

بررسی اثر مهارکنندگی ترکیبات شیمیایی پیشنهادی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی بعنوان دارویی بالقوه جهت درمان و کنترل دیابت

محمد رضا ملک^۱، پریچهره یغمایی^۱، باقر لاریجانی^۲، آزاده ابراهیم حبیبی^{۲*}

چکیده

مقدمه: یکی از مسائل مهم در فرآیند درمان و کنترل دیابت کاهش هایپرگلیسمی بعد از مصرف مواد قندی می باشد که از طریق مهار آنزیم هایی مانند آلفا آمیلاز امکان پذیر است. با توجه به نقش احتمالی باکتری های فلور نرمال در متابولیسم بدن انسان، آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی نیز می تواند از این منظر مورد توجه باشد.

روش ها: در این تحقیق با استفاده از برنامه های Clustal W2 و Blast میزان تشابه و همانندی بین توالی های آمینو اسیدی آلفا آمیلازهای ۸ باکتری فلور نرمال حفره دهان بررسی شد. سپس با استفاده از برنامه Autodock vina محل جای گیری ۵ ترکیب پیشنهادی به عنوان مهارکننده شامل آکاربوز، کنگو رد، بی کولین، هسپریدین متیل چالکون و جیبرلیک اسید در ساختار آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* به عنوان مدل آنزیم باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. در بخش آزمایشگاهی اثر ترکیبات مذکور بر فعالیت آلفا آمیلاز باکتریایی با روش برنفلد سنجیده شد.

یافته ها: در بررسی تطابق توالی های آمینواسیدی آلفا آمیلازهای باکتری های فلور نرمال با آنزیم *Bacillus amyloliquefaciens* تشابه ای با میانگین ۶۴٪ و همانندی با میانگین ۴۶٪ مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از مقایسه محل اتصال یون های فلزی و رزیدوهای کاتالیتیک جایگاه فعال نشان دهنده تشابه فراوان ساختار آلفا آمیلازهای باکتریایی است. نتایج حاصل از جای گیری ترکیبات پیشنهادی به عنوان مهارکننده در ساختار آنزیم باکتریایی تمایل به برهم کنش میان آنها با آنزیم باکتریایی را نشان می دهد. در بخش سنجش های آزمایشگاهی نیز ترکیبات مذکور تا غلظت ۲۰ میکرو مولار اثری کاهش بر فعالیت آنزیم داشتند.

نتیجه گیری: در بخش تجزیه و تحلیل آماری تطابق توالی ها تشابه معنی داری بین ترادف توالی ها وجود دارد که نشان دهنده تشابه فراوان بین ساختار آلفا آمیلازهای باکتریایی است. در بخش آزمایشگاهی با توجه به غلظت پایین ترکیبات مورد سنجش احتمال دارد این مواد در غلظت های بالاتر اثر مهارتی مطلوب تری داشته باشند.

واژگان کلیدی: آلفا آمیلاز، فلور نرمال، مهار کننده

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: aehabibi@sina.tums.ac.ir

مقدمه

میزان شیوع دیابت به عنوان یک بیماری مزمن متابولیکی که به علت کمبود هورمون انسولین و یا اختلال در پاسخ ارگانلها به انسولین بروز می‌کند، طی دهه‌های اخیر رشد روز افزونی داشته است [۱]. از طرفی شیوع چاقی و اضافه وزن نیز به عنوان عاملی خطرناک که می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های مختلفی از جمله دیابت گردد روز به روز در حال افزایش است [۲]. لذا یافتن روش‌هایی مفید و مؤثر که علاوه بر کنترل میزان چربی و قند خون و کاهش آنها دارای کمترین عوارض جانبی نیز باشند، حائز اهمیت فراوانی است. یکی از رویکردهای درمان و کنترل بیماری دیابت که امروزه مورد توجه دانشمندان می‌باشد کاهش هیپرگلیسمی بعد از مصرف ترکیبات قندی است [۳]. این روش از طریق مهار آنزیم‌های موثر در هضم کربوهیدرات‌ها از جمله آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز میسر است [۴،۵]. آنزیم آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1) که از گروه هیدرولازها محسوب می‌شود، در بسیاری از انواع موجودات از جمله انسان و باکتری‌ها وجود دارد [۶]. در انسان دو ایزوآنزیم عمده آلفا آمیلاز مربوط به پانکراس و غدد بزاقی می‌باشد [۷،۸]. عمل آلفا آمیلاز هیدرولیز نشاسته از محل پیوندهای $\alpha(1-4)$ و تبدیل آن به مالتوز و گلوکز است که در نهایت می‌تواند موجب افزایش سطح گلوکز خون شود [۹]. بنابراین مهارکننده‌های آلفا آمیلاز می‌توانند از جذب کربوهیدرات‌های پیچیده در داخل بدن جلوگیری کرده و در کنترل قند خون مؤثر باشند [۱۰]. مطالعات فراوانی وجود این مهارکننده‌ها را در ترکیبات شیمیایی مختلف و به خصوص در گیاهان دارویی به اثبات رسانده است [۱۱]. به طور متداول آلفا آمیلاز انسان به عنوان هدف نهایی این مهارکننده‌ها مطرح می‌باشد ولی با توجه به وجود باکتری‌های فلور نرمال که در بدن انسان به صورت همزیستی زندگی می‌کنند و از استقرار باکتری‌های بیماری‌زا در بدن جلوگیری می‌نمایند و همچنین شواهدی احتمال دخالت آنها را در متابولیسم بدن نشان می‌دهد، لذا آلفا آمیلاز باکتریایی نیز می‌تواند از این منظر مورد توجه قرار گیرد [۱۲،۱۳]. در بین گونه‌های مختلف باکتریایی بیشترین مطالعات بر روی آلفا آمیلاز سویه‌های مختلف جنس باسیلوس انجام شده است که از آن جمله می‌توان به

Bacillus licheniformis، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Bacillus stearothermophilus* و *Bacillus halmapalus* اشاره کرد [۱۴-۱۶]. در این تحقیق با توجه به نتایج حاصل از تطابق توالی‌های آمینواسیدی آلفا آمیلازهای باکتریایی و همچنین بررسی و مقایسه محل اتصال یون‌های فلزی (کلسیم و سدیم) و رزیدوهای کاتالیتیک جایگاه فعال شباهت بسیار زیادی بین ساختار آنزیم آلفا آمیلاز باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان باسویه‌ای از جنس باسیلوس مشاهده شد. در نهایت جهت بررسی اثر ترکیبات شیمیایی پیشنهادی به عنوان مهارکننده آنزیم باکتریایی از آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* استفاده گردید.

روش‌ها

بررسی میزان تشابه و همانندی بین توالی آنزیم‌های آلفا آمیلاز باکتریایی

ابتدا تعدادی از شاخص‌ترین باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان با بررسی مقالات شناسایی شدند [۱۷]. سپس در سایت NCBI^۱ توالی آمینو اسیدی آنزیم‌های آلفا آمیلاز باکتری‌های مذکور مورد جستجو قرار گرفت. جهت بررسی میزان تشابه و همانندی بین این توالی‌ها از برنامه Clustal W2 و جهت بررسی میزان تشابه و همانندی بین توالی‌های آلفا آمیلاز فلور نرمال حفره دهان با باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* از برنامه Blast^۲ استفاده گردید [۱۸].

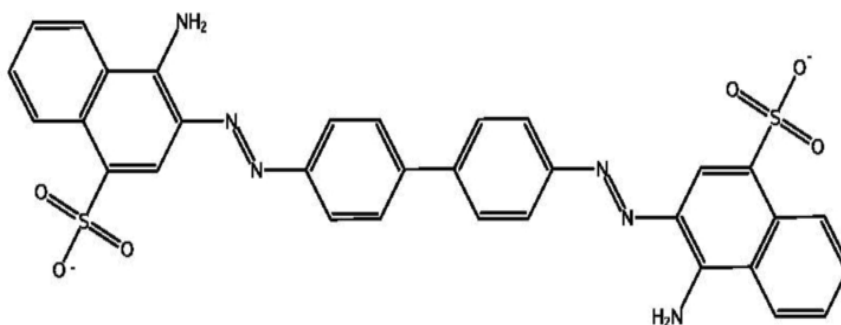
بررسی برهم‌کنش‌های بین ترکیبات شیمیایی پیشنهادی به عنوان مهارکننده با آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی

در این تحقیق اثر مهارکنندگی پنج ترکیب آکاربوز^۳، کنگو رد^۴، بی کوکولین^۵، هسپریدین متیل چالکون‌های^۶ و جیبرلیک اسید^۷ بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی بررسی

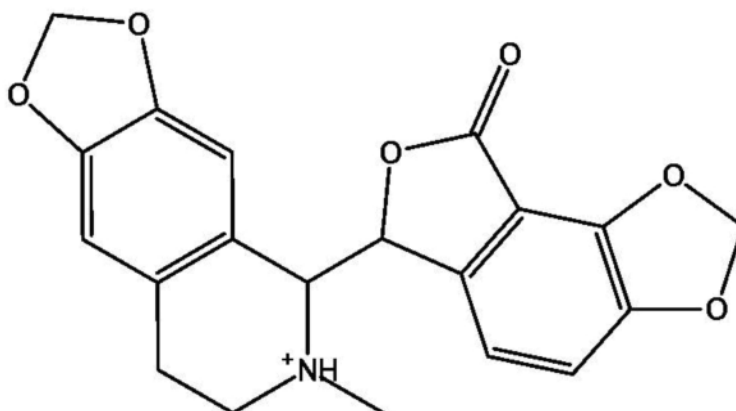
1- National center for Biotechnology information
2- Basic Local Alignment search Tool
3-Acarbose
4-Congo red
5-Bicuculline
6-Hesperidin Methyl Chalcone
7-Gibberellic acid

بود، انتخاب گردید. تصویر مربوط به این برهم کنش‌ها با استفاده از نرم‌افزار MOE.2010.10 (شرکت CCG کانادا) ترسیم شده است. در نهایت با توجه به پارامترهایی مانند اندازه مولکولی، میزان میل ترکیبی، وجود گروه‌های آمینی و نوع آمینو اسیدهای شرکت کننده، ترکیبات پیشنهادی جهت سنجش‌های آزمایشگاهی مرتب شدند. از سایت Chemspider (www.chemspider.com) جهت بررسی ساختار شیمیایی ترکیبات استفاده شد (اشکال ۱ تا ۵).

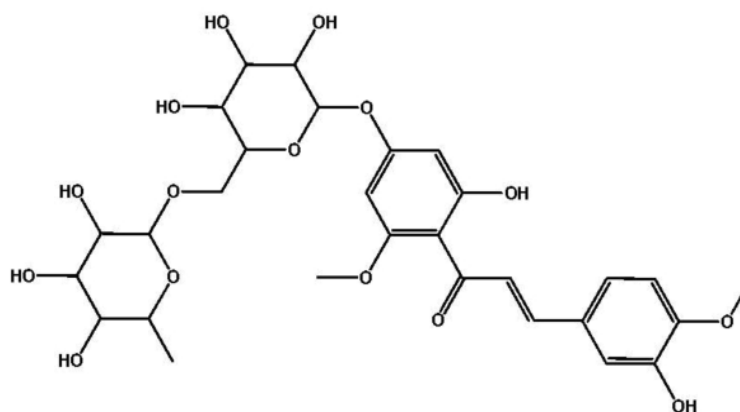
شد. آکاربوز با توجه به پیشینه آن در مهار آلفا آمیلاز انسان به عنوان ترکیب مرجع انتخاب گردید [۱۹]. جهت بررسی برهم کنش بین لیگاند و رسپتور از برنامه Autodock vina استفاده شد [۲۰]. بدین منظور از ترکیبات شیمیایی پیشنهادی به عنوان لیگاند و از آنزیم آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* به عنوان رسپتور استفاده گردید. کلیه برهم کنش‌های لیگاند-آنزیم برای هر ترکیب بررسی شد و از بین آنها میانکنشی که دارای بیشترین میزان میل ترکیبی



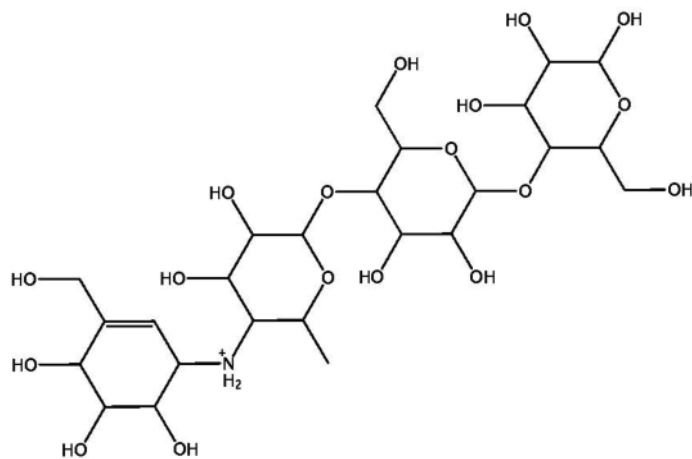
شکل ۱- کنگورد



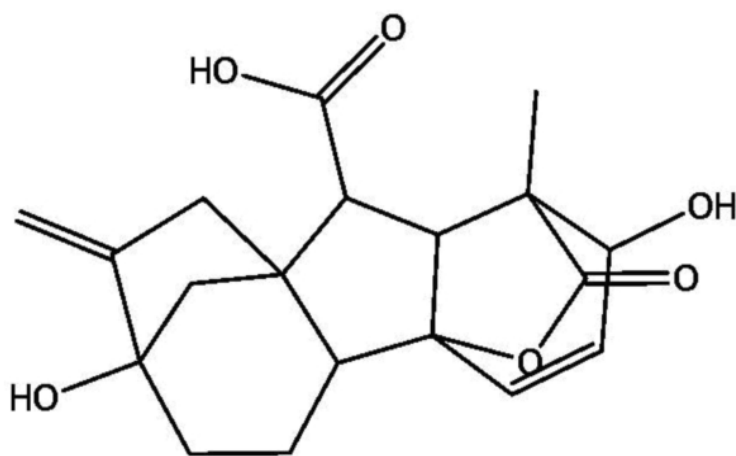
شکل ۲- بی کوکولین



شکل ۳- هسپریدین متیل چاکون



شکل ۴- آکاربوز



شکل ۵- جیبرلیک اسید

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی به

روش برنفلد

در روش برنفلد جهت سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی ابتدا در لوله تست ۱۲۵ μlit بافر فسفات پتاسیم و ۱۲۵ μlit آنزیم آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* اضافه شد. در لوله بلانک فقط ۲۵۰ μlit بافر ریخته شد (این لوله فاقد آنزیم است). پس از ریختن آنزیم با رعایت فاصله زمانی مورد نظر سوپسترا (محلول نشاسته ۴٪) اضافه گردید. در مرحله بعد به کلیه لوله‌ها محلول DNS اضافه شد. محلول DNS در روش برنفلد، با مالتوز حاصل از فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز کمپلکس رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۵۴۰ nm جذب نوری دارد. برای هر یک از غلظت‌های ترکیب مورد نظر، یک لوله بلانک، ۳ لوله حاوی ماده مورد نظر، یک سری لوله حاوی DMSO بدون

سنجش‌های آزمایشگاهی

در این تحقیق از روش برنفلد جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی استفاده شد [۲۱]. ابتدا فعالیت آنزیم در حضور سوپسترا و سپس در حضور ترکیبات شیمیایی پیشنهادی به عنوان مهار کننده مورد سنجش قرار گرفت. محلول‌های لازم جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی به روش برنفلد عبارتند از: محلول DNS (۳ و ۵ - دی نیتروسالیسیلیک اسید)، حلال DMSO (دی متیل سولفوکساید)، محلول آنزیم باکتریایی، بافر فسفات پتاسیم و محلول نشاسته ۴٪ که مورد اخیر به دلیل ناپایداری نشاسته به صورت روزانه تهیه گردید.

به روش آزمایش غلظت‌های نهایی ترکیبات به ترتیب شامل ۰/۱، ۱، ۲، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار بودند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تطابق توالی‌های آمینواسیدی مربوط به آنزیم آلفا آمیلاز باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان

با استفاده از برنامه Clustal W2 عمل تطابق بین توالی‌های آنزیم آلفا آمیلاز باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان انجام شد و با توجه به امتیازات به دست آمده میزان تشابه و همانندی بین توالی‌ها مقایسه شدند (جدول ۱). در این بین بالاترین میزان تشابه و همانندی با امتیاز ۹۳٪ مربوط به دو باکتری *Streptococcus vestibularis* و *Streptococcus salivarius* می‌باشد.

ماده مورد نظر جهت حذف اثر حلال بر آنزیم و یک سری لوله حاوی آنزیم در غیاب ماده مورد نظر به کار برده شد. حلال DMSO جهت حل کردن ترکیباتی که تأثیر آنها بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سنجیده می‌شود و در آب غیر محلولند کاربرد دارد. پس از سنجش فعالیت آنزیم در حضور ماده و غیاب آن در طول موج ۵۴۰ nm نتایج حاصل (سه خوانش برای هر غلظت) ثبت و میانگین، میزان انحراف از معیار (SD) و درصد ضریب تغییرات (CV%) محاسبه گردید. سپس نمودار درصد تغییرات فعالیت آنزیم (درصد کاهش یا افزایش فعالیت در حضور ماده مورد نظر) به کمک برنامه Excel رسم و مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که برای هر یک از ترکیبات مورد آزمایش ابتدا یک محلول اولیه با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار تهیه شد، سپس غلظت‌های ۵۰/۵، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار از محلول اولیه تهیه گشت. در نهایت با توجه

جدول ۱- مقایسه توالی آمینواسیدهای باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان و امتیازات آنها از طریق برنامه ClustalW2

	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	<i>Streptococcus peroris</i>	<i>Streptococcus australis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Actinomyces sp</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	۷۵	۹۳	۷۴	۷۳	۷۵	۶۰	۴۳
<i>Streptococcus sanguinis</i>	۷۵	-	۷۲	۷۳	۷۵	۷۳	۶۱	۴۲
<i>Streptococcus vestibularis</i>	۹۳	۷۲	-	۷۴	۷۱	۷۵	۶۰	۴۲
<i>Streptococcus peroris</i>	۷۴	۷۳	۷۴	-	۷۴	۸۶	۵۹	۴۱
<i>Streptococcus australis</i>	۷۳	۷۵	۷۱	۷۴	-	۷۳	۵۹	۴۳
<i>Streptococcus mitis</i>	۷۵	۷۳	۷۵	۸۶	۷۳	-	۵۹	۴۲
<i>Streptococcus mutans</i>	۶۰	۶۱	۶۰	۵۹	۵۹	۵۹	-	۳۷
<i>Actinomyces sp</i>	۴۳	۴۲	۴۲	۴۱	۴۳	۴۲	۳۷	-

تطابق داده شد. نتایج با میانگین ۶۴٪ تشابه و ۴۶٪ همانندی حاکی از تشابه معنی‌دار توالی‌ها است (جدول ۲). تشابه معنی‌دار ترادف دو مولکول به این نکته دلالت دارد که آن دو احتمالاً دارای منشاء تکاملی یکسانی بوده و به تبع آن ساختار سه بعدی عملکردی و مکانیسم یکسانی دارند [۲۲].

نتایج حاصل از تطابق توالی‌های آمینواسیدی مربوط به آنزیم آلفا آمیلاز باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان با توالی آنزیم آلفا آمیلاز

Bacillus amyloliquefaciens

در این بررسی با استفاده از برنامه Blast توالی‌های آمینواسیدی آلفا آمیلاز باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان با توالی آنزیم آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens*

جدول ۲- نتایج حاصل از مقایسه توالی آلفا آمیلاز فلور نرمال حفره دهان با ی از جنس باسیلوس از برنامه BLAST

درصد تشابه	درصد همانندی	حداکثر امتیاز	سویه‌ای از جنس باسیلوس	باکتریهای فلور نرمال حفره دهان
٪۶۲	٪۴۶	۴۳۲	Bacillus amyloliquefaciens	Actinomyces sp
٪۶۵	٪۴۸	۴۶۳	Bacillus amyloliquefaciens	Streptococcus sanguinis
٪۶۵	٪۴۸	۴۷۵	Bacillus amyloliquefaciens	Streptococcus peroris
٪۶۵	٪۴۷	۴۶۳	Bacillus amyloliquefaciens	Streptococcus mitis
٪۶۶	٪۴۸	۴۶۷	Bacillus amyloliquefaciens	Streptococcus vestibularis
٪۶۶	٪۴۸	۴۶۷	Bacillus amyloliquefaciens	Streptococcus salivarius
٪۶۶	٪۴۸	۴۸۱	Bacillus amyloliquefaciens	Streptococcus australis
٪۶۵	٪۴۳	۴۴۱	Bacillus amyloliquefaciens	Streptococcus mutans

که در *Bacillus amyloliquefaciens* رزیدوهای Asp195, Asn103 و Asp201 و His236 در واکنش شرکت دارند [۱۵]، که در ساختار *Streptococcus australis* به وسیله رزیدوهای Asp203 و Asp197 جایگزین می‌شوند و رزیدوهای His238, Asn103 و Phe206 نیز در اطراف وجود دارند ولی اتصالی برقرار نمی‌کنند. در مورد Ca غیر محافظت شده به ترتیب در *Bacillus amyloliquefaciens* رزیدوهای Ala182, Asp205, Asp203, Asp184, Asp160 در واکنش شرکت دارند [۱۵]، ولی در *Streptococcus australis* تنها Asp186 دارای اتصال مطلوب با یون Ca می‌باشد و رزیدوهای Thr160, Asp205 و Ala184 در اطراف دیده می‌شوند. آخرین یون Ca که در جایگاهی بین ذمین A و ذمین C قرار دارد و غیر محافظت شده است در *Bacillus amyloliquefaciens* با رزیدوهای Gly301, Tyr303, Pro407, Asp408 و Asp431 واکنش می‌دهد [۱۵] ولی در *Streptococcus australis* رزیدوهای Phe305, Pro407, Glu303 و Asn429 در واکنش شرکت دارند و رزیدوی Asn408 در اطراف یون دیده می‌شود. در مورد رزیدوهای کاتالیتیک در *Bacillus amyloliquefaciens* H107, R234, D236, E266, W268, H332 در جایگاه فعال وجود دارند [۱۵]. در حالی که در مورد *Streptococcus australis* رزیدوهای H104, R230, D232, E262, W265, H328 و D329 در محدوده مورد نظر دیده می‌شوند.

نتایج حاصل از مقایسه محل اتصال یون‌های فلزی

کلسیم و سدیم و رزیدوهای کاتالیتیک بین دو ساختار آنزیم آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens*

و *Streptococcus australis*

در این بررسی *Streptococcus australis* از بین باکتری‌های فلور نرمال حفره دهان انتخاب شد چراکه با ٪۴۸ همانندی و امتیاز ۴۸۱ بیشترین میزان شباهت را با توالی آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* نشان داد. به طور کلی ساختار آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی به مانند آلفا آمیلاز انسان دارای سه ذمین A, B و C می‌باشد [۷,۲۳]. ذمین A از barrel $(\beta/\alpha)_8$ درست شده است و در برگرنده جایگاه فعال می‌باشد [۸]. ذمین B ساختار متغیری را در بین آلفا آمیلازهای باکتریایی نشان می‌دهد و به طور کلی از یک صفحه با چهار بتا غیرموازی درست شده است [۸]. ذمین C کروی و دارای هشت صفحه بتا (Greek key) می‌باشد [۸]. در ساختار آنزیم آلفا آمیلاز سه یون کلسیم و یک یون سدیم وجود دارد که محل اتصال آنها در سطح داخلی ذمین B و سطح مشترک بین ذمین‌های A و C می‌باشد [۸]. در بررسی برهم کنش‌های بین رزیدوها و یون‌های فلزی در *Bacillus amyloliquefaciens* رزیدوهای Asp160, Asp184, Asp195, Asp201 و Val202 در واکنش با یون Na شرکت دارند [۱۵]، که در ساختار *Streptococcus australis* به وسیله Ile204, Asp197 جایگزین می‌شوند و دو رزیدوی Asp186 و Thr160 نیز در اطراف یون Na بدون شرکت در واکنش وجود دارند. در مورد یون‌های Ca، ابتدا جایگاه اتصال یون Ca محافظت شده در ساختار آنزیم بررسی شد

نتایج حاصل از جایگیری ترکیبات شیمیایی پیشنهادی به عنوان مهار کننده در ساختار آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens*

در این تحقیق ۵ ترکیب مطابق جدول ۳ جهت بررسی میانکنش با آلفا آمیلاز باکتریایی انتخاب شدند.

جدول ۳- ترکیبات پیشنهادی بر اساس خصوصیات ساختاری و نتایج حاصل از Autodock vina

نام ترکیب شیمیایی	اندازه مولکولی	میل ترکیبی (kcal/mol)	وجود گروه آمینی	آمینواسیدهای واکنش دهنده با ترکیب
کنگور د	بزرگ	-۹/۶	2(N=N) 2(NH2)	R392-G4 -Y359
بی ککولین	بزرگ	-۸/۷	NH+	W137
هسپریدین متیل چالکون	بزرگ	-۸/۷	-	Y55-D232-E262-K235
آکاربوز	بزرگ	-۸	NH+	Y55-H236-D52
جیبرلیک اسید	متوسط	-۸	-	G4-R392

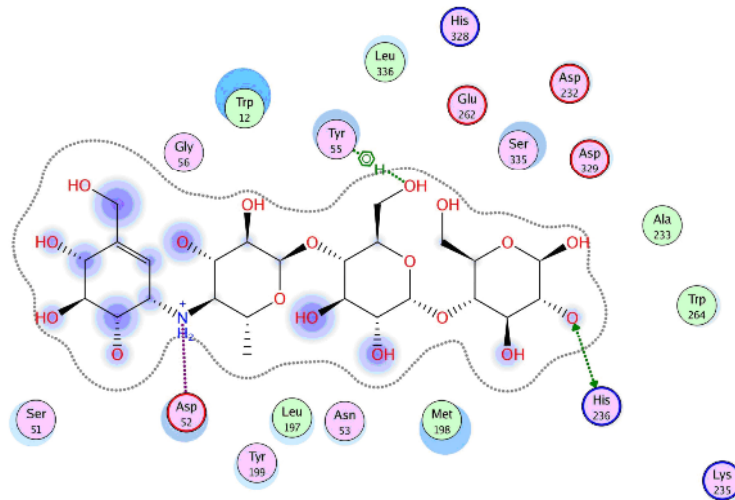
آنزیم باکتریایی در اطراف کنگور د دیده شد (شکل ۸). این ترکیب نمک سدیمی از بنزیدین دی آزو- بیس-۱- نفتیل آمین-۴- سولفونیک اسید است و به عنوان شناساگر اسید و باز به کار می‌رود. در ساختار بزرگ آن که حالت قرینه داشته و از شش حلقه بنزنی درست شده است دو گروه (NH₂) و دو گروه (N=N) وجود دارد (شکل ۸). ترکیب بعدی بی ککولین با میل ترکیبی ۸/۷ kcal/mol با آنزیم باکتریایی می‌باشد. این ترکیب از نظر اندازه مولکول بزرگی است و دارای یک گروه آمینی در ساختار خود می‌باشد. رزیدوی W137 از آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی با پیوند arene-H در میانکنش با این ترکیب دیده می‌شود (شکل ۹).

ترکیب بعد هسپریدین متیل چالکون با میل ترکیبی ۸/۷ kcal/mol می‌باشد که هرچند مقدار آن برابر میل ترکیبی بی ککولین است ولی با توجه به وجود گروه‌های آمینی در رتبه سوم جدول قرار می‌گیرد. در بررسی میانکنش این ترکیب با آنزیم نشان داده شد که هسپریدین متیل چالکون با پنج رزیدوی کاتالیتیک از آنزیم باکتریایی شامل H328, R230, D329, D232 و E262 به وسیله پیوندهای هیدروژنی و arene_H واکنش دارد که این مطلب احتمال فراوان جای‌گیری آن را در جایگاه فعال آنزیم نشان می‌دهد و به نظر می‌رسد که این ترکیب بتواند اثر مهارتی بر فعالیت آلفا آمیلاز باکتریایی داشته باشد (شکل ۱۰). در رتبه آخر از نقطه نظر تمایل واکنش به آنزیم باکتریایی ترکیب جیبرلیک اسید قرار دارد که از لحاظ اندازه مولکول چندان بزرگی نیست و همچنین فاقد گروه‌های آمینی است ولی از

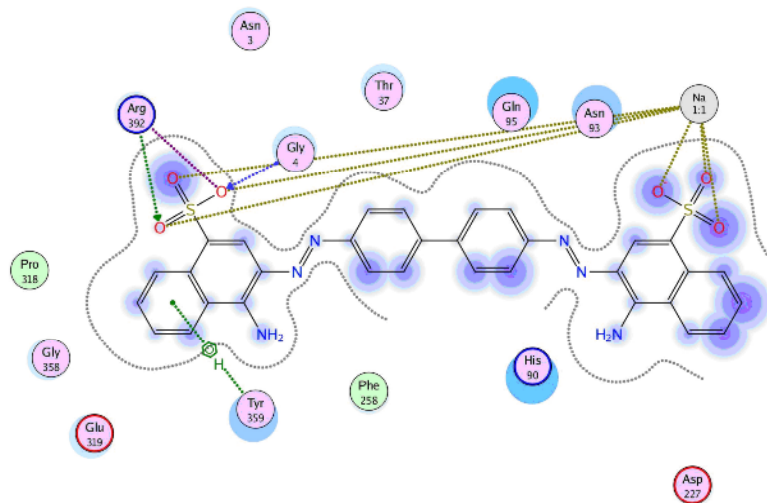
آکاربوز ترکیبی است که در کنار کنترل رژیم غذایی و همراه سایر داروهای پایین آورنده قند خون در بیماران مبتلا به دیابت غیر وابسته به انسولین مصرف می‌شود [۱۹]. سازوکار عمل آکاربوز تاخیر در هضم کربوهیدرات‌ها به قندهای ساده از طریق مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز در پانکراس و آلفا گلوکوزیداز در روده می‌باشد [۱۹]. حضور رزیدوهای کاتالیتیک H328, D232, D329 و D262 از آنزیم باکتریایی در اطراف آکاربوز احتمال جایگیری آنرا در جایگاه فعال آنزیم قوت می‌بخشد و به نظر می‌رسد که این ماده بتواند در غلظت مناسب آلفا آمیلاز باکتریایی را مهار نماید (شکل ۷). آکاربوز مولکول بزرگی است که در ساختار خود دارای گروه آمینی است و همان طوری که قبلاً ذکر شد به عنوان ترکیب مرجع انتخاب گردید. در واکنش میان آکاربوز با آنزیم باکتریایی رزیدوهای D52, H236 و Y55 از آنزیم به ترتیب به وسیله پیوندهای الکترواستاتیکی، هیدروژنی و arene-H شرکت دارند (شکل ۷). میل ترکیبی این میانکنش ۸ kcal/mol می‌باشد. با توجه به این خصوصیات پس از بررسی نتایج حاصل از برنامه Autodock vina ترکیب کنگور د با میل ترکیبی ۹/۶ kcal/mol با آنزیم باکتریایی رتبه اول را در بین سایرین به دست آورد. در این واکنش کنگور د با رزیدوهای R392, G4 و Y359 از آنزیم به ترتیب به وسیله پیوندهای الکترواستاتیکی و arene-H شرکت داشت، ضمن این که یون Na از آنزیم بایکی از گروه‌های سولفیدریل کنگور د واکنش یونی برقرار می‌کند (شکل ۸). همچنین سه آمینواسید بسیار محافظت شده G358, H90 و D227 از

وسيله پیوندهای الکترواستاتیکی و هیدروژنی با جیرلیک اسید واکنش دارند.

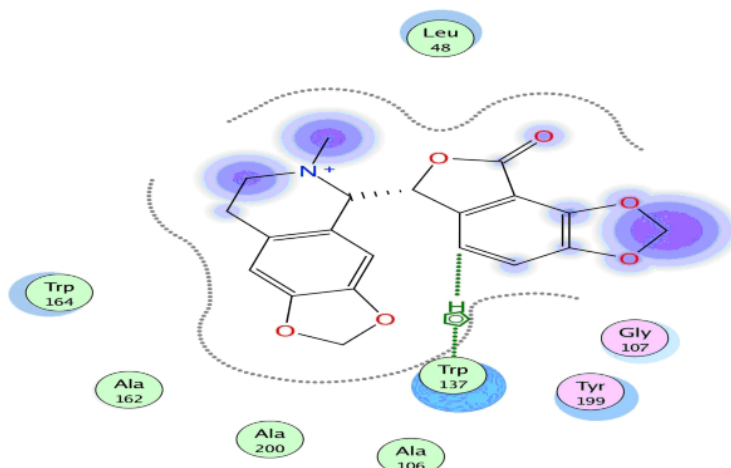
لحاظ میل ترکیبی به آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی به میزان -8kcal/mol با آکاربوز برابر است. در این میانکنش رزیدوهای R392 و G4 از آنزیم باکتریایی به ترتیب به



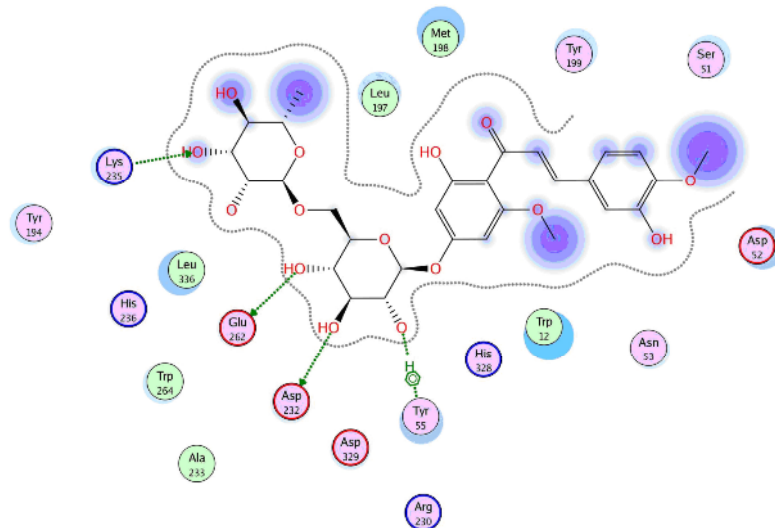
شکل ۶- میانکنش بین آکاربوز با آنزیم باکتریایی



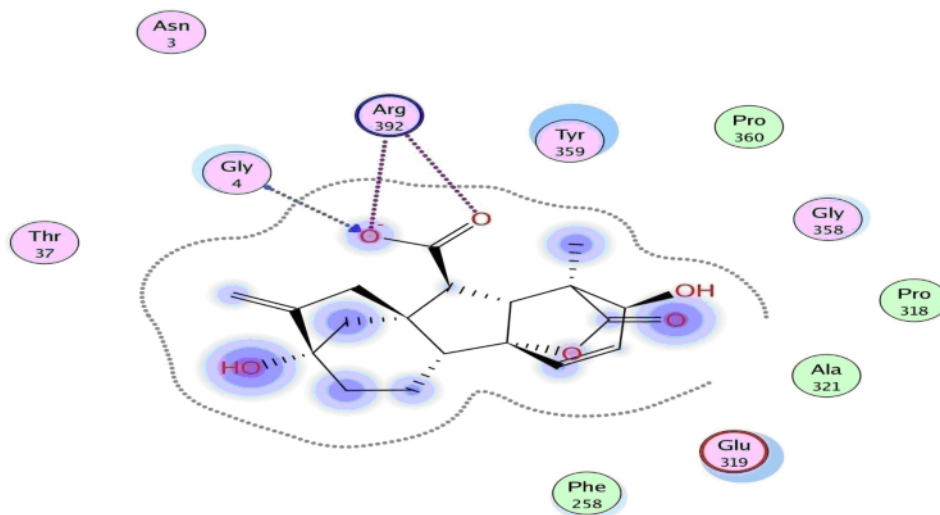
شکل ۷- میانکنش بین کنگو رد با آنزیم باکتریایی



شکل ۸- میانکنش بین بی کوکولین با آنزیم باکتریایی



شکل ۹- میانکنش بین هسپریدین متیل چالکون با آنزیم باکتریایی



شکل ۱۰- میانکنش بین جیبرلیک اسید با آنزیم باکتریایی

صورت خطی و وابسته به غلظت نبود (جدول ۶). هسپریدین متیل چالکون دارای اثر کاهشی بر فعالیت آلفا آمیلاز بود به طوری که بیشترین اثر در غلظت ۱۰ میکرومولار و به میزان ۱۲ درصد مشاهده شد (جدول ۷). در نهایت در حضور ماده جیبرلیک اسید فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز به میزان ۱۵ درصد کاهش یافت که این اثر در غلظت‌های ۱ تا ۲۰ میکرومولار تفاوت زیادی نداشتند (جدول ۸).

نتایج حاصل از سنجش‌های آزمایشگاهی

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی در حضور ترکیب آکاربوز در غلظت ۲۰ میکرومولار ۳۰ درصد کاهش نشان داد (جدول ۴). در مورد کنگورد اثر کاهشی ملاحظه نشد و تنها در غلظت ۰/۱ میکرومولار به میزان ۱۲ درصد کاهش فعالیت دیده شد که نتیجه معنی‌داری نمی‌باشد (جدول ۵). در مورد ترکیب بی کوکولین کاهش فعالیت آنزیم به میزان حداکثر ۱۵ درصد در غلظت ۰/۱ میکرومولار مشاهده شد که البته فرایند کاهش فعالیت در غلظت‌های بالاتر به

جدول ۴- تغییرات فعالیت آلفا آمیلاز باکتریایی در حضور غلظت‌های مختلف آکاربوز

آکاربوز (میکرو مولار)	فعالیت آنزیم (میانگین \pm انحراف از معیار)	درصد ضریب تغییرات	درصد باقیمانده فعالیت آنزیم
۰	۱/۴۵۸ \pm ۰/۰۰۴۳	٪۰/۲۹	٪۱۰۰/۰۰
۰/۱	۱/۳۲۳ \pm ۰/۰۰۸۱	٪۰/۶۱	٪۹۰/۷۴
۱	۱/۴۳۳ \pm ۰/۰۱۷۲	٪۱/۲	٪۹۸/۲۸
۲	۱/۳۷۷ \pm ۰/۰۰۹۸	٪۰/۷۱	٪۹۴/۴۴
۱۰	۱/۰۹۹ \pm ۰/۰۰۱۵	٪۰/۱۴	٪۷۵/۳۷
۲۰	۱/۰۲ \pm ۰/۰۰۱۵	٪۰/۱۵	٪۶۹/۹۶

مقادیر فعالیت آنزیم به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده است. جهت بررسی دقت نتایج هر یک از مقادیر حداقل سه مرتبه خوانش شدند. درصد ضریب تغییرات ($CV < 3\%$) نشان دهنده دقت قابل قبول نتایج می‌باشد. غلظت ترکیب مورد آزمایش بر حسب μM (میکرومولار) و واحد فعالیت آنزیم IU/L می‌باشد.

جدول ۵- تغییرات فعالیت آلفا آمیلاز باکتریایی در حضور غلظت‌های مختلف کنگو رد

کنگو رد (میکرو مولار)	فعالیت آنزیم (میانگین \pm انحراف از معیار)	درصد ضریب تغییرات	درصد باقیمانده فعالیت آنزیم
۰	۱/۷۸۳ \pm ۰/۰۰۲	٪۰/۱۱	٪۱۰۰
۰/۱	۱/۵۸۱ \pm ۰/۰۰۱	٪۰/۰۶۳	٪۸۸/۶۰
۱	۱/۸۵۹ \pm ۰/۰۰۳۶	٪۰/۱۹	٪۱۰۴/۲۰
۲	۱/۸۲۶ \pm ۰/۰۰۳	٪۰/۱۶	٪۱۰۲/۴۰
۱۰	۱/۸۱ \pm ۰/۰۰۲۵	٪۰/۱۴	٪۱۰۱/۵۰
۲۰	۱/۸۰۳ \pm ۰/۰۰۱	٪۰/۰۵۵	٪۱۰۱/۱۰

مقادیر فعالیت آنزیم به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده است. جهت بررسی دقت نتایج هر یک از مقادیر حداقل سه مرتبه خوانش شدند. درصد ضریب تغییرات ($CV < 3\%$) نشان دهنده دقت قابل قبول نتایج می‌باشد. غلظت ترکیب مورد آزمایش بر حسب μM (میکرومولار) و واحد فعالیت آنزیم IU/L می‌باشد.

جدول ۶- تغییرات فعالیت آلفا آمیلاز باکتریایی در حضور غلظت‌های مختلف بی کولین

بی کولین (میکرو مولار)	فعالیت آنزیم (میانگین \pm انحراف از معیار)	درصد ضریب تغییرات	درصد باقیمانده فعالیت آنزیم
۰	۱/۷۱ \pm ۰/۰۱۵۲	٪۰/۱۵	٪۱۰۰
۰/۱	۱/۴۶ \pm ۰/۰۰۲۵	٪۰/۱۷	٪۸۵/۳۰
۱	۱/۵۳۴ \pm ۰/۰۰۳۵	٪۰/۲۲	٪۸۹/۵۰
۲	۱/۶۱۱ \pm ۰/۰۰۳۶	٪۰/۲۲	٪۹۴
۱۰	۱/۶۰۲ \pm ۰/۰۰۱	٪۰/۰۶۲	٪۹۳/۶۰
۲۰	۱/۶۱۷ \pm ۰/۰۰۱۵	٪۰/۰۹۴	٪۹۴/۵۰

مقادیر فعالیت آنزیم به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده است. جهت بررسی دقت نتایج هر یک از مقادیر حداقل سه مرتبه خوانش شدند. درصد ضریب تغییرات ($CV < 3\%$) نشان دهنده دقت قابل قبول نتایج می‌باشد. غلظت ترکیب مورد آزمایش بر حسب μM (میکرومولار) و واحد فعالیت آنزیم IU/L می‌باشد.

جدول ۷- تغییرات فعالیت آلفا آمیلاز باکتریایی در حضور غلظت های مختلف هسپریدین متیل چالکون

هسپریدین متیل چالکون (میکرو مولار)	فعالیت آنزیم (میانگین \pm انحراف از معیار)	درصد ضریب تغییرات	درصد باقیمانده فعالیت آنزیم
۰	۱/۱۴ \pm ۰/۰۲	٪۱/۷۵	٪۱۰۰
۰/۱	۱/۰۸ \pm ۰/۰۱۱	٪۰/۱	٪۹۵
۱	۱/۱۰۴ \pm ۰/۰۰۱۵	٪۰/۱۳	٪۹۶/۸۴
۲	۱/۰۴۴ \pm ۰/۰۰۱	٪۰/۰۹۵	٪۹۱/۵۷
۱۰	۰/۹۹۹ \pm ۰/۰۰۰۵۷	٪۰/۰۵۷	٪۸۷/۶۳
۲۰	۱/۰۱۶ \pm ۰/۰۰۰۵۸	٪۰/۰۵۷	٪۸۹

مقادیر فعالیت آنزیم به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده است. جهت بررسی دقت نتایج هر یک از مقادیر حداقل سه مرتبه خوانش شدند. درصد ضریب تغییرات ($CV < 3\%$) نشان دهنده دقت قابل قبول نتایج می باشد. غلظت ترکیب مورد آزمایش بر حسب μM (میکرومولار) و واحد فعالیت آنزیم IU/L می باشد.

جدول ۸- تغییرات فعالیت آلفا آمیلاز باکتریایی در حضور غلظت های مختلف جیبرلیک اسید

جیبرلیک اسید (میکرو مولار)	فعالیت آنزیم (میانگین \pm انحراف از معیار)	درصد ضریب تغییرات	درصد باقیمانده فعالیت آنزیم
۰	۱/۷۱ \pm ۰/۰۱۵۲	٪۰/۱۵	٪۱۰۰
۰/۱	۱/۵۹۴ \pm ۰/۰۰۰۵۷	٪۰/۰۳۶	٪۹۳
۱	۱/۴۳۵ \pm ۰/۰۰۰۵۷	٪۰/۰۴۰	٪۸۳/۹۰
۲	۱/۴۵ \pm ۰/۰۰۰۵۷	٪۰/۰۳۹	٪۸۴/۷۰
۱۰	۱/۴۸۹ \pm ۰/۰۰۰۵۸	٪۰/۰۳۸	٪۸۶/۵۰
۲۰	۱/۴۵۴ \pm ۰/۰۰۰۵۶۶	٪۰/۰۴۵	٪۸۴/۷۰

مقادیر فعالیت آنزیم به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده است. جهت بررسی دقت نتایج هر یک از مقادیر حداقل سه مرتبه خوانش شدند. درصد ضریب تغییرات ($CV < 3\%$) نشان دهنده دقت قابل قبول نتایج می باشد. غلظت ترکیب مورد آزمایش بر حسب μM (میکرومولار) و واحد فعالیت آنزیم IU/L می باشد.

بحث

دارند که قادرند آنزیم آلفا آمیلاز را مهار نمایند [۱۱]. این ترکیبات دارای ساختارهای متفاوت بیوشیمیایی می باشند. به عنوان مثال در برخی از گیاهان نظیر گندم و لوبیا عصاره ای استخراج شده است که دارای ساختار پروتئینی بوده و قادر است از طریق مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با اتصال به جایگاه فعال آن از جذب کربوهیدرات در روده جلوگیری نماید [۱۰]. همچنین در ترکیباتی که به صورت داروهای شیمیایی جهت درمان دیابت استفاده می شود نظیر آکاربوز ساختارهایی مشتق از خانواده کربوهیدرات ها وجود دارد [۱۹، ۲۴]. از دیگر ترکیبات می توان به خانواده فلاونوئیدها اشاره کرد که از ترکیبات پلی فنولی هستند و در بسیاری از گیاهان وجود دارند [۲۵، ۲۶]. بسیاری از این ترکیبات علاوه بر مهار آنزیم آلفا آمیلاز می توانند باعث

اهمیت بالینی مهار آنزیم آلفا آمیلاز

یکی از رویکردهای درمان و کنترل دیابت کاهش هیپرگلیسمی بعد از مصرف ترکیبات قندی است [۳]. این روش با ایجاد تاخیر در هضم و جذب گلوکز از طریق مهار آنزیم های دخیل در هضم کربوهیدرات ها مثل آلفا آمیلاز میسر است [۴، ۵].

مهارکننده های آنزیم آلفا آمیلاز

به طور کلی انواع مختلفی از ترکیبات چه به صورت داروهای شیمیایی و چه به صورت گیاهان دارویی وجود

این به عنوان مهار کننده‌های انواع دیگر آلفا آمیلاز مطرح شده‌اند [۲۷]. به نظر نمی‌رسد در مورد جیبرلیک اسید تا کنون گزارشی مبنی بر توانایی این ترکیب در مهار آلفا آمیلاز منتشر شده باشد، و در صورتی که این ترکیب با غلظت بالاتری بتواند به صورت وابسته به دوز تاثیر مهاری بر آنزیم داشته باشد، نشان دهنده احتمال تاثیر ترکیبات تریپنی بر آنزیم آلفا آمیلاز خواهد بود.

نتیجه گیری

در تجزیه و تحلیل آماری تطابق توالی‌های آمینواسیدی پروتئین‌ها در توالی‌های بزرگتر از ۱۰۰ آمینو اسیدی، همسانی‌های بیشتر از ۲۵٪ نمی‌تواند تصادفی باشد و تشابه معنی‌دار بین توالی دو مولکول و به تبع آن ساختار سه بعدی عملکردی آنها را نشان می‌دهد [۲۵]. در این تحقیق با توجه به میانگین تشابه بالای ۶۴٪ بین توالی‌های آلفا آمیلاز باکتری‌های فلور نرمال دهان با توالی آلفا آمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* و همچنین وجود تشابه بین رزیدوهای متصل به یون‌های فلزی و رزیدوهای کاتالیتیک جایگاه فعال می‌توان نتیجه گرفت که بین ساختار سه بعدی آلفا آمیلازهای باکتریایی تشابه فراوانی وجود دارد. در بخش سنجش‌های آزمایشگاهی برخی از ترکیبات منتخب توانستند فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی را کاهش دهند که با توجه به غلظت‌های پایین این ترکیبات و همچنین میل ترکیبی مناسبی که در بررسی جای‌گیری آنها در ساختار آنزیم باکتریایی بدست آمد می‌توان امید داشت که این ترکیبات در غلظت‌های بالاتر اثر مهار کنندگی مطلوب‌تری را از خود نشان دهند که این مورد در پژوهش‌های آتی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

سپاسگزاری

کلیه هزینه‌های این طرح توسط مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تأمین شده است.

کاهش چربی نیز بشوند [۲۷]. به دلیل خواص آنتی هایپرگلیسمیک و آنتی هایپرلیپمیک فلاونوئیدها امروزه بسیاری از گیاهان حاوی این ترکیبات می‌توانند به عنوان دارو در بیماران دیابتی مورد استفاده قرار گیرند که تحقیقات روی آنها همچنان ادامه دارد [۲۷].

نگاهی بر اهمیت باکتری‌های فلور نرمال در متابولیسم

بدن

برخی از انواع فلور نرمال بدن به ویژه انواع مستقر در حفره دهان مثل استرپتوکوک موتانس و استرپتوکوک سانگوئیس به هنگام استفاده از مواد قندی تکثیر می‌شوند و با چسبیدن به روی دندان و ایجاد پلاک‌های دندانی و تولید اسید در نهایت باعث پوسیدگی و تخریب دندان‌ها می‌گردند [۱۷]. برخی دیگر می‌توانند بدن را از مواد زائد پاک کنند مثل باکتری‌های مفید روده که از مواد زائد روده تغذیه می‌کنند [۱۲]. بسیاری از باکتری‌های روده می‌توانند ویتامین‌های مهمی از گروه B و ویتامین E و K را سنتز کنند که مورد استفاده میزبان قرار می‌گیرند [۱۲]. همچنین باکتری‌های روده‌ای در سنتز ویتامین K، تجزیه و تبدیل املاح و اسیدهای صفراوی، جذب مواد غذایی و تجزیه مواد غذایی به متابولیت‌های گوناگون و مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا نقش مهمی را به عهده دارند [۱۲]. تحقیقات اخیر نشان داده است که برخی از باکتری‌های روده بزرگ که اکثراً بی‌هوازی می‌باشند و از دسته باکتریوئیدها هستند قادرند با تجزیه فیبرهای غذایی مانند سلولز در تولید انرژی در بدن نقش ایفا نمایند [۱۳]. *bacterioides ovatus* و *bacterioides thetaiotaomicron* دو نمونه از این باکتری‌ها می‌باشند [۱۳]. با توجه به مسایل ذکر شده می‌توان به نقش احتمالی آنزیم آلفا آمیلاز باکتری‌های فلور نرمال در افزایش میزان قند خون توجه داشت. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده پتانسیل ترکیب هسپریدین متیل چالکون و جیبرلیک اسید در مهار آنزیم باکتریایی می‌باشد. ترکیب هسپریدین متیل چالکون دارای تشابه با ساختارهای آروماتیک و پلی فنلی است که پیش از

ماخذ

- 1- Erkelen Dw. Insulin resistance syndrome and type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Cardiology* 2001, 88; 38J-42J.
- 2- Zamboni M, Mazzali G, Zoic E, Harris TB, Meigs JB, Francesco V, Fantin F, Bissoli L, Bosello O. Health consequences of obesity in the elderly: a review of four unresolved questions. *International Journal of obesity* 2005, 29, 1011-1029
- 3- Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications. It is time to treat? *Diabetes* 2005, 57:17.
- 4- Akkarachiyasit S, Charoenlertkul P, Yibchok-anun S, Adisakwattana S. Inhibitory Activities of oyanidin and its Glycoside and synergistic effect with acarbose against Intestinal α -Glucosidase and Pancreatic α -Amylase. *International Journal of Molecular Sciences* 2010, 11, 3387-3396.
- 5- Kim J.s, Kwon C.S, Son K.H. Inhibition of Alpha glucosidase and Amylase by luteolin, a Flavonoid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2000, 64; 2458-2461
- 6- Reddy N.S, Nimmagadda A, Sambasiva Rao K.R.S. An overview of the microbial α -Amylase family. *African Journal of Biotechnology* 2003, 2; 645-648.
- 7- Brayer G.D, Yaoguang LUO, Withers S.G. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 A resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science* 1995, 4:1730-1742
- 8- Ramasubbu N, Paloth V, Laoy, Brayer G D, Levine MJ. Structure of human α -Amylase at 1.6 A resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallographica D* 1999, 1: 52(pt3): 435-46.
- 9- Brayer G.D., Sidhu G, Maurus R, Rydberg E.H, Braun C, Wang Y, Withers S.G. Subsite mapping of the human pancreatic alpha-amylase active site through structural, kinetic and mutagenesis techniques. *Biochemistry* 2000, 39, 4778-4791.
- 10- Udani J, Hardy M, Madsen D.C. Blocking carbohydrate Absorption and weight loss: A clinical Trial using phase 2 Brand proprietary fractionated white Bean Extract. *Alternative Medicine Review* 2004, 9, 63-9
- 11- Flatt P.R., Bailey C.J., Green B.D. Recent Advances in Antidiabetic Drug therapies targeting the Enteroinular Axis. *Current Drug Metabolism* 2009, 10, 125-37
- 12- Guarner F, Malagelada J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003, 361: 512-19.
- 13- Inman M. How Bacteria Turn Fiber into Food. *Plos Biology* 2011, 9(12):e1001227
- 14- Demrikan E, Mikami B, Adachi M. α - Amylase from *B.amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E.coli* process. *Biochemistry* 2005, 2629-2636.
- 15- Suvd D, Fujimoto Z, Takase K, Matsumura M, Mizuno H. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* α -Amylase: possible Factors determining the thermostability. *Journal of Biochemistry* 2001, 129; 461-468
- 16- Violet M, Meunier J.C. Kinetic study of irreversible thermal denaturation of *Bacillus lechniformis* α -Amylase. *Biochemistry Journal* 1989, 263; 665-67
- 17- Aas J, Paster B, Stokes L, Olsen I, Dewhirst F. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 11; 5721-5732.
- 18- Altschul S.F., Gish W, Miller W, Myers E.W. Lipmann D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 1990, 215; 403-410.
- 19- Chiasson JL, Josse RG, Gomis R. Acarbose for the prevention of type 2 diabetes hypertension and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: facts and interpretations concerning the critical analysis of the stop-niddm trial data. *Diabetologia* 2004, 47: 969-975.
- 20- Kalirajan R, Rafick MH, Sankar S, Jubie S. (2012) Docking studies, synthesis, characterization and evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities of some novel isoxazole-substituted 9-anilinoacridine derivatives. *Scientific World Journal* 2012, Article ID; 165258.
- 21- Brenfeld P. Amylase α and β . *Methods in Enzymology* 1995, 1; 149-151.
- 22- Stryer L, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko. *Biochemistry* 2007.
- 23- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H. Microbial α -Amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 2003, 11; 1599-1616.
- 24- Fujita H, Yanagami T, Oshima Kazunori. Long-Term Ingestion of a Fermented soybean-Derived Touchi- Extract with Borderline and mild Type 2 Diabetes. *Human Nutrition and Metabolism* 2000, 131; 2105-8.
- 25- Alberton E.H, Damazio R.G., Cazarolli L.H., Chiaradia L.D., Leal P.C., Nunes R.G., Yunes R.A., Silva F.R.M.B. Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. *Chemico Biological Interaction* 2008, 171:355-362.
- 26- Abdul Rahim Al Jamal. Effects of cinnamon on blood glucose and lipids levels in diabetic patients. *African Journal of Biochemistry Research* 2009, 3; 181-184.
- 27- Piparo EL, Scheib H, Frei N, Williamson G. Flavonoids for controlling starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human. *J of Medicinal Chemistry* 2008, 51; 3555-3561.