Research Article

Nova Biologica Reperta 10(3): 169-183 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.10.3.169

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۱۰، شماره ۳، صفحات ۱۶۹ الی ۱۸۳ (۱۴۰۲)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی اثر مهاری مشتقات جدید ایمیدازولی بر آنزیم سیکلواکسیژناز II با رویکرد محاسباتی

زینب ملایی[۱]، لیلا کرمی[۱]، الهام رضائی[۲] و گیلدا کریمی[۱]

[۱] گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران؛ [۲] گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: لیلا کرمی، l_karami@khu.ac.ir

چکیده. امروزه مشخص شده که ایزوفرم دوم آنزیم COX موسوم به COX-2 با تولید واسطه های التهابی نقش مهمی در التهاب و در بیماری هایی همچون آرتریت روماتوئید و آرتروز دارد. با این هدف طراحی داروهای مهارکننده COX-2 برای درمان التهاب یکی از مهم ترین اهداف محققان است. در این مطالعه با رویکرد in silico، اثر مهاری ۳ مشتق جدید ایمیدازولی بر آنزیم COX-2 ارزیابی شد. داکینگ مولکولی با استفاده از Autodock Vina انجام شده و بهترین حالت اتصالی مهارکننده ها با آنزیم به عنوان ورودی شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) مورد استفاده قرار گرفت. MD با استفاده از نرم افزار Gromacs، به مدت ۱۲۰ نانوثانیه انجام شد. سپس آنالیزهای ساختاری و ترمودینامیکی (تغییرات انرژی آزاد اتصال) و پیشگویی خواص فیزیکوشیمیایی انجام شدند. بر اساس داده های RMSD، ترکیبات در طی شبیه سازی به تعادل خوبی رسیدند و ثبات مطلوبی داشتند. همینطور نمودارهای RMSF نشان دادند که در اثر اتصال مهارکننده ها نوسانات کمپلکس ها کاهش پیدا کرد و رزیدوهای جایگاه فعال کمترین میزان نوسانات را داشتند. آنالیزهای Rg، SASA و DSSP نشان دادند که ساختار پروتئین تغییر چشمگیری نداشته است. همچنین مشخص شد که رزیدوهای Ser 530 وTyr 355 در تشکیل پیوند هیدروژنی نقش موثرتری دارند. بررسی پارامترهای فیزیکوشیمیایی بیانگر رفتار دارویی مناسب مهارکننده ها است. انجام آنالیزهای ساختاری و ترمودینامیکی (با روش MM-PBSA) و نیز مقایسه با داده های آزمایشگاهی IC_{50} حاکی از تاثیر مهاری مطلوب ترکیب 5b نسبت به سایر ترکیبات بر آنزیم COX-2 است.

واژه‌های کلیدی. التهاب، انرژی آزاد اتصال، داکینگ مولکولی، شبیه سازی دینامیک مولکولی، مهارکننده های COX-2

Investigating the inhibitory effect of new imidazole derivatives on cyclooxygenase II enzyme with computational approach

Zeinab Mollaie[1], Leila Karami[1], Elham Rezaee[2] & Gilda Karimi[1]

[1]Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran;
[2]Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Correspondent author: Leila Karami, l_karami@khu.ac.ir

Abstract. It has been found that the second isoform of COX enzyme known as COX-2 plays an important role in inflammation and rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Thus, designing COX-2 inhibitors to treat inflammation is among the most important goals of researchers. In this study, the inhibitory effect of 3 new imidazole derivatives on COX-2 was evaluated by in silico approach. Molecular docking was done using Autodock Vina and the best binding mode of inhibitors was used as input of molecular dynamics (MD) simulation. MD was performed using Gromacs software for 120 ns. Then, structural and thermodynamic analyzes ($\Delta G_{binding}$) and prediction of physicochemical properties were performed. RMSD data showed the compounds reached a good equilibrium and had favorable stability during simulation. Also, the RMSF showed that due to binding of inhibitors, the fluctuations of complexes decreased and the active site residues had the lowest amount. Rg, SASA and DSSP analysis showed that the protein structure did not change significantly. It was also found that Ser530 and Tyr355 residues play a more effective role in hydrogen bond formation. Physicochemical parameters determined the good drug-likeness properties for all compounds. Structural and thermodynamic analyzes (MM-PBSA) and IC_{50} data indicate the favorable inhibitory effect of compound 5b.

Key words. binding free energy, COX-2 inhibitors, inflammation, molecular docking, molecular dynamics simulation

Received 16.06.2023/ Revised 02.09.2023/ Accepted 09.09.2023/ Published 20.12.2023

دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۶/ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۶/۱۱/ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸/ انتشار: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

مقدمه

آنزیم سیکلواکسیژناز یا به اختصار COX، پروستاگلاندین H سنتازی است که متعلق به ابرخانواده میلو پراکسیدازها است (Daiyasu et al., 2000). نقش این آنزیم، تبدیل آراشیدونیک اسید (Arachidonic Acid=AA) به پروستاگلاندین ها است. پروستاگلاندین ها و ترکیبات مشابه واسطه های شیمیایی در بدن هستند که ساختار لیپیدی و شبه کلسترولی دارند و با تاثیر بر گیرنده های در اتصال با G پروتئین، فعالیت می کنند (Chandrasekharan et al., 2004). آنزیم COX، دارای دو ایزوفرم اصلی COX-1 و COX-2 (که ۶۰ تا ۶۵ درصد تشابه توالی دارند) است که COX-1 از ۵۷۶ آمینو اسید و COX-2 از ۵۸۷ آمینو اسید تشکیل شده است (Smith et al., 2000). هر دو آنزیم شامل سه اولیگوساکارید مانوز هستند که در تسهیل فولدینگ پروتئین نقش دارند. یک اولیگوساکارید چهارم نیز وجود دارد که فقط در ساختار COX-2 دیده شده و تجزیه‌پذیری آن را تنظیم می‌کند (Rouzer et al., 2009; Mbonye et al., 2008).

آنزیم COX یک پروتئین غشایی سراسری است که به صورت یک هومودایمر در عرض غشاء قرار گرفته است (Blobaum et al., 2007). هر یک از زیر واحدهای این دایمر از سه دومین تشکیل شده است: ۱) دومین فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal Growth Factor) که رزیدوی ۳۴ تا ۷۲ را تشکیل داده، و در انتهای آمینی پروتئین (N ترمینال) قرار دارد و به وسیله یک پیوند دی سولفیدی محافظت شده در ساختار پروتئین قرار گرفته است. ۲) دومین اتصال غشایی که رزیدوی ۷۳ تا ۱۱۶ را تشکیل می دهد و مجموعه ای از ۴ هلیکس آمفی پاتیک است که پروتئین را به غشا متصل می کند. ۳) دومین کاتالیتیک شامل ساختارهای آلفا هلیکس محافظت شده در بخش C ترمینال پروتئین است. این دومین شامل ۲ جایگاه فعال مجزا، یکی مربوط به عملکرد سیکلواکسیژنازی آنزیم و دیگری مربوط به عملکرد پروکسیدازی آنزیم است. گروه هِم در درون جایگاه فعال پروکسیدازی (POX) قرار گرفته است (Blobaum et al., 2007; Rouzer et al., 2009).

هر دو ایزوفرم COX آنزیم های دو عملکردی با ۲ جایگاه فعال مجزا هستند؛ فعالیت سیکلواکسیژنازی و فعالیت پراکسیدازی. اولین قدم در سنتز پروستاگلاندین ها، هیدرولیز فسفولیپیدهای غشاء به وسیله فسفولیپازA_2 برای تولید آراشیدونیک اسید آزاد است. COX در فعالیت اکسیژنازی، ابتدا آراشیدونیک اسید را اکسیژنه می کند تا پروستاگلاندین G_2 بسازد. بعد از آن فعالیت پرواکسیدازی، PG_2 را به PH_2 تبدیل می کند (Sobolewski et al., 2010; Kapoor et al., 2005).

آنزیم COX-1 به شکل دائمی در بسیاری از سلول ها و بافت های بدن تولید می شود و مسئول تولید پروستاگلاندین های دخیل در فرایندهای فیزیولوژیک است. به همین دلیل این آنزیم را یک آنزیم خانگی (Housekeeping Enzyme) قلمداد می کنند (Phillis et al., 2006; Tanabe et al., 2002). در مقابل آنزیم COX-2 هم به شکل دائمی در اندام هایی مثل مغز و کلیه و هم به شکل القایی در سلول هایی همچون مونوسیت ها، ماکروفاژها و سلول های اندوتلیال عروقی در پاسخ به سایتوکاین های التهابی، استرس شدید و فاکتورهای رشد تولید می شود و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند کنترل فشار خون و همودینامیک کلیوی، درد، التهاب، تومورزایی کلورکتال و تولرورزیستانس اندوتلیال (مقاومت در برابر لخته شدن خون در سلول های اندوتلیال) نقش دارد (Patrono et al., 2016; Bishop -Bailey et al., 2006). جدال و مقابله با التهاب یکی از مشکلات عمده پیش روی پزشکان در درمان طیف وسیعی از بیماری ها است و با توجه به آمار سازمان بهداشت جهانی سالانه باعث مرگ ۴۱ میلیون نفر می شود و ۷۱ درصد از کل مرگ و میرها را شامل می شود (Garcia-Aranda et al., 2020). در طی التهاب، میزانmRNA ی COX-1 و سطح فعالیت آن عموماً تغییر نمی کند اما سطح COX-2 بلافاصله زیاد می شود و در نتیجه تولید پروستاگلاندین های التهابی نیز افزایش می یابد. این داده ها منجر به این نتیجه گیری شد که آنزیم COX-2 در ایجاد التهاب نقش مهمی دارد. همچنین این آنزیم به عنوان یکی از عوامل گسترش تومورهای بدخیم در مطالعات اپیدمیولوژیک شناخته شده است (Gandhi et al., 2017).

امروزه داروهای متعددی با هدف قرار دادن رسپتورها به عنوان عامل ضد التهاب استفاده می شوند که در میان آنها NSAID ها (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) که به شکل غیر اختصاصی باعث مهار عملکرد آنزیم های COX-1 و COX-2 و تولید پروستاگلاندین ها می شوند، بسیار شناخته شده هستند (Van Hecken et al., 2000). اما استفاده طولانی مدت آنها باعث به وجود آمدن عوارض گوارشی جدی می شود، از این رو مهارکننده های اختصاصی COX-2، که علی رغم داشتن اثر ضد التهابی مشابه، برای سیستم گوارش بی خطر هستند مورد توجه ویژه محققان قرار گرفتند. در سال ۱۹۹۹ G. D. Searl در شرکت Pfizer موفق به تولید اولین مهار کننده COX-2، یعنی Celecoxib شد (Rao et al., 2008). در واقع فعالیت ضد التهابی سلکوکسیب به علت جایگزینی سولفون آمید در موقعیت para

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

یک حلقه آریل است. مطالعات ارتباط ساختار و عملکرد (Structure Activity Relationship) یا به اختصار SAR نشان داده اند که حضور گروه جایگزین سولفون آمید، یک ویژگی مهاری بهینه به سلکوکسیب می دهد (Ahmed et al., 2020).

با توجه به مهار غیر اختصاصی آنزیم های COX-1 و COX-2 توسط NSAID های قدیمی تر و ایجاد عوارض جانبی خطرناک برای سیستم گوارشی، تولید داروهایی با خاصیت مهار اختصاصی آنزیم COX-2 که فاقد اثرات جانبی بر سیستم گوارشی هستند و قدرت بالایی نیز در مهار این آنزیم و پیشگیری در التهاب دارند، تبدیل به یک هدف مهم در صنعت داروسازی شده است. از این رو بررسی اثرات مهارکنندگی مشتقات جدید ایمیدازولی طراحی شده بر پایه روش SAR بر آنزیم COX-2 از اهداف کلی این پروژه است. بر اساس نتایج پژوهش های پیشین بر پایه مطالعات SAR، مشخص شده است که جایگزینی گروه SO_2NH_2 و SO_2Me در یکی از حلقه های فنیل در مهار کننده های اختصاصی COX-2، می تواند باعث عملکرد اختصاصی تر این مهار کننده ها شود (Kiani et al., 2018). از این رو در این مطالعه، دسته جدیدی از ترکیبات که دارای گروه ایمیدازول به عنوان حلقه هتروسیکلیک مرکزی و فارماکوفور متیل سولفونیل هستند، مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). نحوه اندازه گیری و محاسبه پارامتر IC_{50} در مقاله قبلی ما به تفصیل توضیح داده شده است (Kiani et al., 2018).

روش های کامپیوتری همچون داکینگ مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی به شکل گسترده ای در درک و چگونگی برهم کنش درشت مولکول هایی مانند آنزیم ها و ریز مولکول هایی مانند مهارکننده ها، مورد استفاده قرار می گیرند. به عنوان مثال در پژوهشی برای بررسی اثر ضدالتهابی و مهارکنندگی تولید نیتریک اکسید بر آنزیم های COX از روش داکینگ مولکولی استفاده شد (Garcia-Aranda et al., 2020). همچنین در پژوهشی دیگر برای ارزیابی مشتقات جدید پیریدازین به عنوان مهارکننده های اختصاصی COX-2، از داکینگ مولکولی استفاده شد (Ahmed et al., 2020). در همین حال در مطالعه ای دیگر برای درک عملکرد گروه جدیدی از مشتقات ناپروکسن نسبت به مهار آنزیم های COX-1 و COX-2 از روش های شبیه سازی دینامیک مولکولی و داکینگ مولکولی استفاده شد (El Sayed et al., 2018). همچنین در طی پژوهش دیگری، در بررسی بر همکنش مشتقات ایندول با آنزیم COX-2 به منظور تولید NSAID های نوین، از داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد (Dileep et al., 2014).

درک چگونگی اتصال مهارکننده ها با آنزیم و همچنین بررسی عملکرد آنها در سطح مولکولی نقش بسیار مهمی در تولید مهارکننده های جدید تر و با اختصاصیت بالاتر دارد. در این مطالعه، به منظور درک مکانیزم مولکولی اتصال مهار کننده ها به آنزیم COX-2، از روش های داکینگ مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. به دنبال انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی به مدت ۱۲۰ نانوثانیه، آنالیزهای ساختاری مانند انحراف جذر میانگین مربع (Root mean square deviation, RMSD)، افت و خیز جذر میانگین مربع (Root mean square fluctuation, RMSF)، تحلیل شعاع ژیراسیون (Radius of gyration, R_g)، تحلیل پیوند های هیدروژنی (H-bond)، تحلیل ساختار دوم (Define secondary structure of protein, DSSP)، تحلیل سطح در دسترس حلال (Solvent accessible surface area, SASA) و همچنین آنالیز ترمودینامیکی تحلیل انرژی آزاد اتصال با روش MM-PBSA (Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area) انجام شد. علاوه بر آن پارامترهای فیزیکوشیمیایی ترکیبات و خواص ADME (Absorption, distribution, metabolism, excretion) نیز ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

آماده سازی ساختار اولیه پروتئین و لیگاند

برای آماده سازی ساختار ۳ بعدی مهارکننده ها از وب سرور CORINA (https://www.mn-am.com/online_demos/corina_demo) که یک ابزار سریع، معتبر و کاربردی در تولید ساختار های سه بعدی در اندازه کوچک و متوسط است، استفاده شد. پس از آن ساختار مهارکننده ها با استفاده از نرم افزار مکانیک کوانتومی گوسین (https://gaussian.com) و با روش B3LYP/6-311++G** از لحاظ پایداری و شکل هندسی بهینه شدند. پیش از انجام داکینگ مولکولی ابتدا ساختار ۳ بعدی آنزیم سیکلواکسیژناز در اتصال با یک مهارکننده (مفنامیک اسید) با شناسه 5IKR از پایگاه داده PDB (https://www.rcsb.org) استخراج شد. علت انتخاب این ساختار رزولوشن بالا و ارگانیسم انسانی بودن آن بود. پس از آن قسمت های غیر ضروری از ساختار پروتئین حذف شدند.

داکینگ مولکولی

در بحث مدلسازی مولکولی با استفاده از روش داکینگ، جهت گیری مطلوب یک مولکول با مولکولی دیگر در قالب یک ترکیب کمپلکس بررسی می شود. آگاهی از یک جهت گیری مطلوب برای پیشگویی قدرت اتصال یا وابستگی اتصال و با استفاده از

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

ΔG اتصال (تابع امتیاز دهی) انجام می شود. در این مطالعه، برای انجام داکینگ مولکولی از نرم افزار Autodock Vina (http://vina.scripps.edu) استفاده شد (Trott et al,. 2009). در طی داکینگ مولکولی، پروتئین ثابت و لیگاند منعطف در نظر گرفته شد. برای تولید فایل های pdbqt از نرم افزار AutoDock tools (V 1.5.6) استفاده شد. در طی فرایند آماده سازی ساختار پروتئین و مهارکننده ها، برای ساختار پروتئین اتم هیدروژن اضافه شده و بار جزئی kollman در نظر گرفته شد. همچنین برای ساختار لیگاندها نیز بار جزئی Gasteiger لحاظ شد. در نهایت با لحاظ کردن بار و گونه اتمی (atom type) برای هر یک از پروتئین (COX-2) و لیگاندها (مهار کننده ها)، ساختار های پروتئین و لیگاند به صورت جداگانه و با فرمت pdbqt آماده شدند. برای داکینگ مهارکننده ها و آنزیم ابعاد grid box (به عنوان فضایی که داکینگ در آن انجام می شود)، ۳۰ ×۳۰ ×۳۰ و مختصات مرکز grid box ۳.۸ ۸.۷ ۱۱.۵در نظر گرفته شد. پس از انجام داکینگ مولکولی، بهترینposeهای انتخابی بر اساس انرژی اتصال لیگاند ها با آنزیم COX-2 به منظور بررسی برهم کنش های بین مهارکننده ها و آنزیم با استفاده از نرم افزار LIGPLOT (https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/) مورد بررسی قرار گرفتند (شکل۱) و نتایج شامل انرژی اتصال لیگاندها ($\Delta G_{binding}$) و برهم کنش های بین پروتئین و لیگاندها بررسی و بهترین حالت اتصالی که بر اساس کمترین انرژی اتصال بود برای شبیه سازی دینامیک مولکولی انتخاب شد.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

برای بررسی دقیق تر دینامیک سیستم ها، جزئیات مولکولی و به دست آوردن اطلاعات ساختاری و ترمودینامیکی جامع تر نسبت به سیستم های شبیه سازی شده از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. همچنین با توجه به پویایی سیستم های بیولوژیک روش شبیه سازی دینامیک مولکولی برای ارزیابی های ساختاری و ترمودینامیکی این سیستم ها روش بسیار مناسبی است. در این پروژه برای انجام شبیه سازی از نرم افزار گرومکس ۲۰۱۸ (https://www.gromacs.org) با گام زمانی ۲ فمتو ثانیه استفاده شد (Abraham et al., 2015). مزیت استفاده از این نرم افزار قابلیت پشتیبانی از انواع میدان های نیرو برای انواع سیستم های زیستی است. در مرحله بعد، از میدان نیروی Amber99SB که میدان نیرویی از نوع تمام اتمی (all-atom) است، برای شبیه سازی بخش پروتئینی استفاده شد (Duan et al., 2003). برای تولید توپولوژی پروتئین از نرم افزار گرومکس و برای تولید توپولوژی لیگاند از ماژول antechamber در نرم افزار Amber استفاده شد (Pearlman et al., 1995). ورودی این نرم افزار فایل pdb مربوط به لیگاندها و خروجی آن فایل های توپولوژی و ساختاری برای لیگاند است. در ادامه، کمپلکس پروتئین-لیگاند در مرکز جعبه شبیه سازی با فاصله ۰.۹ نانومتر از دیواره جعبه قرار داده شدند. از مدل آب TIP3P برای حلال پوشی جعبه شبیه سازی و از یون کلر برای خنثی سازی بار الکتریکی سیستم استفاده شد (Mahoney et al., 2000). در ادامه برای نزدیک شدن به شرایط توده ای و از بین بردن اثرات مرزی، از PBC یا شرایط مرزی متناوب استفاده شد (Wu et al., 2014). برای از بین بردن برهم کنش های نامطلوب، انرژی پتانسیل با دو روش تندترین کاهش و گرادیان مزدوج در ۵۰۰ گام حداقل رسانی شد. بعد از آن برای به تعادل رساندن ساختار کمپلکس ها، ۲ مرحله به تعادل رسانی در هنگردهای (Ensemble) NVT در دمای ۳۰۰ کلوین و NPT در دمای ۳۰۰ کلوین و فشار ۱ بار انجام شد. به این منظور از ترموستات نوزه -هاور و باروستات پارینلو استفاده شد (Nose., 1984; Hoover., 1985; Parrinello., 1981). هر یک از تعادل رسانی ها در بازه زمانی ۵۰۰ پیکوثانیه انجام شد. از شعاع قطع ۱.۲ نانومتر برای برهمکنش های وان دروالسی و از روش PME برای برهمکنش های برد بلند الکترواستاتیک استفاده شد (Essmann et al., 1995). برای ثابت نگه داشتن اتم های کمپلکس پروتئین-لیگاند در طول تعادل رسانی اول، قید موقعیت با ثابت نیروی ۱۰۰۰ کیلوژول بر مول بر نانومتر مربع اعمال شد تا فقط مولکول های آب دینامیک داشته باشند. پس از تعادل رسانی، خواص کنترلی مانند دما، فشار و چگالی سیستم های شبیه سازی شده، بررسی شدند. در نهایت مرحله نمونه برداری (مرحله آخر از فرایند MD) به مدت ۱۲۰ نانوثانیه در هنگرد NPT انجام شد و خروجی ها هر ۳۰ پیکو ثانیه در فایل مسیر ذخیره شدند. همچنین فایل مسیر با استفاده از نرم افزار VMD مورد ارزیابی قرار گرفت.

محاسبه انرژی آزاد اتصال

برای تخمین انرژی آزاد اتصال مهار کننده ها به آنزیم، روش MM-PBSA و ابزار g_mmpbsa (https://rashmikumari.github.io/g_mmpbsa/) مورد استفاده قرار گرفت. روش MM-PBSA روش موثری است که به شکل گسترده ای برای تخمین انرژی آزاد بین آنزیم و مهار کننده ها استفاده می شود (Wang et al., 2001). با این روش، انرژی آزاد اتصال ($\Delta G_{binding}$) برای کمپلکس های مهارکننده و آنزیم COX-2 و سهم برهمکنش های مختلف (الکترواستاتیک، واندروالسی، حلال پوشی قطبی و غیرقطبی) برای تمام کمپلکس ها محاسبه شد. از

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

دیگر مزایای روش MM-PBSA می توان به مشخص شدن سهم رزیدوها درمحاسبه $\Delta G_{binding}$ اشاره کرد. بر اساس این روش، انرژی آزاد اتصال بین آنزیم و مهارکننده از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_{MM\text{-}PBSA} = \Delta G_{gas} + \Delta G_{sol}$$

ΔG_{gas} بیانگر انرژی برهمکنش بین آنزیم و مهارکننده در فاز گازی است و از حاصل جمع ΔE_{ele} (برهمکنش الکترواستاتیک) و ΔE_{vdW} (برهم کنش واندروالسی) تشکیل می شود:

$$\Delta G_{gas} = \Delta E_{vdw} + \Delta E_{ele}$$

همچنین، ΔG_{sol} بیانگر انرژی حلال پوشی است و از مجموع مقادیر انرژی های حلال پوشی قطبی (ΔG_{pol}) و غیرقطبی(ΔG_{nonpol}) به دست می آید:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{pol} + \Delta G_{nonpol}$$

نتایج

بررسی نتایج داکینگ مولکولی (شکل ۱) نشان داد که هر ۳ ترکیب 5b، 5d و 5e با آمینو اسید Tyr 385 در تشکیل پیوند هیدروژنی مشارکت دارند. همچنین آمینو اسید هایی مانند Phe 205، Phe 209، Tyr 348 و Phe 381 برهمکنش های Π-Π استکینگ را با حلقه های آروماتیک موجود در ساختار لیگاندها برقرار کرده و آمینواسیدهای Leu 531 و Val 349نیز در برهمکنش های هیدروفوب مشارکت می کنند.

برای ارزیابی نتایج شبیه سازی بعد از مرحله تولید، دو سری آنالیز مورد بررسی قرار گرفت: دسته اول، آنالیز های ساختاری شامل RMSD،RMSF ، Rg و DSSP و دسته دوم، آنالیز ترمودینامیکی با روش MM-PBSA که با انجام این آنالیز، انرژی آزاد اتصال و سهم انواع برهمکنش ها در انرژی اتصال میان آنزیم و مهارکننده ها مشخص شد. در انتها ویژگی های فیزیکو شیمیایی و پارامترهای ADME برای بررسی رفتار دارویی این ترکیبات ارزیابی شدند.

تحلیل انحراف جذر میانگین مربع (RMSD)

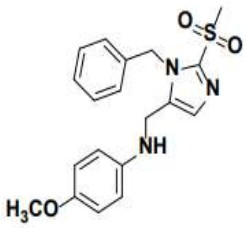
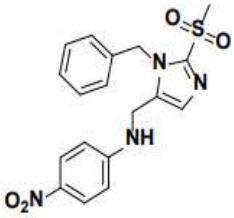
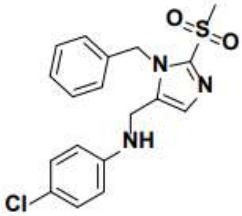
تحلیل RMSD معیاری برای ارزیابی پایداری کلی شبیه سازی و پایداری کمپلکس های مهار کننده و آنزیم COX-2 است. مقدار RMSD کربن های آلفای آنزیم COX-2 با گذشت زمان و در مقایسه با ساختار مرجع (ساختار بعد از حداقل رسانی انرژی) برای آنزیم COX-2 به تنهایی و در کمپلکس با مهار کننده ها ارزیابی شد (شکل ۲). مقادیر میانگین RMSD به صورت زیر است: 5b (۰,۱۷۶ نانومتر) 5d (۰,۱۹۱ نانومتر)،5e (۰,۱۸۱ نانومتر) و پروتئین به تنهایی (۰,۲۱۷ نانومتر).

تحلیل افت و خیز جذر میانگین مربع (RMSF)

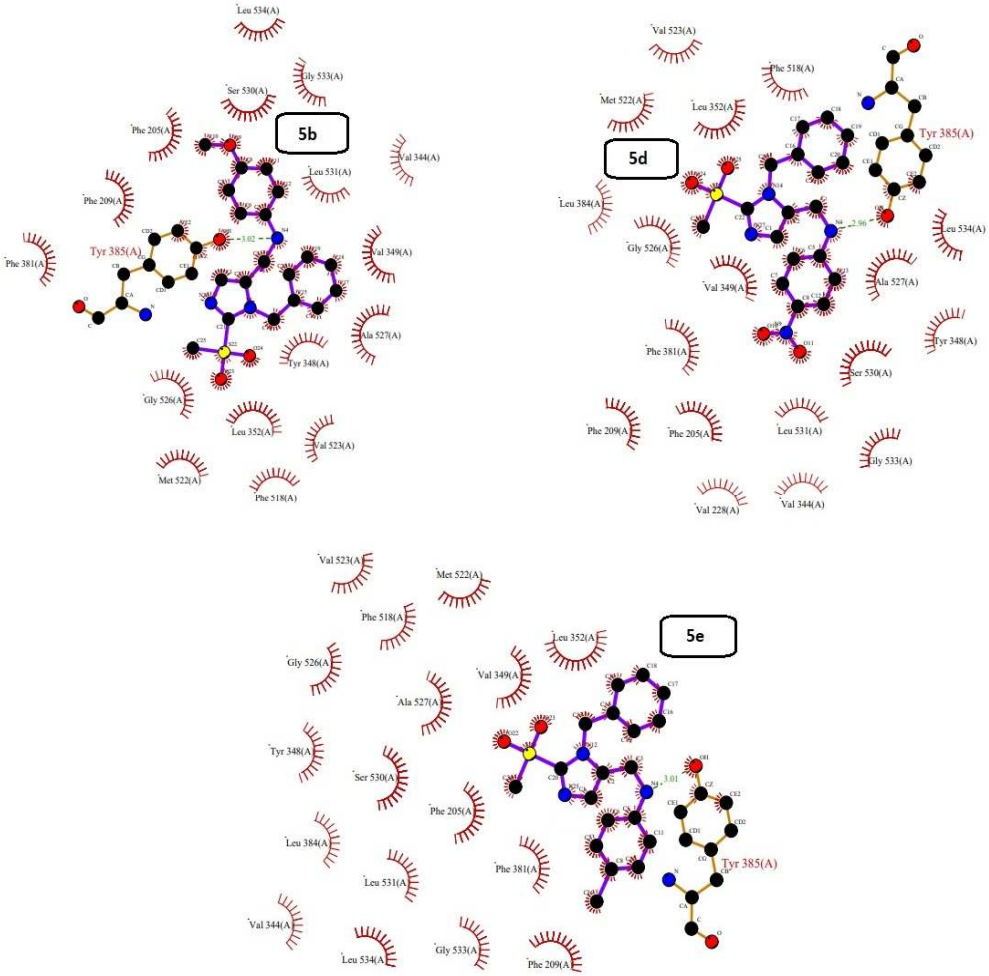
اگرچه RMSD اطلاعات خوبی در رابطه با پایداری شبیه سازی ها و کمپلکس ها در اختیار ما قرار می دهد، اما دانستن انحراف فاصله از ساختار اولیه برای انعکاس حرکات جزئی سیستم کافی نیست؛ به همین منظور از آنالیز RMSF استفاده شد تا میزان انعطاف پذیری ساختار کمپلکس ها ارزیابی شود که نتایج آن در شکل ۳ قابل بررسی است. در ادامه برای هر شبیه سازی، به کمترین میزان نوسانات اشاره می شود: برای ترکیب 5b، کمترین میزان مربوط به Ile 304، ترکیب 5d، مربوط به Phe 20 و در ترکیب 5e، کمترین میزان نوسان به Ala 302، Phe 198 و Ser 530 اختصاص دارد.

جدول ۱- مشتقات ایمیدازولی جدید طراحی شده با روش SAR.

Table 1. The new imidazole derivatives designed on the basis of SAR method.

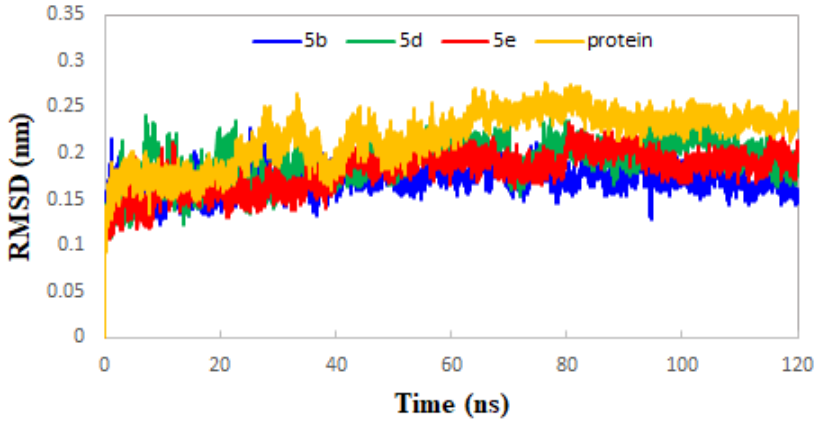
Compound /IC_{50} (µM)	Structure	Compound /IC_{50} (µM)	Structure	Compound /IC_{50} (µM)	Structure
5b (0.71)		5d (3)		5e (3.6)	

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]



شکل ۱- نمودار LIGPLOT لیگاند های 5b، 5d و 5e؛ برهمکنش های پیوند هیدروژنی بین پروتئین و لیگاند با خط چین (سبز) و برهم کنش های هیدروفوبیک توسط کمان قرمز رنگ نمایش داده می شوند.

Figure 1. The LIGPLOT diagrams of compounds 5b, 5d and 5e; Hydrogen bonds are shown by dashed (green) lines and hydrophobic contacts between protein and ligand are indicated by (red) spoked arcs.



شکل ۲- RMSD کربن های آلفا COX-2 در سیستم های شبیه سازی شده.

Figure 2. RMSD of the alpha carbon atoms of COX-2 in the simulated systems.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

تحلیل شعاع ژیراسیون (R_g)

شعاع ژیراسیون که برای بررسی تغییرات ساختاری انجام می شود، معیاری برای ارزیابی میزان فشردگی پروتئین است. با انجام این آنالیز می توان ارزیابی مناسبی از تاثیری که اتصال لیگاند بر فشردگی و فولدینگ پروتئین می گذارد، انجام داد (شکل ۴). مقادیر میانگین Rg به شرح زیر است: 5b (۲,۴۵۳ نانومتر) 5d (۲,۴۷۱ نانومتر)، 5e (۲,۴۵۴ نانومتر) و پروتئین به تنهایی (۲,۴۳ نانومتر).

تحلیل سطح در دسترس حلال (SASA)

شکل ۵ نشان دهنده سطح در دسترس حلال برای ترکیبات مورد نظر در طی شبیه سازی است. سطح در دسترس حلال مانند شعاع ژیراسیون معیار دیگری برای بررسی فشردگی پروتئین بعد از شبیه سازی است. مقدار میانگین SASA برای ترکیبات به شرح زیر است: 5b ۲۴۷.۴۵۷ نانومتر مربع، 5d ۲۴۹.۸۵۸ نانومتر مربع، 5e ۲۴۸.۴۵۵ نانومترمربع و برای COX-2 ۲۴۳.۳۰۳ نانومتر مربع.

تحلیل پیوند هیدروژنی

با توجه به اینکه پیوند هیدروژنی یکی از برهمکنش های غیر کوالان مهم در تشکیل و پایداری کمپلکس های پروتئین-لیگاند محسوب می شود، آنالیز پیوندهای هیدروژنی میان آنزیم COX-2 و مهارکننده ها با هدف تعیین تعداد پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده در طول شبیه سازی (شکل ۶) و همچنین درصد حضور پیوندهای هیدروژنی در طی زمان شبیه سازی انجام شده و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است. معیار هندسی برای لحاظ کردن یک پیوند هیدروژنی در طی شبیه سازی به صورت فاصله دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی کمتر از ۳.۵ آنگستروم و زاویه دهنده – هیدروژن – پذیرنده بزرگتر از ۱۳۵ درجه درنظر گرفته شد. آنالیز پیوند هیدروژنی نشان می دهد که بالاترین درصد حضور پیوند هیدروژنی در پیوندهای تشکیل شده میان مهارکننده 5b و آمینواسید های Tyr 348 (۱۱.۹۰٪) و Ser 530 (۱۰.۰۶٪) و Tyr 385 (۳۶.۷۴٪)، مهارکننده 5d و آمینواسیدهای Tyr 385 (۶۱.۹۷٪) و Ser 530 (۳۳.۰۲٪) و مهارکننده 5e و آمینواسیدهای Tyr 385 (۲۵.۰۶٪) و Ser 530 (۱۰.۲۱٪) دیده می شود. این نتایج با داده های داکینگ مولکولی تطابق خوبی را نشان می دهد.

تحلیل ساختار دوم (DSSP)

در این آنالیز، تغییرات ساختار دوم پروتئین در آنزیم COX-2 در حالت آزاد و در کمپلکس با مهارکننده ها با استفاده از ماژول DSSP مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور متوسط تعداد آمینواسیدهایی که به ترتیب با ساختارهای دوم شامل مارپیچ آلفا (α-helix)، صفحه بتا (β-sheet)، پیچ (turn)، خمش (bend) و پیچش (coil) مطابقت دارند، محاسبه شده و در نمودار در طول زمان شبیه سازی نشان داده می شود (شکل ۷). با بررسی این شکل مشخص شد که در تمامی کمپلکس ها ساختار غالب مارپیچ آلفا است. پس از آن بیشترین تراکم ساختاری مربوط به coil و پس از آن turn و bend ها است. بررسی دقیق تر نشان می دهد که در کمپلکس ترکیب 5e با آنزیم COX-2 میزان مارپیچ آلفا نسبت به آنزیم تنها افزایش کمی داشته اما میزان تراکم مارپیچ های آلفا در ترکیب 5b کمی کمتر شده است. برای تمام کمپلکس ها، صفحات بتا و bend ها تقریبا بدون تغییر باقی ماندند. در مورد coil نیز روالی مشابه با مارپیچ آلفا دیده می شود.

تحلیل انرژی آزاد اتصال

برای تخمین انرژی آزاد اتصال مهار کننده ها به آنزیمCOX-2 از روش MM-PBSA و برای ۶۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی استفاده شد. در این آنالیزΔG اتصال به همراه سهم برهم کنش های واندروالس، الکترواستاتیک، حلال پوشی قطبی و غیرقطبی محاسبه شد (شکل ۸). با یک نگاه کلی به این نمودار می توان دریافت که کمترین $\Delta G_{binding}$ مربوط به ترکیب 5b (۱۶۲.۰۱۴- کیلوکالری بر مول) است. همچنین سایر مقادیر $\Delta G_{binding}$ به شرح زیر است: ترکیب 5e ۱۴۷.۶۸۹- کیلوکالری بر مول و ترکیب 5d ۱۲۶.۳۶۵- کیلوکالری بر مول. از نتایج دیگر این آنالیز می توان به مشخص شدن سهم هر رزیدو در مقدار $\Delta G_{binding}$ اشاره کرد (شکل ۹).

پیشگویی پارامترهای فیزیکو شیمیایی و ADME

ویژگی های فیزیکو شیمیایی مهارکننده ها با استفاده از ابزار Swiss ADME (http://www.swissadme.ch/) بررسی و نتایج آن در جدول ۳ نشان داده شده اند. با توجه جدول ۳، جرم هر سه ترکیب در حدود ۴۰۰ گرم بر مول است. همینطور مساحت سطح قطبی توپولوژیکی (Topological polar surface area=TPSA) برای هر سه ترکیب کمتر از ۱۴۰ آنگستروم و مقادیر LogP (به عنوان معیاری از چربی دوستی) کمتر از ۵ هستند. علاوه بر آن تعداد دهنده های پیوند هیدروژنی برای ترکیبات، کمتر از ۵ و پذیرنده پیوندها کمتر از ۱۰ هستند. بر اساس این داده ها می توان نتیجه گرفت که هر ۳ ترکیب خواص شبه دارویی خوبی را از خود نشان داده و انحرافی از قوانین لیپینسکی نشان نمی دهند. همچنین با استفاده از فرمول (%ABS=109−(0.345 × TPSA درصد جذب روده ای محاسبه شد. این پارامتر برای ترکیب 5b، 5d و 5e به ترتیب ۸۰.۰۲، ۶۹.۹۹ و ۸۵.۸۰ درصد است که نشان می دهد هر ۳ ترکیب به خصوص ترکیبات 5b و 5e قابلیت اثرگذاری مطلوبی به صورت خوراکی را دارند.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

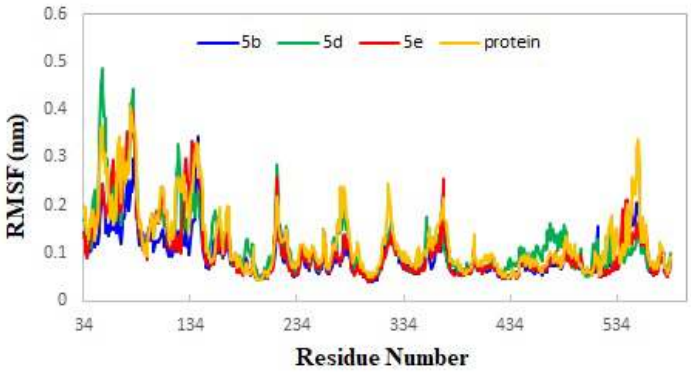
بحث

مقابله با التهاب یکی از مشکلات عمده پیش روی پزشکان در درمان طیف وسیعی از بیماری ها است. با توجه به آمار سازمان بهداشت جهانی بیماری های التهابی سالانه باعث مرگ ۴۱ میلیون نفر شده و ۷۱ درصد از کل مرگ و میرها را شامل می شود. امروزه داروهای متعددی با هدف قرار دادن رسپتورها به عنوان عامل ضد التهاب استفاده می شوند که در میان آنها NSAID ها که به شکل غیر اختصاصی باعث مهار عملکرد آنزیم های COX-1 و COX-2 و تولید پروستاگلاندین ها می شوند، بسیار شناخته شده هستند. اما استفاده طولانی مدت آنها باعث به وجود آمدن عوارض گوارشی جدی می شود، از این رو مهارکننده های اختصاصی COX-2، علی رغم داشتن اثر ضد التهابی مشابه، برای سیستم گوارش بی خطر بوده و مورد توجه ویژه محققان قرار گرفته اند (Garcia-Andrea et al. 2020; Ahmed et al., 2020). در اوایل دهه ۱۹۹۰ که حضور ایزوفرم القاپذیر COX یعنی COX-2 اعلام شد، ایده تولید پروستاگلاندین های التهابی توسط COX-2 و COX-1 قوت گرفت. در نتیجه تولید مهارکننده های اختصاصی COX-2 که اثر ضد التهابی قوی تر و عوارض جانبی کمتر دارند، مورد توجه ویژه دانشمندان قرار گرفت. در نهایت در سال ۱۹۹۹ شرکت Pfizer موفق به تولید اولین مهار کننده اختصاصی COX-2 یعنی Celecoxib شد (Rao et al., 2008).

در این مطالعه هدف بررسی اثر ضد التهابی و فعالیت مهاری ۳ مشتق ایمیدازولی طراحی شده با متد SAR است. پس از آماده سازی ساختارهای سه بعدی مهارکننده ها توسط وب سرور CORINA و بهینه سازی ساختاری مهارکننده ها توسط نرم افزار Gaussian، داکینگ مولکولی با نرم افزار Autodock Vina انجام شد. در این فرایند که اتصال بهینه لیگاندها با آنزیم COX-2 ارزیابی شد، بهترین pose یا جایگاه اتصالی، که اولین پوز بر اساس binding affinity یا انرژی اتصال بود، انتخاب و پس از بررسی مجدد با نرم افزار LIGPLOT و اطمینان از قرارگیری صحیح لیگاندها در جایگاه فعال آنزیم، شبیه سازی دینامیک مولکولی انجام شد. پس از شبیه سازی به مدت ۱۲۰ نانوثانیه، آنالیزهای ساختاری و ترمودینامیکی متعددی بر روی فایل مسیر انجام شد تا از جنبه های مختلف اتصال مهارکننده ها با آنزیم COX-2 ارزیابی شود.

پژوهش های قبلی نشان داده است که دسته ای از مشتقات ایندول با نام های Des-1، Des-2، Des-3 و Des-4 قادر به مهار آنزیم COX-2 بودند. در این پژوهش برای بررسی برهم کنش مهارکننده ها و COX-2 از داکینگ مولکولی استفاده شد و حالت اتصالی ترکیبات با مهارکننده سلکوکسیب مقایسه شد. همچنین برای بررسی انرژی آزاد اتصال روش MM-GBSA به کار گرفته و مشخص شد که این ترکیبات اتصال محکم تری در جایگاه فعال آنزیم COX-2 دارند (Dileep et al., 2014).

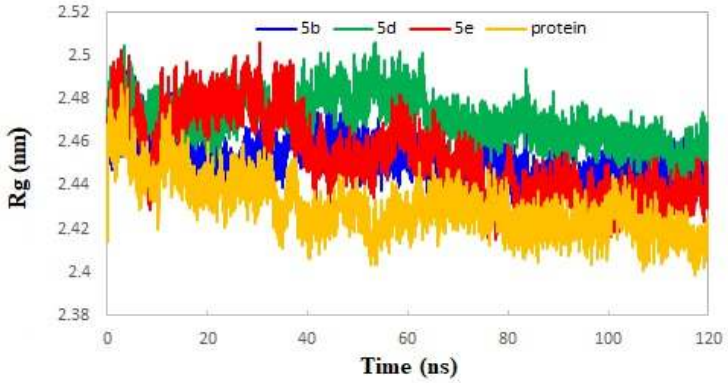
محققین دیگر نیز با استفاده از روش SAR موفق به طراحی مشتقات جدید پیریدازین شدند. در این مطالعه مشخص شد که ترکیبات تازه سنتز شده اختصاصیت بیشتری نسبت به مهارکننده های موجود در مقابل آنزیم COX-2 دارند. علاوه برآن داکینگ مولکولی نشان داد که مشتقات جدید در مقایسه با مهارکننده های موجود، حالت اتصالی مطلوب تری با COX-2 دارند که نشان دهنده ظرفیت مهارکنندگی بالای این ترکیبات است. همچنین مشخص شد که یکی از ترکیبات تازه سنتز شده دارای عوارض جانبی کمتری برای معده و روده است (Ahmed et al., 2020).



شکل ۳- RMSF کربن های آلفا COX-2 در سیستم های شبیه سازی شده.

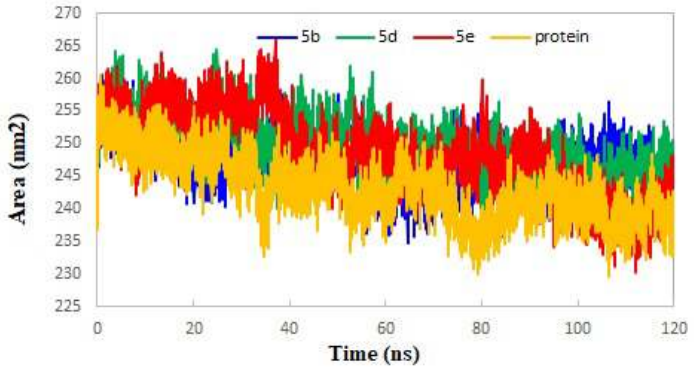
Figure 3. RMSF of the alpha carbon atoms of COX-2 in the simulated systems.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]



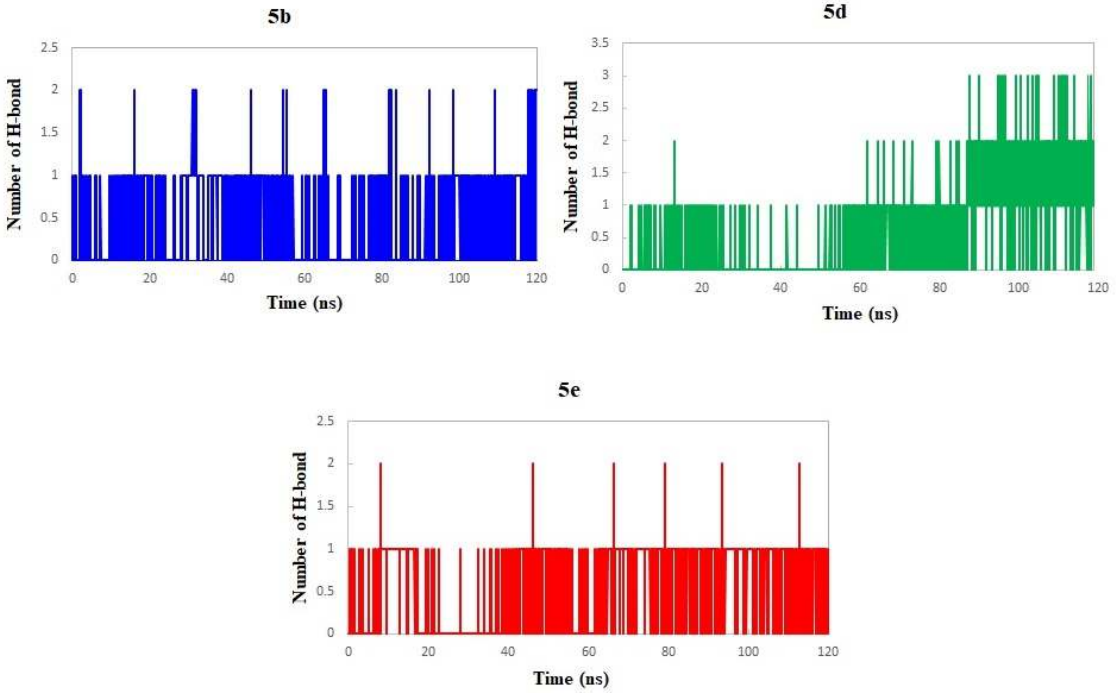
شکل ۴- شعاع ژیراسیون COX-2 در سیستم های شبیه سازی شده.

Figure 4. Radius of gyration for COX-2 in the simulated systems.



شکل ۵- سطح در دسترس حلال برای ترکیبات 5b,5d, 5e و Celecoxib در طی شبیه سازی.

Figure 5. Solvent accessible surface area for compounds 5b, 5d, 5e and Celecoxib during the simulation.



شکل ۶- تعداد پیوند های هیدروژنی برای ترکیب های 5b، 5d و 5e در طی شبیه سازی.

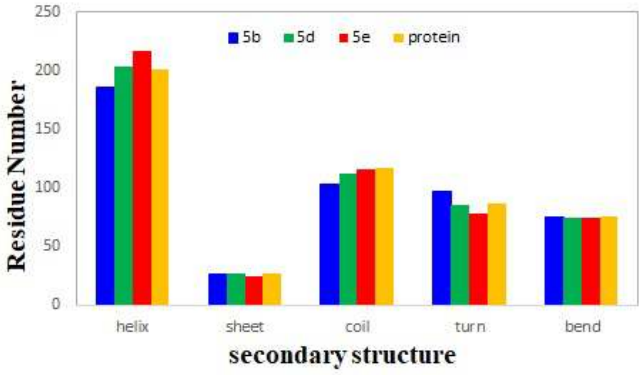
Figure 6. The number of hydrogen bonds during the MD simulation for 5b, 5d and 5e.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

جدول ۲- درصد حضور پیوند های هیدروژنی میان آنزیم COX-2 و مهارکننده ها.

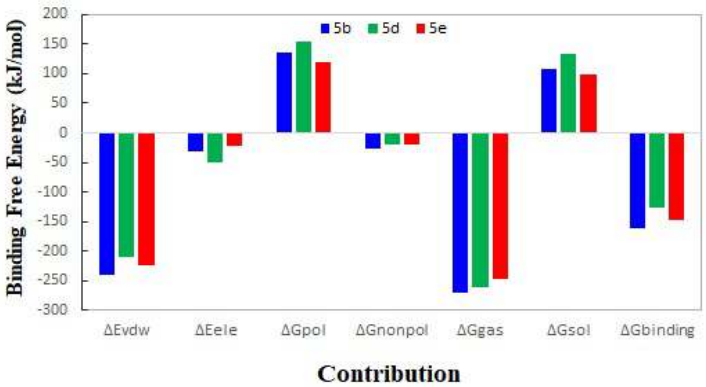
Table 2. The occupancy of hydrogen bonds formed between COX-2 enzyme and inhibitors.

COX-2		Inhibitors		%Exist
TYR348	OH	5b	N4	11.90
ALA527	N	5b	O23	3.38
TYR385	OH	5b	N4	36.74
SER530	OG	5b	N13	10.06
SER530	OG	5b	N26	2.65
TYR348	OH	5d	N4	3.06
TYR385	OH	5d	O24	61.97
SER530	OG	5d	N14	11.01
SER530	OG	5d	O24	3.08
SER530	OG	5d	N27	33.02
TYR385	OH	5e	N4	25.06
SER530	OG	5e	O22	2.71
SER530	OG	5e	N25	10.21



شکل ۷- تعداد آمینو اسیدهایی که ساختار دوم helix، sheet، coil، turn و bend دارند.

Figure 7. The number of amino acids having the secondary structure of α-helix, random coil and β-sheet.



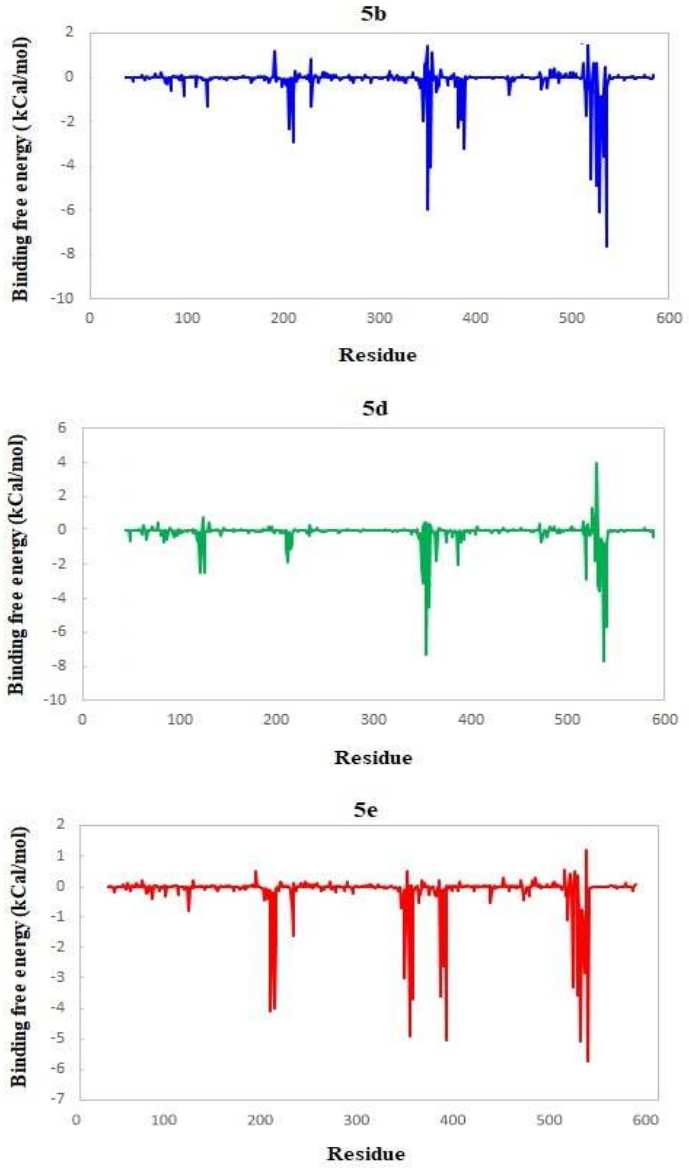
شکل ۸- نمودار MM-PBSA برای ترکیبات شبیه سازی شده به همراه سهم اجزای انرژی اتصال.

Figure 8. MM-PBSA plot for simulated complexes providing the binding free energy components.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

همچنین برخی محققین با استفاده از روش SAR موفق به طراحی مشتقات جدید ناپروکسن شدند. به علاوه با به کارگیری داکینگ مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی به مدت ۳ نانوثانیه، اثر ضد التهابی ترکیبات تازه سنتز شده را ارزیابی کردند. همچنین در این پژوهش مشخص شد که ترکیبات نام برده شده منجر به ممانعت از رشد برخی رده های سلولی سرطانی به عنوان مثال رده سلولی سرطان ملانوما و سرطان کولون، می شوند (El Sayed et al., 2018).

محققین دیگر با استفاده از چندین مرحله غربالگری مجازی ۱۸ میلیون ترکیب استخراج شده از پایگاه داده ZINC، موفق به شناسایی دو ترکیب ZINC40484701 و ZINC16934653 شدند. در این پژوهش پس از انجام داکینگ مولکولی مشخص شد که لیگاندهای فوق با رزیدوهای کلیدی جایگاه فعال آنزیم COX-2 برهم کنش داشتند. همچنین با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی به مدت ۱۰۰ نانوثانیه مشخص شد که ترکیبات نام برده شده قادر به برقراری پیوند هیدروژنی و برهم کنش های هیدروفوبیک با رزیدوهای مهم جایگاه فعال آنزیم COX-2 هستند (Heidarpoor et al., 2021).



شکل ۹- نمودار سهم رزیدوها در انرژی آزاد اتصال برای ترکیب های 5b، 5d و 5e.

Figure 9. The residue contribution in binding free energy of 5b, 5d and 5e.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

جدول ۳- ویژگی های فیزیکو شیمیایی مهارکننده های مورد بررسی.

Table 3. Physicochemical properties of the studied inhibitors.

Compound	M_w[a]	Log*P*[b]	HBD[c]	HBA[d]	TPSA (A^2)[e]	n-RB[f]	Lipinski Violation
5b	403.71	1.02	1	5	83.98	6	0
5d	414.65	1.11	0	6	113.06	6	0
5e	402.08	1.69	0	4	67.24	5	0
Lipinski RO 5	≤ 500	≤ 5	≤ 5	≤ 10	≤ 140	≤ 10	≤ 1

[a] Molecular weight (M_w).
[b] Logarithm of the partition coefficient between n-octanol and water (Log*P*).
[c] Number of hydrogen bond donors (HBD).
[d] Number of hydrogen bond acceptor (HBA).
[e] Topological polar surface area (TPSA).
[f] Number of rotatable bonds (Nrb)

در این مطالعه، بر اساس تحلیل RMSD ، هر چه این میزان کمتر باشد (یا به صفر نزدیک تر باشد) نشان می دهد که انحراف ساختار نسبت به ساختار مرجع بسیار کم است و مقادیر بالای RMSD بیانگر انحراف ساختاری کمپلکس ها پس از شبیه سازی کمپلکس ها و همچنین پروتئین در ابتدا افزایش پیدا کرده و سپس به ثبات رسیده است. یعنی سیستم های شبیه سازی شده برای انجام سایر آنالیزها مناسب هستند. با بررسی میانگین RMSD می توان این نتیجه را گرفت که مقادیر RMSD آنزیم COX-2 در کمپلکس با مهارکننده ها کمتر از این مقدار برای آنزیم COX-2 به تنهایی است. این یافته اهمیت مهارکننده ها در پایدار کردن آنزیم را نشان می دهد. علاوه بر آن ترکیبات 5b (۰,۱۷۶ نانومتر)، و 5e (۰,۱۸۱ نانومتر)کمترین مقدار میانگین و در نتیجه مطلوب ترین میزان RMSD را دارند.

از آنجاکه آنالیز RMSD به تنهایی پارامتر مناسبی برای نشان دادن میزان نوسانات اتم ها نیست، از افت و خیز جذر میانگین یا RMSF برای بررسی نوسانات اتم ها در حین شبیه سازی استفاده شد. با یک نگاه کلی به نمودار RMSF (شکل۳) می توان دریافت که نوسانات اتم های کربن آلفای پروتئین بیشتر از پروتئین در کمپلکس با مهارکننده ها است. علت این پدیده را می توان به اتصال مهارکننده ها به آنزیم و کاهش تحرکات پروتئین نسبت داد. به علاوه با بررسی نمودارهای RMSF می توان دریافت که اتم های نواحی N و C ترمینال پروتئین نوسانات بالاتری نسبت به سایر اتم ها دارند. دلیل این امر آزادی تحرک اتم های انتهایی است. همچنین اکثر رزیدوهایی که کمترین نوسان را دارند رزیدوهایی هستند که در جایگاه فعال آنزیم قرار داشته و لیگاند به آنها متصل شده است.

تحلیل شعاع ژیراسیون که برای ارزیابی تغییرات ساختاری انجام می شود، معیاری برای ارزیابی میزان فشردگی پروتئین است. در واقع هر چه شعاع ژیراسیون یک پروتئین کمتر باشد، نشان دهنده متراکم و فشرده تر بودن ساختار پروتئین است. با انجام این آنالیز در بازه زمانی ۱۲۰ نانوثانیه مشخص شد که میانگین میزان شعاع ژیراسیون در کمپلکس های مهارکننده-آنزیم تفاوت بسیار اندکی با شعاع ژیراسیون آنزیم به تنهایی دارد. با توجه به مقادیر میانگین Rg (برای ترکیب 5b: ۲.۴۵۳ نانومتر، ترکیب 5d: ۲.۴۷۱ نانومتر، ترکیب 5e، ۲.۴۵۴ نانومتر و برای پروتئین ۲.۴۳۱ نانومتر) می توان گفت در بین این ترکیبات کمترین میزان شعاع ژیراسیون مربوط به ترکیب 5b است. این داده ها نشان می دهند میزان میانگین Rg پروتئین در کمپلکس با لیگاند ها نسبت به پروتئین به تنهایی افزایش کمی داشته (در حد ۰.۱-۰.۲ نانومتر) که می تواند به دلیل تاثیر اتصال مهار کننده ها به آنزیم باشد. علاوه بر آن با بررسی نمودار های Rg (شکل ۴) می توان دریافت که میزان نوسانات شعاع ژیراسیون در طی زمان شبیه سازی بسیار کم است، یعنی اتصال مهار کننده ها به پروتئین تاثیر چشم گیری بر فشردگی پروتئین نداشته و ساختار ها توانسته اند ثبات خود را حفظ کنند.

با در نظر گرفتن شکل ۵ و بررسی مقادیر میانگین SASA (5b ۲۴۷.۴۵۷ نانومتر مربع، 5d ۲۴۹.۸۵۸ نانومتر مربع، 5e ۲۴۸.۴۵۵ نانومترمربع و COX-2 ۲۴۴.۳۰۳ نانومتر مربع) برای ترکیبات شبیه‌سازی شده مشخص شد که SASA برای COX-2 در کمپلکس با مهارکننده‌ها یک روند کاهشی را تا ثانیه ۸۰ شبیه سازی طی می‌کند و پس از آن تا پایان ثابت می‌ماند. علاوه بر آن اتصال مهارکننده ها تاثیر چندانی بر مقدار SASA برای COX-2 به شکل تنها و در اتصال با مهارکننده نداشته است و ساختارها توانسته اند ثبات خود را حفظ کنند. این نتیجه‌گیری با داده‌های شعاع ژیراسیون به خوبی مطابقت دارد.

با انجام آنالیز پیوند هیدروژنی (شکل ۶)، تعداد پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده در طول شبیه‌سازی و همچنین درصد حضور این پیوند ها مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). در برخی

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

از بازه های زمانی شبیه سازی (به عنوان مثال ۶۷ تا ۷۳ نانوثانویه در کمپلکس 5b-COX-2)، تعداد پیوند های هیدروژنی تشکیل شده میان مهارکننده ها و آنزیم کاهش یافته و حتی به صفر می رسد، دلیل این امر آن است که با توجه به دینامیک بودن سیستم های بیولوژیک، در این بازه ها جهت گیری لیگاند به نحوی است که هندسه لازم (طول و زاویه پیوند هیدروژنی) برای تشکیل پیوند هیدروژنی مطلوب شکل نمی گیرد. آنالیز پیوند هیدروژنی نشان می دهد که بالاترین درصد حضور پیوند هیدروژنی در پیوندهای تشکیل شده میان مهارکننده ها و آمینواسید های Tyr 348 و Ser 530 دیده می شود. این نتایج با داده های داکینگ مولکولی در تطابق هستند. علاوه بر این نتایج، میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی به شرح زیر است: 5b (۰.۶۰)، 5d (۰.۶۵)، 5e (۰.۴۶). این مقادیر را می توان با توجه به اینکه تعداد گروه‌های دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی ترکیب 5d بیشتر از ترکیب 5b و آن هم بیشتر از ترکیب 5e است، توجیه کرد.

در آنالیز DSSP، به تغییرات ساختار دوم پروتئین در طول زمان شبیه سازی پرداخته می شود. با بررسی شکل ۷ مشخص شد که در تمامی کمپلکس ها ساختار غالب مارپیچ آلفا است. پس از آن بیشترین تراکم ساختاری مربوط به coil و پس از آن turn وbend ها است. بررسی دقیق تر نشان می دهد که در کمپلکس ترکیب 5e با آنزیم COX-2 میزان مارپیچ آلفا نسبت به آنزیم تنها افزایش کمی داشته اما میزان تراکم مارپیچ های آلفا در ترکیب 5b کمی کمتر شده است که این نشان دهنده کاهش انسجام ساختاری به میزان خیلی کم است. برای تمام کمپلکس ها، صفحات بتا و bend ها تقریبا بدون تغییر باقی ماندند. در مورد coil نیز روالی مشابه با مارپیچ آلفا دیده می شود. به طور کلی می توان این نتیجه را گرفت که در اثر اتصال مهار کننده ها به آنزیم COX-2 تغییر چشم گیری در ساختار دوم پروتئین مشاهده نشده است.

برای تخمین انرژی آزاد اتصال مهار کننده ها به آنزیمCOX-2 از روش MM-PBSA استفاده شد. در این آنالیزΔG اتصال به همراه سهم برهم کنش های واندروالسی، الکترواستاتیک، حلال پوشی قطبی و غیرقطبی محاسبه شد (شکل ۸). با یک نگاه کلی به این نمودار می توان دریافت که کمترین (مطلوب ترین) $\Delta G_{binding}$ مربوط به ترکیب 5b (۱۶۲.۰۱۴- کیلوکالری بر مول) است. همچنین با در نظر گرفتن سایر مقادیر $\Delta G_{binding}$ (ترکیب 5e ۱۴۷.۶۸۹- کیلوکالری بر مول و ترکیب 5d ۱۲۶.۳۶۵- کیلوکالری بر مول) می توان نتیجه گرفت که مطلوب ترین انرژی آزاد اتصال بعد از ترکیب 5b مربوط به ترکیب 5e و درنهایت ترکیب 5d است. شایان ذکر است این روند تاحد زیادی با پارامتر IC_{50} در جدول ۱ (برای ترکیبات 5b ، 5d و 5e به ترتیب ۰.۷۱، ۳ و ۳.۶ میکرومولار) همخوانی دارد (Kiani et al., 2018). بررسی ها نشان می دهد که در هر ۳ کمپلکس سهم برهمکنش های وان دروالسی بیشتر از برهمکنش های الکترواستاتیک است. در بین کمپلکس ها به دلیل تعداد پیوندهای هیدروژنی بیشتر، بیشترین سهم برهمکنش های الکترواستاتیک مربوط به کمپلکس ترکیب 5d و آنزیم COX-2 است و به دلیل خاصیت الکترون دهندگی گروه متوکسی، بیشترین سهم برهمکنش های الکترواستاتیک مربوط به کمپلکس ترکیب 5b و آنزیم COX-2 است. نتایج بررسی سهم مطلوب ترین رزیدوها در انرژی اتصال به شرح زیر است: در ترکیب 5b رزیدوهای Met 535 (۷.۶۱- کیلوکالری بر مول) و Gln350 (۵.۹۶- کیلوکالری بر مول)، ترکیب 5d، مطلوب ترین رزیدوها به ترتیب Lys532 (۷.۷۱- کیلوکالری بر مول) و Gln350 (۷.۳۱- کیلوکالری بر مول) هستند و برای ترکیب 5e رزیدوهای Ser 530 (۵.۷۴- کیلوکالری بر مول) و Ala527 (۵.۱- کیلوکالری بر مول) هستند (شکل ۹). بررسی همزمان این آنالیز با آنالیز RMSF نشان داد که رزیدوهایی که سهم مطلوبی در انرژی آزاد اتصال دارند، عمدتا رزیدوهایی هستند که نوسانات کمتری داشته، در جایگاه فعال آنزیم قرار دارند و درگیر برهمکنش با مهارکننده هستند. این نتیجه به خوبی همخوانی بین نتایج آنالیزهای مختلف محاسباتی (ساختاری و ترمودینامیکی) را نشان می دهد.

در ارتباط با پارامترهای فیزیکوشیمیایی و ADME می توان گفت؛ بر اساس قوانین Lipinski اگر یک ترکیب جرم مولکولی کمتر از ۵۰۰ داشته باشد، رفتار شبه دارویی مناسبی را نشان می دهد (Lipinski et al., 2001). با توجه به جدول ۳ جرم هر سه ترکیب در حدود ۴۰۰ است که می توانند از این نظر گزینه های مناسب دارویی باشند. همینطور اگر یک ترکیب دارای مساحت سطح قطبی توپولوژیکی (TPSA) کمتر از ۱۴۰ آنگستروم باشد و کسر مولی بین ۱۳۰-۴۰ داشته باشد، نفوذپذیری غشایی خوبی دارد و می تواند یک ترکیب مناسب دارویی قلمداد شود. مقدار بهینه LogP (به عنوان معیاری از چربی دوستی) بیانگر این است که تمام ترکیبات چربی دوستی مناسب و دسترسی زیستی مناسبی دارند که برای جذب روده ای آنها اهمیت بالایی دارد. اگر میزان Log P از ۵ بیشتر باشد نشان دهنده قابلیت تجمع ترکیب مورد نظر در بافت زنده است. تعداد دهنده ها و پذیرنده های پیوند هیدروژنی و مساحت سطح قطبی توپولوژیکی در محدوده مناسبی هستند. این داده ها مشخص می کنند که

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

ترکیبات مورد نظر از قوانین Lipinski تبعیت می کنند و رفتار شبه دارویی مطلوبی نیز دارند. همچنین محاسبه پارامتر درصد جذب روده ای نشان داد ترکیبات 5b و 5e قابلیت اثرگذاری به صورت خوراکی را دارند.

نتیجه گیری

در این مطالعه اثر مهاری مشتقات جدید ایمیدازولی بر آنزیم COX-2 با استفاده از روش های محاسباتی مانند داکینگ مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی بررسی شد. با توجه به آنالیزهای ساختاری مثل RMSD می توان گفت که پس از اتصال مهارکننده ها میزان RMSD برای تمام ترکیبات کاهش یافت که بیانگر تاثیر مثبت اتصال ترکیبات بر آنزیم است. همچنین دو ترکیب 5b و 5e کمترین میانگین RMSD را داشتند. همین‌طور با انجام آنالیز RMSF مشخص شد که اتصال مهارکننده‌ها باعث کاهش نوسانات کمپلکس‌ها می‌شود و همچنین رزیدوهای جایگاه فعال دارای کمترین میزان نوسانات بودند. آنالیزهای شعاع ژیراسیون و SASA هر دو حاکی از حفظ ثبات ساختاری پروتئین بعد از اتصال مهارکننده ها بودند. علاوه بر آن آنالیز DSSP نشان داد که در پی اتصال مهارکننده ها تغییر چشم گیری در ساختار پروتئین ایجاد نشد. ΔG اتصال نشان داد کمترین و مطلوب ترین مقدار این انرژی برای کمپلکس 5b و آنزیم بود. به علاوه سهم بر هم کنش های واندروالس از سایر بر هم کنش ها در میزان انرژی اتصال بیشتر بود. با انجام آنالیز پیوند هیدروژنی و درصد اشغال آن مشخص شد که رزیدوهای Ser 530 و Tyr 348 بیشتر از سایر رزیدوهای جایگاه فعال در تشکیل پیوند هیدروژنی مشارکت دارند. علاوه بر آنالیزهای ساختاری و ترمودینامیکی انجام شده، بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و پارامترهای ADME نشان دادند که این ترکیبات رفتار شبه دارویی مطلوبی دارند. یافته های این پژوهش شامل بررسی آنالیزهای ساختاری و ترمودینامیکی و نیز مقایسه با داده های آزمایشگاهی IC_{50} نشان داد که از بین ۳ ترکیب مورد بررسی می توان ترکیب 5b را به عنوان مهارکننده منتخب برای آنزیم COX-2 معرفی کرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دانشگاه خوارزمی و دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی قدردانی و تشکر می شود.

REFERENCES

Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B. & Lindahl, E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX 1: 19-25.

Ahmed, E.M., Hassan, M.S., El-Malah, A.A. & Kassab, A.E. 2020. New pyridazine derivatives as selective 1COX-2 inhibitors and potential anti-inflammatory agents; design, synthesis and biological evaluation. Bioorganic Chemistry 95: 103497.

Bishop-Bailey, D., Mitchell, J.A. & Warner, T.D. 2006. COX-2 in cardiovascular disease. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 26: 956-958.

Blobaum, A.L. & Marnett, L.J. 2007. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. Journal of Medicinal Chemistry 50: 1425-1441.

Chandrasekharan, N.V. & Simmons, D.L. 2004. The cyclooxygenases. Genome Biology 5: 1-7.

Daiyasu, H. & Toh, H. 2000. Molecular evolution of the myeloperoxidase family. Journal of Molecular Evolution 51: 433-445.

Dileep, K.V., Remya, C., Tintu, I. & Sadasivan, C. 2014. Interactions of selected indole derivatives with COX-2 and their in silico structure modifications towards the development of novel NSAIDs. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 32: 1855-1863.

Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M.C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J. & Kollman, P. 2003. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. Journal of Computational Chemistry 24: 1999-2012.

El Sayed, M.T., El-Sharief, M.A.S., Zarie, E.S., Morsy, N.M., Elsheakh, A.R., Nayel, M., Voronkov, A., Berishvili, V., Sabry, N., Hassan, G. & Abdel-Aziz, H.A. 2018. Design, synthesis, anti-inflammatory antitumor activities, molecular modeling and molecular dynamics simulations of potential naprosyn® analogs as COX-1 and/or COX-2 inhibitors. Bioorganic Chemistry 76: 188-201.

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H. & Pedersen, L.G. 1995. A smooth particle mesh Ewald method. The Journal of Chemical Physics 103: 8577-8593.

Gandhi, J., Khera, L., Gaur, N., Paul, C. & Kaul, R. 2017. Role of modulator of inflammation cyclooxygenase-2 in gammaherpesvirus mediated tumorigenesis. Frontiers in Microbiology 8: 538.

Garcia-Aranda, M.I., Gonzalez-Padilla, J.E., Gómez-Castro, C.Z., Gómez-Gómez, Y.M., Rosales-Hernández, M.C., García-Báez, E.V. & Padilla-Martínez, I.I. 2020. Anti-inflammatory effect and inhibition of nitric oxide production by targeting COXs and iNOS enzymes with the 1, 2-diphenylbenzimidazole pharmacophore. Bioorganic & Medicinal Chemistry 28: 115427.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

Heidarpoor Saremi, L., Ebrahimi, A. & Lagzian, M. 2021. Identification of new potential cyclooxygenase-2 inhibitors: insight from high throughput virtual screening of 18 million compounds combined with molecular dynamic simulation and quantum mechanics. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 39: 1717-1734.

Hoover, W.G. 1985. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. Physical Review A 31: 1695-1697.

Kapoor, M., Shaw, O. & Appleton, I. 2005. Possible anti-inflammatory role of COX-2-derived prostaglandins: implications for inflammation research. Current Opinion in Investigational Drugs 6: 461-466.

Kiani, A., Rezaee, E. & Tabatabai, S.A. 2018. Novel group of imidazole derivatives as atypical selective cyclooxygenase-2 inhibitors: design, synthesis and biological evaluation. Iranian Journal of Pharmaceutical Research (IJPR) 17: 78-86.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews 46: 3-26.

Mahoney, M.W. & Jorgensen, W.L. 2000. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. The Journal of Chemical Physics 112: 8910-8922.

Mbonye, U.R., Yuan, C., Harris, C.E., Sidhu, R.S., Song, I., Arakawa, T. & Smith, W.L. 2008. Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. Journal of Biological Chemistry 283: 8611-8623.

Nosé, S. 1984. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. The Journal of Chemical Physics 81: 511-519.

Parrinello, M. & Rahman, A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. Journal of Applied Physics 52: 7182-7190.

Patrono, C. 2016. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. British Journal of Clinical Pharmacology 82: 957-964.

Pearlman, D.A., Case, D.A., Caldwell, J.W., Ross, W.S., Cheatham III, T.E., DeBolt, S., Ferguson, D., Seibel, G. & Kollman, P. 1995. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. Computer Physics Communications 91: 1-41.

Phillis, J.W., Horrocks, L.A. & Farooqui, A.A. 2006. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. Brain Research Reviews 52: 201-243.

Rao, P. & Knaus, E.E. 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 11: 81-110.

Rouzer, C.A. & Marnett, L.J. 2009. Cyclooxygenases: structural and functional insights. Journal of Lipid Research 50: 29-34.

Smith, W.L., DeWitt, D.L. & Garavito, R.M. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annual Review of Biochemistry 69: 145-182.

Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L. & Diederich, M. 2010. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. International Journal of Cell Biology 2010: 1-21.

Tanabe, T. & Tohnai, N. 2002. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. Prostaglandins & Other Lipid Mediators 68: 95-114.

Trott, O. & Olson, A.J. 2009. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry 31: 455-461.

Van Hecken, A., Schwartz, J.I., Depré, M., De Lepeleire, I., Dallob, A., Tanaka, W., Wynants, K., Buntinx, A., Arnout, J., Wong, P., Ebel, D., Gertz, B. & De Schepper, P.J. 2000. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. The Journal of Clinical Pharmacology 40: 1109-1120.

Wang, J., Morin, P., Wang, W. & Kollman, P.A. 2001. Use of MM-PBSA in reproducing the binding free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of efavirenz by docking and MM-PBSA. Journal of American Chemical Society 123: 5221-5230.

Wu, W., Owino, J., Al-Ostaz, A. & Cai, L. 2014. Applying periodic boundary conditions in finite element analysis. SIMULIA Community Conference. Available from: https://www.3ds.com/newsroom/press-releases/dassault-systemes-opens-2014-simulia-community-conference-highlighting-simulation-age-experience.

*****

How to cite this article:

Mollaie, Z., Karami, L., Rezaee, E. & Karimi, G. 2023**.** Investigating the inhibitory effect of new imidazole derivatives on cyclooxygenase II enzyme with computational approach. Nova Biologica Reperta 10: 169-183. (In Persian).

ملایی، ز. کرمی، ل.، رضائی، ا. و کریمی، گ. ۱۴۰۲. بررسی اثر مهاری مشتقات جدید ایمیدازولی بر آنزیم سیکلواکسیژناز II با رویکرد محاسباتی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۱۸۳-۱۶۹.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]