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

سیده فاطمه موسوی[۱]، علی رمضانی[۲]، پرویز اشتری[۳]، فاطمه کشاورزی[۱*]

۱) گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۲) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۳) پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۵

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 شیمیایی 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_{50} 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، ۵۰۰۰ مولکول مشابه سلوکوکسیب بود. ۲۴ تا از ترکیبات امتیازهای انرژی بهتری نسبت به 6COX باند 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 جهت‌گیری 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 سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

Email: gol.keshavarzi@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

مقدمه

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 سلول های بدن آزاد می شوند و تغییراتی در بافت بدن به وجود می آید. در نتیجه این تغییرات عامل آسیب از بدن حذف شده و آسیب وارد شده به بدن ترمیم می گردد. التهاب نشانه عفونت نیست حتی موقعی که یک عفونت موجب التهاب می شود. عفونت به علت یک ویروس، باکتری یا قارچ ایجاد می شود ولی التهاب پاسخ بدن نسبت به آن است. از علائم التهاب درد ناشی از آزاد شدن مواد شیمیایی خاص از سلول های صدمه دیده و گلبول های سفید و تاثیر این مواد بر روی عصب های 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 می باشد(۱). از جمله واسطه های کلیدی التهاب، محصولات ایکوزانوئیدی مانند PGE2، پروستاسایکلین و ترومبوکسان A2 را می توان نام برد. این محصولات در نتیجه تاثیر آنزیم هایی از قبیل سیکلواکسیژنازها بر آراشیدونیک اسید حاصل می شوند. آنزیم های سیکلواکسیژناز، آنزیم کلیدی در تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین ها می باشند. در پستانداران دو ایزوفرم از این آنزیم، به نام های Cox1 و Cox2 وجود دارد که شباهت های فراوان ساختاری دارند. آنزیم دارای دو جایگاه فعال پراکسیدازی و سیکلواکسیژنازی در دو طرف گروه پروستاتیک «هم» می باشد. یعنی جایگاه سیکلو اکسیژناز مسئول تبدیل آراشیدونیک اسید به هیدروکسی اندوپراکسید است و جایگاه فعال پراکسیدازی از همی تشکیل شده است که مسئول احیای پروستاگلاندین G2 به پروستاگلاندین H2 است. فسفولیپاز A_2، اسیدآراشیدونیک را از فسفولیپیدهای غشایی جدا می کنند. آراشیدونیک اسید آزاد شده طی مراحلی با واسطه ایزوآنزیم های سیکلواکسیژناز Cox_1 و Cox_2 به انواع ایکوزانوئیدها تبدیل می شود. سومین ایزوفرم این آنزیم به نام Cox_3 به عنوان یک هدف دارویی زیر سوال است(۲،۳). نوعی از داروهای ضد التهاب، استروئیدها یا کورتیکواستروئیدها هستند که به اختصار به آن ها کورتون هم می گویند. عارضه پوکی استخوان در مصرف داروهای کورتیکواستروئیدی یا کورتن ها برخلاف داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی بالا است. داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی نظیر ایندومتاسین و ایبوپروفن که به کانال هیدروفوبی ایزوزیم های سیکلواکسیژناز متصل شده و باعث مهار آن می شوند(۴)، جزو شایع ترین داروهایی هستند که از صد سال پیش و به طور گسترده ای برای درمان التهاب، درد، تب و برای جلوگیری از ترومبوزیس به کار برده می شوند. مکانیسم اثر NSAID یا Nonsteroidal anti-inflammatory drugs بر پایه مهارکنندگی آنزیم های سیکلواکسیژناز می باشد. انواع داروهای غیر استروئیدی بر اساس این که Cox_1 و Cox_2 را به طور هم زمان مهار کنند یا تنها Cox_2 را مهار کنند، به دو دسته تقسیم می شوند: داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی انتخابی، ضد التهاب های غیر استروئیدی غیر انتخابی که این داروها هر دو ایزوزیم Cox را به طور هم زمان می کنند(۵). آسپیرین تنها مهارکننده سیکلواکسیژناز است که با آن اتصال کووالانسی(استیلاسیون) برقرار می کند. استیلاسیون اسید آمینه سرین ۵۳۰ مانع از اتصال آراشیدونیک اسید به جایگاه فعال و در نتیجه مهار برگشت ناپذیر آنزیم می شود(۶). داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی انتخابی تحت عنوان مهارکننده های انتخابی Cox_2 شناخته می شوند و اتصال آن ها به Cox_1 ضعیف و برگشت‌پذیر است. مهار شدن ترجیهی Cox_2 ناشی از فضای اضافی در کانال هیدروفوبی Cox_2 است. داروهایی مثل سلوکوکسیب، والدوکوکسیب، اتوریکوکسیب، روفکوکسیب و SC57666 و... از مهارکنندگان انتخابی Cox_2 هستند. بسیاری از مهار کننده های انتخابی Cox_2 به کلاس ترکیبات دی آریل 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 می شوند(۷). از آن جائی که مکانیسم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

اثر داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی بر پایه مهار هر دو ایزوزیم سیکلواکسیژناز است و از آن جائی که آثار سوء این داروها ناشی از مهار ایزوفرم سیکلو اکسیژناز ۱ است، لذا تحقیقات جدید معطوف به شناسایی و تولید مهارکننده های انتخابی-اختصاصی آنزیم سیکلواکسیژناز دو می باشد. هدف این مطالعه تعیین کموانفورماتیکی لیگاندهای ممانعت کننده آنزیم سیکلواکسیژناز دو(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 می باشد.

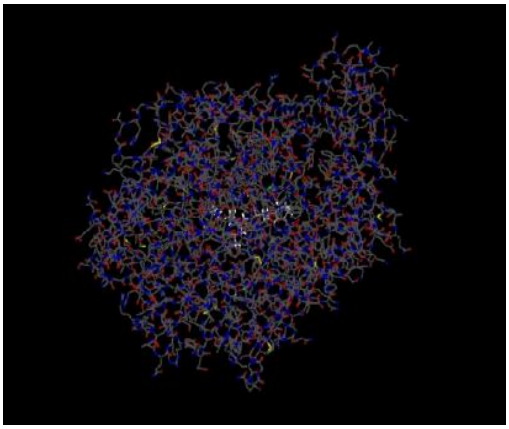
مواد و روش ها

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 Cox_2 می باشد، بود. لذا با استفاده از نرم افزار Chem sketch، ساختار سه بعدی شیمیایی مولکول سلوکوکسیب رسم شد. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov این سایت یک پایگاه اطلاعاتی و زیر مجموعه پایگاه داده NCBI است. از دیگر امکانات این پایگاه ابزاری برای جستجوی سریع ساختارهای شیمیایی مشابه فراهم می نماید.

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

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 می کند. در اولین نسخه FlexX پروتئین سخت در نظر گرفته می شد. 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 می نماید. هر چند، گاهی مواقع اطلاعاتی در مورد لیگاند یا حتی در مورد کمپلکس اضافه می شود. می توان این اطلاعات را به صورت دستی در محاسبات وارد کرد. چهار مرحله اصلی دستور کار FlexX شامل:۱-تعریف گیرنده، ۲-ساخت لیگاند و کتابخانه داکینگ، ۳-داکینگ، ۴-تجزیه و تحلیل داکینگ

آماده سازی پروتئین در GUI (Graphical user interface): پروتئین، مستقیماً از پایگاه PDB بارگذاری شد. GUI فقط قادر است پروتئین های با فرمت pdb را بخواند. فایل pdb آنزیم Cox_2، در حالت باند شده با لیگاند SC-558، از سایت www.rcsb.org، استخراج شد(شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. فایل pdb آنزیم 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

پس از بارگذاری پروتئین، گیرنده تعریف 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 اشتباه سیستم است.

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

تعریف جایگاه اتصال: محدوده برش جایگاه اتصال در این قسمت تعیین شد. در این جا 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 pdb وجود داشت و یا با بارگذاری از یک فایل mol خارجی موجود امکان پذیر بود. لیگاند مرجع با کربن های سبز رنگ اسکلتش 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 تعریف شد.

لیگاندها در GUI: لیگاندها با استفاده از منوی Ligands در 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- متوکسی فنیل)-H۱ پیرازول-۳-کربوکسیلیک اسید

مرحله اول:

-محلول متوکسیدسدیم با انحلال(۰/۳۵ گرم، ۱۵/۲ میلی مولار) سدیم در ۷ میلی لیتر متانول بی آب تهیه شد.

-محلول فوق به محلول(۱/۲۵ گرم، ۸/۳ میلی مولار) ۴-متوکسی استوفنون و (۱/۵۷ گرم، ۱۳/۸ میلی مولار) دی متیل اگزالات در ۱۵ میلی لیتر متانول بی آب اضافه شد.

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

-با اسیدکلریدریک 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 تقطیر در خلاء، برای تهیه ۰/۷۹ گرم«متیل ۴-(۴ متوکسی فنیل)-۲، ۴-دی کتو بوتیرات» تغلیظ 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 (۰/۲۰ گرم، ۱/۱ میلی مولار) کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، در ۱۰ میلی لیتر متانول مخلوط شد.

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

-مخلوط حاصل به ۲۰ میلی لیتر آب اضافه شد.

- به وسیله(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-متوکسی فنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل روغن زرد رنگ بدهد.

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 هیدروکسیدسدیم ۱ نرمال، به محلول فوق اضافه شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

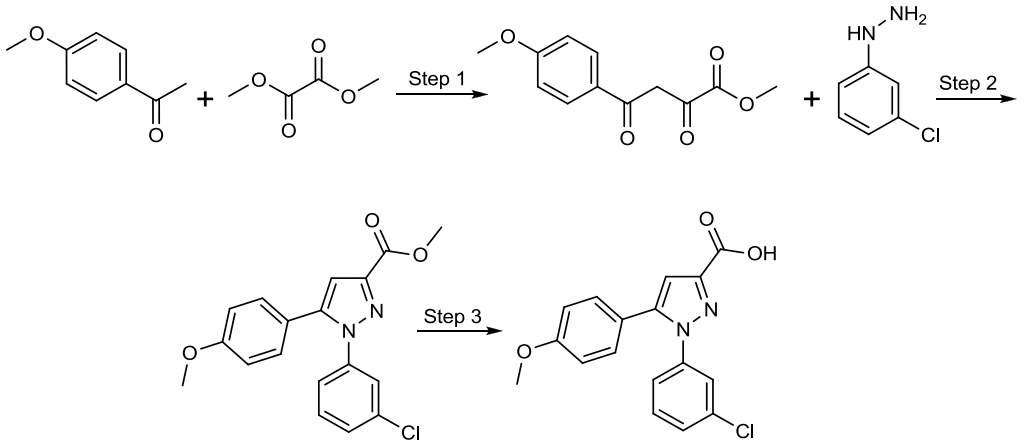
-مخلوط حاصل به مدت ۵ ساعت تحت رفلوکس گرما داده شد.

-برای خنثی کردن مخلوط، ۱/۸ میلی لیتر اسید هیدروکلریک ۱ نرمال به آن اضافه شد.

-به وسیله(۲۰×۳ 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).



شکل شماره ۲. مراحل سنتز داروی شماره ۱

متوکسید سدیم به ٤-متوکسی استوفنون و دی متیل اگزالات اضافه شد. ترکیب حاصل در کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، اضافه شد. به این ترتیب«متیل ۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(٤-متوکسی فنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل روغن زرد رنگ به دست آمد.

ب-روش سنتز ترکیب شماره ۲

متیل۱-(۴-متوکسی فنیل)-۵-(۴-کلروفنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات

مرحله اول:

-محلول متوکسیدسدیم، با انحلال(۰/۳۵ گرم، ۱۵/۲ میلی مولار) سدیم در ۷ میلی لیتر متانول بی آب تهیه شد.

-محلول فوق به محلول(۱/۲۸ گرم، ۸/۳ میلی مولار) ۴-متوکسی استوفنون و (۱/۵۷ گرم، ۱۳/۸ میلی مولار) دی متیل اگزالات در ۱۵ میلی لیتر متانول 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 تقطیر در خلاء، برای تهیه ۰/۹۸ گرم«متیل ۴-(۴ متوکسی فنیل)-۲،۴-دی کتو بوتیرات» تغلیظ شد. ماده حاصل، بدون تصفیه بیشتر، در مرحله بعد مورد استفاده قرار داده شد.

مرحله دوم

-(۰/۲۴ گرم، ۱ میلی مولار) از ماده حاصل از مرحله اول و (۰/۲۰ گرم، ۱/۱ میلی مولار) کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، در ۱۰ میلی لیتر متانول مخلوط شد.

-محلول حاصل، به مدت ۲۰ ساعت تحت رفلوکس حرارت داده شد.

-مخلوط حاصل، به ۲۰ میلی لیتر آب اضافه شد.

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

-لایه آلی مرکب، مانند مرحله قبل تیمار شد تا ۰/۳۹ گرم«متیل ۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-متوکسی فنیل)-H۱-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

-(۰/۳۰ گرم، ۰/۸۸ میلی مولار) از ماده حاصل از مرحله دوم، در ۱۰ میلی لیتر متانول حل شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

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

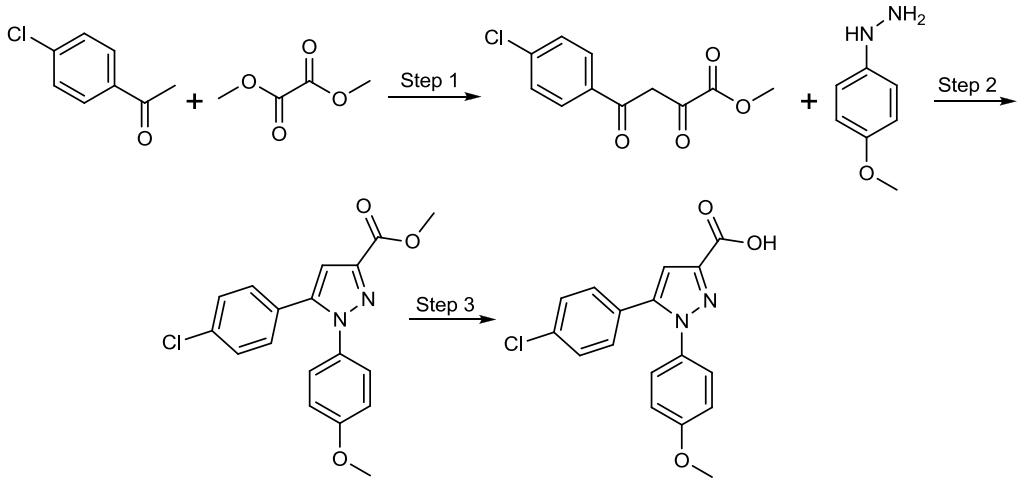
-مخلوط حاصل، به مدت ۵ ساعت تحت رفلوکس گرما داده شد.

-برای خنثی کردن مخلوط، ۲ میلی لیتر اسیدهیدروکلریک ۱ نرمال به آن اضافه شد.

-به وسیله(۲۰× ۳ 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).



شکل شماره ۳. مراحل سنتز داروی شماره ۲

در گام اول محلول متوکسید سدیم به ۴-متوکسی استوفنون و دی متیل اگزالات به متانول اضافه شد. به وسیله تقطیر در خلاء، «متیل ۴-(۴ متوکسی فنیل)-۲،۴-دی کتو بوتیرات» تغلیظ شد. ماده حاصل و کلروفنیل هیدرازین هیدروکلرید، در مخلوط شد و «متیل ۱-(۳-کلروفنیل)-۵-(۴-متوکسی فنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل روغن زرد رنگ بدهد.

آزمایش غربالگری به روش رنگ سنجی مهارکننده های سیکلواکسیژناز گوسفندی(Ovine): در آزمایش غربالگری به روش رنگ سنجی مهارکننده های سیکلواکسیژناز گوسفندی با استفاده از کیت Cayman، جزء پراکسیدازی آنزیم سیکلواکسیژناز اندازه گیری شد. فعالیت پراکسیدازی به روش رنگ سنجی و با استفاده از نمایش پیدایش phenylenediamine-N,N,N,N- tetramethyl-ρ اکسید شده، در طول موج ۵۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اسکن کننده چند خانه ای 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 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 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

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

۷- ۲۰ میکرولیتر از محلول آراشیدونیک اسید، به تمام ول هایی که استفاده کرده بودیم، اضافه 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 در۵۹۰ 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_2 کشت داده شد. سلول های برداشت شده با تریپسین ۰/۲۵ درصد، به وسیله اسلاید نئوبار شمارش شد. سلول ها، در پلیت های ۹۶ چاهکی کشت شد. پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف از داروها، انکوبه شدند. در قدم اول غلظت های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و 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 تایی در هر سنجش در نظر گرفته شد. برای سنجش به روش MTT به محتویات به دست آمده از چاهک ها، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ تترازولیوم(۵ میلی گرم/میلی لیتر) در PBS اضافه 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 اسپکتروفتومتر 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

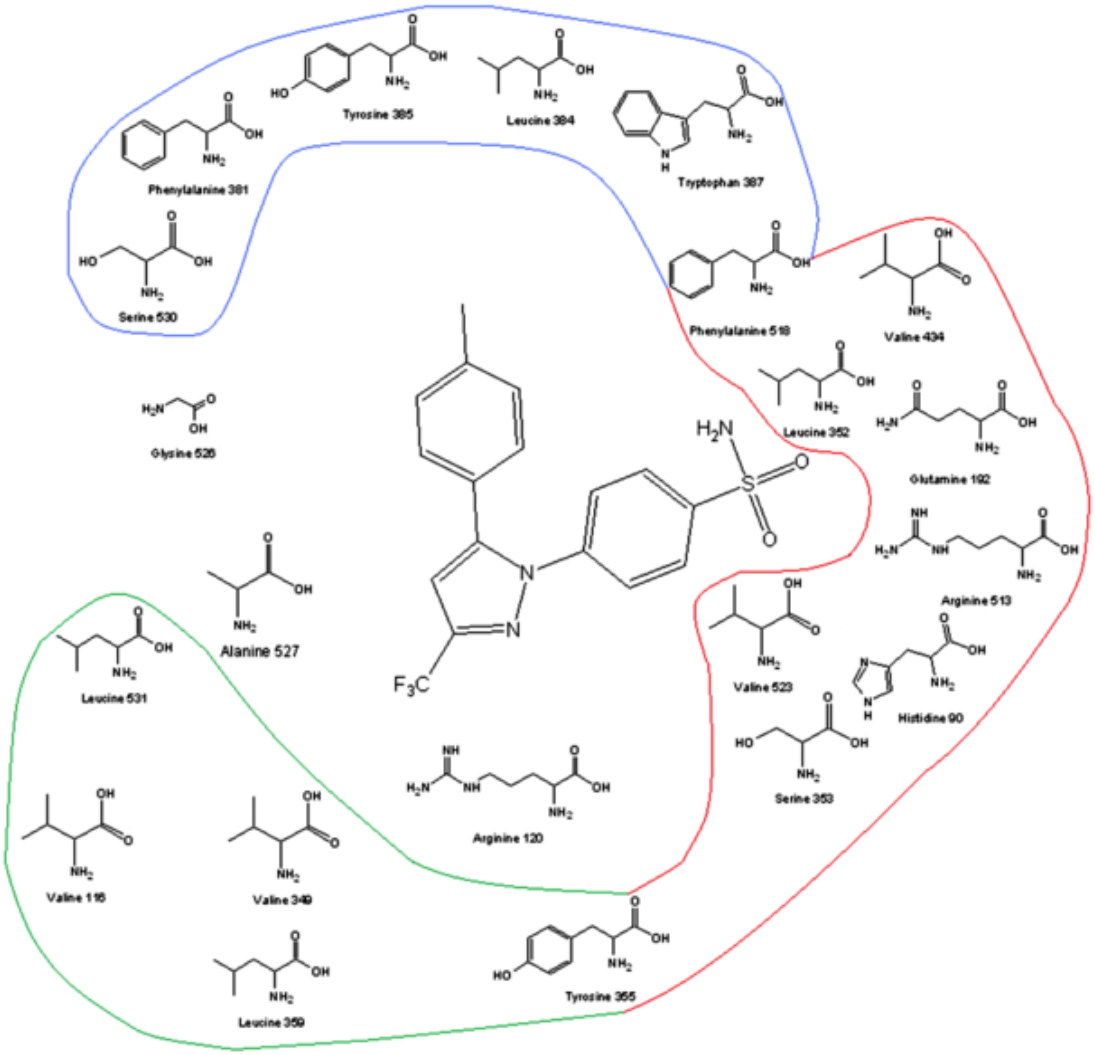
سلول های زنده درصد-۱۰۰: سمیت درصد

IC_{50} هر دارو با آنالیز منحنی دوز پاسخ به دست آمد.

یافته های پژوهش

نتیجه غربالگری مجازی، ۵۰۰۰ مولکول مشابه سلوکوکسیب بود که ۲۴ تا از این ترکیبات بیشترین امتیاز را از داکینگ کسب کردند. لیگاندها که به پاکت پیوندی داک شدند، با اسید آمینه های سرین ۳۵۳، آلانین ۵۲۷، والین ۵۲۳، متیونین ۵۲۲، فنیل‌آلانین ۵۱۸ و لوسین ۳۵۲ میان کنش نشان دادند(شکل شماره ۴). ۲۴ 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.

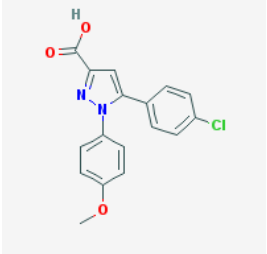
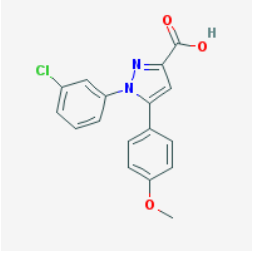
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]



شکل شماره ٤. برهم کنش لیگاند سلوکوکسیب با جایگاه فعال Cox2

لیگاندهایی که به پاکت پیوندی داک شدند، با سرین ۳۵۳، آلانین ۵۲۷، والین ۵۲۳، متیونین ۵۲۲، نیل‌آلانین ۵۱۸ و لوسین ۳۵۲ میان کنش نشان دادند.

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	

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

نتایج سنتز

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

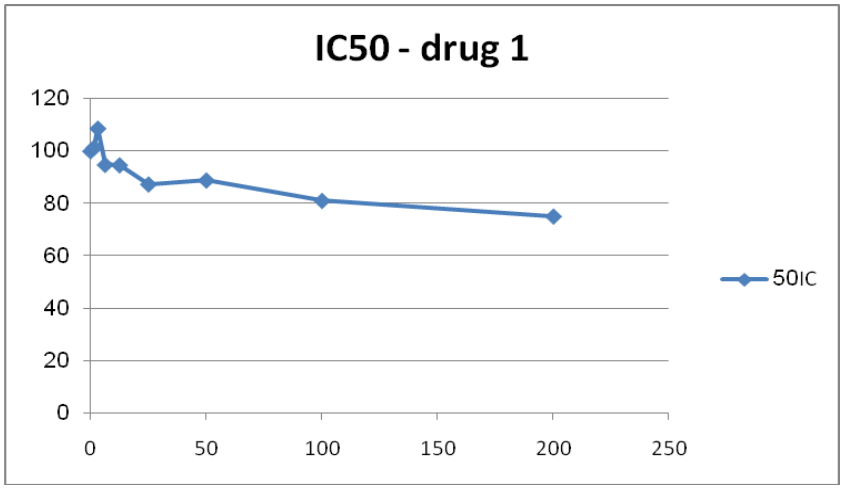
ترکیب شماره ۲، «متیل ۱-(۴-متوکسی فنیل)-۵-(۴-کلروفنیل)-H۱-پیرازول-۳-کربوکسیلات» به شکل جامدی سفید رنگ به دست آمد.

نتیجه غربالگری با آنزیم های گوسفندی

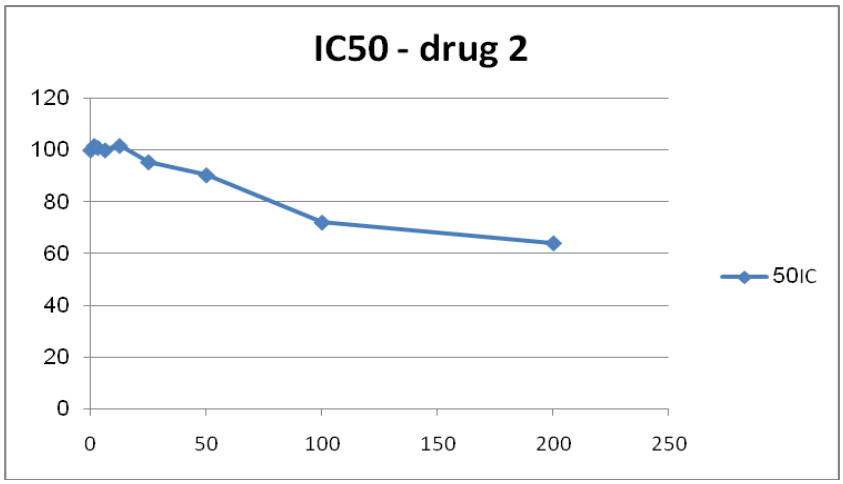
ترکیبات سنتز شده، مهارکنندگی خوبی با ارزش 80 IC_{50}=nM برای ترکیب شماره ۱ و IC_{50}= 100 nM برای ترکیب شماره ۲ نشان دادند.

نتایج اندازه گیری سمیت سلولی

با افزایش غلظت های دارویی درصد رشد سلولی رو به کاهش گذاشت. IC_{50} هر دو دارو <۲۰۰µg/mli بود(نمودار شماره ۱ الف و ب). IC_{50} سلوکوکسیب < ۲۰۰ µg/mlit بود.



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_{50}=80 nM دارد.



نمودار شماره ۱. ب-در ترکیب شماره ۲ مهارکنندگی با IC_{50}=100 nM بود

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

بحث و نتیجه گیری

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 غربالگری، ۵۰۰۰ مولکول مشابه سلوکوکسیب بود. ۲۴ تا از ترکیبات امتیازهای انرژی بهتری نسبت به 6COX باند شده با SC-558 داشتند. داکینگ لیگاندها 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-متوکسی فنیل)-۱پیرازول-۳-کربوکسیلیک اسید» و «متیل۱-(۴-متوکسی 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 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 مهارکننده های انتخابی جدید Cox_2، با استفاده از آزمایش های Cox، مورد بررسی قرار داد. قوی ترین مهارکننده Cox_2، کمترین میزان IC_{50}=2 μM را در میان تترازول ها دارا بود. 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 و Cox_1 گوسفندی اندازه گیری شد. تست های بیولوژیکی 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 μM بر علیه Cox_2 نشان دادند این 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(μIC_{50}=0.11 g) مشابه با داروی سلکوکسیب به عنوان داروی مرجع بود(۱۲). این نتایج با نتایج کار ما مشابه بود. Yasemin Du¨ndar و همکاران یک سری از مشتقات ۴،۵-دی فنیل اکسازولون را سنتز کردند. از میان ترکیبات سنتز شده، فقط «۴-(۴-فنیل-۳-متیل-۲-اکسو-H۳-۱،۳-اکسازول-۵-یل) بنزن سولفونامید»، خاصیت مهارکنندگی انتخابی خوبی با IC_{50} Cox_2=2μM، 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 عمدتاً توسط کبد متابولیسم شده ولی حدود ۵ درصد آن به یک متابولیت شدیداً سمی به نام P توسط مکانیسم ۴۵۰ تبدیل می شود که یک عامل عمده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

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(IC_{50}=18/6±1/29) 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 برای 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 آرژنین ۵۱۳ میان کنش دهد، می توانند مولکول های مناسبی برای پیشنهاد به عنوان مهارکننده های اختصاصی Cox_2 باشند. یافته های این تحقیق، رویه محاسباتی کشف ترکیبات جدید ضدالتهابی با فعالیت بیشتر و سمیت کمتر نسبت به مهارکننده های عمومی Cox_2 را قوت بخشید.

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 Toxicol1998;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 Nature1996 384:644–48.

4. Vane J R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like drugs. J Nat New Biol1971;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 Nature1994; 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 Inflamm1996;5:305–23

9.Pink R. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. J Nat Rev Drug Discov2005;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 Chem2007; 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 Chem2013;25:225-30.

13.Zarghi A, Arfaei S. Selective cox-2 inhibitors a review of their structure-activity relationships. Iranian J Pharm Res2011;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. JSSU2007;15:68-73.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]

Chemo-Informatics Evaluation and Invitro Bioactivity Mesurment of Human Cox_2 Enzyme Inhibitors Ligands

*Mousavi F[1], Ramazani A[2], Ashtari P[3], Keshavarzi F [*1]*

(Received: October 18, 2015 Accepted: April 14, 2015)

Abstract

Introduction: Cox_2 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_2 inhibitors. This study was conducted to introduce new structures with more affinity to Cox_2 enzyme.

Materials & methods: Chemical structures with 80% similarity to celecoxib was collected by using PubChem at NCBI database. The PDB file of Cox_2 enzyme (6COX) obtained from RCSB PDB website in bounding with ligand SC-558 as reference ligand. Docking of ligands to SC-558 site of Cox_2 performed with lead IT software (version 2.1.0 BioSolveIT, GmbH, Germany) and the interaction energy of different compounds was obtained. IC_{50} value of selected compounds identified by using *in vitro* screening against Cox_2 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_2, Cox_2 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*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-01-30]