

بررسی اثر مهاری آلکالوئیدهای استخراج شده از گیاه *Nepeta mahanensis* بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ موثر در بروز سرطان روده‌ی بزرگ به روش شبیه‌سازی بیوانفورماتیک

راضیه صادقی^۱، محمدرضا دایر^{۲*}، فاطمه دانشمند^۳،

فاطمه نژادعلیمرادی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، ص.پ.

۱۹۳۹۵-۶۶۹۷، تهران، ایران

^۲ دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، ص.پ. ۱۹۳۹۵-۶۶۹۷، تهران، ایران

¹hr.sadeghi2022@gmail.com

^{2*}mrdayer@scu.ac.ir

^{3f}daneshmand@yahoo.com

^{3alimoradih60@gmail.com}

چکیده

آنزیم COX-2 در سلول‌های التهابی و گلبول‌های سفید یافت شده و در ابتلا به سرطان‌های مختلف و پیشرفت تومورهای سرطانی از جمله سرطان روده‌ی بزرگ موثر می‌باشد. *Nepeta mahanensis* گیاهی دارویی و بومی استان کرمان می‌باشد. این مطالعه به روش بیوانفورماتیک انجام شد و فایل ساختاری آنزیم و ترکیبات آلکالوئیدی مورد مطالعه در این پژوهش دانلود شد و داکینگ مولکولی هر ترکیب آلکالوئیدی با آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ با استفاده از نرم‌افزار HEX8.0.0 انجام شد و جایگاه اتصال هر ترکیب روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ به دست آمد. یافته‌ها نشان داد Isotetrandrine اثر مهاری قوی‌تری روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ دارد و به‌عنوان کاندیدای مهار این آنزیم معرفی می‌گردد.

کلمات کلیدی: سیکلواکسیژناز-۲، داکینگ مولکولی، سرطان روده‌ی بزرگ، نیتامه‌انسیس، آلکالوئیدها

۱. مقدمه

سرطان روده‌ی بزرگ از مهم‌ترین بیماری‌های مزمنی است که فرد بیمار و خانواده‌ی وی را به چالش کشیده و هزینه‌های گزافی از جنبه‌های اقتصادی و روانی برای بیمار، خانواده و جامعه به همراه دارد و پس از ابتلا به تومورهای ریوی، دومین عامل مرگ و میر در ایالات متحده‌ی آمریکا می‌باشد (۱) و در ایران به جهت تغییرات عمده‌ای که در سبک زندگی افراد رخ داده است، به عنوان چهارمین عامل سرطانی شایع در میان مردان مطرح شده است (۲). رژیم غذایی نادرست، چاقی، دیابت نوع ۲، عدم تحرک، مصرف دخانیات و الکل، سن بالا و ابتلا به سندروم روده‌ی تحریک‌پذیر، بیماری کرون و کولیت اولسرو از فاکتورهای خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ می‌باشند. درمان این نوع از سرطان، به مرحله و جایگاه تومور بستگی دارد و شیمی‌درمانی ترکیبی با استفاده از ۵-فلوروروراسیل^۱ و اوگسالیپلاتین^۲ نیز شایع‌ترین روش درمان دارویی بیماری سرطان روده‌ی بزرگ می‌باشد (۳).

آنزیم سیکلواکسیژناز در تولید میانجی‌های التهابی مانند پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان‌ها نقش دارد و مهار این آنزیم سبب از بین رفتن درد و علائم آلرژی می‌شود. دو ایزوفرم آنزیم سیکلواکسیژناز، سیکلواکسیژناز-۱ و سیکلواکسیژناز-۲ است که آنزیم COX-1 در سلول‌های غیرالتهابی مانند سلول‌های معده یافت شده و به طور پیاپی سنتز می‌شود؛ در حالی که آنزیم COX-2 در سلول‌های التهابی و گلبول‌های سفید یافت شده و سنتز آن در سلول‌های بدن به دلیل تحریک شدن می‌باشد. آنزیم موثر در ابتلا به سرطان‌های مختلف و پیشرفت تومورهای سرطانی از جمله سرطان روده‌ی بزرگ، آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ است که به طور اختصاصی با داروهایی مانند سلکوکسیب^۴ و رافلوکسیب^۵ مهار می‌شود (۴).

آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ اثرات تومورزایی خود را از طریق گیرنده‌ی اندروژن، سیکلین D1 و برخی از فاکتورهای ناشناخته اعمال می‌کند (۵). تحقیقات محققان نشان داده است که افزایش بیان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ سبب مهار مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی می‌شود و چرخه‌ی کیتیکی سلول‌های اپیتلیالی دستگاه گوارش را تغییر می‌دهد (۶).

داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی مانند آسپرین^۶، سولینداک^۷ و پیروکسیکام^۸ خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ را کاهش داده و آنزیم سیکلواکسیژناز را مهار می‌کنند (۷). مهارکننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ برای زمان طولانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که عوارض جانبی بسیاری ایجاد می‌کند و لازم است درمان دارویی مناسب‌تری جایگزین روش‌های درمانی کنونی شود. در این مطالعه اثرات مهارتی ترکیبات آلكالوئیدی موجود در ساختار *Nepeta mahanensis* از گیاهان بومی ایران و متعلق به خانواده‌ی نعناعیان بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ به روش شبیه‌سازی بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه‌ی میلادی^۹ و همکاران (۲۰۱۷) که به روش شبیه‌سازی بیوانفورماتیکی داکینگ مولکولی انجام شد، اثر مهارتی مشتقات گزانتون بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها ساختار کریستالوگرافی آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ با کد

¹ 5-fluorouracil

² Oxaliplatin

³ Cyclooxygenase2(COX-2)

⁴ Celecoxib

⁵ Rofloxicam

⁶ Aspirin

⁷ sulindac

⁸ piroxicam

⁹ Isnatin Miladiyah

دسترسی 3N8Z.pdb و سیکلواکسیژناز-۲ با کد دسترسی 1CX2.pdb را از بانک اطلاعات پروتئین دانلود نموده و داروی سلکسیب را که مهارکننده‌ی انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ است، به عنوان کنترل، انتخاب نمودند؛ نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که داروی سلکسیب به جایگاه فعال آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ اتصال یافته، اما به جایگاه فعال آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ متصل نمی‌شود؛ آن‌ها با مقایسه‌ی نحوه‌ی اتصال و انرژی آزاد اتصال مشتقات گزانتون و سلکسیب، پیشنهاد کردند که گزانتون و مشتقات آن نمی‌توانند مهارکننده‌ی انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز باشند (۸). در مطالعه‌ی دیگری لئو^۱ و همکاران (۲۰۲۰) اثر مهارتی مهارکننده‌های جدیدتر آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ را بر پایه‌ی ترکیب روفکوکسیب^۲ بررسی نمودند؛ آن‌ها ساختار کریستالوگرافی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ با کد دسترسی 5kir.pdb را از بانک اطلاعات پروتئین دانلود نمودند و مراحل داکینگ مولکولی لیگاندها و آنزیم را با استفاده از نرم‌افزار آنوداک وینا^۳ به انجام رسانیدند و اسیدآمین‌های جایگاه اتصالی محل اتصال ترکیبات مورد مطالعه بر روی آنزیم را به دست آوردند (۹).

۲. مواد و روشها

این مطالعه به روش شبیه‌سازی بیوانفورماتیکی و در محیط *in silico* انجام شد. فایل با فرمت .pdb. آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ از پایگاه داده‌ی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) دانلود شد و مراحل آپتیمایز و مینیمایز انرژی آن با استفاده از بسته‌ی نرم افزاری Gromacs4.6.5 به انجام رسید. فایل با پسوند .sdf. ترکیبات آلكالوئیدی مورد مطالعه در این پژوهش، از پایگاه داده‌ی pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) ساختار آن‌ها با استفاده از نرم افزار OpenBabel 2.3.2 به فرمت .pdb. تبدیل و ذخیره شد و مینیمایز انرژی ترکیبات آلكالوئیدی مورد مطالعه به وسیله‌ی نرم‌افزار ArgusLab به انجام رسید. داکینگ مولکولی هر ترکیب آلكالوئیدی با آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ با استفاده از نرم افزار HEX8.0.0 انجام شد و بهترین ساختار با بهترین انرژی اتصالی حاصل از داکینگ مولکولی، برای به دست آوردن جایگاه فعال آنزیم انتخاب شد و جایگاه اتصالی هر ترکیب بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ با استفاده از نرم افزار ArgusLab به دست آمد. نتایج با استفاده از نرم افزارهای WebLab Viewer، PyMOL و LigPlot آنالیز شد.

۳. نتایج و بحث

در این مطالعه که به روش بیوانفورماتیک به انجام رسید، فایل ساختاری کریستالوگرافی شده‌ی پروتئین سیکلواکسیژناز-۲ با کد دسترسی 5KIR.pdb از پایگاه داده‌ی پروتئین دانلود شد و مشاهده گردید که این پروتئین دارای دو زنجیره‌ی آمینواسیدی کاملاً یکسان است که هر زنجیر با اسیدآمین‌های Asparagin34 آغاز شده و به اسیدآمین‌های Prolin583 ختم می‌شود؛ بنابراین زنجیره‌ی A برای ادامه‌ی کار انتخاب شد و پس از بهینه‌سازی انرژی، مراحل داکینگ مولکولی آن با هر کدام از ترکیبات آلكالوئیدی به انجام رسید که نتایج آن در (جدول-۱) مشاهده می‌گردد:

¹ Rozires P. Leao

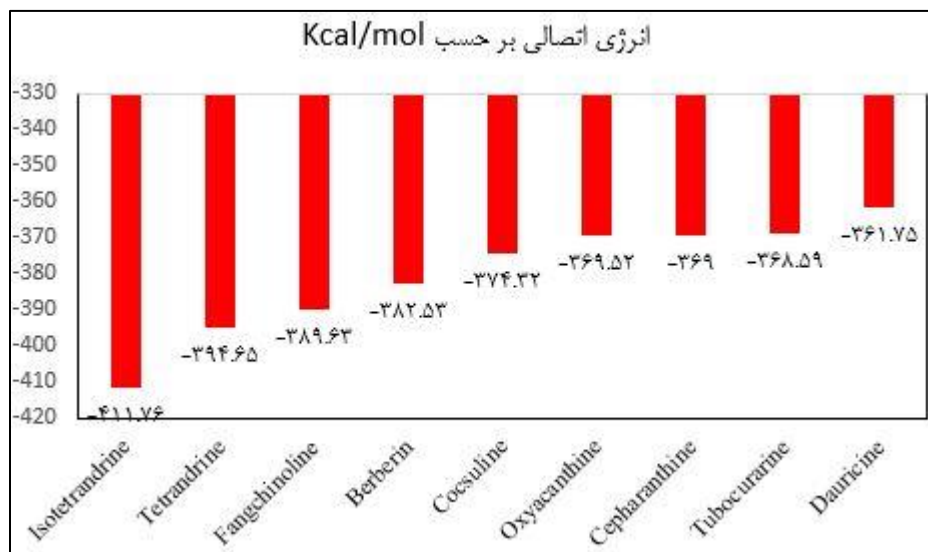
² Rofecoxib

³ Autodock Vina

جدول ۱: انرژی اتصالی برهم کنش آنزیم سیکلواکسیژناز و ترکیبات آلکالوئیدی

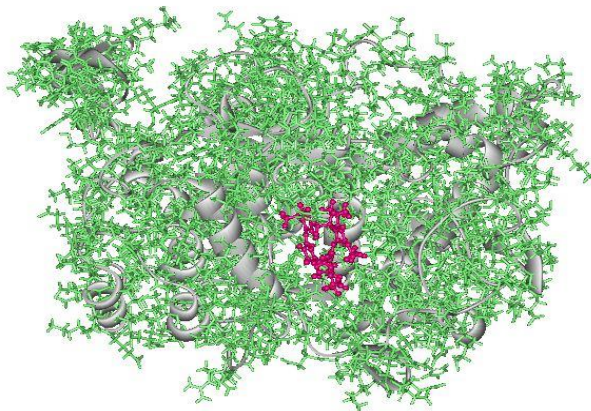
نام ترکیبات آلکالوئیدی	انرژی اتصالی بر حسب Kcal/mol
Berberin	-۳۸۲/۵۳
Cepharanthine	-۳۶۹/۰۰
Cocsuline	-۳۷۴/۳۲
Dauricine	-۳۶۱/۷۵
Fangchinoline	-۳۸۹/۶۳
Isotetrandrine	-۴۱۱/۷۶
Oxyacanthine	-۳۶۹/۵۲
Tetrandrine	-۳۹۴/۶۵
Tubocurarine	-۳۶۸/۵۹

در (شکل-۱) مشاهده می‌گردد که انرژی اتصالی حاصل از برهم کنش میان آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ و هر ترکیب آلکالوئیدی به صورت نزولی نشان داده شده است و نتایج نشان داد که ترکیب آلکالوئیدی Isotetrandrine دارای بیشترین انرژی اتصالی منفی می‌باشد و ترکیب ترکیب آلکالوئیدی Dauricine دارای کمترین میزان انرژی اتصالی منفی حاصل از برهم کنش با آنزیم بود، که به معنای کمترین تمایل برای برهم کنش با آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ می‌باشد و در مقابل آلکالوئید Isotetrandrine دارای بالاترین تمایل برای برهم کنش با آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ است.

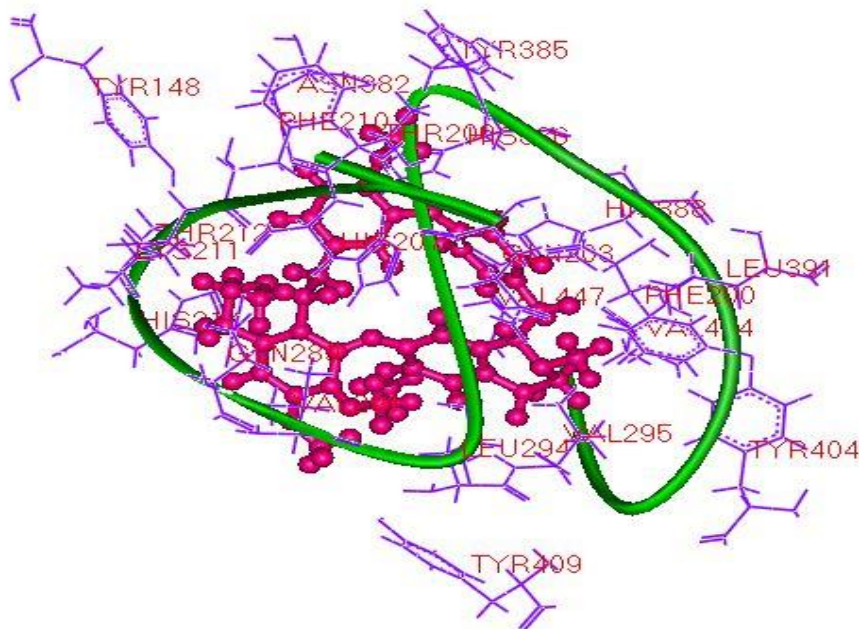


شکل ۱:- نمودار انرژی اتصالی حاصل از داکینگ مولکولی

بررسی جایگاه اتصالی ترکیبات آکالوئیدی بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ نشان داد که ۱۱ ترکیب آکالوئیدی به اسیدآمینوهای یکسانی در جایگاه فعال آنزیم اتصال پیدا کردند که شامل His207، Phe210 و His214 می باشند و ترکیب آکالوئیدی Dauricine به محل دیگری از آنزیم اتصال پیدا نمود. در (شکل-۲) نحوه قرارگیری آکالوئید Isotetrandrine در جایگاه اتصالی آنزیم و در (شکل-۳) اسیدآمینوهای جایگاه اتصالی این ترکیب مشاهده می گردد.

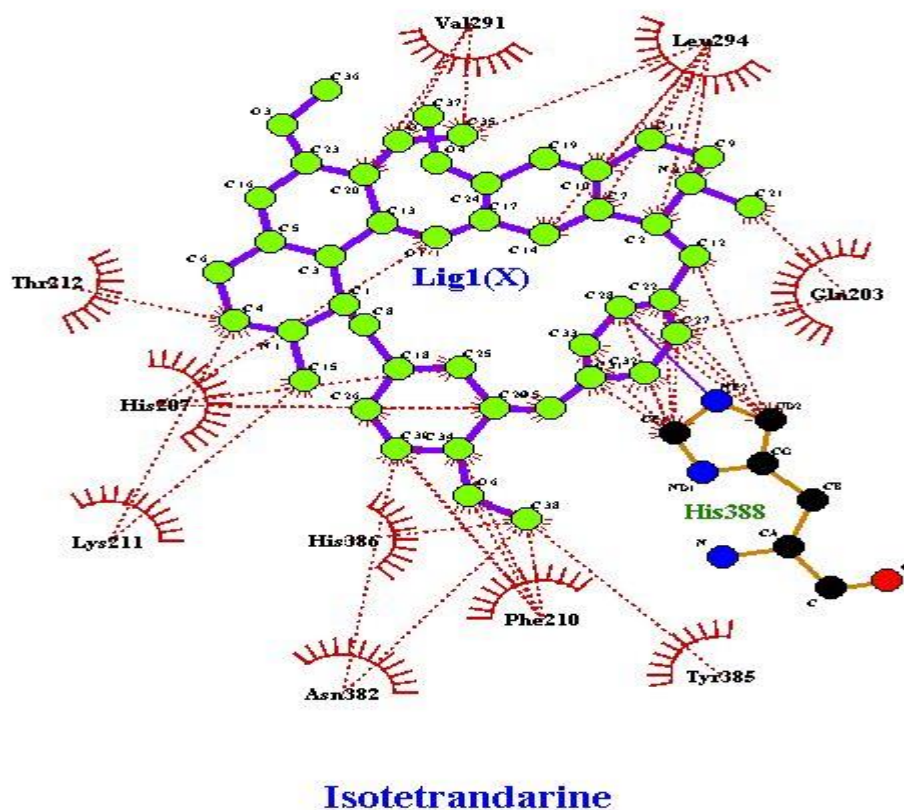


شکل ۲- نحوه قرارگیری آکالوئید Isotetrandrine در جایگاه اتصالی آنزیم



شکل ۳- اسیدآمینوهای واقع در جایگاه اتصالی آکالوئید Isotetrandrine در آنزیم سیکلواکسیژناز-۲

در (شکل-۴) همانطور که مشاهده می‌گردد، پیوندهای هیدروفوب و هیدروژنی برهم‌کنش بین ترکیب آکالوئیدی Isotetrandrine و آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ نشان داده شده است و این ترکیب از طریق His388 با پیوند هیدروژنی به جایگاه اتصال آنزیم اتصال یافته است.



شکل ۴-: پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب موجود در جایگاه اتصال آکالوئید Isotetrandrine بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲

آکالوئیدها ترکیبات آلی جامد بی رنگ و بدون بو یا مایعاتی هستند که به رنگ زرد متمایل بوده و طعم و مزه تلخی دارند و در بیشتر موارد در حلقه‌ی هتروسیکل خود اتم‌های نیتروژن با خاصیت بازی دارند و از اسیدهای آمینه سنتز می‌شوند و باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات قادرند ترکیبات آکالوئیدی را تولید نمایند و متنوع‌ترین متابولیت‌های ثانویه هستند و تاکنون بیش از ۵۵۰۰ نوع از این ترکیبات شناسایی شده‌است (۱۰). در مطالعه‌ای که انجام شد، مشاهده گردید که ترکیب آکالوئیدی Isotetrandrine از نظر تمایل به اتصال با جایگاه فعال آنزیم، در مقایسه با سایر ترکیبات مورد بررسی، قوی‌تر می‌باشد؛ مطالعات و تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که این ترکیب از دسته‌ی ایزوکوئینولون‌هاست و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد درد است و در مطالعه‌ای که انجام شد، توانایی ترکیب Isotetrandrine برای مهار آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ و جلوگیری از توسعه و پیشرفت تومور تأیید شد. در این زمینه و برای انجام تحقیقات بیشتر پیشنهاد می‌شود اثر ترکیبات آکالوئیدی استخراج

شده از گونه‌های گیاهی متفاوتی را برای مهار آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در بستر بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار داده ضمن یافتن مهارکننده‌ی قوی‌تر، گونه‌های غنی از این ترکیبات شناسایی شود.

۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه دریافته شد که ترکیبات آلكالوئیدی به جهت دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قادرند که به عنوان درمان جایگزین محصولات و داروهای شیمیایی با عوارض جانبی جدی مورد استفاده قرار بگیرند و ترکیب آلكالوئیدی Isotetrandrine در میان ترکیبات مورد مطالعه، اثر مهارری قوی‌تری بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ نشان داد و به عنوان کاندیدای مهار این آنزیم معرفی می‌گردد.

۵. مراجع

1. Abdifard, E., Ghaderi, S., Hosseini, S., Heidari, M. (2013). Incidence trends of colorectal cancer in the West of Iran during 2000-2005. *Asian Pac J. Cancer Prev*;14(3):1807-11.
2. Allemani, C., Rachet, B., Weir, H.K., Richardson, L.C., Lepage, C., Faivre, J., et al. (2013). Colorectal cancer survival in the USA and Europe: a CONCORD high-resolution study. *BMJ Open*; 3(9):e003055.
3. DeSantis, C.E., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Siegel, R.L., Stein, K.D., Kramer, J.L., et al. (2014). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*; 64(4): 252-271.
4. Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L. S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal*. 12(12), 1063-1073.
5. Israel, K., Yu, W., Sanders, B.G., Kline, K. (2000). Vitamin E Succinate Induces apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Role for Fas in Vitamin E Succinate-Triggered Apoptosis. *Nutr Cancer*. 36:90-100.
6. Leão, R. P., Cruz, J. V., da Costa, G. V., Cruz, J. N., Ferreira, E. F., Silva, R. C., Santos, C. B. (2020). Identification of new rofecoxib-based cyclooxygenase-2 inhibitors: A bioinformatics approach. *Pharmaceuticals*. 13(9): 209.
7. Miladiyah, I., Jumina, J. U. M. I. N. A., Haryana, S. M., Mustofa, M. (2017). In silico molecular docking of xanthone derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitor agents. *Int J Pharm Pharm Sci*. 9(3): 98-104.
8. Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., Hla, T. (1995). Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 55(17):3785-3789.
9. Tsujii, M., Dubois, R.N. (1995). Alterations in Cellular Adhesion and Apoptosis in Epithelial Cells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2. *Cell*. 83:493-501.
10. Roy, A. (2017). A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *International journal of plant biotechnology*. 3, 1-9.
11. Contreras, M. D. M., Bribi, N., Gómez-Caravaca, A. M., Gálvez, J., & Segura-Carretero, A. (2017). Alkaloids profiling of *fumaria capreolata* by analytical platforms based on the hyphenation of gas chromatography and liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *International journal of analytical chemistry*, 2017.