

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی اثر زانتوهمول به‌عنوان ماده‌ی مؤثره‌ی گیاه رازک در مهار پیام‌رسان MAPK/ERK در سرطان تیروئید

زهره قلی‌زاده سیاهمزیگی^۱، شیوا ایرانی^{۱*}، علی غیاث‌الدین^۲، پرویز فلاح^۳، وحید حق‌پناه^{۴*}

چکیده

هدف: زانتوهمول یکی از اصلی‌ترین مواد مؤثره‌ی گل ماده‌ی گیاه رازک است که تحقیقات زیادی اثرات ضد سرطانی آن را نشان می‌دهد. مسیر MAPK/ERK یکی از آبشارهای کلیدی در تنظیم بیان ژن، رشد و بقای سلول است. سیگنالینگ غیرطبیعی مسیر MAPK منجر به تکثیر کنترل نشده در سرطان تیروئید می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین‌های اصلی این مسیر و معرفی آنها به‌عنوان پروتئین هدف زانتوهمول است. همچنین به‌دلیل اهمیت پروتئین‌های EGFR، Grb2، SOS بر مسیر MAPK/ERK، این پروتئین‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفتند.

روش‌ها: ابتدا خواص فیزیکی-شیمیایی، فارماکوکینتیک-فارماکودینامیک زانتوهمول با استفاده از نرم‌افزار SwissADME پیش‌بینی شد. سپس ساختار سه بعدی زانتوهمول و پروتئین‌های هدف (ERK1، MEK2، MEK1، RAF، RAS، SOS، Grb2، EGFR) به ترتیب از پایگاه PubChem و پایگاه داده‌های پروتئین دریافت شد و در بررسی داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار Autodock4.1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که زانتوهمول دارای خاصیت فیزیکی-شیمیایی مناسب است و توسط سازوکار پمپ P-گلیکوپروتئین، مقاومت دارویی ایجاد نمی‌کند. نتایج به‌دست آمده از داکینگ مولکولی نشان می‌دهد که زانتوهمول نسبت به همه‌ی پروتئین‌های بررسی شده در مسیر MAPK/ERK پتانسیل مهاری دارد و قوی‌ترین برهمکنش آن با پروتئین MEK2 با انرژی اتصال $-7.04 \text{ kcal.mol}^{-1}$ است. **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به‌دست آمده، پیش‌بینی شد که زانتوهمول دارای پتانسیل مهار پروتئین‌های مسیر MAPK/ERK است و فاقد سمیت است بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک نامزد مهار مسیر MAPK/ERK در سلول‌های سرطانی تیروئید معرفی شود.

واژگان کلیدی: فارماکوکینتیک، فارماکودینامیک، زانتوهمول، مسیر MAPK/ERK

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی زیست‌پزشکی، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۴- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

***نشانی:** تهران، انتهای بزرگراه شهید ستاری، میدان دانشگاه بلوار شهدای حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات. کدپستی:

۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۶۱۵۴-۸، نامبر: ۰۲۱۴۴۸۶۷۱۴، پست الکترونیک: s.irani@srbiau.ac.ir

***نشانی:** تهران، بزرگراه شهید چمران، تقاطع جلال آل احمد، بعد از دانشگاه تربیت مدرس، پلاک ۱۰، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، کدپستی:

۱۴۱۱۷۱۳۱۳۷، تلفن: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۳۷، نامبر: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: vghghanah@tums.ac.ir

مقدمه

گیاه رازک در طول سالیان طولانی به‌عنوان یک گیاه دارویی استفاده شده است. این گیاه دارای مواد مؤثره‌ی زیادی از جمله Prenylated flavonoids است که کاربردهای زیادی در داروسازی و پزشکی دارد. زانتوهمول^۱ فراوانترین flavonoid است که بیشترین درصد آن در گل ماده‌ی رازک یافت می‌شود [۱]. مطالعات زیادی اثر ضد سرطانی زانتوهمول را بر علیه سرطان‌های ریه، پستان، پروستات و رحم را نشان می‌دهد.

از آنجا که اختلال در مسیر ERK/MAPK در بسیاری از سرطان‌ها به‌خصوص در سرطان تیروئید وجود دارد [۲] که جهش در BRAF در سرطان تیروئید باعث القاء تومور اولیه می‌شود [۳]. بنابراین این مسیر می‌تواند به‌عنوان هدف بالقوه‌ی مناسبی جهت درمان سرطان تیروئید باشد. در این مطالعه از پروتئین‌های این مسیر به‌عنوان پروتئین هدف و از زانتوهمول به‌عنوان مهار کننده جهت انجام مطالعات داکینگ استفاده شد.

آبشار Ras/Raf/MEK/ERK از گیرنده‌های سطح سلول، سیگنال‌هایی را به فاکتورهای رونویسی منتقل می‌کند که باعث تنظیم بیان ژن می‌شوند و همچنین فعالیت‌های پروتئین‌های درگیر در آپتوز را نیز تنظیم می‌کنند [۳]. ساختار این مسیر به‌طور کلی شامل یک G-پروتئین کوچک به‌نام RAS و سه پروتئین کیناز به‌نام‌های RAF، MEK و ERK است [۴].

پروتئین KRAS نقش مهمی در مسیر آبشاری MAPK و مسیر PI3K دارند. زمانی که پروتئین KRAS فعال می‌شود، پروتئینی به‌نام BRAF که عضو کلیدی و آغازگر مسیر MAPK است را فعال می‌کند [۲]. آبشار کینازی که از BRAF آغاز می‌شود، به MEK و به پروتئین‌های خانواده MAP کیناز می‌رسد. پروتئین‌های خانواده MAP کیناز پس از فعال شدن (فسفریله شدن) قادرند هم مسیرهای موازی همچون PI3K را فعال کنند و هم از غشای هسته عبور کرده و از طریق فعال‌سازی فاکتورهای نسخه‌برداری، موجب بیان ژن‌های تقسیم سلولی شوند. اختلال در مسیر سیگنالینگ ERK/MAPK باعث افزایش تکثیر سلول، بقای سلول و متاستاز در بسیاری از سرطان‌ها می‌شود [۲].

به‌عنوان مثال بیان بالای ERK، باعث القاء بیان مولکول‌های ضد آپتوز مانند BCL2 و به‌دنبال آن مقاومت دارویی در انواع سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین جهش در BRAF، تقریباً در ۵۰٪ بیماران مبتلا به سرطان پاپیلاری تیروئید شناسایی شده است [۲] مسیر Raf-MEK-ERK یک فاکتور مهم در پایین دست برای RAS است که بیشترین فراوانی موتاسیون در سرطان‌های انسانی را دارد [۲] که اکثریت جهش‌ها در سرطان تیروئید در ارتباط با RAF و RAS در این مسیر است [۶].

همچنین بسیاری از گزارشات پیشنهاد می‌کنند که مسیرهای سیگنالینگ مانند مسیر ERK/MAPK در تنظیم بیان P-گلیکوپروتئین مؤثر هستند. P-گلیکوپروتئین یکی از اعضای خانواده‌ی ناقل ABC است که در سلول‌ها و بافت‌های نرمال مانند کلیه، کبد، روده بزرگ و سد خونی مغزی جهت محافظت در مقابل مواد سمی، بیان می‌شود [۷]. در سلول‌های سرطان P-گلیکوپروتئین بیان بالایی دارد و پمپ نمودن داروها توسط P-گلیکوپروتئین یکی از مهم‌ترین سازوکارهای مقاومت دارویی در سلول‌های سرطانی است که می‌تواند مولکول‌های ضد سرطانی [۶] و داروهای هیدروفوبیک را به خارج از سلول پمپ کند [۷]. افزایش فعالیت مسیر پیام‌رسان MAPK در رده‌های سلولی مقاوم باعث افزایش مقاومت می‌شود و مهار این مسیر راهبرد مناسبی جهت غلبه بر مقاومت سلول‌های سرطان تیروئید به دارو است [۶].

بر این اساس در این پژوهش، پیش‌بینی پتانسیل ایجاد مقاومت زانتوهمول با استفاده از سازوکار مذکور مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین برای این که مولکول به‌عنوان یک داروی اثربخش معرفی شود، باید بتواند با غلظت مناسب به هدف خود در بدن برسد و به یک حالت فعال زیستی به‌مدت طولانی باقی بماند تا وقایع زیست‌شناختی مورد انتظار رخ دهد [۷].

بنابراین در این مطالعه به بررسی بیوانفورماتیکی خواص فیزیکی-شیمیایی، پارامترهای جذب، توزیع، متابولیسم و دفع زانتوهمول پرداخته شد. همچنین انرژی آزاد اتصال زانتوهمول و پروتئین‌های کلیدی مسیر MAPK/ERK شامل RAS، BRAF، MEK1، MEK2، ERK1، ERK2 و پروتئین‌های تأثیرگذار این مسیر شامل EGFR، Grb2 و SOS مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه بیوانفورماتیکی با هدف معرفی بهترین

¹ Xanthohumol

آماده‌سازی رسپتور (پروتئین)

فایل PDB پروتئین‌ها به‌عنوان رسپتور از پایگاه داده به نشانی www.rcbs.org به‌دست آمدند که در جدول ۱ نشان داده شده است. بعد از اضافه شدن اتم‌های هیدروژن قطبی به پروتئین و حذف مولکول‌های آب، بار کلی آن با استفاده از Charge Kollman تعیین گردید و در نهایت با فایل pdbqt ذخیره شد.

فرآیند داکینگ

پس از ایجاد فایل gle، مراحل داکینگ مولکولی برای هر کدام از پروتئین‌ها در ۲۰۰ مرتبه مستقل تکرار شد. در این مطالعه الگوریتم ژنتیک Lamarckian GA مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه فایل خروجی n.dlg از دستور autodock4 -p n.dpf -l n.dlg استفاده شد و اطلاعات به‌دست آمده توسط فایل متنی dlg مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج پیش‌بینی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک زانتوهمول

طبق نتایج حاصل شده زانتوهمول با فرمول مولکولی $C_{21}H_{24}O_4$ دارای وزن مولکولی 354.4 g.mol^{-1} و پیوندهای قابل انعطاف^۴ آن شش عدد است. همچنین میزان چربی دوستی^۵ آن ۵/۷، قطبیت^۶ آن 16.99 \AA^2 ، حلالیت^۷ آن ۵/۱۸- و حالت اشباعی آن ۰/۱۹ پیش‌بینی شد (شکل ۱).

پروتئین هدف زانتوهمول در مسیر MAPK/ERK، که کمترین انرژی اتصال با زانتوهمول را دارد و همچنین پیش‌بینی عوارض جانبی زانتوهمول به‌عنوان یک مهار کننده‌ی این مسیر انجام شد.

روش‌ها

ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی، فارماکوکینتیک و فارماکودینامیکی زانتوهمول

داشتن خواص فیزیکوشیمیایی مناسب و عدم سمیت از شاخص‌های مهم یک مولکول جهت معرفی آن به‌عنوان یک دارو است. لذا این ویژگی‌ها با استفاده از سرور آنلاین SwissADME به آدرس www.swissadme.ch برای زانتوهمول پیش‌بینی شد. به این منظور ساختار مولکولی زانتوهمول در قالب SMILES در نرم افزار آنلاین SwissADME وارد شد. خواص فیزیکوشیمیایی شامل حلالیت در آب، میزان قطبیت^۲، چربی دوستی، انعطاف‌پذیری و خواص فارماکوکینتیک شامل جذب زانتوهمول در سد مغزی خونی، جذب در دستگاه گوارش انسان و بررسی قابلیت زانتوهمول به‌عنوان سوبسترای P-گلیکوپروتئین با استفاده از مدل^۳ BOILED-Egg این سرور [V] و قابلیت مهار پنج سیتوکروم (CYP1A2، CYP2C19، CYP2C9، CYP2D6، CYP3A4) مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده‌سازی لیگاند

به‌منظور آماده سازی لیگاند، ساختار سه بعدی زانتوهمول که از پایگاه داده PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) به‌دست آمد و توسط نرم‌افزار Chimera 1.13.1 بار Gasteiger بهینه سازی ساختار شد و با پسوند pdb ذخیره شد. سپس با استفاده از نرم افزار AutoDockTools، بارهای قابل چرخش و مرکز ثقل مولکول در تمامی باندها مشخص گردید.

⁴ Size

⁵ Flex

⁶ Lipo or XlogP3

⁷ Topological polar surface area

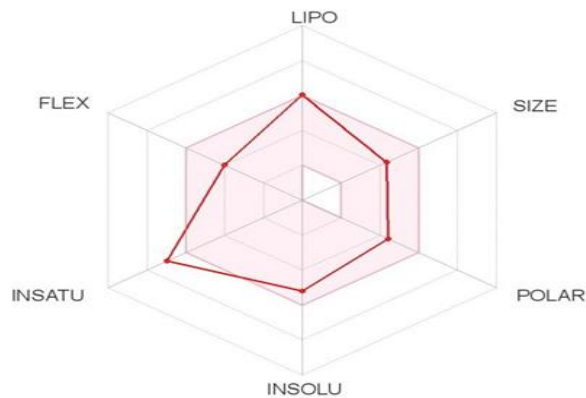
⁸ ESOL or LogS

² Topological polar surface area

³ Brain Or IntestinaL EstimatedD permeation predictive model

جدول ۱- نتایج داکینگ مولکولی زانتوهمول یا پروتئین‌های EGFR^۹، Grb2^{۱۰}، SOS^{۱۱}، KRAS^{۱۲}، BRAF^{۱۳}، MEK1^{۱۴}، MEK2^{۱۵}، ERK1^{۱۶}، ERK2^{۱۷}

اسید آمینه‌های برهمکنش با زانتوهمول	ثابت مهارى محاسبه شده Ki (µM)	حداقل انرژی آزاد اتصال (ΔG) Kcal.mol ⁻¹	کد PDB	اندازه جعبه Å	پروتئین
Glu ⁷⁰⁹ , Lys ⁷⁰⁸ , Ile ⁷⁰⁶ , Cys ⁷⁸¹ , Leu ⁷⁸² , Leu ⁷⁰⁷ , Thr ⁷⁸³ , Ser ⁷⁸⁴	۱۸۲/۰۹	-۵/۱۰	4R3P	۷۰×۷۰×۶۰	EGFR
Arg ¹⁴² , His ¹⁰⁷ , Gln ¹⁰⁶ , Phe ¹⁰¹ , Phe ¹⁰⁸ , Lys ¹⁰⁹ , Trp ¹²¹ , Val ¹⁴⁰ , Ser ⁹⁹³	۴۲/۸۷	-۵/۹۶	1GRI	۷۰×۷۰×۷۰	Grb2
Asn ⁹⁹³ , Arg ⁸²⁶ , Lys ⁸²³ , Leu ⁷⁹⁵ , His ⁸²⁷ , Leu ⁷⁹¹ , Asn ⁸³⁰ , Glu ⁹⁹² , Leu ⁹⁹⁴ , Asn ⁹⁹⁵ , Asn ⁹⁹³	۴۷۰/۵۶	--۴/۴۸	4URU	۹۰×۹۰×۱۲۰	SOS
Gln ¹⁰⁶ , Thr ¹⁰⁴ , Tro ¹⁰⁵ , Phe ⁹⁴ , Gly ⁹⁵ , Lys ⁷³ , Glu ⁹³ , Gln ¹⁰⁶	۱۰۸/۹۵	-۵/۴۱	3GFT	۷۰×۹۰×۷۰	K-RAS
Ser ¹¹⁰ , Val ¹²³ , Leu ¹²³ , Pro ¹²⁷ , Ile ¹²⁶ , Ile ¹³⁰ , Arg ¹²⁸ , Phe ¹⁰⁹ , Thr ¹²¹ , Pro ¹⁰⁷ , Ile ¹³² , Arg ⁸⁸ , Asp ¹³⁵ , Ile ¹³⁶ , Lys ⁹¹ , Ser ¹⁰⁵ , Asn ¹⁰⁴ , Arg ¹⁰	۸۲/۱۳	-۵/۵۷	4CQE	۷۰×۶۰×۷۰	B-RAF
Leu ²¹⁵ , Ile ⁹⁹ , Glu ¹³⁸ , Ile ¹³⁹ , Leu ¹⁰¹ , Met ²¹⁹ , Lys ⁹⁷ , Ile ¹⁴¹ , Asp ²⁰⁸ , Leu ¹¹⁵ , Leu ¹¹⁸ , Met ¹⁴³ , Phe ²⁰⁹ , Ser ²¹² , Cys ²⁰⁷ , Val ²¹¹	۲۹۸/۱۵	-۶/۴۷	4U80	۸۰×۸۰×۹۰	MEK1
Tyr ³²⁴ , Pro ³²⁹ , Pro ²⁶⁹ , Asp ²⁸⁵ , Pro ³³⁰ , Pro ³³¹ , Lys ³³² , Leu ²⁷⁵ , Pro ³³⁴ , Val ²⁸⁴ , Pro ²⁷⁰	۶/۹۱	-۷/۰۴	1S9I	۸۰×۹۰×۷۰	MEK2
Asn ²⁷⁹ , Met ³⁵⁰ , Asp ³⁵³ , Glu ³⁵¹ , Tyr ²²² , Arg ¹⁸⁹ , Ala ³⁴⁹ , Phe ³⁴⁸ , Ile ¹⁹⁰ , Asp ¹⁹² , His ¹⁹⁵ , Thr ³⁴⁷ , Met ²⁷⁹	۱۰۴/۳۸	-۵/۴۳	2ZOQ	۹۰×۱۰۰×۱۲۶	ERK1
Arg ²⁴ , Asp ⁸⁸ , Ile ⁸⁹ , Gln ³⁵⁵ , Arg ⁹¹ , Ile ⁹⁰ , Gly ³⁵⁷ , Pro ³⁵⁶ , Phe ³⁵⁴ , Arg ³⁵³	۹۷/۸۷	-۵/۴۷	5NGU	۷۰×۶۰×۸۰	ERK2

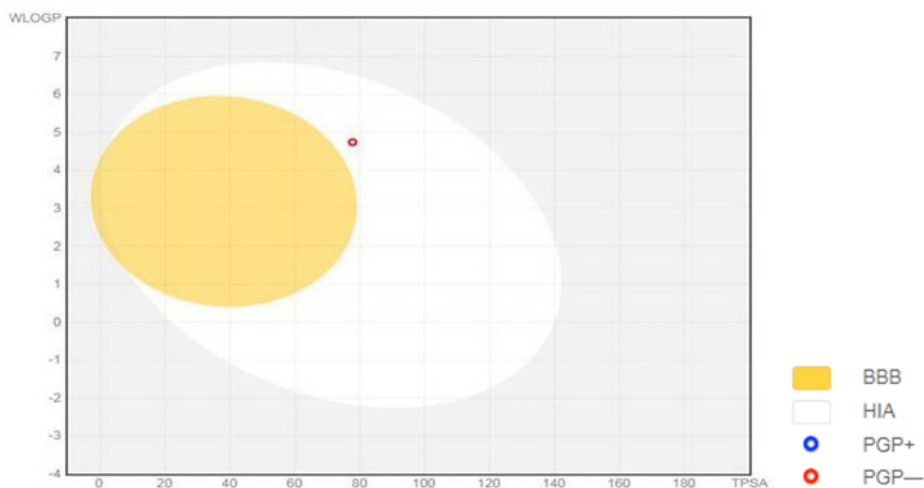
شکل ۱- رادار زیست‌فراهمی^{۱۸}

آنالیز خاصیت فیزیکوشیمیایی زانتوهمول: خط قرمز نتایج بررسی خاصیت فیزیکوشیمیایی زانتوهمول را نشان می‌دهد و ناحیه صورتی نشان دهنده‌ی دامنه‌ی بهینه برای هر کدام از خواص مورد بررسی برای داروی خوراکی است که به‌ترتیب شامل چربی دوستی: ۰/۷- تا ۵، وزن مولکولی: ۱۵۰ تا ۵۰۰ g.mol⁻¹، قطبیت ۲۰ تا ۱۳۰ Å²، حالیت کمتر از شش و تعداد باندهای قابل چرخش کمتر از نه و حالت اشباع بیشتر از ۰/۲۵ است [۷].

- ⁹ Epidermal growth factor receptor
¹⁰ Growth factor receptor-bound protein 2
¹¹ Son of Sevenless
¹² Kirsten rat sarcoma
¹³ B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
¹⁴ Mitogen-activated protein kinase kinase 1
¹⁵ Mitogen-activated protein kinase kinase 2
¹⁶ Extracellular signal-regulated kinase 1
¹⁷ Extracellular signal-regulated kinase 2
¹⁸ Bioavailability Radar

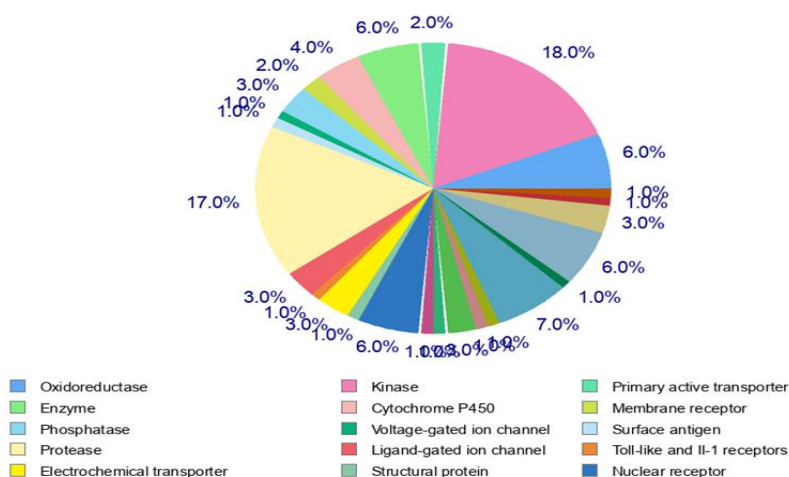
CYP3A4 را مهار می‌کند اما قابلیت مهار سیتوکروم‌های CYP2C19 و CYP2D6 را ندارد. نتیجه‌ی پیش‌بینی پروتئین‌های هدف زانتوهمول از سرور SwissADME نشان می‌دهد که کینازها (۱۸ درصد) می‌توانند بیشترین درصد پروتئین‌های مورد هدف زانتوهمول هستند (شکل ۳).

همچنین نتایج خصوصیت فارماکوکیتیک زانتوهمول براساس مدل BOILED-Egg نشان می‌دهد که از لحاظ تئوری، زانتوهمول جذب گوارش بالایی دارد اما از سد مغزی خونی جذب نمی‌شود و سوبسترای P-گلیکوپروتئین نیست (شکل ۲). ارزیابی میزان سمیت سلولی مرتبط با مهار پنج سیتوکروم نشان می‌دهد که زانتوهمول، سیتوکروم‌های CYP1A2، CYP2C9،



شکل ۲- خروجی گرافیکی مدل BOILED-Egg

امکان ارزیابی بصری از جذب غیرفعال دستگاه گوارش (HIA) و نفوذ سد مغزی-خونی (BBB) را فراهم می‌کند. ناحیه‌ی سفید احتمال جذب توسط دستگاه گوارش و ناحیه‌ی زرد احتمال بالای جذب مغز را نشان می‌دهد. علاوه بر این اگر مولکول مورد بررسی به صورت نقطه آبی نشان داده شود، نشان دهنده‌ی این است که سوبسترای P-گلیکوپروتئین است و نقطه‌ی قرمز به معنای این است که سوبسترای P-گلیکوپروتئین نیست [۷].



شکل ۳- نتیجه‌ی پیش‌بینی پروتئین‌های هدف زانتوهمول از سرور SwissADME

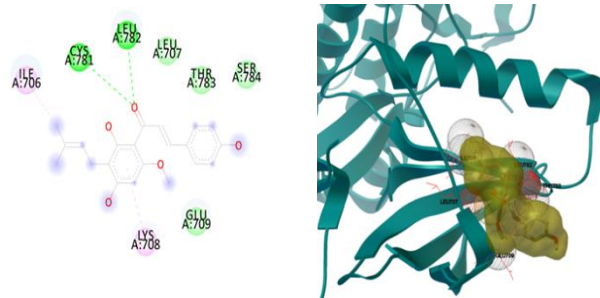
براساس این خروجی گرافیکی، کینازها می‌توانند بیشترین درصد پروتئین‌های مورد هدف زانتوهمول باشند.

پتانسیل مهاری مربوط به پروتئین MEK2 است که با $\Delta G = -7/04 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ منفی‌ترین سطح انرژی اتصال در بین پروتئین‌های مورد مطالعه را دارد. همچنین مشخص شد که زانتوهومول با اسید آمینه‌های تیروزین ۳۲۴، پرولین ۲۶۹، پرولین ۳۲۹، آسپارتیک اسید ۲۸۵، پرولین ۳۳۰، پرولین ۳۳۱، لیزین ۳۳۲، لوسین ۲۷۵، پرولین ۳۳۴، والین ۲۸۴، پرولین ۲۷۰ و اسپارتیک اسید ۲۷۱ پروتئین MEK2 برهمکنش می‌دهد (شکل ۴). از طرف دیگر زانتوهومول، ضعیف‌ترین اتصال با کمترین پتانسیل مهاری را با پروتئین SOS در بین پروتئین‌های مورد مطالعه دارد که انرژی اتصال آن برابر با $-4/48^1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ است.

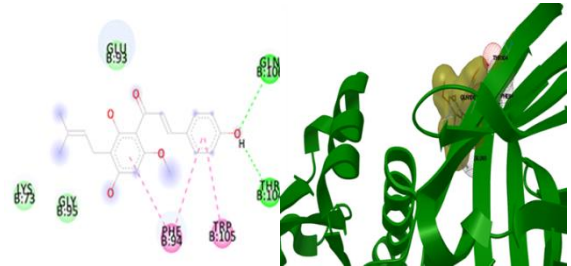
براساس نتایج حاصل، پیش‌بینی می‌شود که زانتوهومول به‌خوبی در دستگاه گوارش جذب می‌شود اما قابلیت نفوذ در مغز را ندارد و سوبسترای P-گلیکوپروتئین نیست و توانایی پمپ کردن این مولکول به خارج از سلول را ندارد.

نتایج داکینگ

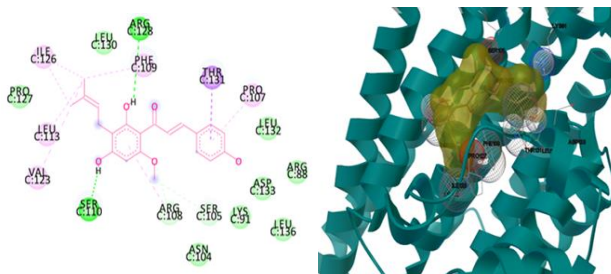
نتایج حاصل از داکینگ بین زانتوهومول و پروتئین‌های EGFR، ERK2، GRB2، SOS، RAS، RAF، MEK1، MEK2، ERK1، ERK2 جدول ۱ آمده است. بررسی مقایسه‌ای برهمکنش‌ها نشان داد که زانتوهومول برهمکنش‌های قوی‌تری با پروتئین‌های کیناز مورد بررسی انجام می‌دهد. علاوه بر این مشخص شد که قوی‌ترین اتصال زانتوهومول، با بیشترین



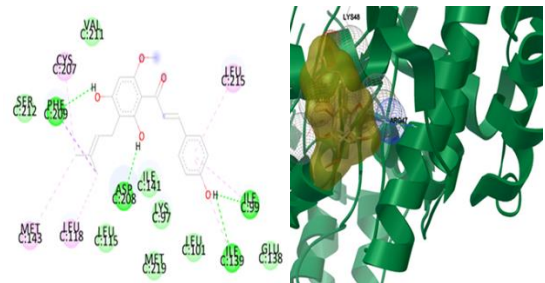
الف: EGFR



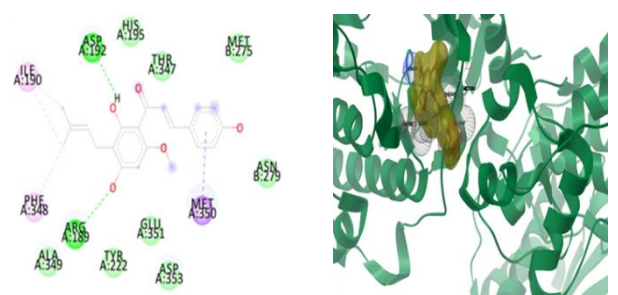
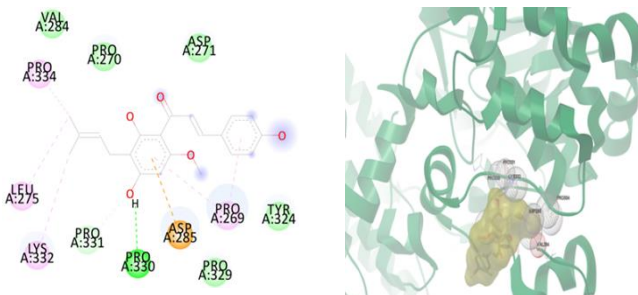
ب: KRAS

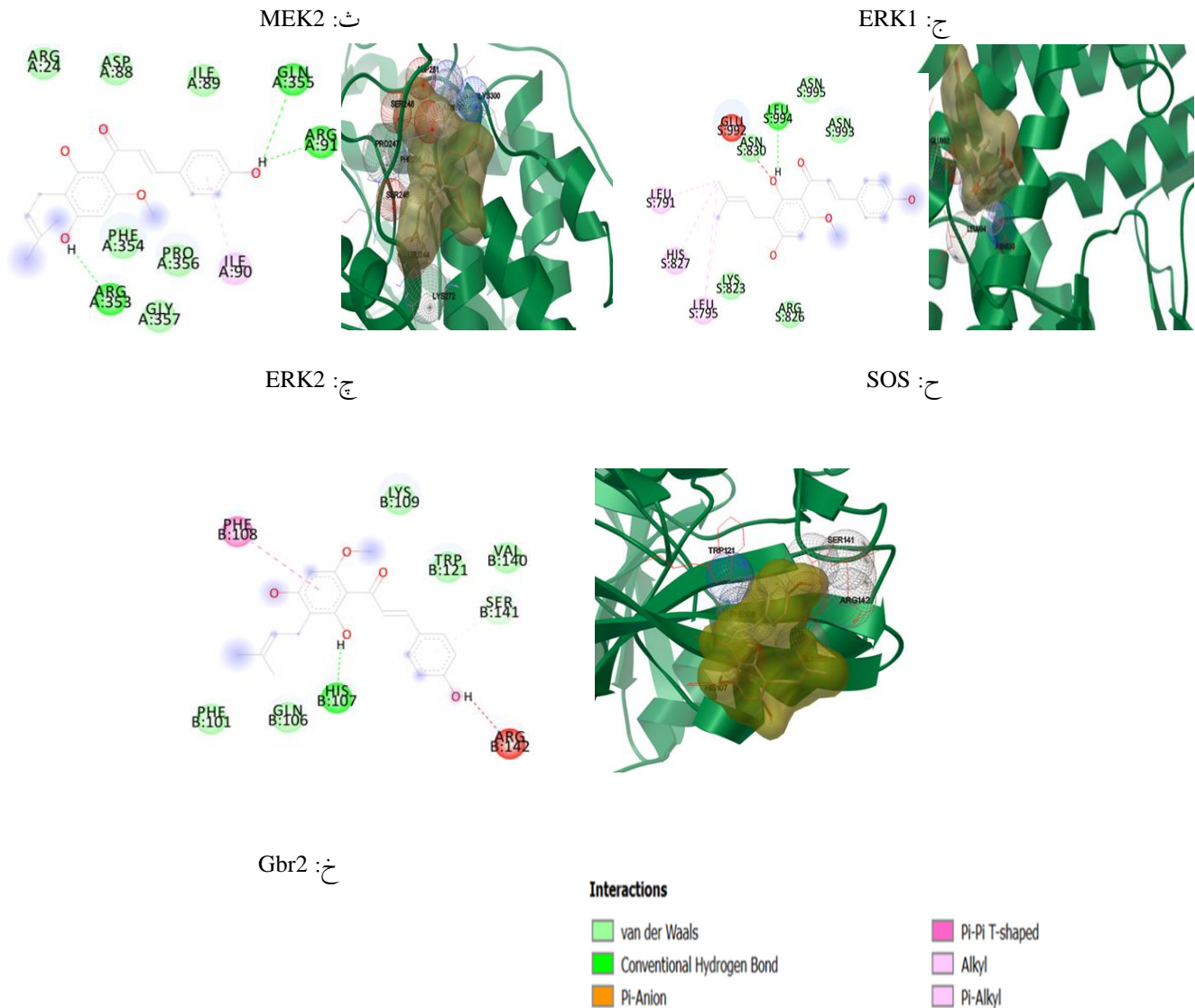


پ: BRAF



ت: MEK1





شکل ۴- نمایش دو بعدی و سه بعدی برهمکنش‌های زانتوهمول با استفاده از نرم افزار Discovery studio با پروتئین‌های الف: EGFR ب: KRAS پ: BRAF ت: MEK1 ث: MEK2 ج: ERK1 ح: ERK2 خ: Gbr2 و نمایش انواع پیوندهای بین آنها

همچنین اثر بخشی زانتوهمول در مهار پروتئین‌های مسیر MAPK/ERK به‌عنوان یک مسیر فعال در سلول‌های سرطان تیروئید تحت شرایط In-Silico مورد ارزیابی قرار گرفت. جذب دارو فرآیندی است که به موجب آن مولکول دارو پس از عبور از غشای زیستی سلول، وارد گردش خون می‌شود تا تأثیر دارویی خود را بگذارد. ساختارهای دو لایه فسفولیپیدی غشای سلول‌های زیستی، دارای طبیعت چربی دوستی هستند. بنابراین این مولکول دارویی مورد نظر، باید دارای خاصیت آبگریزی کافی باشد تا از طریق جذب درون سلولی بتواند از غشا عبور کند و از طرفی مولکول‌ها باید دارای خاصیت

بحث

در سال‌های اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران، به پتانسیل دارویی زانتوهمول جلب شده است و فعالیت دارویی این ترکیب فیتوشیمیایی به‌خصوص اثر ضد سرطانی آن در شرایط In-vitro و In-vivo مورد بررسی گرفته است [۸]. استفاده از روش‌های محاسباتی (In-silico) در معرفی یک مولکول به‌عنوان دارو و شناسایی هدف مناسب دارو، دارای اهمیت زیادی است [۹]. در پژوهش حاضر خواص فیزیکی و شیمیایی، فارماکوکینتیک، فارماکودینامیک زانتوهمول و

بنابراین سبب ماندگاری زانتوهمول در سلول می‌شود تا بتواند تأثیر دارویی خود را ایجاد کند. همچنین با توجه به این که این لیگاند در سد مغزی-خونی قابلیت نفوذ ندارد که برای سرطان‌های مغزی یک چالش محسوب می‌شود اما دارای جذب بالایی در دستگاه گوارش است بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک داروی خوراکی در نظر گرفته شود.

در این مطالعه، نه پروتئین به‌عنوان هدف زانتوهمول در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از داکینگ نشان داد که زانتوهمول قابلیت مهار همه‌ی پروتئین‌های مورد بررسی را دارد که براساس آن، پتانسیل مهارتی زانتوهمول با پروتئین‌های هدف این مسیر با هم متفاوت هستند و سطح انرژی این اتصالات از $4/48$ - تا $7/04$ - است. بیشترین و کمترین پتانسیل مهارتی به‌ترتیب مربوط به MEK2 و SOS است و نتایج داکینگ، نتایج پیش‌بینی SwissADME را که کینازها را به‌عنوان بیشترین درصد پروتئین‌های هدف زانتوهمول معرفی می‌کرد را تأیید نمود. زانتوهمول به‌دلیل دارا بودن بخش‌های هیدروفوب (حلقه‌های آروماتیک) توانایی بالایی برای تشکیل برهمکنش‌های هیدروفوب با اسید آمینه‌ها را دارد و یک ترکیب لیوفیلیک با LogP برابر $0/7$ است. پروتئین MEK2 ترکیب مرکزی در مسیر سیگنالینگ MAPK است [۱]. شواهد مهمی مبنی بر اهمیت Raf، MEK1 و MEK2 در پیشرفت و ترویج رشد سرطان تیروئید وجود دارد [۲]. با توجه به این موضوع، داروهای جدیدی که Raf یا MEK1 و MEK2 را مهار می‌کنند، تأیید شده و یا در مرحله‌ی نهایی ارزیابی قرار دارند [۱۳]. در این مطالعه نشان داده شد که اسید آمینه‌های تیروزین ۳۲۴، پرولین ۲۶۹، پرولین ۳۲۹، اسپارتیک اسید ۲۸۵، پرولین ۳۳۰، پرولین ۳۳۱، لیزین ۳۳۲، لوسین ۲۷۵، پرولین ۳۳۴، والین ۲۸۴، پرولین ۲۷۰ و اسپارتیک اسید ۲۷۱ پروتئین MEK2 نقش مهمی در برهمکنش با زانتوهمول دارند. و با توجه به اینکه زانتوهمول بیشترین میانگین‌ها را با ریشه‌های ۲۶۹، ۳۲۹، ۳۳۰، ۳۳۱، ۳۳۴ و ۲۷۰ اسید آمینه‌ی پرولین پروتئین MEK2 دارد، نشان دهنده‌ی این است که زانتوهمول با بخش C- ترمینال پروتئین MEK2 که سرشار از اسید آمینه پرولین است [۱۴] برهمکنش نشان می‌دهد و با پرولین ۳۳۰ پیوند قوی هیدروژنی که نشان دهنده‌ی فعالیت قوی زانتوهمول است. منابع علمی نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه‌ی

آبدوستی کافی جهت حل شدن در محیط آبی اطراف غشای زیستی سلول برخوردار باشند [۱۰]. به‌طور کلی، میزان نفوذپذیری درون سلولی غیرفعال عمدتاً بوسیله میزان حمل و نقل در سراسر غشای سلولی آپیکال تعیین می‌شود که این نفوذپذیری توسط خصوصیات فیزیکوشیمیایی مولکول جذب شده کنترل می‌شود و ترکیباتی با چربی دوستی $\text{LogP} > 0$ و وزن مولکولی کمتر از 500 g.mol^{-1} از طریق انتقال درون سلولی منتقل می‌شود [۱۰]. بنابراین با توجه به اینکه زانتوهمول دارای چربی دوستی (LogP) برابر با $0/7$ و وزن مولکولی $354/39 \text{ g.mol}^{-1}$ و حلالیت (LogS) $-0/18$ می‌توان گفت که انتقال آن از طریق درون سلولی انجام شود. همچنین پیوندهای قابل چرخش زانتوهمول برابر با شش است که این ویژگی در خواص فیزیکی-شیمیایی زانتوهمول در تجویز خوراکی دارو می‌تواند مؤثر باشد. مولکول‌های داروهای خوراکی نباید دارای بیشتر از نه پیوند قابل چرخش باشند [۷].

مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر داروها در حال تبدیل شدن به یک چالش مهم در علم پزشکی است [۱۱]. اگر چه شیمی درمانی یکی از راهبردهای مهم درمان سرطان است اما ممکن است باعث کاهش حساسیت و افزایش مقاومت در برابر داروهای سرطانی شود [۱۰]. مقاومت به چند دارو^{۱۹} در سلول‌های سرطانی دلایل مختلفی دارد که یکی از مهم‌ترین آنها بیان بالای P-گلیکوپروتئین است [۶]. P-گلیکوپروتئین، یک ناقل وابسته به ATP است که وظیفه‌ی خروج داروها را از سلول بر عهده دارد و توسط ژن MDR1 کد می‌شود [۱۲]. بیان ژن MDR1 حدوداً در ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی دیده می‌شود [۱۰]. مطالعات زیادی ثابت کرده است که P-گلیکوپروتئین نقش مهمی در مقاومت چند دارویی شیمی درمانی به‌ویژه مقاومت در برابر مولکول‌های ضد سرطانی که سوبسترای P-گلیکوپروتئین هستند، ایفا می‌کند [۶]. P-گلیکوپروتئین، در دستگاه گوارش به‌خصوص روده‌ی کوچک که به‌عنوان محل جذب بسیاری از داروهای خوراکی است، یافت می‌شود [۱۱]. نتایج مطالعه‌ی حاضر در SwissADME پیش‌بینی کرده است که لیگاند مورد بررسی (زانتوهمول)، به‌عنوان سوبسترای P-گلیکوپروتئین نیست و در نتیجه از طریق این سازوکار، نمی‌تواند مقاومت دارویی ایجاد کند.

¹⁹ Multi Drug Resistance (MDR)

عدم توانایی پمپاژ آن به خارج سلول‌های سرطان تیروئید مقاوم به دارو توسط P-گلیکوپروتئین می‌تواند به‌عنوان نامزد مناسبی جهت انجام پروژه‌های تحقیقاتی بیشتر در سرطان تیروئید مورد توجه قرار گیرد. در پایان براساس پیش‌بینی، پروتازها نیز درصد قابل توجهی از پروتئین‌های هدف زانتوهومول را شامل هستند بنابراین در مطالعات آینده می‌توان، از زانتوهومول جهت مهار پروتازها نیز استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران که محققین را در جهت اجرای این پژوهش یاری داده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

اسپارتیک اسید، لیزین و لوسین در برهمکنش با سایر مهارکننده‌های MEK2 مانند Trametinib نیز نقش دارند [۱۵] که این اسید آمینه‌ها در برهمکنش با زانتوهومول نیز دیده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان دهنده‌ی این است که اکثر پروتئین‌های مورد بررسی در مسیر سیگنالینگ MAPK/ERK، اهداف مناسبی برای زانتوهومول هستند و زانتوهومول با ایجاد برهمکنش‌های قوی با این پروتئین‌ها به‌خصوص MEK2 موجب مهار مسیر MAPK می‌شود و از آنجا که جهش در BRAF در سرطان تیروئید شایع است و باعث فعالیت زیاد مسیر MAPK می‌شود، مهار پروتئین‌های پایین دست BRAF مانند MEK2 می‌تواند راهکار مناسبی جهت مهار این مسیر در سرطان تیروئید باشد. همچنین زانتوهومول به‌دلیل داشتن خواص فیزیکی-شیمیایی و

مآخذ

- Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2018;8(4):552-62.
- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26(22):3291-310.
- Knauf JA, Fagin JA. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(2):296-303.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2007; 1773(8):1263-84.
- McCain J. The MAPK (ERK) pathway: Investigational combinations for the treatment of BRAF- mutated metastatic melanoma. *PT* 2013; 38(2).
- Beadnell TC, Mishall KM, Zhou Q, Riffert SM, Wuensch KE, Kessler BE, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway facilitates resistance to the src inhibitor dasatinib in thyroid cancer. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(8):1952-63.
- Sharom FJ. Membrane Biology Topical Review The P-Glycoprotein Efflux Pump: How Does it Transport Drugs? *J Membr Biol* 1997; 175:161-75.
- Qi SS, Sun JH, Yu HH, Yu SQ. Co-delivery nanoparticles of anti-cancer drugs for improving chemotherapy efficacy. *Drug Deliv* 2017; 24(1):1909-26.
- Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017; 7:1-13.
- S. Fajardo, García-Galvan, F. R., V. Barranco, J. C. Galvan, and S. F. Batlle, "We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %," Intech, vol. i, no. tourism, p. 13, 2016, doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353.
- Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, et al. Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int* 2015;15(1):1-13.
- Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2005; 2(1):86-98.
- Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: The long and winding road. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(10):577-92.
- Roskoski R. Allosteric MEK1/2 inhibitors including cobimetanib and trametinib in the treatment of cutaneous melanomas. *Pharmacol Res* 2017; 117:20-31.
- Hashemzadeh S, Ramezani F, Rafii-Tabar H. Study of Molecular Mechanism of the Interaction Between MEK1/2 and Trametinib with Docking and Molecular Dynamic Simulation. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* 2019; 11(1):115-24.

BIOINFORMATIC STUDY ON EFFECT OF XANTHOTHUMOL AS BIOACTIVE COMPOUND OF HOP IN THE INHIBITION OF THE MAPK/ERK PATHWAY IN THYROID CANCER

Zohreh Gholizadeh Siahmazgi¹, Shiva Irani^{1*}, Ali Ghiaseddin², Parviz Fallah³, Vahid Haghpanah^{4*}

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Biomedical Engineering Division, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Laboratory Science Department, Allied Medicine Faculty, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

4. Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: Xanthohumol is one of the main bioactive compounds extracted from the female flowers of the hops plant (*Humulus lupulus L*), that has been shown in several studies to have anti-cancer effects. The MAPK/ERK pathway is one of the key pathways in the regulation of gene expression, cell growth and survival. The abnormal activation of this pathway leads to the uncontrolled cell proliferation in thyroid cancer. This study aims to perform a bioinformatic screening of the proteins in the MAPK/ERK pathway and introduce them as target protein to Xanthohumol. In addition, due to the significant role of EGFR, Grb2, SOS proteins in the MAPK/ERK pathway, they have also been studied.

Method: Using SwissADME software, first the physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of Xanthohumol are predicted. Then three-dimensional structure of Xanthohumol and target proteins (EGFR, Grb2, SOS, RAS, BRAF, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2) were collected from PubChem database and Protein Data Bank, finally, using Auto Dock 4.1. the molecular docking were studied.

Results: Our study shows lack of cytotoxicity in Xanthohumol. In addition, Xanthohumol with proper physicochemical properties does not induce drug resistance through pump P-glycoprotein mechanism. Analysis of molecular docking indicate that Xanthohumol has inhibitory potential to the all proteins studied. Note that its strongest interaction is with MEK2 protein with binding energy $-7.04 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Conclusion: According to our results, Xanthohumol has inhibitory potential to the all proteins present in the MAPK/ERK pathway. It lacks cytotoxicity. Thus, it can be considered as an alternative inhibitor for the MAPK/ERK pathway in thyroid cancer cells.

Key words: Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, Xanthohumol, MAPK/ERK pathway

* Science and Research Branch, Daneshgah Blvd, Simon Bulivar Blvd, Tehran. Postal Code: 1477893855, Phone: +98(21) 44865154-8, FAX: : +98 (21)44867141, Email: s.irani@srbiau.ac.ir

* No. 10, Jalal Al-Ahmad St., Next to Shariati Hospital, Chamran Hwy., Tehran, Iran. Postal Code: 1411713119, Phone: +98(21) 88631296, Fax: +98 (21) 88220052, Email: vhaghpanah@tums.ac.ir