

## بررسی کموانفورماتیکی و اندازه گیری فعالیت آزمایشگاهی لیگاندهای ممانعت کننده آنزیم سیکلواکسیژناز دو $Cox_2$ انسانی

سیده فاطمه موسوی<sup>۱\*</sup>، علی رمضانی<sup>۲</sup>، پرویز اشتربی<sup>۳</sup>، فاطمه کشاورزی<sup>۱</sup>

- (۱) گروه زیست شناسی، واحد سندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سندج، ایران  
 (۲) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران  
 (۳) پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۶

### چکیده

**مقدمه:** مهارکننده های انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز دو، نظیر سلوکوکسیب، روفوکوکسیب و والدوکسیب اخیراً به عنوان کاهنده های پاسخ های التهابی به کار می روند، با وجود این هنوز به مطالعات و تحقیقات بیشتری در زمینه مهارکننده های انتخابی  $Cox_2$  نیاز است. این مطالعه در راستای معرفی ساختارهای جدید با میل ترکیبی بیشتر به آنزیم  $Cox_2$  می باشد.

**مواد و روش ها:** ساختارهای شبیهای با ۸۰ درصد شباهت به سلوکوکسیب، از Pubchem در پایگاه اطلاعاتی NCBI استخراج و جمع آوری شد. فایل PDB آنزیم  $Cox_2$  (6COX) را در حالت پیوند با لیگاند SC-558 به عنوان لیگاند مرجع، از سایت RCSB PDB به دست آمد. داکینگ لیگاندها به جایگاه اتصال SC-558 را با استفاده از نرم افزار FlexX، Lead IT اجرا شد و انرژی میان کنش های بین ترکیبات مختلف به دست آمد. مقدار IC<sub>50</sub> ترکیبات مورد نظر با استفاده از روش غربالگری آزمایشگاهی، بر علیه آنزیم  $Cox_2$  تعیین شد. سرانجام با استفاده از روش سنجش MTT، میزان سمیت سلولی ترکیبات مورد نظر تعیین شد.

**یافته های پژوهش:** نتیجه غربالگری در پایگاه داده Pubchem .5000 مولکول مشابه سلوکوکسیب بود. ۲۴ تا از ترکیبات امتیازهای انرژی بهتری نسبت به 6COX 5band شده با SC-558 داشتند. لیگاندها به پاکت پیوندی داک شدند که با سرین ۳۵۳، آلانین ۵۲۷، والین ۵۲۳، متیونین ۵۲۲، فنیل آلانین ۵۱۸ و لوسین ۳۵۲ میان کنش نشان دادند. با بررسی چشمی، ترکیبات جهت گیری و حالت پیوندی مشابه با SC-558 نشان دادند.

**بحث و نتیجه گیری:** یافته های ما، رویه محاسباتی کشف ترکیبات جدید ضدالتهابی با فعالیت بیشتر و سمیت کمتر نسبت به مهارکننده های عمومی  $Cox_2$  را قوت بخشید.

**واژه های کلیدی:** آنزیم سیکلواکسیژناز دو، مهارکننده انتخابی سیکلواکسیژناز دو، داکینگ، روش سنجش MTT

\* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد سندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سندج، ایران

Email: gol.keshavarzi@gmail.com

## مقدمه

به عنوان یک هدف دارویی زیر سوال است(۲،۳). نوعی از داروهای ضد التهاب، استروئیدها یا کورتیکواستروئیدها هستند که به اختصار به آن‌ها کورتون هم می‌گویند. عارضه پوکی استخوان در مصرف داروهای کورتیکواستروئیدی یا کورتن‌ها برخلاف داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی بالا است. داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی نظیر ایندومتانین و ایبوپروفن که به کانال هیدروفوبی ایزوژیم‌های سیکلواکسیژناز متصل شده و باعث مهار آن می‌شوند(۴)، جزو شایع ترین داروهایی هستند که از صد سال پیش و به طور گسترده‌ای برای درمان التهاب، درد، تب و برای جلوگیری از ترومبوزیس به کار برده می‌شوند. مکانیسم اثر NSAID یا Nonsteroidal anti-inflammatory drugs بر پایه مهار کنندگی آنزیم‌های سیکلواکسیژناز می‌باشد. انواع داروهای غیر استروئیدی بر اساس این که Cox<sub>1</sub> و Cox<sub>2</sub> را به طور هم زمان مهار کنند یا تنها Cox<sub>2</sub> را مهار کنند، به دو دسته تقسیم می‌شوند: داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی انتخابی، ضد التهاب‌های غیر استروئیدی غیر انتخابی که این داروها هر دو ایزوژیم Cox را به طور هم زمان مهار کنند(۵). آسپیرین تنها مهار کننده سیکلواکسیژناز است که با آن اتصال کووالانسی (استیلاسیون) برقرار می‌کند. استیلاسیون اسید آمینه سرین ۵۳۰ مانع از اتصال آراشیدونیک اسید به جایگاه فعال و در نتیجه مهار برگشت ناپذیر آنزیم می‌شود(۶). داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی Cox<sub>2</sub> انتخابی تحت عنوان مهار کننده‌های انتخابی شناخته می‌شوند و اتصال آن‌ها به Cox<sub>1</sub> ضعیف و برگشت پذیر است. مهار شدن ترجیه‌ی Cox<sub>2</sub> ناشی از فضای اضافی در کانال هیدروفوبی Cox<sub>2</sub> است. داروهایی مثل سلوکوکسیب، والدوکوکسیب، اتوریکوکسیب، روکوکسیب و SC57666 و... از مهار کنندگان انتخابی Cox<sub>2</sub> هستند. بسیاری از مهار کننده‌های انتخابی Cox<sub>2</sub> به کلاس ترکیبات دی‌آریل هتروسیکل تعلق دارند. ساختار مشترک بین این ترکیبات، حضور دو حلقه آریلی مجاور است که به یک موتیف کربوسیکلیک یا هتروسیکلیک مرکزی ۵ یا ۶ عضوی متصل می‌شوند(۷). از آن جایی که مکانیسم

التهاب قسمتی از پاسخ سیستم دفاع ایمنی بدن است. گاهی التهاب برای بدن مفید است و در مواردی ممکن است مضر باشد. التهاب، در نتیجه پاسخ بدن به یک آسیب فیزیکی، شیمیایی و یا بیولوژیک، مواد شیمیایی از سلول‌های بدن آزاد می‌شوند و تعییرات در بافت بدن به وجود می‌آید. در نتیجه این تعییرات عامل آسیب از بدن حذف شده و آسیب وارد شده به بدن ترمیم می‌گردد. التهاب نشانه عفونت نیست حتی موقعی که یک عفونت موجب التهاب می‌شود. عفونت به علت یک ویروس، باکتری یا قارچ ایجاد می‌شود ولی التهاب پاسخ بدن نسبت به آن است. از علائم التهاب درد ناشی از آزاد شدن مواد شیمیایی خاص از سلول‌های صدمه دیده و گلبول‌های سفید و تاثیر این مواد بر روی عصب‌های درد، قرمزی به علت گشاد شدن عروق خونی کوچک در بافت ملتهب و در نتیجه پرخونی ناحیه، بی حرکتی، تورم ناشی از تجمع مایع در فضای بین سلولی و گرمی می‌باشد(۱). از جمله واسطه‌های کلیدی التهاب، محصولات ایکوزانوئیدی مانند PGE2، پروستاسایکلین و ترومبوکسان A2 را می‌توان نام برد. این محصولات در نتیجه تاثیر آنزیم‌هایی از قبیل سیکلواکسیژنازها بر آراشیدونیک اسید حاصل می‌شوند. آنزیم‌های سیکلواکسیژناز، آنزیم کلیدی در تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین‌ها می‌باشند. در پستانداران دو ایزوفرم از این آنزیم، به نام Cox<sub>1</sub> و Cox<sub>2</sub> وجود دارد که شباهت‌های فراوان ساختاری دارند. آنزیم دارای دو جایگاه فعال پراکسیدازی و سیکلواکسیژنازی در دو طرف گروه پروستاتیک «هم» می‌باشد. یعنی جایگاه سیکلواکسیژناز مسئول تبدیل آراشیدونیک اسید به هیدروکسی اندوپراکسید است و جایگاه فعال پراکسیدازی از همی تشکیل شده است که مسئول اجای پروستاگلاندین G2 به پروستاگلاندین H2 است. فسفولیپاز A<sub>2</sub>، اسید آراشیدونیک را از فسفولیپیدهای غشایی جدا می‌کند. آراشیدونیک اسید آزاد شده طی مراحلی با واسطه ایزوآنزیم‌های سیکلواکسیژناز Cox<sub>1</sub> و Cox<sub>2</sub> به انواع ایکوزانوئیدها تبدیل می‌شود. سومین ایزوفرم این آنزیم به نام Cox<sub>3</sub>

ترکیبات یا مواد با استفاده از الگوریتم اتصالی منفرد بر مبنای شباهت ساختاری، دسته بندی می‌شود. شباهت ساختاری یا امتیاز تانیموتو محاسبه شده از اثر انگشت ساختار دو بعدی و یا شباهت شکل سه بعدی می‌باشد و مختصات سه بعدی به صورت تئوری محاسبه می‌شود.

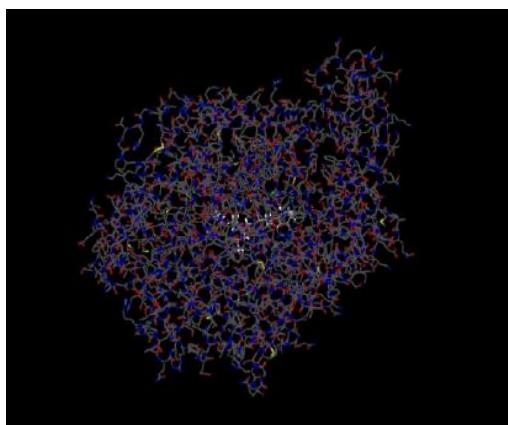
**اجرای داکینگ:** Flex یک برنامه کامپیوتری برای پیشگویی برهم کنش های میان پروتئین و لیگاند است. برای یک پروتئین و لیگاند مفروض، Flex قدرت پیوند و شکل هندسی ترکیب را پیشگویی می‌کند. در اولین نسخه FlexX پروتئین سخت در نظر گرفته می‌شود. بنا بر این پروتئین باید با شکل فضایی که مشابه وضعیت پیوندی است، به نرم افزار داده شود. الگوریتم داکینگ در FlexX بدون دخالت دست عمل می‌نماید. هر چند، گاهی موقع اطلاعاتی در مورد لیگاند یا حتی در مورد کمپلکس اضافه می‌شود. می‌توان این اطلاعات را به صورت دستی در محاسبات وارد کرد. چهار مرحله اصلی دستور کار Flex شامل: ۱- تعریف گیرنده، ۲- ساخت لیگاند و کتابخانه داکینگ، ۳- داکینگ، ۴- تجزیه و تحلیل داکینگ

آماده سازی پروتئین در *Graphical user interface* (GUI): پروتئین، مستقیماً از پایگاه PDB بارگذاری شد. GUI فقط قادر است پروتئین های با فرمت pdb را بخواند. فایل pdb آنزیم  $\text{Cox}_2$ , در حالت باند شده با لیگاند SC-558 از سایت [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), استخراج شد(شکل شماره ۱).

اثر داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی بر پایه مهار هر دو ایزوژیم سیکلواکسیژناز است و از آن جائی که آثار سوء این داروها ناشی از مهار ایزوفرم سیکلواکسیژناز ۱ است، لذا تحقیقات جدید معطوف به شناسایی و تولید مهارکننده های انتخابی-اختصاصی آنزیم سیکلواکسیژناز دو می‌باشد. هدف این مطالعه تعیین کموانفورماتیکی لیگاندهای ممانعت کننده آنزیم سیکلواکسیژناز دو( $\text{Cox}_2$ ) انسانی و اندازه گیری فعالیت آن ها در شرایط آزمایشگاهی به منظور پیدا کردن مهارکننده های جدید جهت توسعه داروهای نو در آینده می‌باشد.

## مواد و روش ها

**غربالگری مجازی:** در غربالگری مجازی ما پروتئین های هدفی در بدن انسان داریم که به دنبال لیگاندهای جدید برای متصل شدن به این پروتئین ها هستیم. هدف از اجرای عملیات غربالگری مجازی، جستجوی ساختارهای شیمیایی مشابه با ساختار شیمیایی سلوکوکسیب که یک مهارکننده اختصاصی شناخته شده آنزیم  $\text{Cox}_2$  می‌باشد، بود. لذا با استفاده از نرم افزار Chem sketch، ساختار سه بعدی شیمیایی مولکول سلوکوکسیب رسم شد. [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) پایگاه اطلاعاتی و زیر مجموعه پایگاه داده NCBI است. از دیگر امکانات این پایگاه ابزاری برای جستجوی سریع ساختارهای شیمیایی مشابه فراهم می‌نماید.



شکل شماره ۱. فایل pdb آنزیم  $\text{Cox}_2$ , در حالت باند شده با لیگاند SC-558. این شکل نمای سه بعدی پروتئین و دیگر مولکول ها و هم چنین محلول های داکینگ را نمایش می دهد.

- محلول متوكسیدسیم با انجلاع(۳۵٪ ۰ گرم، ۱۵/۲ میلی مولار) سدیم در ۷ میلی لیتر متابول بی آب تهیه شد.

- محلول فوق به محلول(۲۵٪ ۱ گرم، ۸/۳ میلی مولار) ۴-متوكسی استوفون و ۱/۵۷ گرم، ۱۳/۸ میلی مولار) دی متیل اگرالات در ۱۵ میلی لیتر متابول بی آب اضافه شد.

- مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت، هم زده شد.

- با اسید کلریدریک ۱ نرمال اسیدی شد.

- به وسیله(۲۰×۳ میلی لیتر) استات اتیل استخراج شد.

- لایه های آلی ترکیب شده، با آب نمک شست و شو داده شد.

- با سولفات سدیم بی آب خشک شد.

- به وسیله تقطری در خلاء، برای تهیه ۰/۷۹ گرم «متیل ۴-۴ متوكسی فنیل)-۲، ۴-دی کتو بوتیرات» تغییظ شد.

- ماده حاصل، بدون تصفیه بیشتر، در مرحله بعد مورد استفاده قرار داده شد.

مرحله دوم

- (۰/۲۳ گرم، ۱ میلی مولار) از ماده حاصل از مرحله اول و (۰/۰ گرم، ۱/۱ میلی مولار) کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، در ۱۰ میلی لیتر متابول مخلوط شد.

- محلول حاصل به مدت ۳ ساعت تحت رفلوکس حرارت داده شد.

- مخلوط حاصل به ۲۰ میلی لیتر آب اضافه شد.

- به وسیله(۲۰×۳) ۲۰ میلی لیتر) کلروفرم استخراج شد.

- لایه آلی مرکب مانند مرحله قبل تیمار شد تا ۰/۳۳ گرم «متیل ۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-متوكسی فنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل روغن زرد رنگ بددهد.

ماده خام به دست آمده بدون تصفیه بیشتر برای مرحله بعد مورد استفاده قرار داده شد.

مرحله سوم

- (۰/۳۰ گرم، ۰/۸۸ میلی مولار) از ماده حاصل از مرحله دوم در ۶ میلی لیتر تترا هیدروفوران حل شد.

- ۲/۲۵ میلی لیتر هیدروکسیدسیم ۱ نرمال، به محلول فوق اضافه شد.

پس از بارگذاری پروتئین، گیرنده تعريف شد. در نام گذاری FlexX، گیرنده عبارت از همه زنجیره ها، کوفاکتورها و اتم ها یا یون های منفرد است که لیگاند به آن ها داک می شود. هر چه پروتئین بیشتری (قطعات بیشتری از پروتئین) نمایش داده شود، بیشتر محتمل است که اتصال غلط انجام شود و یا به عبارتی هر چه پروتئین بیشتری ارائه می شد، به علت این که لیگاند فضای بزرگ تری برای انتخاب پیش رو داشت، بیشتر احتمال اشتباہ سیستم است.

**انتخاب گیرنده:** برای این که زنجیره در عمل داکینگ در گیر شود، روی زنجیره مربوطه کلیک شد.

تعريف جایگاه اتصال: محدوده برش جایگاه اتصال در این قسمت تعیین شد. در اینجا دو روش وجود دارد، یکی استفاده از لیگاندهای به اصطلاح «مرجع» بدین وسیله لیگاند با شکل فضایی پیوند شده آن درک می شد. این کار، با کلیک کردن روی لیگاندی که در فایل mol وجود داشت و یا با بارگذاری از یک فایل pdb خارجی موجود امکان پذیر بود. لیگاند مرجع با کرین های سبز رنگ اسکلتتش تمیز داده می شد، و حالت بعد یک برش کروی با استفاده از یک اتم مرجع است.

**تائید گیرنده:** گیرنده نیاز به یک نام اختصاصی برای استفاده در پردازش های بعدی داشت. در آخر با کلیک finish، گیرنده تعريف شد.

لیگاندها در GUI. لیگاندها با استفاده از منوی FlexX بارگذاری شد، سپس داکینگ در GUI انجام شد.

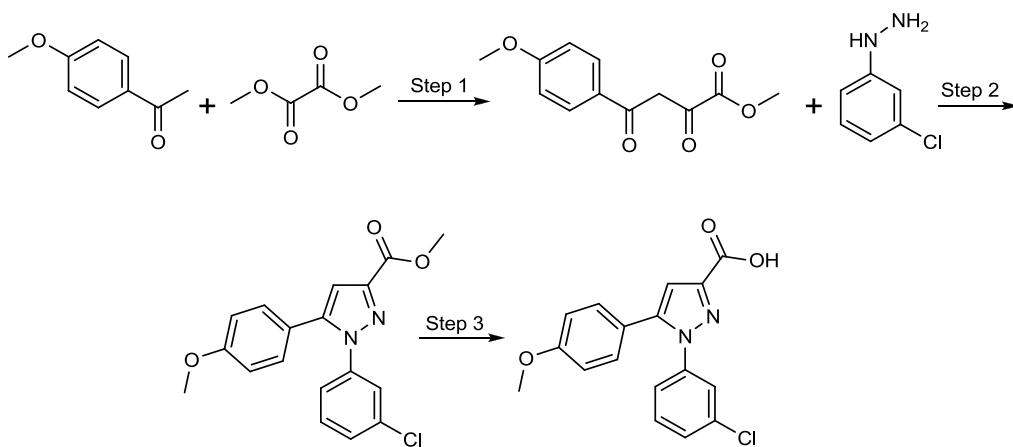
**تجزیه و تحلیل داکینگ:** زمانی که داکینگ کامل شد، همه داده ها به درون GUI وارد و در انتهایی ترین قسمت سیستم ظاهر شدند. می توان حالت ها(Pose) را انتخاب و در بخش نمای 3D مشاهده کرد. بر اساس داکینگ دو ترکیب (داروی ۱ و ۲) با بیشترین امتیاز انتخاب و ساخته شدند و در تمام مراحل سنتز و خالص سازی نهایی از نمونه کنترل استفاده شد.

سنتز مواد

**الف- سنتز ترکیب شماره ۱:**  
۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-متوكسی فنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلیک اسید  
مرحله اول:

- به وسیله ( $3 \times 20$  میلی لیتر) کلروفرم استخراج شد.  
- با لایه آلی مرکب مانند مرحله اول رفتار شد.  
ماده مورد نظر از انجام هر سه مرحله به شکل جامدی سفید رنگ به دست آمد(شکل شماره ۲).

- مخلوط حاصل به مدت ۵ ساعت تحت رفلوکس گرما داده شد.  
- برای خنثی کردن مخلوط،  $1/8$  میلی لیتر اسید هیدروکلریک ۱ نرمال به آن اضافه شد.



شکل شماره ۲. مراحل سنتز داروی شماره ۱

متوكسید سدیم به ۴-متوكسی استوفنون و دی متیل اگزالات اضافه شد. ترکیب حاصل در کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، اضافه شد. به این ترتیب «متیل ۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-پیرازول-۳-کربوکسیلات)» به شکل روغن زرد رنگ به دست آمد.

بوتیرات» تقطیع شد. ماده حاصل، بدون تصفیه بیشتر، در مرحله بعد مورد استفاده قرار داده شد.

## مرحله دوم

- $0/24$  گرم، ۱ میلی مولار) از ماده حاصل از مرحله اول و  $0/20$  گرم،  $1/1$  میلی مولار) کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، در  $10$  میلی لیتر متابول مخلوط شد.  
- محلول حاصل، به مدت  $20$  ساعت تحت رفلوکس حرارت داده شد.

- مخلوط حاصل، به  $20$  میلی لیتر آب اضافه شد.  
- به وسیله ( $20 \times 3$ ) میلی لیتر کلروفرم استخراج شد.  
- لایه آلی مرکب، مانند مرحله قبل تیمار شد تا  $0/39$  گرم «متیل ۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-متوكسی فنیل)-H1-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل روغن زرد رنگ دهد.

ماده خام به دست آمده، بدون تصفیه بیشتر برای مرحله بعد مورد استفاده قرار داده شد.

## مرحله سوم

- $0/30$  گرم،  $0/88$  میلی مولار) از ماده حاصل از مرحله دوم، در  $10$  میلی لیتر متابول حل شد.

ب-روش سنتز ترکیب شماره ۲  
متیل ۱-(۴-متوكسی فنیل)-۵-(۴-کلروفنیل)-H1-پیرازول-۳-کربوکسیلات

## مرحله اول:

- محلول متوكسید سدیم، با اتحلال( $0/35$  گرم،  $15/2$  میلی مولار) سدیم در  $7$  میلی لیتر متابول بی آب تهیه شد.

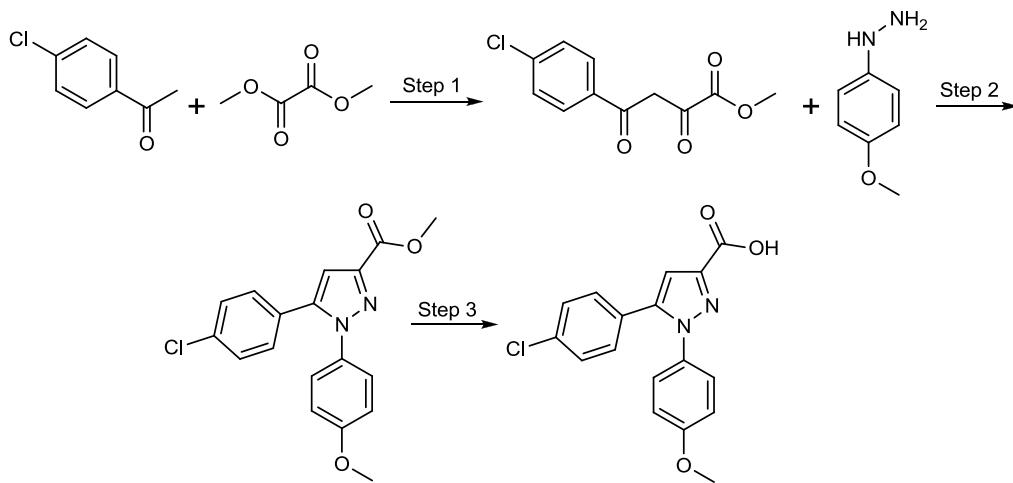
- محلول فوق به محلول( $1/28$  گرم،  $8/3$  میلی مولار) ۴-متوكسی استوفنون و ( $1/57$  گرم،  $13/8$  میلی مولار) دی متیل اگزالات در  $15$  میلی لیتر متابول بی آب اضافه شد.

- مخلوط حاصل به مدت  $24$  ساعت هم زده شد.  
- با اسید کلریدریک ۱ نرمال اسیدی شد.  
- به وسیله ( $3 \times 20$ ) میلی لیتر استات اتیل استخراج شد.  
- لایه های آلی ترکیب شده، با آب نمک شست و شو داده شد.

- با سولفات سدیم بی آب خشک شد.  
- به وسیله تقطیر در خلاء، برای تهیه  $0/98$  گرم «متیل ۴-متوكسی فنیل)-۲،۴-دی کتو

- به وسیله ( $20 \times 3$  میلی لیتر) کلروفرم استخراج شد.  
- با لایه آلی مرکب مانند مرحله اول رفتار شد.  
ماده مورد نظر از انجام هر سه مرحله، به شکل جامدی سفید رنگ به دست آمد(شکل شماره ۳).

۲/۲۵- ۲ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۲ نرمال، به محلول فوق اضافه شد.  
- مخلوط حاصل، به مدت ۵ ساعت تحت رفلوکس گرما داده شد.  
- برای ختنی کردن مخلوط، ۲ میلی لیتر اسیدهیدروکلریک ۱ نرمال به آن اضافه شد.



شکل شماره ۳. مراحل سنتز داروی شماره ۲

موج ۵۹۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر اسکن کننده چند خانه‌ای قرائت و اندازه گیری شد.  
انجام آزمایش  
۱- ۱۶۰ میکرولیتر از بافر سنجش و ۱۰ میکرولیتر از «هم»، به ۳ ول به عنوان ول های «زمینه» اضافه شد.  
۲- ۱۵۰ میکرولیتر از بافر سنجش، ۱۰ میکرولیتر از هم و ۱۰ میکرولیتر از آنزیم  $\text{COX}_2$ ، به عنوان ول های «فعالیت اولیه ۱۰۰ درصد»، به ۳ ول اضافه شد.  
۳- ۱۵۰ میکرولیتر از بافر سنجش، ۱۰ میکرولیتر هم و ۱۰ میکرولیتر آنزیم  $\text{COX}_2$ ، به ۳ ول به عنوان «ول های مهاری» اضافه شد.  
۴- ۱۰ میکرولیتر از مهارکننده، به ول های مهاری و ۱۰ میکرولیتر از حلال مهارکننده، به ول های فعالیت اولیه ۱۰۰ درصد و ول های زمینه، اضافه شد.  
۵- به آرامی پلیت را برای چند دقیقه تکان داده و به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

در گام اول محلول متوكسید سدیم به ۴-متوكسی استوفون و دی متیل اگزالت به متابول اضافه شد. به وسیله تقطری در خلاء، «متیل ۴-(۴-متوكسی فنیل)-۲،۴-دی کتو بوتیرات» تغليظ شد. ماده حاصل و کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، در مخلوط شد و «متیل ۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-متوكسی فنیل)-۱-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل روغن زرد رنگ بدهد.

آزمایش غربالگری به روش رنگ سنجی مهارکننده های سیکلو اکسیژناز گوسفندی (Ovine): در آزمایش غربالگری به روش رنگ سنجی مهارکننده های سیکلو اکسیژناز گوسفندی با استفاده از کیت Cayman، جزء پراکسیدازی آنزیم سیکلو اکسیژناز اندازه گیری شد. فعالیت پراکسیدازی به روش رنگ سنجی و با استفاده از نمایش پیدایش  $N,N,N,N$ -tetramethyl- $\rho$ -phenylenediamine اکسید شده، در طول

۴۰۰ میکروگرم/میلی لیتر از داروها با استفاده از محلول استوک تهیه شد. ۱۲ تا از چاهک های محتوی سلول کشت شده، بدون تیمار و به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سلول ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. هر دوز دارویی به صورت سه تابی در هر سنجش در نظر گرفته شد. برای سنجش به روش MTT به محتویات به دست آمده از چاهک ها، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ ترازوولیوم(۵ میلی گرم/میلی لیتر) در PBS اختفه و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. فورمازان نامحلول تولید شده، در محلول DMSO حل شده و جذب نوری آن، با استفاده از اسپکتروفوتومتر اسکن کننده چند خانه ای در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

درصد سمیت سلولی طبق معادله زیر محاسبه شد:  
(متوسط جذب کنترل منفی / متوسط جذب سلول های تیمار شده): سلول های زنده درصد سلول های زنده درصد-۱۰۰: سمیت درصد IC<sub>50</sub> هر دارو با آنالیز منحنی دوز پاسخ به دست آمد.  
یافته های پژوهش

نتیجه غربالگری مجازی، ۵۰۰ مولکول مشابه سلوكوكسیب بود که تا این ترکیبات بیشترین امتیاز را از داکینگ کسب کردند. لیگاندها که به پاکت پیوندی داک شدن، با اسید آمینه های سرین ۳۵۳، آلانین ۵۲۷، والین ۵۲۳، متیونین ۵۲۲، فنیلآلانین ۵۱۸ و لوسين ۳۵۲ میان کنش نشان دادند(شکل شماره ۴). تا از ترکیبات امتیازهای انرژی بهتری نسبت به 6COX باند شده با SC-558 داشتند(جدول شماره ۱). با بررسی چشمی، ترکیبات، جهت گیری و حالت پیوندی مشابه با SC-558 نشان دادند.

۶- پس از پایان مدت زمان انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر از محلول سوبستراتی رنگ سنج، به تمام ول هایی که استفاده کرده بودیم، اختفه شد.

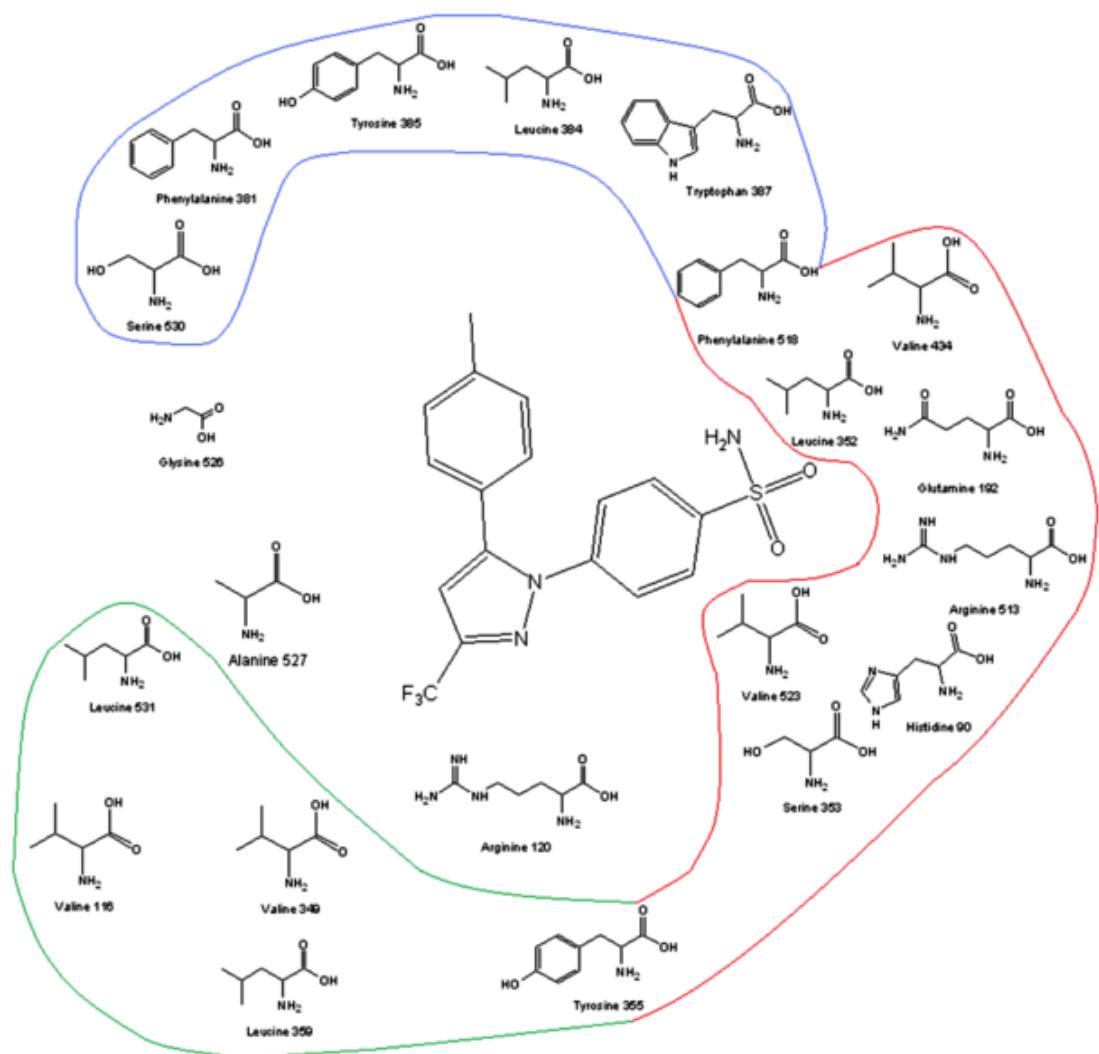
۷- ۲۰ میکرولیتر از محلول آراشیدونیک اسید، به تمام ول هایی که استفاده کرده بودیم، اختفه شد.

۸- پلیت به آرامی برای چند دقیقه تکان داده و به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

۹- با استفاده از دستگاه Plate reader، جذب در ۵۹۰ نانومتر خوانده شد.

روش انجام آزمایش ارزیابی سمیت سلولی از روش های ارزیابی سمیت سلولی ترکیبات شیمیایی استفاده از روشی به نام MTT assay می باشد که میزان مرگ و میر سلول را بعد از یک زمان مشخص مواجه با ترکیبات را نشان می دهد و توان کاهش سلول با استفاده از یک واکنش رنگی اندازه گیری می شود. سلول های زنده می توانند واکنش گر MTT را به یک محصول رنگی به نام فورمازان کاهش دهند. در تمام مراحل سنتز و خالص سازی نهایی از نمونه کنترل استفاده شد.

سلول های رده ۱۹۲۹ موشی از بانک سلول ایران(انیستیتو پاستور)، در محیط کشت RPMI 1640 با مکمل های FCS ۱۰ درصد، گلوتامین ۲ میلی مولار، پنی سیلین و آنتی بیوتیک اسپرپتومایسین، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد شامل ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub> کشت داده شد. سلول های برداشت شده با تریپسین ۰/۲۵ درصد، به وسیله اسلامید نئوبار شمارش شد. سلول ها، در پلیت های ۹۶ چاهکی کشت شد. پس از اختفه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف از داروها، انکوبه شدند. در قدم اول غلظت های ۱/۱۲۵، ۳/۱۲۵، ۶/۱۲۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ و



شکل شماره ۴. برهم کنش لیگاند سلوکوکسیب با جایگاه فعال Cox2

نیلآلانین ۵۱۸ و لوسین ۳۵۲ میان کنش نشان دادند.

لیگاندهایی که به پاکت پیوندی داک شدند، با سرین ۳۵۳، آلانین ۵۲۷، ۵۲۳، والین ۵۲۲، متیونین ۵۲۲ داشتند.

جدول شماره ۱. امتیازدهی ترکیبات، توسط نرم افزار FlexX. این دو ترکیب یعنی داروی شماره ۱ و ۲ بالاترین امتیاز را در داکینگ داشتند.

No.	FlexX SCORE	STRUCTURE	No.	FlexX SCORE	STRUCTURE
2	-31.96		1	-30.26	

ترکیبات سنتز شده، مهارکنندگی خوبی با ارزش ۸۰ IC<sub>50</sub>=nM برای ترکیب شماره ۱ و برای ترکیب شماره ۲ نشان دادند.

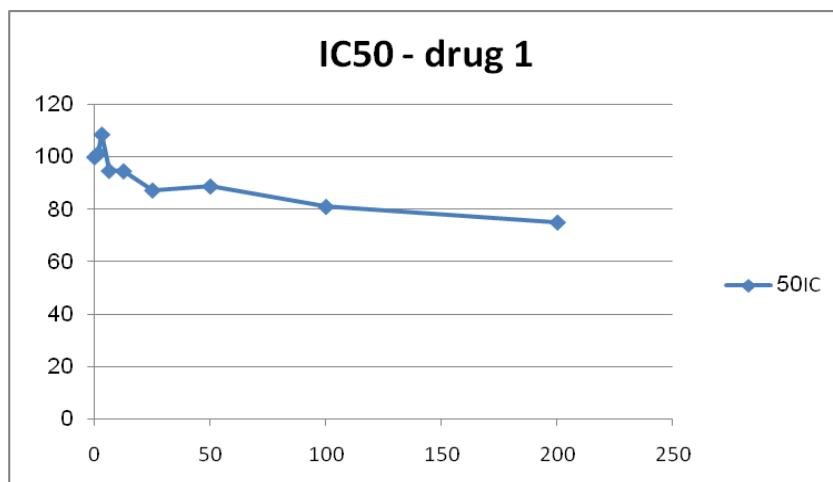
نتایج اندازه گیری سمیت سلولی با افزایش غلظت های دارویی درصد رشد سلولی رو به کاهش گذاشت. IC<sub>50</sub> هر دو دارو < ۲۰۰ µg/ml بود(نمودار شماره ۱ الف و ب). IC<sub>50</sub> سلوکسیب > ۲۰۰ µg/ml بود.

نتایج سنتز

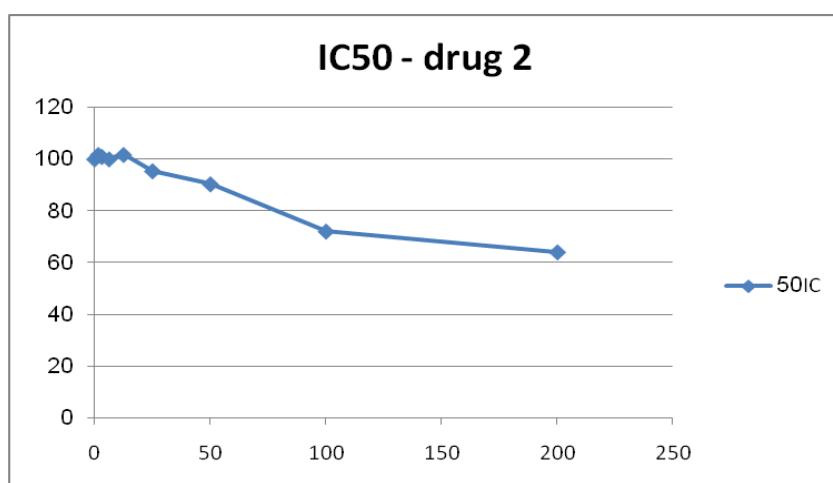
ترکیب شماره ۱، «۳-(۴-کلروفنیل)-۵-(۴-متوكسی فنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلیک اسید» به شکل جامدی سفید رنگ به دست آمد.

ترکیب شماره ۲، «متیل ۱-(۴-متوكسی فنیل)-۵-(۴-کلروفنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل جامدی سفید رنگ به دست آمد.

نتیجه غربالگری با آنزیم های گوسفندری



نمودار شماره ۱. الف-در نمودار محور عمودی، نمایانگر درصد رشد سلولی و محور افقی نمایانگر غلظت دارویی می باشد. ترکیب شماره ۱ مهارکنندگی با IC<sub>50</sub>=80 nM دارد.



نمودار شماره ۱. ب-در ترکیب شماره ۲ مهارکنندگی با IC<sub>50</sub>=100 nM بود

## بحث و نتیجه گیری

ترکیبات مهارکننده های  $Cox_2$  بودند(۹). هم چنین، غربالگری مجازی با استفاده از تکنیک داکینگ انجام شد. به طوری که ترکیبات طراحی شده برای پیشگویی این که آیا ترکیبات جدید مدل های پیوندی مشابه با مهارکننده های اسبق  $Cox_2$  دارند یا خیر، به داخل جایگاه اتصال آنزیم  $Cox_2$  داک شدند. مطالعات داکینگ ترکیبات جدید به درون جایگاه فعال  $Cox_2$  حالت پیوندی مشابهی با SC-558 که یک مهارکننده انتخابی  $Cox_2$  است، نشان داد(۱۰). با استفاده از داکینگ پیشنهاد شد که بخش آریل هیدرازون که پاکت جانبی را در جایگاه فعال  $Cox_2$  پر می کند، در انتخابگری این مواد دخیل است و داربست مناسبی برای مهار آنزیم  $Cox_2$  است(۱۱)، نتایج ما با کارهای ذکر شده مغایرتی ندارد. افشین زرقی و همکاران، گروهی از مشتقات ۱ و ۳ دی آریل اوره را برای سنجش و ارزیابی مهارکنندگی انتخابی بر علیه آنزیم  $Cox_2$ ، سنتز کردند. از بین ترکیبات، «۱-(۴-متیل سولفونیل فنیل)-۳-(۴-متیل اکسی فنیل) اوره» به عنوان مهارکننده قوی  $Cox_2$  با ( $\mu IC_{50}=0.11$  g) مشابه با داروی سلکوکسیب به عنوان داروی مرجع بود(۱۲). این نتایج با نتایج کار ما مشابه بود. *Yasemin Duñdar* مشتقات ۴،۵-دی فنیل اکسازولون را سنتز کردند. از میان ترکیبات سنتز شده، فقط «۴-(۴-فنیل-۳-متیل-۲-اکسو-۳-H۳-۱،۳-اکسازول-۵-یل) بنزن سولفونامید»، خاصیت مهارکنندگی انتخابی خوبی با  $IC_{50} = 2 \mu M$ ، در حین آزمایش آنزیم تخلیص شده، از خود نشان داد. هم چنین ترکیب مذکور مهار کنندگی خوبی بر علیه  $Cox_2$  در آزمایش خون کامل انسانی از خود نشان داد. مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که این ترکیب می تواند به جایگاه اتصال  $Cox_2$  داک شود که این امر پایه و مبنای فعالیت آن را به دست داد. سایر ترکیبات، فعالیت مهارکنندگی معنی دار و قابل توجهی نشان ندادند(۱۳). استامینوفن که دارویی ضد درد و تب است و طول اثر ۴ ساعت داشته و عمدهاً توسط کبد متabolیسم شده ولی حدود ۵ درصد آن به یک متabolیت شدیداً سمی به نام P مکانیسم ۴۵۰ تبدیل می شود که یک عامل عمدۀ

این مطالعه در راستای معرفی ساختارهای جدید با میل ترکیبی بیشتر به آنزیم  $Cox_2$  بود. به این ترتیب با استفاده از تکنیک غربالگری مجازی ساختارهای با تشابه ۸۰ درصدی با سلوکوکسیب استخراج شد. نتیجه ۲۴ غربالگری، ۵۰۰۰ مولکول مشابه سلوکوکسیب بود. تا از ترکیبات امتیازهای انرژی بهتری نسبت به 6COX به جایگاه اتصال SC-558 اجرا شد. دو تا از مشتقات یعنی ۱،۵-دی آریل پیرازول ها که بیشترین امتیازات را از داکینگ مولکولی کسب کردند، شامل «۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-متوكسی فنیل)-۱پیرازول-۳-کربوکسیلیک اسید» و «متیل ۱-(۴-متوكسی فنیل)-۵-(۴-کلروفنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» با بهترین داکینگ، سنتز شدند. مقدار  $IC_{50}$  ترکیبات مورد نظر، با استفاده از روش غربالگری آزمایشگاهی بر علیه آنزیم  $Cox_2$  تعیین شد.  $IC_{50}=100, 80 \text{ nM}$  به دست آمد که در مقایسه با سلوکوکسیب به عنوان داروی مرجع، مهارکنندگی خوبی در برابر  $Cox_2$  نشان دادند. *Bakhle* یک سری از مشتقات ۱،۵-دی آریل تترازول ها را سنتز و آماده کردند و به عنوان مهارکنندگی انتخابی جدید داد. قوی ترین مهارکننده های  $Cox_2$ ، مورد بررسی قرار داد. قوی ترین مهارکننده  $Cox_2$ ، کمترین میزان  $\mu M$  را در میان تترازول ها دارد. هر چند قدرت مهارکنندگی این ترکیبات بسیار کمتر از سلوکوکسیب به عنوان داروی مرجع بود. سپس قوی ترین ترکیب، در مطالعات داکینگ مورد استفاده قرار گرفت(۸). Pink مشتقات جدید آریل هیدرازون و یک سری از مشتقات ۱ و ۵ دی فنیل پیرازول ها را سنتز کرد. ترکیبات جدید سنتز شده، از نظر فعالیت ضدالتهابی و قدرت مهارکنندگی آنزیم  $Cox_2$ ، در بدن موجود زنده، مورد آزمایش قرار گرفتند. فعالیت مهارکنندگی این ترکیبات در آزمایشگاه بر علیه  $Cox_2$  گوسفندی اندازه گیری شد. تست های  $Cox_1$  و یولوژیکی نشان دادند که ترکیبات جدید با فعالیت مهارکنندگی کمتر از دیکلوفناک فعال بودند. بعضی از ترکیبات مهارکنندگی آزمایشگاهی قابل قبولی با  $IC_{50}=0.45 \mu M$  بر علیه  $Cox_2$  نشان دادند این

برای  $\text{Cox}_2$  باشند. پیرازول ها با جانشینی مناسب که می تواند پاکت جانبی را پر کرده و با ریشه های نسبتاً قطبی از قبیل گلوتامین ۱۹۲ و آرژینین ۵۱۳ میان کنش دهد، می توانند مولکول های مناسبی برای پیشنهاد به عنوان مهارکننده های اختصاصی  $\text{Cox}_2$  باشند. یافته های این تحقیق، رویه محاسباتی کشف ترکیبات جدید ضدالتهابی با فعالیت بیشتر و سمیت کمتر نسبت به مهارکننده های عمومی  $\text{Cox}_2$  را قوت بخشد.

اکسیدانت داخل NAPQA سلولی می باشد. در مصرف زیادی این دارو مسیرهای سم زدایی آن اشباع و میزان متابولیت سمی آن زیاد می شود(۱۴)، شکرزاده در تحقیقی روی سلول های سرطانی و استفاده از این ترکیب( $\text{IC}_{50}=18/6\pm1/29$ ) دریافت که مقاومت سلول های سرطانی در ارتباط با سمیت سلولی ایجاد شده کمتر از سلول های نرمال است(۱۴). به نظر می رسد ترکیبات دی آریل پیرازول ها مهارکننده های خوبی

## References

- 1.Albelda SM, Smith CW Ward PA. Adhesion molecules and inflammation injury. *J FASEB* 1994; 8:504-12.
- 2.Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120
- 3.Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, Mcdonald JJ, Stegeman RA, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *J Nature* 1996 384:644-48.
4. Vane J R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like drugs. *J Nat New Biol* 1971;43:232-5.
- 5.Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P. Cyclo oxygenase isoenzymes.How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti inflammatory drugs. *J Drugs* 1997;53:563-82
- 6.Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *J Nature* 1994; 367:243-49.
- 7.Fitzgerald GA, Patrono C. The coxibs,selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Eng J Med* 2001; 345:433-42.
8. Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediat Inflamm* 1996;5:305-23
- 9.Pink R. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *J Nat Rev Drug Discov* 2005;4: 727-4.
- 10.Mcgaughey GB, Sheridan RP, Bayly CI, Culberson JC, Kreatsoulas C, Cornell WD. Comparison of topological, shape, and docking methods in virtual screening. *J Chem Inform Model* 2007;47:1504-19.
- 11.Hawkins PCD, Skillman AG, and Nicholls A. Comparison of shapematching and docking as virtual screening tools. *J Med Chem* 2007; 50:74-82.
12. Dundar Y, Onurdag Fk, Onkol T. Synthesis biological activity of some 3-[(4-amino-5-thioxo-1,2,4-triazol-3-yl) methyl]benzothiazol-2(3h)-one derivatives. *Asian J Chem* 2013;25:225-30.
- 13.Zarghi A, Arfaei S. Selective cox-2 inhibitors a review of their structure-activity relationships. *Iranian J Pharm Res* 2011;10:655-83.
- 14.Shokrzadeh M, HosseiniShirazi F, Saeedisaravi S. Evaluation of cellular toxicity for cisplatin, arsenic and acetaminophen in the cancer and normal cell line. *JSSU* 2007;15:68-73.



## Chemo-Informatics Evaluation and Invitro Bioactivity Mesurment of Human Cox<sub>2</sub> Enzyme Inhibitors Ligands

Mousavi F<sup>1</sup>, Ramazani A<sup>2</sup>, Ashtari P<sup>3</sup>, Keshavarzi F \*<sup>1</sup>

(Received: October 18, 2015)

Accepted: April 14, 2015)

### Abstract

**Introduction:** Cox<sub>2</sub> selective inhibitors such as celecoxib, rofecoxib and valdecoxib are recently used to reduce inflammatory response. There is still a need to develop more potent Cox<sub>2</sub> inhibitors. This study was conducted to introduce new structures with more affinity to Cox<sub>2</sub> enzyme.

**Materials & methods:** Chemical structures with 80% similarity to celecoxib was collected by using PubChem at NCBI database. The PDB file of Cox<sub>2</sub> enzyme (6COX) obtained from RCSB PDB website in binding with ligand SC-558 as reference ligand. Docking of ligands to SC-558 site of Cox<sub>2</sub> performed with lead IT software (version 2.1.0 BioSolveIT, GmbH, Germany) and the interaction energy of different compounds was obtained. IC<sub>50</sub> value of selected compounds identified by using *in vitro* screening against Cox<sub>2</sub>

enzyme. The cytotoxicity assay was performed by using MTT method.

**Findings:** Screening results in PubChem database was 5000 molecules similar to celecoxib. 24 compounds had better energy scores than 6COX bound co-crystallized ligand SC-558. The ligands were docked with the binding pocket that they showed interaction with Leu352, Phe518, Met522, Val523, Ala527 and Ser353. By visual inspection, compounds showed orientation and hybrid mode similar to SC-558.

**Discussion & Conclusion:** our findings strengthened the computational procedure the discovery of new compounds with anti-inflammatory activity and less toxicity than Cox2 general inhibitors.

**Keywords:** Cox<sub>2</sub>, Cox<sub>2</sub> selective inhibitors, Docking, MTT method

1. Dept of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

2. Dept of Biotechnology, faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

3. Radiation Application Research Center, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

\*Corresponding author E-mail: gol.keshavarzi@gmail.com