمتر در قلب و عضله وجود دارد.[11]

2. روش ها :

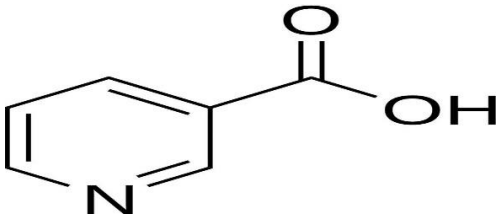
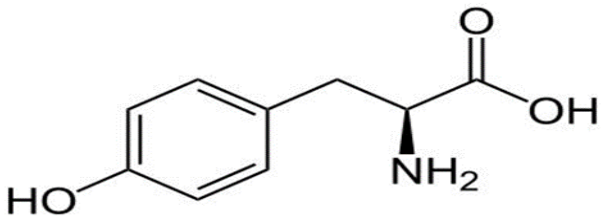
در این تحقیق از سرور H Dock برای انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. بدین منظور فایل لیگاند و پروتئین در سایت آپلود و نتیجه ی داکینگ مشاهده شد . در این پژوهش، ترکیباتی باخاصیت دارویی مورد بررسی قرار گرفت . ساختار ترکیبات مورد نظر از سایت http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov بدست آمد . نام و جزئیات ساختاری ترکیبات مورد مطالعه در جدول 1 آورده شده است.

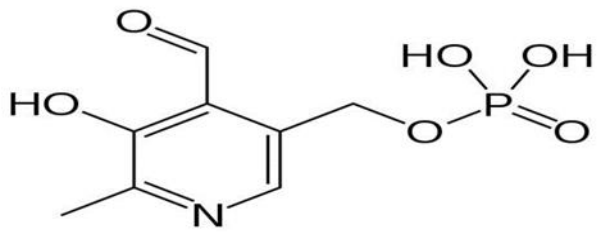
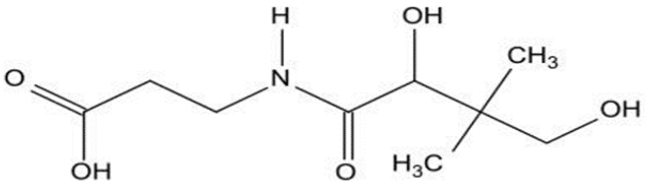
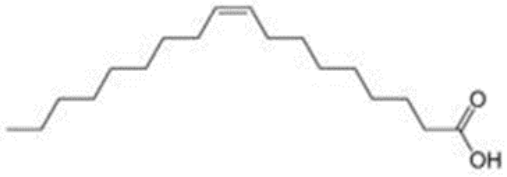
ساختار کریستالی مناسب آنزیم حاوی بخش کاتالیتیکی مرکزی از سایت https://www.rcsb.org/pdb انتخاب و دانلود شد . کد آنزیم در این سایت aib3 با وضوح 6/1 آنگستروم است . آماده کردن لیگاند و پروتئین گلوکان سوکراز برای داکینگ : ساختار دوبعدی

لیگاندهای مورد نظر توسط برنامه ی Hyperchem ترسیم شد و سپس توسط همین نرم افزار از نظر انرژی بهینه شد . در مرحله ی بعد ساختارهای اضافی آنزیم شامل آبها و بخش های غیر پروتئینی با استفاده از نرم افزار Discovery حذف شد و بعد از آن ، توسط برنامه ی Chimera کاملا بهینه و آماده ی داکینگ مولکولی شد . فایل پروتئین و فایل لیگاند مورد مطالعه در سرور H Dock بارگذاری و سابمیت شد . در مرحله ی بعد ، ۱۰ تا مدل برتر داکینگ مولکولی دانلود و مدلی که انرژی اتصال منفی تر داشت کاملا بررسی شد.

مشاهده و آنالیز نتایج داکینگ : پس از انجام عملیات داکینگ ، نتایج شامل Most favoured regions و Disallowed regions ، انرژی اتصال لیگاندها ، انواع برهمکنش های لیگاند با پروتئین شامل برهمکنش های هیدروژنی ، برهمکنش های هیدروفوبی ، انواع برهمکنش های عدد پی ، برهمکنش با یونهای مس موجود در جایگاه فعال آنزیم و سایر موارد قابل مشاهده و تجزیه و تحلیل هستند . به منظور دستیابی به اطلاعات مذکور ، از نرم افزار Discovery و دو سرور HDOCK , Pdb Sum Generate استفاده شد.

جدول1- نام و جزئیات ساختاری ترکیبات مورد مطالعه :

نیاسین pyridine-3-carboxylic acid	
تیروزین (S)-Tyrosine	

	ویتامین B6 Vitamin B6
	اسید پانتوتنیک Dihydroxy-33-‐24)-3 dimethylbutanamido)propanoic acid
	اسید اولئیک (9Z)-Octadec-9-enoic acid

3. یافته ها :

در تصاویر زیر نتایج بررسی نرم افزار Discovery studio پس از عملیات داکینگ نشان داده شده است.

تصویر 1 نیاسین را نشان میدهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای لیزین LYS 237،اسید آسپارتیک ASP 205 و تیروزین TYR 208 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت میکند و سطح انرژی اتصال 89.46- میباشد.

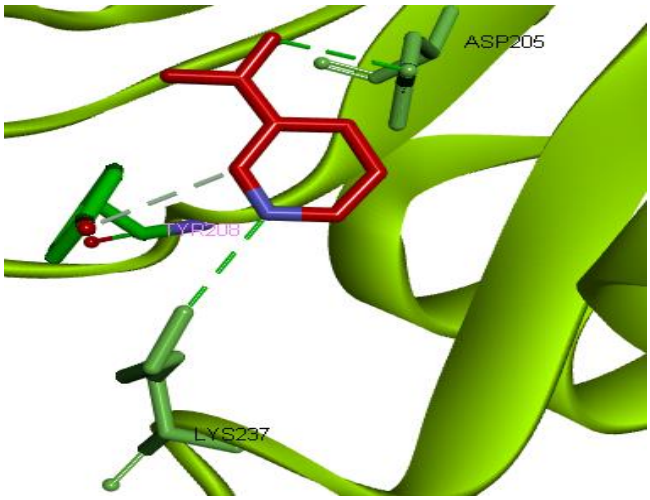
تصویر2 تیروزین را نشان میدهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای ترئونین10 TH3R ،تیروزین TYR 208 ، TYR 127 و آرژنین ARG 245 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت میکند و سطح انرژی اتصال 128.19- می باشد.

تصویر 3 ویتامینB6 را نشان میدهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینواسیدهای والین VAL 102 ،ترئونین THR 103، سرین SER 236، آرژنین ARG 245، اسید آسپارتیک ASP 205 و تیروزین TYR 127 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت میکند و سطح انرژی اتصال134.35 - میباشد.

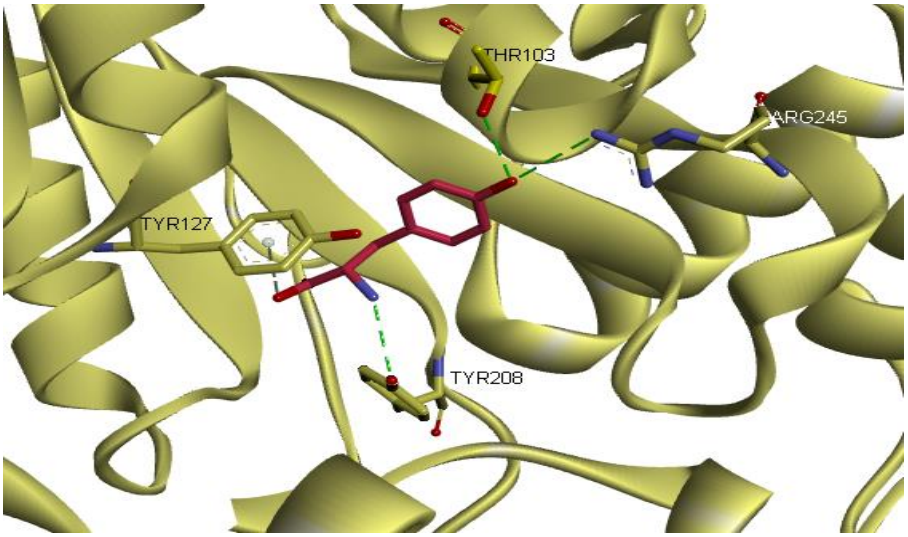
تصویر4 اسید پانتوتنیک را نشان میدهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای والین VAL 102،ترئونین THR 103،لیزین LYS 237، تیروزین TYR 328 و تیروزین TYR 127 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت میکند و سطح انرژی اتصال 123.56 –میباشد.

تصویر 5 اسید اولئیک را نشان میدهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسید آسپارتیک ASP 205 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت میکند و سطح انرژی اتصال 115.22 – میباشد

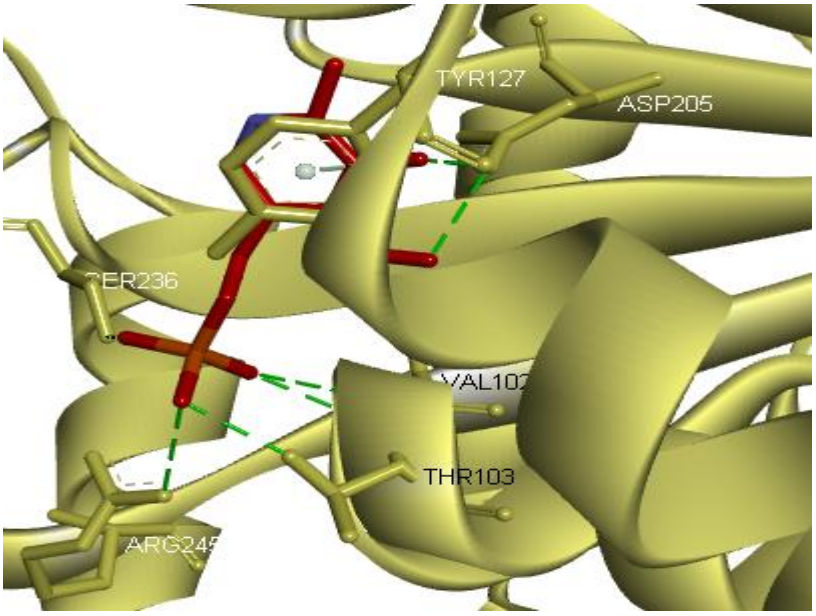
تصویر 6 نشان دهنده ی کوکریستال است که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینواسیدهای آرژنین ARG 245، والین VAL 102، ترئونین THR 103، آسپاراژین ASN 177 ،تیروزین TYR 208، سرین SER 236 و تیروزین TYR 127 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت میکند.



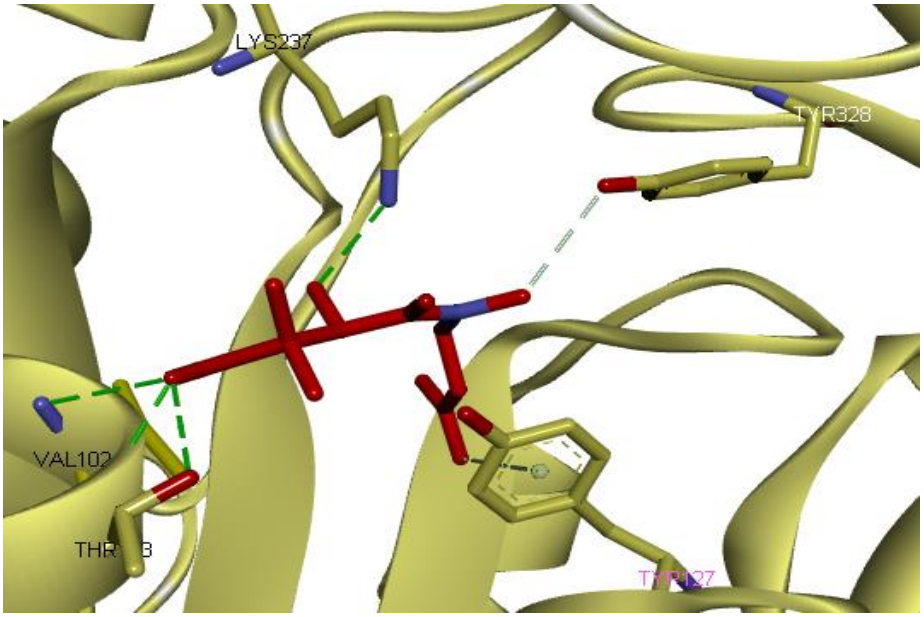
تصویر1: ترکیب نیاسین در جایگاه فعال آنزیم



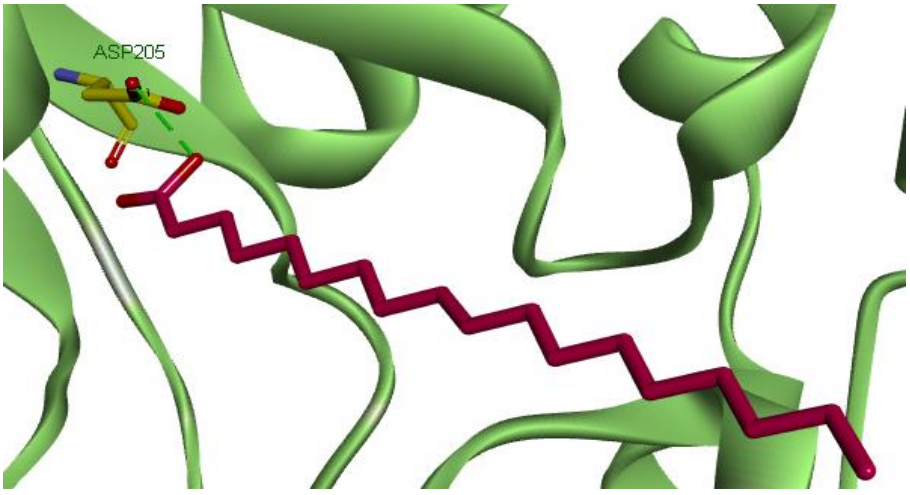
تصویر2: ترکیب تیروزین در جایگاه فعال آنزیم



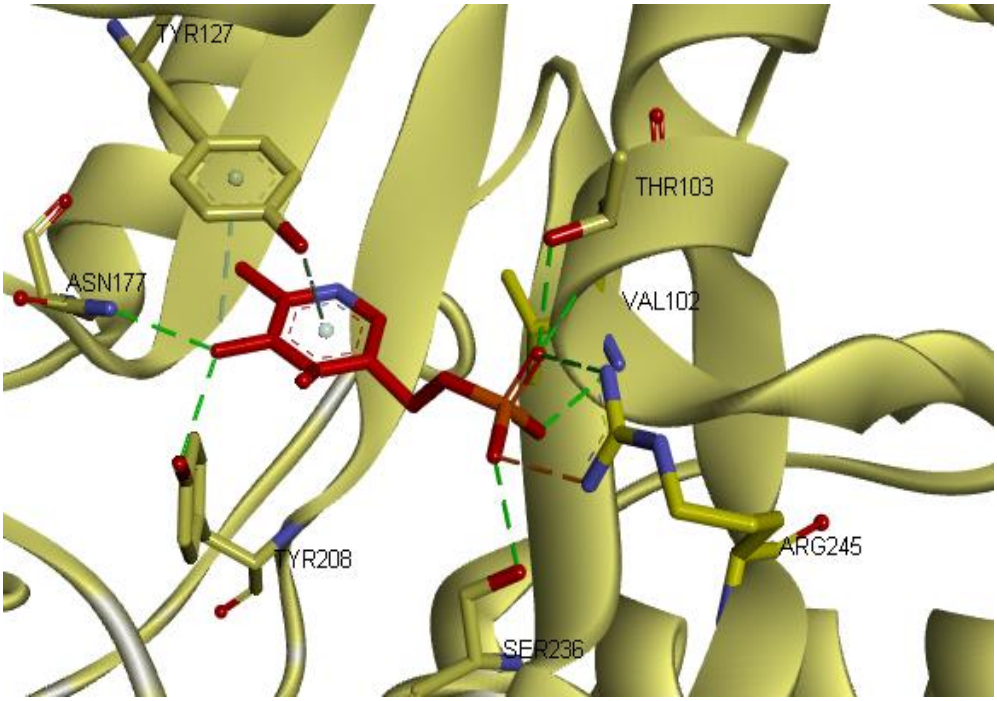
تصویر3: ترکیب ویتامینB6 در جایگاه فعال آنزیم



تصویر 4: ترکیب اسید پانتوتنیک در جایگاه فعال آنزیم



تصویر5: ترکیب اسید اولئیک در جایگاه فعال آنزیم



تصویر6 : ترکیب کوکریستال در جایگاه فعال آنزیم

4. بحث و نتیجه گیری :

نتایج حاصل از داکینگ نشان میدهد که ترکیبات نیاسین، تیروزین، اسید پانتوتنیک، ویتامین B6 و اسید اولئیک میتوانند به جایگاه فعال آنریم آلانین آمینو ترانسفراز متصل و موجب مهار این آنزیم شود. نیاسین دارای 3 پیوند هیدروژنی با آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در جایگاه فعال آنزیم است. تیروزین هم دارای 4 پیوند هیدروژنی با آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز میباشد. اسید پانتوتنیک دارای 5 پیوند هیدروژنی با آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز است. ویتامین B6 هم دارای 6 پیوند با انزیم ALT است و بسیار ترکیب خوبی می باشد. و همینطور اسید اولئیک دارای یک پیوند هیدروژنی با آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز است.در مطالعه ای که Dimpele Motriramani و همکارش در سال 2021 به منظور درمان PCOS و سرطان رحم انجام دادند، ترکیب 4-(3-(5-chloro-3,3-dimethyl-8-(morpholin-4-yl)-1H,3H,4H-pyrano(3,4-c)pyridine-6-yl)-2H-1,2,3,4-tetrazol-4-ium با آمینواسیدهای LYS237 ، ARG371 ، TYR127 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است که در مطالعه ی ما اسیدپانتوتنیک هم با آمینواسیدهای LYS237 ، TYR127 اینترکشن داشته است .

ترکیب دیگر آنها (3Z)-5-chloro-6-(furan-3-yl)-3-[(furan-3-yl)methylidene]-1H,3H,4H-pyrano[3,4-c]pyridine با آمینواسیدهای LYS237، PLP501، ARG245، THR103، PRO129، LEU133 درجایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است که در بین ترکیبات ما تیروزین با 4 آمینواسید پیوند هیدروژنی برقرار کرده است که از بین آنها با آمینواسیدهای THR103و ARG245 مشترک است. به علاوه ترکیب اسید پانتوتیک همانطور که گفته شد با 5 آمینواسید اینترکشن داشته و آمینواسیدهای مشترک با ترکیب آنها فقط LYS237 و THR103 میباشد.

ترکیب دیگر آنها (8E)-2,3-dimethyl-6-(2-phenylethyl)-8-[thiophen-2-yl)methylidiene]-4-(thiophen-3-yl)-4H,5H,6H,7H,8H-pyrano[3,2-c]pyridine با آمینو اسیدهای ARG245، THR103، TYR13، PRO129 و LEU133 اینترکشن داشته است که از بین ترکیبات ما ، ترکیبی که با چنین آمینو اسیدهایی پیوند هیدروژنی برقرار کنند مشاهده نشد، به استثنای ترکیب تیروزین که از 4 آمینو اسید ، فقط در آمینواسیدهای ARG245 و THR103 با ترکیب گفته شده مشترک است و با سایر آمینواسیدهای نامبرده در ترکیب آنها هیچ پیوند هیدروژنی برقرار نشده است. [12]

در مطالعه ی دیگری که از Reshma Tendulkar و همکارش در سال 2021 برای درمان بیماری دیابت انجام دادند، ترکیب 5,7-dichloroquinazoline با آمینواسیدهای LTY168، ASP118 و LYS140 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است، در صورتیکه هیچکدام از ترکیبات ما با این آمینو اسیدها اینترکشنی نداشته اند.

ترکیب دیگر آنها یعنی 5,7-dibenzylquinazoline که با آمینواسیدهای ARG245، PLP501، VAL102، THR103، TYR208 ، TYR127، ILE207 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است و از بین ترکیبات ما، ویتامین B6 با آمینواسیدهای نامبرده بجز آمینواسیدهای PLP501، ILE207، TYR208 اینترکشن داشته است.

ترکیب دیگر آنها یعنی 5-dibutylquinazoline با آمینواسیدهای ARG3، LYS140، LYS168 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است ، در صورتیکه هیچکدام از ترکیبات مورد مطالعه ی ما با این آمینواسیدها اینترکشنی نداشته اند.

ترکیب دیگر آنها یعنی 5-(propan-2-yl)quinazoline که با آمینواسیدهای ARG245، PLP501 ، VAL102، THR103، ILE207 ، TYR127 و TYR208در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است و از بین ترکیبات ما ، ویتامین B6 با 6 آمینواسید اینترکشن داشته است که از بین آنها، آمینواسیدهای ARG245، VAL102، THR103 و TYR127 مشترک است.[13]

5. مراجع:

1 – سید موید علویان، شهناز سالی _ مروری بر هپاتیت C و نحوه ی برخورد با آن ، مجله علمی نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران. دوره 18 ، شماره 1 ، سال 1379

2- سید موید علویان، رضا ملکزاده _ گزارش مرکز تحقیقات گوارش و کبد تهران، انتشارات مرکز تحقیقات گوارش و کبد . 1371

3- حسین خارا، رعنا حق پرست، مسعود فرخ روز _ مقاله تاثیر ویتامین نیاسین بر برخی شاخص های خون شناسی بچه ماهی استرالیا پرورشی ، دانشگاه گیلان ، نشریه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان . تابستان 1394 ، دوره 3 ، شماره2 ، صفحه 1تا14

4- Poston H.A. and Wolfe M.J. 1985.*Niacin requirement for optimum growth, feed conversion and protection of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, from Ultraviolet-B irradiation. Journal of Fish Diseases, 8(5): 451–460.*

5- حمید محمدی آذرم ، خیری محمدی ، و دوستان _مقاله اثر سطوح مختلف نیاسین در جیره بر بافت شناسی کبد، روده و فعالیت برخی آنزیم های کبدی ماهی کپور معمولی . شیلات ، مجله منابع طبیعی ایران ، دوره 5961 ، شماره 2، تابستان 96 ، صفحات 211-291

6- Yudong L. Diazotization-coupling reaction-based determination of tyrosine in urine Using Ag nanocubes by surface-enhanced Raman spectroscopy:Nanomaterials 2018; 8(6): 400.

7- Lichter-Konecki U , Jerry V. Phenylketonuria: current treatments and future developments.

Drugs 2019; 79(5): 495-500.

8- کتاب بیوشیمی لنیجر

9- "pantothenic acid (CHEBI:7916)". Chemical Entities of Biological Interest. UK: European Bioinformatics Institute. 16 November 2011. Main. Retrieved 3 July 2012.

10- info@pkrad.com

11- صلاحی،م _تفسیر بالینی تست های آزمایشگاهی،چاپ اول، انتشارات نور دانش (1381)

12- Structure-Based Drug Design and AutoDock study of Potential Protein Alanine Aminotransferase in The Treatment of PCOS and Uterine Center : Dimpele Motiramani, Reshma Tendulkar ; 2021.

13- Structure-Based Drug Design and Development for Potential Anti-Diabetic Activity : Reshma Tendulkar, Rubana Arkate , Shifaa Bora ;2021.