مجله شیمی کوانتومی و اسپکتروسکوپی
۹:۳۱ (۱۳۹۸) ٤٥-٥٤
Journal of Quantum Chemistry and Spectroscopy (JQCS)

مطالعه اثر گیاه بومادران بر روی هلیکوباکترپیلوری باکمک روش شبیه سازی داکینگ مولکولی

خدیجه توکلی هفشجانی[۱]، فاطمه بنی شریف دهکردی[۲]، فاطمه رئیسی سرتشنیزی [۱*]، الهه صابری[۳]

[۱]دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲]دانشکده علوم پایه،گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۳]دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ ثبت اولیه:۱۳۹۸/۰۴/۱۰، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده:۱۳۹۸/۰۵/۰۹ ، تاریخ پذیرش قطعی:۱۳۹۸/۰۶/۲۶

چکیده

مقاومت هلیکوباکترپیلوری نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج علت اصلی پایین بودن درصدریشه‌کنی این باکتری درکشورهای درحال توسعه می‌باشد. به همین دلیل نیاز به یک داروی جایگزین برای درمان عفونت هلیکوباکترپیلوری وجود دارد. داروی جدید باید موثر،کم عارضه، همراه با اثرات خوب برعلیه هلیکوباکترپیلوری بوده ودرضمن موجب مقاومت باکتری نسبت به دارو نگردد. استفاده از گیاهان دارویی یکی از راه های حل معضل مقاومت میکروبی به شمار می‌آید. زیرا ترکیبات ثانویه گیاهان، مولکول‌های پیچیده ای هستند که تعداد زیادی از آن‌ها دارای فعالیت های بیولوژیک می‌باشند. بومادران گیاهی است که ترکیبات آن سبب از بین بردن هلیکوباکترپیلوری می‌شود همچنین مطالعات تجربی نشان داد که آنزیم اوره‌آز این باکتری سبب حیات آن در معده می‌شود. پس این فرض به وجود آمد که ترکیبات گیاه بومادران ممکن است بر روی آنزیم اوره آز تآثیر داشته باشند. طراحی دارویی گیاهی برای مقابله با هلیکوباکترپیلوری با استفاده از شبیه سازی داکینگ مولکولی ونرم افزار اتوداک۴ انجام شد. آلفاپنین با انرژی آزاد اتصال(۵/۱۵-) وکاریوفلین اکسید با انرژی آزاد اتصال(۵/۴۳-) و بیسموت با انرژی آزاد اتصال(۴/۹۲-) برای مهار آنزیم اوره آز می‌توانند استفاده شوند.کاریوفلین اکسید با انرژی اتصال بالامهارکننده بهتری برای این آنزیم است.

واژه های کلیدی: ***هلیکوباکتر پیلوری، آنزیم اوره آز، داکینگ ملکولی، آلفاپنین، کاریوفلین اکسید.***

۱. مقدمه

زمانی که از بیوپسی معده، باکتری هلیکوباکترپیلوری جدا شد به شدت این باکتری مورد توجه باکتریولوژیست‌ها، سرطان-شناسان‌ها، متخصصین بیماری‌های گوارشی و عفونی، اپیدمیدلوژیست‌ها، پاتولوژیست‌ها و محققین دارویی قرار گرفت.

***عهده دار مکاتبات:** فاطمه رئیسی سرتشنیزی

نشانی: گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تلفن:۰۹۱۹۴۷۰۴۲۹۹ **پست الکترونیک:**E-mail: hsa25078@gmail.com

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری میله‌ای شکل، میکروآئروفیل، گرم منفی، کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز مثبت است. که باعث التهاب معده، بیماری زخم پپتیک، زخم معده و سرطان معده می‌شود[۲-۱]. آنزیم اوره‌آز یکی از عوامل مهم بیماری‌زایی این باکتری است که نقش بسیار مهمی در چسبندگی این باکتری به سلول‌های اپیتلیال و تحریک آپپتوز دارد.آنزیم اوره‌آز با وزن ۵۸۰ کیلودالتون دارای ۶ زیر واحد ۶۶ کیلودالتونی UreA و ۶ واحد ۳۲ کیلودالتونی UreB است[۵-۳]. این آنزیم، اوره را به آمونیاک، کربامات و بی‌کربنات قلیایی تبدیل می‌کند که آمونیاک تولید شده موجب تشکیل واکوائل و همچنین به واسطه ترکیب با کلر تشکیل مونوکلرآمین که این ترکیب مرگ سلولی را در سلول‌های اپتلیال القا می‌کند. به همین دلیل اگر آنزیم اوره‌آز مهار شود از ابتلا به بیماری توسط این باکتری جلوگیری می‌شود. از آنجایی که این باکتری مقاومت آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهد به همین دلیل محققان در پی داروهایی مؤثرو جدید علی الخصوص از فراورده‌های طبیعی جهت حذف این میکروارگانیسم هستند که یکی از این فرآورده های طبیعی شناخته شده گیاه بومادران است[۶]. گیاه بومادران میلفولیوم که به اسم‌های هزار برگ، فلفل پیرمرد، زخم سرباز، سرباز وندورات و گیاه شوالیه معروف است گیاهی از خانواده کاسنی می‌باشد که در مناطق آسیا، اروپا و شمال آمریکا به خوبی رشد می-کند[۸-۷]. اسانس اصلی آن در کرک‌های ترشحی برگ و ساقه به خصوص در گل‌های گیاه است. این گیاه دارای گونه‌های متفاوت می‌باشد که هر گونه دارای ترکیب متفاوتی از مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها می‌باشد[۹]. تحقیقات در کشورهای اروپایی نشان داده که ترکیب‌های اسانسی بومادران هزار برگ نمونه‌های استونی، مجارستان، یونان، مولداوی، لیتوانی و آلمان حاوی مقادیر بالای از مونوترپن‌ها و کامازولین بالا گزارش شده است[۱۲-۱۰]. گیاه بومادران ۱۲۰ترکیب دارد که در این مقاله به بررسی چندین نوع از مهم ترین ترکیبات پرداخته شده و اثر این ترکیبات بر آنزیم اوره آز هلیکوباکترپیلوری بیان می‌شود. از جمله خواص این گیاه هزار برگ آنتی باکتریال، ضد آپتوزی و ضد التهابی است از گیاه بومادران هزار برگ به علت خاصیت‌های فراوان آن در طب سنتی از جمله بیماری‌های عفونی، التیام زخم، بیماری‌های گوارشی، درمان تب و سرماخودگی و درد و همچنین در صنایع آرایش و بهداشتی استفاده‌ی فراوانی می‌شود[۱۵-۱۳].

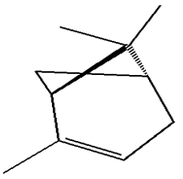
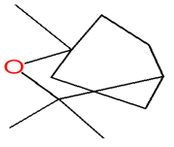
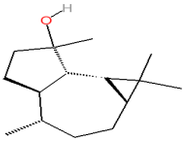
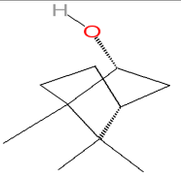
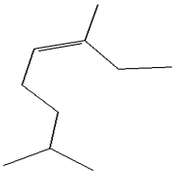
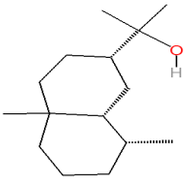
آنزیم اوره‌آز با از بین بردن خاصیت اسیدی معده سبب زنده ماندن هلیکوباکترپیلوری و زخم معده می‌شود از طرفی مطالعات نشان می‌دهد که گیاه بومادران با خاصیت آنتی باکتریال اثر مهاری روی آنزیم اوره‌آز دارد به همین منظور این فرض به وجود آمد که ترکیبات گیاه بومادران ممکن است اثر مهاری بر آنزیم اوره‌آز داشته باشند. بنابراین این فرضیه با بررسی تاثیر ترکیبات عصاره بومادران بر مهار آنزیم اوره‌آز و تاثیر این مهارکننده بر فعالیت هلیکوباکترپیلوری با روش شبیه سازی داکینگ ملکولی با هدف طراحی دارویی طبیعی و بدون عارضه انجام شد.

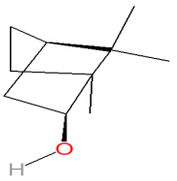
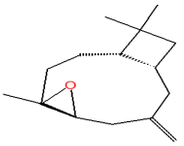
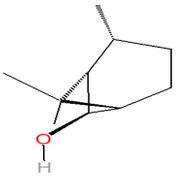
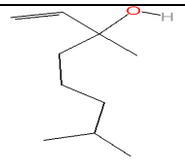
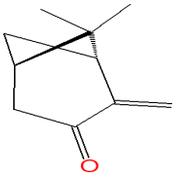
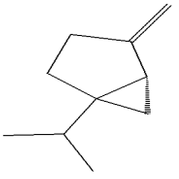
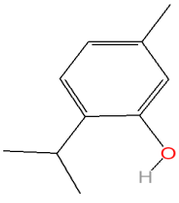
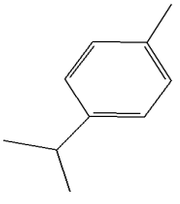
۲. مواد و روش ها

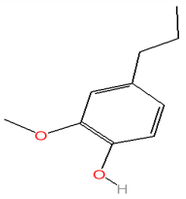
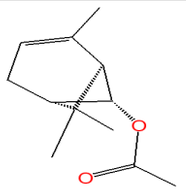
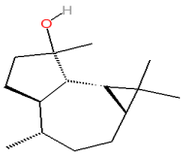
۲-۱. آماده سازی لیگاند

برای انجام داکینگ ملکولی به ساختار کریستالوگرافی ترکیبات نیاز است که این ساختارها از مقالات منتشره شده در بازه زمانی ۲۰۰۳ الی ۲۰۱۶ [۱۷-۱۶] استخراج و با کمک نرم افزار Gauss.۵ رسم شدند و سپس با فرمان 6-31G** بهینه شدند[۱۸]. از کل ترکیبات مورد مطالعه در اسانس بومادران ۱۷ترکیبی که بیشترین میزان را در اسانس بومادران داشتند انتخاب شدند.

جدول ۱. نام، فرمول شیمیایی، نسبت درصد وزنی و ساختار اجزای جدا شده از گیاه بومادران

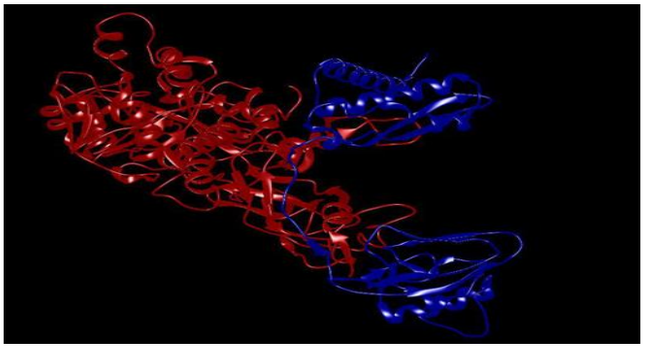
ردیف	نام ترکیب	فرمول مولکولی	نسبت درصد وزنی از اسانس بومادران	ساختار
۱	آلفا پینن	$C_{10}H_{16}$	۱۰/۱۴	
۲	۱، ۸-سینئول	$C_{10}H_{18}O$	۸/۲۶	
۳	اسپاتولنول	$C_{15}H_{24}O$	۰/۹۳	
٤	کامفور	$C_{10}H_{16}O$	۲۶/۲۷	
۵	۳،۲ اوسیمن	$C_{10}H_{16}$	۰/۴۵	
٦	بتادسمول	C15H27O	۲/۹۸	

۷	برنئول	$C_{10}H_{18}O$	۴/۸۵	
۸	کریوفیلن اکساید	$C_{15}H_{24}O$	۴/۶۹	
۹	کریسانتنون	$C_{10}H_{14}O$	۵/۱۱	
۱۰	لینالول	$C_{10}H_{18}O$	۴/۱۰	
۱۱	پینوکاروون	$C_{10}H_{14}O$	۰/۵۵	
۱۲	سابینن	$C_{10}H_{16}$	۱/۰۵	
۱۳	تیمول	$C_{10}H_{14}O$	۲/۱۴	
۱٤	سایمن	$C_{10}H_{14}$	۴/۷۰	

۱۵	اوژنول	$C_{10}H_{12}O_2$	۱/۱۲	
۱٦	کریسانتنیل استات	$C_{12}H_{18}O_2$	۱/۲۳	
۱۷	اسپاتولنول	$C_{15}H_{24}O$	۰/۶۹	

۲-۲. آماده سازی پروتئین

ساختار کریستالوگرافی شده‌ی آنزیم اوره از بانک اطلاعاتی پروتئین[1] با کد (PDB ID: 1e9z) و قدرت تفکیک[2] ۳ آنگستروم دانلود گردید[۱۹]. برای اطمینان از سالم بودن، کریستالوگرافی آن با نرم افزار vmd مشاهده شد. همچنین ساختار دوم پروتئین با کایمرا بررسی شد.



شکل ۱. ساختار دوم پروتئین با نرم افزار کایمرا

۲-۳. داکینگ مولکولی

فرایند داکینگ ترکیبات گیاه بومادران به جایگاه اتصال آنزیم اوره‌آز با استفاده از نرم افزار AutoDock4.0 و Autodock Toolsانجام گرفت[۲۰]. هیدروژن های قطبی به ترکیبات و پروتئین اضافه و سپس بار جزئی ترکیبات اضافه شد و بار جزئی پروتئین با روش kollman به آن اضافه گردید.

[1] Protein Data Bonding
[2] Rezolition

جدول ۲. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین آنزیم اوره آز و ترکیبات عصاره گیاه بومادران

اسم پروتئین	انرژی اتصال	سهم انرژی واندروالس (کیلوژول بر مول)	سهم انرژی الکترواستاتیک (کیلوژول بر مول)
1.8cineol	−۴/۶۹	−۵/۰۰	+۰/۰۴
3.2ocimene	−۳/۷۱	−۴/۹۰	۰/۰۰
alpha-pienene	−۵/۱۵	−۵/۱۴	−۰/۰۱
beta eudesmol	−۴/۷۵	−۵/۲۸	−۰/۰۶
bismuth	−۴/۹۲	−۵/۲۶	۰/۲۶
borneol	−۳/۵۰	−۲/۷۳	−۰/۰۷
camphor	−۴/۹۶	−۵/۱۷	−۰/۰۸
caryophylleneoxid	−۵/۴۳	−۵/۳۸	−۰/۰۵
chrysathenone	−۳/۵۹	−۳/۸۵	−۰/۰۴
chrysantenylacetate	−۴/۷۷	−۵/۳۸	−۰/۰۹
eugenol	−۲/۶۵	−۳/۷۴	−۰/۱۱
linalool	−۳/۳۴	−۵/۰۹	−۰/۰۴
P-cymene	−۴/۵۶	−۴/۸۵	−۰/۰۰
pinocarvone	−۴/۸۸	−۴/۷۹	−۰/۰۹
sabinene	−۳/۶۳	−۳/۹۳	+۰/۰
spathulenol	−۵/۸۲	−۶/۱۹	+۰/۰۷
thymol	−۳/۴۱	−۳/۹۴	−۰/۰۶

تمام محاسبات داکینگ با استفاده از الگوریتم بهینه کننده ژنتیکی و صفات لامارکی که تنظیمات این الگوریتم به صورت زیر است بررسی گردید: حداکثر تعداد ارزیابی انرژی ۲۵/۰۰۰/۰۰۰، یک جمعیت اولیه از ۱۵۰ نفر به صورت تصادفی قرار می گیرد، حداکثر تعداد نسل ۲۷/۰۰۰ ، نرخ جهش ۰/۰۲ ، نرخ متقاطع از ۰/۸ و یک مقدار نخبه گرایی است. برای جستجوی محلی، به اصطلاح الگوریتم سولیس با حداکثر ۱۰۰۰ تکرار در هر جستجو استفاده شد. این داک با درنظر گرفتن پروتئین به صورت انعطاف ناپذیر و لیگاند انعطاف پذیرانجام شد. جعبه گرید با ابعاد ۱۲۰×۱۲۰×۱۲۰ که کل پروتئین را دربر می‌گیرد و فاصله گرید ۱ آنگستروم و سایر پارامترها به صورت پیش فرض درنظر گرفته شد و پس از انجام داکینگ بهترین کانفورماسیون با پایین‌ترین میزان انرژی اتصال به عنوان نتیجه انتخاب شد.

۳. بررسی نتایج

نتایج داکینگ ترکیبات گیاه بومادران با آنزیم اوره آز در جدول۲ نشان داده شده است. انرژی اتصال ترکیبات spathulenol، caryophylleneoxid و alpha-pienene با انرژی های اتصال به ترتیب برابر با ۵/۸۲-، ۵/۴۳- و ۵/۱۸- کیلوژول بر مول بهتر از ترکیبات دیگرهستند. همچنین در این اتصال سهم انرژی واندروالس بیشتر از انرژی الکترواستاتیک است.

٤. نتیجه گیری

آنزیم اوره از هلیکوباکترپیلوری یکی از مهم ترین آنزیم های مرتبط با فعالیت باکتری است. بنابراین مهار این آنزیم باعث از بین رفتن باکتری می شود از طرفی داروهای شیمیایی به علت داشتن عوارض بالا آسیب بیشتری به بافت معده می رساند. بنابراین نیاز به دارویی با عوارض کمتر احساس می شود و داروهای گیاهی می توانند جایگزین بهتری باشند. در این مطالعه گیاه بومادران بررسی شد وطبق نتایج داکینگ و باتوجه به انرژی های اتصال ترکیب Spathulenol با داشتن کمترین انرژی اتصال(۵/۸۲-) اثر مهاری بالایی بر انزیم اوره از هلیکو باکترپیلوری دارد و می تواند جایگزین بسیارخوبی برای داروهای شیمیایی باشد.

۵. مراجع

[1] Ageyeva, Y.S., Shtygasheva, O.V., Iptyshev, V.M., Butorin, N.N. and Tsukanov, V.V., 2018. The role apoptosis in dysregulations of lokal and system immunitet at the Helicobacter pilory-infection. *Bulletin of Siberian Medicine*, *9*(5), pp.13-18.

[2] Quintana-Guzmán, E.M., Schosinsky-Nevermann, K., Arias-Echandi, M.L. and Davidovich-Rose, H., 1999. Estudio comparativo de pruebas de ureasa para la detección de Helicobacter pilory en biopsias gástricas. *Revista Biomédica*, *10*(3), pp.145-151.

[3] Fawcett, J.K. and Scott, J., 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of clinical pathology*, *13*(2), pp.156-159.

[4] Tamaru, Y., Hojo, M., Higashimura, H. and Yoshida, Z., 1988. Urea as the most reactive and versatile nitrogen nucleophile for the palladium (2+)-catalyzed cyclization of unsaturated amines. *Journal of the American Chemical Society*, *110*(12), pp.3994-4002.

[5] Sirviö, J.A., Visanko, M. and Liimatainen, H., 2015. Deep eutectic solvent system based on choline chloride-urea as a pre-treatment for nanofibrillation of wood cellulose. *Green Chemistry*, *17*(6), pp.3401-3406.

[6] Saeidnia, S., Gohari, A.R., Mokhber-Dezfuli, N. and Kiuchi, F., 2011. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus Achillea. *DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, *19*(3), p.173.

[7] Potrich, F.B., Allemand, A., da Silva, L.M., dos Santos, A.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Mendes, D.A.G.B., Andre, E., de Paula Werner, M.F. and Marques, M.C.A., 2010. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of Achillea millefolium L.: involvement of the antioxidant system. *Journal of ethnopharmacology*, *130*(1), pp.85-92.

[8] Eghdami, A. and Sadeghi, F., 2010. Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of Achillea millefolium. *Organic Chemistry Journal*, *2*, pp.81-84.

[9] Mohammadhosseini, M., Sarker, S.D. and Akbarzadeh, A., 2017. Chemical composition of the essential oils and extracts of Achillea species and their biological activities: A review. *Journal of ethnopharmacology*, *199*, pp.257-315.

[10] Gharibi, S., Tabatabaei, B.E.S., Saeidi, G. and Goli, S.A.H., 2016. Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of Achillea species. *Applied biochemistry and biotechnology*, *178*(4), pp.796-809.

[11] Saeidnia, S., Yassa, N., Rezaeipoor, R., Shafiee, A., Gohari, A.R., Kamalinejad, M. and Goodarzy, S., 2015. Immunosuppressive principles from Achillea talagonica, an endemic species of Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, *17*(1), pp.37-41.

[12] Baharara, J., Namvar, F., Ramezani, T., Mousavi, M. and Mohamad, R., 2015. Silver nanoparticles biosynthesized using Achillea biebersteinii flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of Bax and Bcl-2 gene expression. *Molecules*, *20*(2), pp.2693-2706.

[13] Alfatemi, S.M.H., Rad, J.S., Rad, M.S., Mohsenzadeh, S. and da Silva, J.A.T., 2015. Chemical composition, antioxidant activity and in vitro antibacterial activity of Achillea wilhelmsii C. Koch essential oil on methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus spp. *3 Biotech*, *5*(1), pp.39-44.

[14] Almadiy, A.A., Nenaah, G.E., Al Assiuty, B.A., Moussa, E.A. and Mira, N.M., 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four Achillea species and their nanoemulsions against foodborne bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, *69*, pp.529-537.

[15] Boutennoun, H., Boussouf, L., Rawashdeh, A., Al-Qaoud, K., Abdelhafez, S., Kebieche, M. and Madani, K., 2017. In vitro cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of Algerian Achillea odorata leaves. *Arabian journal of chemistry*, *10*(3), pp.403-409.

[16] Bickerton, G.R., Paolini, G.V., Besnard, J., Muresan, S. and Hopkins, A.L., 2012. Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature chemistry*, 4(2), pp.90.

[17] KOÇAK, A. and ÇAKICI, A.V., Composition of The Volatile Oils of Two Achillea L.(Asteraceae) Taxa from Turkey. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology*, *5*(2).

[18] Mockute, D. and Judzentiene, A., 2003. Variability of the essential oils composition of Achillea millefolium ssp. millefolium growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology, 31(9)*, pp.1033-1045.

[19] Beheshti, A., Pourbasheer, E., Nekoei, M. and Banaei, A., 2012. Quantitative structure-activity relationship study of amino acid derivatives as histone deacetylase inhibitors using the genetic algorithm–Multiple linear regression. *Analytical Chemistry Letters*, *2*(1), pp.33-43.

[20] Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. and Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, *30(16)*, pp.2785-2791.

The Study of Yarrow's Effect on Helicobacter Pylori with Ducting Molecular Simulation

Khadijeh Tavakoli hafshejani[1], Fatemeh banisharif dehkordi[2], Fateme Raisi *[1], Ellaheh.Saberi[3]

[1]*Faculty of Science,Department of Chemistry, Islamic Azad University, shahrekord Branch, shahrekord,Iran*

[2]Department of Genetics, Faculty of science, shahrekord university,shahrekord,Iran

[3]*Faculty of Science,Department of* Genetics, *Islamic Azad University, shahrekord Branch, shahrekord,Iran*

Submited: 01 July 2019, Revised: 31 July 2019, Accepted: 17 September 2019

Abstract

Helicobacter pylori resistance to common antibiotics is the main cause of the low percentage of bacteria in developing countries.Therefore, there is a need for an alternative drug to treat Helicobacter pylori infection. The new medicine should be effective, less complicated, with good effects against Helicobacter pylori, and not cause bacterial resistance to the drug. The use of medicinal plants is one of the ways to solve the problem of microbial resistance.Because the secondary compounds of plants are complex molecules, many of them have biological activity. Investigators' attention to effective plant combinations, as a solution to the problem of Helicobacter Pylori resistance, is common to antibiotics and one of them is the Yarrow Plant, whose compounds cause the Helicobacter Pylori to be destroyed. Also, empirical studies showed that the urease enzyme of this bacterium causes its life in the stomach. Therefore, it was assumed that the herbal compounds of the yarrow may have an effect on the enzyme urease.The herbal drug design was used to treat Helicobacter pylori, which was done using molecular docking simulator and Autodak 4 software. Alopenin with free energy of binding (5.15) and carophilin oxide with free energy (5.43) and bismuth with free energy binding (4.92) were used to inhibit urease enzymes. Cariogenic oxide with binding energy is better for the enzyme.

Keywords: *Helicobacter pylori, Urease enzyme, Molecular docking, Alopenin, Caryophylline oxide*.

***Corresponding author :** khadijeh Tavakoli

Adress: Department of Chemistry, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Tel: 09194704299 **E-mail:** hsa25078@gmail.com