مجله دیابت و لیپید ایران. دو ماهنامه فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۱؛ دوره ۱۱ (شماره ۴) ۳۳۹-۳۳۱

مطالعه مدلسازی مولکولی و آزمایشگاهی مهارکننده‌های پیشنهادی آنزیم لیپاز

سعیده خلیلی[۱]، آرمین مددکار سبحانی[۲]، عبد الله هلالی[۳]، باقر لاریجانی[۳]، آزاده ابراهیم‌حبیبی*[۳]

چکیده

مقدمه: لیپاز، آنزیم محلول در آب است که هیدرولیز پیوندهای شیمیایی استری درسوبستراهای لیپیدی نامحلول در آب را انجام می‌دهد. لیپاز یک زیر شاخه از استرازها می‌باشد با توجه به ساختار آنزیم، ترکیبات آروماتیک می‌توانند به عنوان مهارکننده‌های لیپاز پستانداران مطرح باشند و کاربرد آنها به عنوان داروی بالقوه در درمان چاقی است. در این مطالعه بر آن شدیم تا ترکیبات آروماتیکی جدیدی را برای اثرگذاری روی عمل لیپاز بیابیم تمامی ترکیبات مورد استفاده در این تحقیق دارای حداقل یک حلقه فنلی در ساختار خود می‌باشند.

روش‌ها: تاثیر ترکیبات آروماتیک شامل استراگول، یدیپامید، وانیلیل نونامید و وانیلیل استون بر فعالیت آنزیم لیپاز پانکراس خوکی در حضور سوبسترای صناعی، پارا نیتروفنیل استات بررسی شد. جهت یافتن جایگاه احتمالی برهم کنش این ترکیبات با آنزیم از روش داکینگ (مدل‌سازی مولکولی) استفاده شد.

یافته‌ها: در حضور سوبسترای پارانیترو فنیل استات (یک سوبسترای مصنوعی) و ترکیبات فوق وانیلیل نونامید و وانیلیل استون در غلظت پایین‌تر اثر قابل توجهی دارند در حالی که یدیپامید مجموعاً تاثیر فعال کنندگی نشان می‌دهد و تاثیر استراگول چندان قابل توجه نیست. بنابراین وانیلیل نونامید و وانیلیل استون برای مطالعات بیشتر با استفاده از روش مدل‌سازی مولکولی انتخاب شدند.

نتیجه‌گیری: این نتایج اثر بالقوه وانیلیل نونامید و وانیلیل استون رادر بین ترکیبات فوق در کاهش فعالیت آنزیم نشان می‌دهد، همچنین این مطالعه با توجه به نتایج به دست آمده از روش‌های مدل‌سازی مولکولی وجود محل‌هایی مشابه در آنزیم برای اتصال به «مهارکننده‌ها» را نشان می‌دهد، به گونه‌ای که محل اتصال مهارکننده به آنزیم در جایگاه فعال یا مکانی نزدیک به جایگاه فعال می‌باشد.

واژگان کلیدی: استراگول، یدیپامید، وانیلیل نونامید، وانیلیل استون، لیپاز پانکراسی، مهارکننده

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

۲- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

۳- 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 درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷ ، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: aehabibi@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۰/۱۱/۲۶ تاریخ درخواست اصلاح: ۹۱/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۱/۲۸

مقدمه

لیپاز (EC۳.۱.۱.۳) هیدرولیز پیوندهای استری داخلی را درترکیبات لیپیدی تری اسیل گلیسرول و مشتقات آنها را در موقعیت‌های مشابه به عهده دارد. این آنزیم‌های حفاظت شده متعلق به خانواده استرازها می‌باشند و در طیف وسیعی از موجودات از آغازیان، پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها دیده می‌شوند. گرچه درتوالی ژنی اینها شباهت کمی دیده می‌شود. اما ساختارهای سه بعدی آنها شباهت بسیار زیادی به هم دارند [۱،۲].

در پستانداران، لیپازها در معده، ترشحات پانکراس و روده باریک دیده می‌شوند. ساختار سه بعدی نوع خوکی و نوع انسانی بسیار به هم شبیه هستند و بنابراین الگوهای واکنش آنها با لیپیدها و مهارکننده‌های لیپیدی مشابه است. هضم لیپیدها طی مراحل مختلفی در انسان انجام می‌شود. در ابتدا لیپازهای معدی یک هضم جزئی انجام می‌دهند، که سبب شکستن تری‌گلیسریدها به منو و دی گلیسریدها می‌شود. وقتی فراورده‌های هضم چربی‌ها به روده باریک وارد می‌شوند، هورمونی به نام کولسیستوکینین از مخاط روده آزاد می‌شود. این هورمون از راه خون به کیسه صفرا می‌رسد و به انقباض ریتمیک آن می‌انجامد و همراه با امواج دودی روده کوچک، به تخلیه کیسه صفرا منجر می‌شود [۳].کیسه صفرا بر اثر تحریک عصب واگ نیز منقبض می‌شود. صفرا هیچ نوع آنزیم گوارشی ندارد و فقط به اعتبار وجود املاح صفراوی برای هضم اهمیت دارد. اولاً، املاح صفراوی به امولسیونی کردن (مخلوط مایع شکل) چربی‌ها کمک می‌کند تا بتوانند با افزایش سطح تماس به کمک لیپازهای روده هضم شوند، و ثانیاً، فرآورده‌های نهایی هضم چربی‌ها را به پرزهای روده‌ای حمل می‌کنند تا به راحتی جذب خون شوند. در مرحله بعد با ترشح لیپاز پانکراسی به داخل روده باریک به طور عمده و همچنین لیپاز روده‌ای، تری اسیل گلیسرول‌های روده‌ای به طورگسترده‌ای به اسیدهای چرب و گلیسرول تبدیل می‌شوند، سپس با تشکیل میسل توسط املاح صفراوی اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آزاد با بخش چربی میسل ترکیب می‌شوند و از آنجا که قسمت دیگر میسل محلول در آب است فراورده‌ها از خلال لایه موکوسی به غشای پوشیده از میکروویلی سلول‌های روده می‌رسند و با عبور از این سلول‌ها وارد خون شده و از طریق ورید باب به کبد منتقل می‌شوند [۴].

Pancreatic Lipase
Triacylglycerol + H2O ⇨ diacylglycerol + a fatty acid anion

از آنجا که هدف مطالعه حاضر، یافتن ترکیباتی است که در نهایت برروی لیپاز انسانی مؤثر باشند و لیپاز خوکی هم شباهت زیادی به نوع انسانی دارد، در اینجا صرفاً خصوصیات دو آنزیم لیپاز پانکراتیک انسان و خوک، بررسی می‌شود. لیپاز پانکراس، شامل یک زنجیره پلی پپتیدی به وزن ۵۰ کیلو دالتون است ساختار کریستالی نشان می‌دهد که لیپاز پانکراس خوک شامل ۴۴۹ آمینو اسید و دو دمین با عمل ویژه است: دمین N- ترمینال شامل سه تایی کاتالیتیکی آسپارتیک اسید ۱۷۷، هیستیدین ۲۶۴ و سرین ۱۵۳ می‌باشد و از آمینو اسید ۱تا ۳۳۶ را شامل می‌شود و مسوول هیدرولیز تری‌گلیسرید است. دمین C-ترمینال که با کولیپاز (پروتئین ۱۰ کیلو دالتونی ترشح شده توسط پانکراس) همراه است با توالی مشابه و با دو سایت متمایز شامل ناحیه غنی از تیروزین و ناحیه اتصال آن به لیپاز که غنی از باقیمانده‌های آمینو اسیدی قطبی است) درگیر است از آمینو اسید ۳۳۷ تا ۴۴۹ را شامل می‌شود [۵]. یکی از ویژگی‌های خاص لیپاز پانکراسی این است که سایت کاتالیتیکی آن در محلول در مقایسه با سایر آنزیم‌های دارای سرین کاتالیتیک، در حالت معمول خود برای سوبسترا غیر قابل دسترس است. تفاوت لیپاز پانکراس انسان نسبت به خوک مربوط می‌شود به تشکیل یک هلیکس سطحی که دسترسی به جایگاه فعال را برای لیپاز پانکراسی انسان بلوکه می‌کند. لیپاز پانکراس در آسپاراژین ۱۶۷ گلیکوزیله می‌باشند. که زنجیره گلیکانی دور از جایگاه فعال است و به نظر نمی‌رسد که در فعالیت کاتالیتیکی نقشی داشته باشد سوبسترای طبیعی این آنزیم تری‌گلیسریدها می‌باشند [۶].

سوبستراهای صناعی شامل استرهای پارا نیتروفنیل اسیل به عنوان سوبستراهای کروموژنیک هستند. استفاده از این سوبستراها سبب می‌شد تا از آنزیم کمکی استفاده نشود [۷]. تعداد و انواع داروهای لاغری که در کتب مرجع تغذیه معرفی شده‌اند انگشت شمار بوده و به دو دسته

اصلی و البته چند زیرگروه فرعی تقسیم می‌شوند. گروه اول داروهای ضد اشتها هستند که با تحریک تولید هورمون‌های سروتونین و سایر کاته کولامین‌ها باعث مهار مرکز اشتها می‌شوند. این داروها عوارضی چون افزایش فشارخون، افزایش ضربانات قلبی و اضطراب داشته و گزارش شده است که در نهایت در صورت مصرف بی‌رویه سبب سکته‌های قلبی یا مغزی می‌شوند [۸]. گروه دوم داروهایی هستند که باعث جلوگیری از جذب چربی در دستگاه گوارشی می‌شوند. این داروها تاثیری در جذب کربوهیدرات‌ها ندارند و فقط جذب ۳۰ درصد از چربی‌های مصرف شده را مهار می‌کنند. [۹]. ترکیبات طبیعی مهار کننده لیپاز به عنوان مثال در گیاهان یافت شده‌اند (ترکیبات پلی فنلی) [۱۰،۱۱]. لیپستاتین و اورلیستات از داروهای مهارکننده لیپاز هستند که با برقراری پیوند کووالان با جایگاه فعال آنزیم آن را به صورت برگشت ناپذیر مهارمی‌کنند [۹،۱۲]. فرضیه‌ای که به عنوان پشتوانه این تحقیق قرار گرفته است، احتمال بروز عوارض جانبی کمتر در صورت استفاده از ترکیبات مهار کننده غیر کووالان است، و ترکیبات آروماتیک مختلف با این دیدگاه مورد مطالعه قرار گرفته اند.

روش‌ها

وسائل و تجهیزات شامل اسپکتروفوتومتر شیمادز و UV-1800، ترازوی آنالیتیک، دستگاه pH متر Jenway، هیتر استیرر و نرم‌افزارهای مورد استفاده شامل MOE 2010.10، Auto Dock Vina، MGL TOOLS می‌باشند.

مواد

فسفات پتاسیم $KH2PO_4$، هیدروژن کلرید، هیدروکسید سدیم، محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO)، از مرک (Merck; Darmstadt) تهیه شده‌اند و لیپاز پانکراتیک خوک (PPA)، پارا نیتروفنیل استات (PNPA)، متانول، استراگول، یدیپامید، وانیلیل نونامید، وانیلیل استون، تایمول، نوردی هیدرو گوارتیک اسید از شرکت سیگما (Sigma, St Louis) خریداری شده‌اند.

روش‌های تجربی

این تحقیق با یک سوبسترای صناعی انجام گرفته است؛ در هر بخش یک مهارکننده متفاوت با آنزیم مشترک لیپاز پانکراس خوکی استفاده شده است. بافر مورد استفاده، بافر فسفات حاوی KH2PO4: 100mM و pH: 7.2±0/01، بود.

در این نوع روش سنجش کینتیکی می‌توان همزمان با پیشرفت واکنش، تغییرات آن را پیگیری و دنبال نمود. این به دلیل آن است که سوبسترا یا محصول رنگی دارند که در اسپکتروفومتر جذب آن خوانده می‌شود. در استفاده از سوبسترای صناعی لیپاز چنین امکانی فراهم شده است [۷]. هنگام بررسی اثر ترکیبات روی آنزیم در حضور سوبسترای پارانیتروفنیل- استات محصول پارا نیتروفنل آزاد می‌شود که در ۴۱۰ نانومتر جذب دارد. پیگیری آزمایش کینتیک، محاسبه فعالیت، محاسبه K_m و رسم منحنی‌ها در دستگاه اسپکتروفوتومتر شیمادزو UV-1800 انجام شد.

فعالیت باقیمانده نمونه (پس از مجاورت) به صورت درصدی از فعالیت نمونه کنترل بیان شده است. تمام تست‌ها سه بار انجام شد. SD و CV محاسبه شد و نتایجی با CV≤ 5/5 (سوبسترای صناعی) و CV≤ ۶ (نشاسته) قابل قبول تلقی شده‌اند.

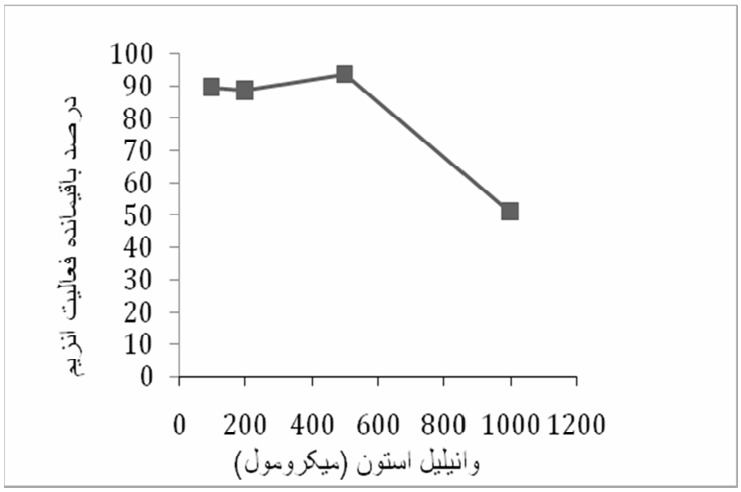
داکینگ (Docking)

داکینگ با Auto dock vina انجام شد [۱۳]. فایل 2L3L.pdb ابتدا پردازش شد: مولکول‌های اضافی همراه آنزیم نظیر حلال حذف شدند و ساختار پروتونه شده برای pH خنثی تنظیم شد. محفظه مکعبی شکلی(Grid box) با ابعاد ۷۰×۸۰×۶۸ با فضایی ۱ آنگستورمی و مرکز مکعب تعریف شد. ۱۰۰ جایگیری برای ترکیبات آروماتیک فوق به دست آمد.

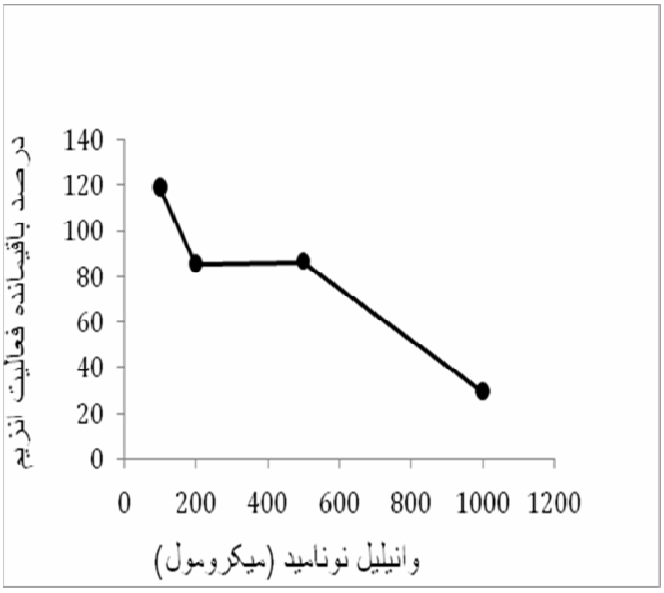
یافته‌ها

قبلاً از لیپستاتین و مشتق اشباع شده آن اورلیستات اثر مهاری بر روی لیپاز پانکراتیک مشاهده شده است [۹،۱۲]. در اینجا با توجه به حضور گروه آروماتیک در جایگاه فعال

آنزیم (هیستیدین ۲۶۴) و احتمال بر هم کنش ترکیبات آروماتیک دیگر با این گروه، اثر تعدادی از مشتقات آروماتیک مشابه برروی فعالیت لیپاز بررسی شد. اولین سری آزمایش‌ها با استفاده از سوبسترای صناعی پارا نیترو فنیل استات انجام شد. در بعضی غلظت‌های ترکیبات فوق، اثری مهاری بر فعالیت آنزیم مشاهده شد. غلظت‌های مورد استفاده به طور متوسط از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار از همه لیگاندها انتخاب شدند تا اثر آنها در حضور سوبسترای صناعی بررسی شوند. نتایج در شکل‌های ۱-۴ نشان داده شده است. غلظت‌های مختلف این ترکیبات با آنزیم مجاور شدند و جذب محصول به عنوان نشانگر فعالیت آنزیم پیگیری شد و بر اساس آن فعالیت آنزیم محاسبه شد. نمونه کنترل با فعالیت صد در صد و بقیه فعالیت‌شان به نسبت کنترل محاسبه شد. در مورد وانیلیل استون و وانیلیل نونامید با افزایش غلظت، میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد و این کاهش فعالیت در مورد وانیلیل نونامید محسوس‌تر و مناسب‌تر است (شکل ۱ و ۲).

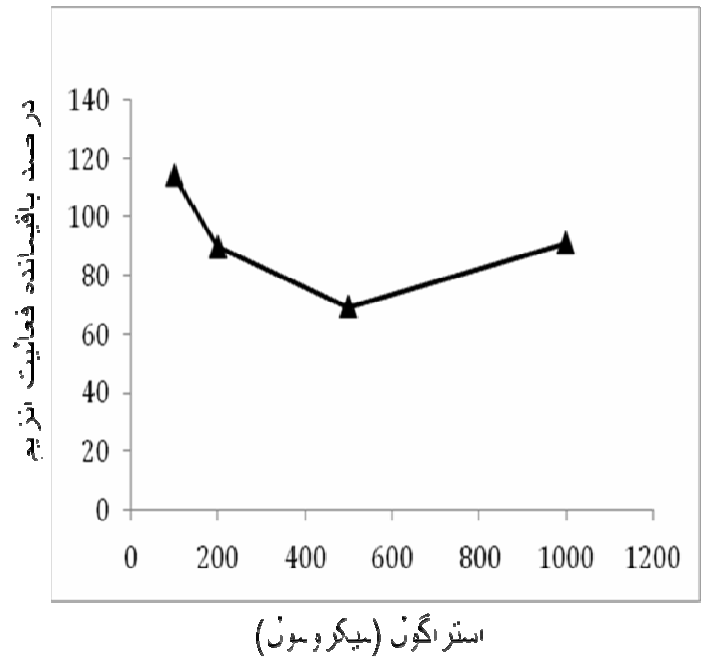


شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف وانیلیل استون بر لیپاز



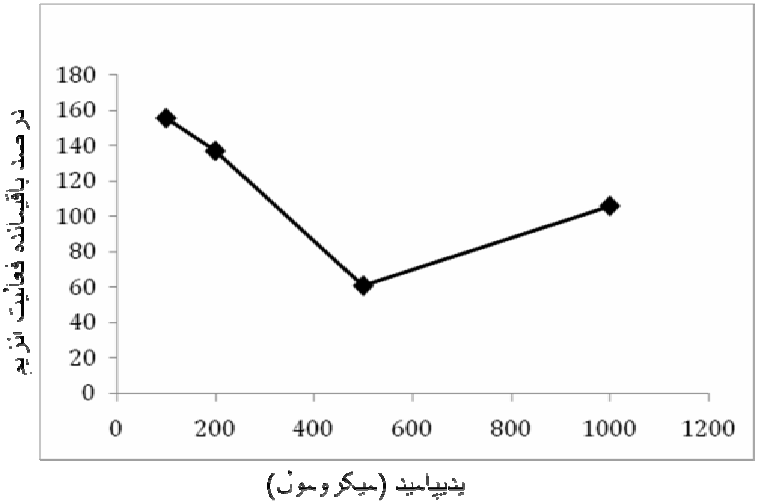
شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف وانیلیل نونامید بر لیپاز

در مورد استراگول، کاهش فعالیت آنزیم تا حدود ۸۰٪ فعالیت اول آن دیده می‌شود (شکل ۳)



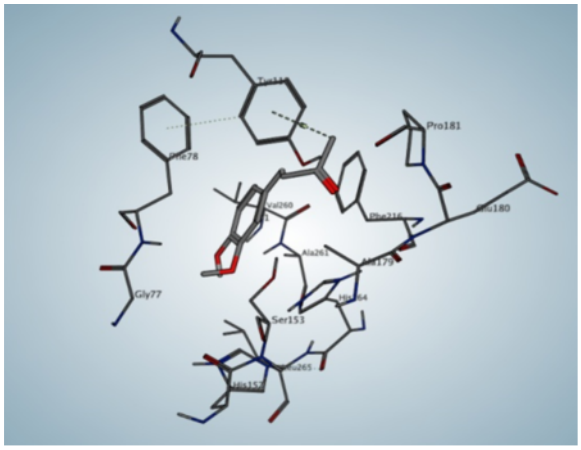
شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف استراگول بر لیپاز

در مورد یدیپامید، در غلظت‌های پایین‌تر، افزایش فعالیت آنزیم مشاهده می‌شود، و با افزایش غلظت ترکیب، تاثیر مهاری مختصری بوجود می‌آید(شکل۴)

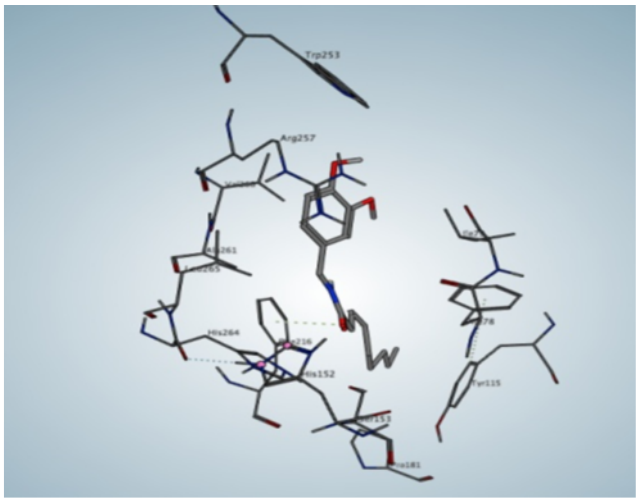


شکل ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف یدیپامید بر لیپاز

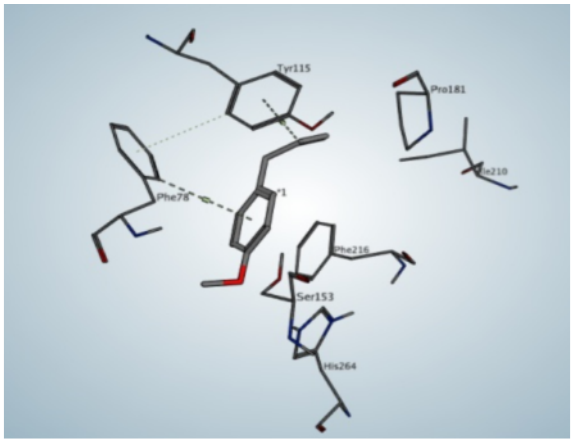
برای درک چگونگی تعامل ترکیبات آروماتیک فوق بر لیپاز، داکینگ انجام شد. با استفاده از روش داکینگ، بدون تعریف محلی خاص برای اتصال لیگاند برای نرم‌افزار، محل اتصال احتمالی در سطح آنزیم پیدا شد. محل فرضی اتصال لیگاندها در این محل در شکل نشان داده شده‌اند (شکل۸-۵).



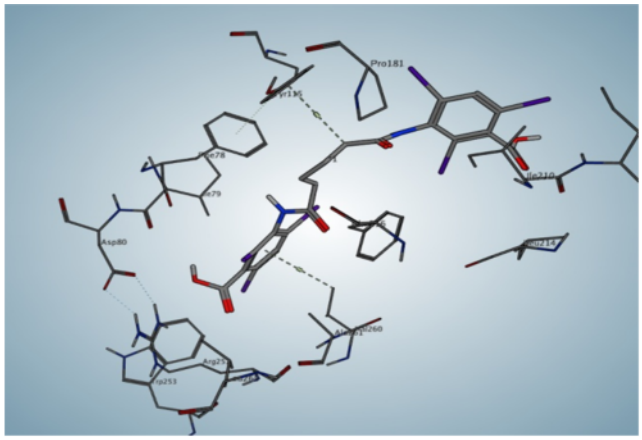
شکل ۵- برهم کنش‌های احتمالی وانیلیل استون با لیپاز



شکل ۶- برهم کنش‌های احتمالی وانیلیل نونامید با لیپاز



شکل ۷- برهم کنش‌های احتمالی استراگول با لیپاز



شکل ۸- برهم کنش‌های احتمالی یدیپامید با لیپاز

بحث

ترکیبات دارای ساختار آروماتیک به عنوان موثر در کاهش وزن گزارش شده‌اند و در برخی موارد احتمال داده می‌شود این ترکیبات بواسطه کاهش بیان آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم چذبی‌ها این نقش را ایفا کنند (۱۴،۱۵). ترکیب دیگری که اخیرا به عنوان مهار کننده لیپاز مطرح شده‌اند ترکیبات ترپنی موجود در جینکو بیلوبا می‌باشند (۱۶). لیکن به نظر نمی‌رسد در مورد ترکیبات ساده آروماتیک نظیر استراگول و وانیلیل نونامید گزارشی در مورد تاثیر مهار کنندگی بر آنزیم لیپاز موجود باشد. بررسی بیشتر در مورد محل برهم کنش احتمالی این ترکیبات با آنزیم می‌تواند در پیشنهاد ترکیبات بالقوه موثرتر کمک کننده باشد. ناحیه‌ای که با روش داکینگ یافت شده است، نزدیک به جایگاه فعال سه تایی کاتالیتیک آنزیم است، که محل اتصال مهار کننده‌های گزارش شده آنزیم لیپاز نیز می‌باشد [۱۷]. هر ترکیب مهارکننده با پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبیک به جایگاه فعال لیپاز متصل می‌شود. تقریباً در مورد تمامی مهارکننده‌های پیشنهادی اسیدهای آمینه مشابه‌ای در برهمکنش با آنزیم عمل می‌کنند. به عنوان مثال امینو اسیدهای تیروزین ۱۱۵، فنیل آلانین ۲۱۶، فنیل آلانین ۷۸ و همچنین در بعضی موارد هیستیدین ۲۶۴ در اطراف لیگاند و در برهمکنش با آن قراردارد.

استراگول از جهت اینکه اندازه کوچکی دارد و با امکان چرخش حلقه می‌تواند در جایگاه بهتری در ساختار آنزیم قرار گیرد مهارکننده بسیار خوبی به شمار می‌رود اما مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که تاثیراین ترکیب بر روی آنزیم وابسته به غلظت نیست. همچنین در مطالعه انجام گرفته اسید آمینه کلیدی در برهمکنش با مهارکننده فنیل آلانین ۷۸ می‌باشد این ترکیب همچنین دارای برهمکنش با تیروزین ۱۱۵، فنیل آلانین ۲۱۶، هیستیدین ۲۶۴نیز می‌باشد. وانیلیل استون هم مانند استراگول مولکول کوچکی است و تقریبا در وضعیت مشابهی نسبت به آن به سر می‌برد اما این ترکیب دارای تاثیر قوی‌تری است و احتمال دارد که در غلظت‌های بالاتر بتواند تاثیر مهارکنندگی بیشتری نشان دهد. در مدلسازی مولکولی برهمکنش این ترکیب با تیروزین ۱۱۵ از آنزیم مشاهده می‌شود. در یدیپامید با وجود بزرگ بودن لیگاند و داشتن ۲حلقه بنزنی دارای ۶گروه ید است که طبق نتیجه داکینگ، در معرض حلال و برهمکنش با آن قرار می‌گیرد. در مدلسازی مولکولی برهمکنش آن با والین ۲۶۰ و تیروزین ۱۱۵ مشاهده می‌شود. وانیلیل نونامید هم دارای برهمکنش با مولکول‌های حلال است اما اثر آن وابسته به دوز بوده و در مدلسازی مولکولی برهمکنش آن با فنیل آلانین ۲۱۶ مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد وانیلیل نونامید و وانیلیل استون دارای اثر مهاری محسوس‌تری نسبت به دو ترکیب دیگر بر روی آنزیم لیپاز می‌باشند به نظر می‌رسد دلیل این موضوع به نحوه جایگیری این دو ترکیب در جایگاه فعال آنزیم و برهمکنش مناسب با آمینو اسیدهای این جایگاه است. در مدلسازی مولکولی انجام شده این دو ترکیب برای مطالعه اثر مهاری آنها بر روی آنزیم همانطور که در

شکل ۲ نشان داده شده است آمینو اسیدهای فنیل آلانین ۲۱۶، والین ۲۶۰، سرین ۱۵۳، هیستیدین ۲۶۴ و فنیل آلانین ۷۸ در مورد وانیلیل استون در جایگاه مناسبی نسبت به این لیگاند قرار گرفته‌اند و به نظر می‌رسد در صورتی که آنزیم در مدت زمان بیشتری در معرض مهارکننده قرار بگیرد با تغییر موقعیت قرارگیری آن نسبت به آنزیم امکان برقراری پیوند با هر یک از آمینو اسیدهای فوق وجود دارد در مورد وانیلیل نونامید نیز آمینو اسیدهای والین ۲۶۰، سرین ۱۵۳، هیستیدین ۲۶۴ و فنیل آلانین ۷۸ در موقعیت نسبتاً مناسبی نسبت به لیگاند قرار دارند و این احتمال وجود دارد که در اثر گذشت زمان با تغییر موقعیت جایگیری مهارکننده نسبت به آنزیم با هریک از آمینو اسیدهای فوق پیوند برقرار کنند. این موضوع یعنی قرارگیری مناسب این آمینو اسیدها در فاصله مناسب با مهارکننده در مورد سایر مهارکننده‌های مطالعه شده مشاهده نشد. اما مطالعه و بررسی برگشت پذیری و یا برگشت ناپذیری این نوع مهار بر روی آنزیم فوق مستلزم مطالعات آزمایشگاهی دقیق‌تر می‌باشد.

مطالعه حاضر احتمال تاثیرگذاری ساختارهای آروماتیک کوچک را به عنوان مهارکننده‌های آنزیم لیپاز نشان داده است. با توجه به تفاوت موجود بین نحوه تاثیر وانیلیل استون و وانیلیل نونامید می‌توان احتمال داد که اندازه و گروه جانبی موجود در وانیلیل نونامید بتواند دلیل تاثیر بیشتر آن بر آنزیم لیپاز باشد. لذا انجام مطالعات بیشتر بر مشتقات این ترکیب گام بعدی در این سلسله تحقیقات خواهد بود.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب یک طرح مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

مأخذ

1. Colin DY, Deprez-Beauclair P, Allouche M, et al. (2008). "Exploring the active site cavity of human pancreatic lipase.". *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370 (3): 394–8.
2. Bier M., (1955). Lipases. In: S.P. Colowick, N.O. Kaplan (Editors). *Methods in Enzymology Academic Press* 1955; 627-642.
3. Lowe ME (1997). "Structure and function of pancreatic lipase and colipase."*Annu Rev Nutr* 1997; 17: 141–58.
4. Terzyan S, Wang, C, Downs B (2000) Crystal structure of the catalytic domain of human bile salt activated lipase**.** *Protein Sci* 2000; 9:1783-90.
5. Chahinian H, Sias B, Carriere F (2000). "The C-terminal domain of pancreatic lipase: functional and structural analogies with C2 domains." *Curr Protein Pept Sci* 2000; 1: 91–103.
6. Benkouka F,Guidoni AA,De Caro JD,Bonicel JJ, Desnuelle PA, Rovery M Porcine Pancreatic Lipase. *European Journal of Biochemistry* 11982; 28:331-341.
7. Sémériva,M., Chapus,C., Bovier,C. , Desnuelle,P. The transient formation of an acetyl enzyme intermediate during the hydrolysis of para-nitrophenyl acetate by pancreatic lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2006; 58:28-38.
8. Scheen AJ. Cardiovascular risk-benefit profile of sibutramine. *Am J Cardiovasc Drugs* 2010; 10:321-34.
9. Heck AM; Yanovski JA; Calis KA. Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacother* 2000; 20:270-279.
10. McDougall, G.J. and Stewart, D. The inhibitory effects of polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors* 2005; 23:1-7.
11. McDougall, G.J., Kulkarni, N. and Stewart, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chemistry* 2009; 115:193–199.
12. Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by Streptomyces toxytricini. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *International Journal of Obesity* 1987; 40:1081-1085.
13. Trott O, Olson AJ AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010; 31:455–461.
14. Ikarashi N, Toda T, Okaniwa T, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K. Anti-Obesity and Anti-Diabetic Effects of Acacia Polyphenol in Obese Diabetic KKAy Mice Fed High-Fat *Diet Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 2011; 952031
15. Lee MS, Kim CT, Kim Y. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in

adipose tissue of diet-induced obese mice. *Ann Nutr Metab* 2009; 54:151-7.

16. Bustanji, Y., Ihab, M., Mohamad, M., Hudaib, M., Tavaha K.H. Pancreatic Lipase Inhibition Activity of Trilactone Terpenes ofGinkgo biloba. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2010; 26:453-459.
17. Hermoso J, Pignol D, Kerfelec B, Crenon I, Chapus C, Fontecilla-Camps JC. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monooctyl ether complex. *J Biol Chem* 1996; 271:18007-18016.