

مطالعه داکینگ مولکولی ترکیبات فیتواستروژنی گل

راعی (*Hypericum perforatum L.*) و شوید (*Anethum graveolens L.*)

با دو ایزوفریم رسپتور استروژنی

محبوبه منصوریان^{*۱}

مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: استروژن‌ها نقشی اساسی در رشد، توسعه و نگهداری طیف متنوعی از بافت‌ها دارند. پاسخ‌های فیزیولوژیکی به هورمون استروژن در بافت‌های ویژه به واسطه حداقل دو ایزوفریم رسپتور استروژنی آلفا (ERα) و بتا (ERβ) در بافت‌های خاص می‌باشد. امروزه گیاهان دارویی به دلیل ارزان‌تر بودن و عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای سنتتیک، کاربرد زیادی در درمان و کنترل بیماری‌ها دارند، از جمله این گیاهان، گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) و شوید (*Anethum graveolens L.*) می‌باشد. گل راعی مؤثر بر سندرم پیش از قاعدگی و گیاه شوید به عنوان قاعده آور، مؤثر بر هورمون‌های جنسی و دیسمنوره می‌باشد. هدف اصلی این پژوهش تعیین و مقایسه برهمکنش مولکولی ترکیبات فیتواستروژنی گل راعی و شوید با دو ایزوفریم رسپتور استروژنی با استفاده از روش داکینگ مولکولی بود.

روش بررسی: این مطالعه داکینگ مولکولی در سال ۱۴۰۰ انجام شد. برای محاسبات برهمکنش مولکولی، با هدف بررسی بیشتر تأثیرات احتمالی هورمونی ترکیبات فیتواستروژنی گیاهان مورد مطالعه از روش داکینگ مولکولی استفاده شد. بررسی جایگاه اتصال نظری ترکیبات فیتواستروژنی فلاونوئیدی فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین و میریستین، رسوراترول، تترامتیل‌استیلین، ترانس‌آنتول، لیمونن و جنیستین به عنوان یک آگونیست یا آنتاگونیست استروژنی با ERα و ERβ انجام شد و اسید آمینه‌های درگیر در برهمکنش، انرژی آزاد اتصال و ثابت اتصال تعیین شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف و مقایسه با نتایج مقالات مرتبط تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با بررسی انرژی اتصال و کنفورماسیون‌های مختلف ترکیبات فیتواستروژنی در ERS، فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین و رسوراترول به عنوان بهترین لیگندهای بالقوه انتخاب شدند. نتایج تأیید می‌کند که این ترکیبات از نظر استریکی نسبتاً با محل قرارگیری در اکتیوسایت (جایگاه فعال) اشغال شده به وسیله آگونیست اندوژن 17β-استرادیول به عنوان آگونیست کامل و آگونیست نسبی جنیستین سازگار هستند. نتایج شواهدی از اتصال ترکیبات فیتواستروژنی این گیاهان به ERα و ERβ با انرژی آزاد اتصال 5.29 تا -8.47 کیلوکالری بر مول و ثابت اتصال 131.62 μM تا 614.61 nM و برهمکنش آنها با اسیدآمینه‌های کلیدی اکتیوسایت شامل Glu353، Arg394 و His524 از ERα و Glu305، Arg346 و His475 از ERβ به عنوان آگونیست نسبی فراهم می‌کند.

نتیجه‌گیری: برهمکنش بهترین ترکیبات فیتواستروژنی مورد بررسی با اسیدآمینه‌های کلیدی اکتیوسایت ERS مانند آگونیست نسبی جنیستین مطلوب می‌باشد. نتایج ارزشمند داکینگ مولکولی در شناسایی مهم‌ترین ترکیبات فیتواستروژنی، می‌تواند به عنوان نقطه شروع بهینه‌سازی در طراحی منطقی دارو در درمان بیماری‌های حساس به استروژن در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: گل راعی، شوید، رسپتور استروژنی، فیتواستروژن، 17β-استرادیول، آگونیست نسبی، داکینگ مولکولی

*نویسنده مسئول: محبوبه منصوریان، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه فارماکولوژی

Email: mahboubehmansourian90@gmail.com

مقدمه

فیزیولوژیکی مانند سیستم تولید مثل و هموستاز استخوان نقش دارند. ER با یک سازمان دهی ساختاری مدولار مشخص با دومین‌های^(۱) مشخص مرتبط با فعال‌سازی، اتصال DNA و اتصال هورمون است. ER α و ER β دارای شباهت توالی کلی متوسط (۴۷ درصد) با همولوژی کمی بین دومین‌های ترانس اکتیواسیون N ترمینال (AF-1)^(۲) خود هستند، اما دومین‌های اتصال DNA و لیگاند به خوبی حفظ می‌شوند (۱، ۳، ۸ و ۹).

دامنه اتصال لیگاند C ترمینال (LBD)^(۸) چند منظوره است و علاوه بر لنگرگاه‌های^(۹) برای جایگاه شناسایی لیگاند، شامل نواحی برای دیمریزاسیون گیرنده و ترانس اکتیواسیون وابسته به لیگاند (AF-2)^(۱۰) است. اتصال هورمون به ER-LBD باعث تغییر کنفورماسیونی در گیرنده شده که مجموعه‌ای از وقایع را آغاز می‌کند و در نهایت منجر به فعال شدن یا سرکوب ژن‌های مسؤل می‌شود. ER یک هدف دارویی مهم برای جایگزینی هورمون در زنان یائسه و داروهای شیمی درمانی علیه برخی از سرطان‌های تولید مثل است (۸). چندین مولکول طبیعی و سنتزی از طریق برهمکنش با این پروتئین‌ها فعالیت نشان می‌دهند. مجموعه‌ای گسترده از ترکیبات متمایز

استروژن‌ها نقشی اساسی در رشد، توسعه و نگهداری طیف متنوعی از بافت‌ها دارند. آنها اثرات فیزیولوژیکی خود را از طریق رسپتورهای استروژنی (ERs)^(۱) اعمال می‌کنند که به عنوان تنظیم کننده رونویسی فعال شده به وسیله لیگاند عمل می‌کنند. پاسخ‌های فیزیولوژیکی به هورمون استروژن در بافت‌های ویژه به واسطه حداقل دو ایزوفرم رسپتور استروژنی آلفا (ER α) و رسپتور استروژنی بتا (ER β) در بافت‌های خاص می‌باشد. این دو ایزوفرم ER الگوهای با همپوشانی توزیع بافتی، اما متمایز از خود نشان می‌دهند و از نظر اتصال لیگاند و خواص ترانس اکتیواسیون (فعال سازی)^(۲) متفاوت هستند. داده‌های اولیه حاصل از پژوهش‌های رسپتورهای استروژنی نشان می‌دهد که هر ایزوفرم نقش بیولوژیکی جداگانه‌ای دارد (۴-۱). ER α عمدتاً در اندام‌های تولید مثل زنان رحم و تخمدان (سلول‌های تکال^(۳))، پستان، کلیه، استخوان، بافت چربی سفید و کبد بیان می‌شود، در حالی که ER β در چندین بافت از بدن مردان و زنان از جمله سیستم عصبی مرکزی، روده بزرگ، ریه، کلیه، تخمدان (سلول‌های گرانولوزا)^(۴)، اندام‌های تولید مثل؛ مردان، مثانه، کولون و سیستم‌های قلبی-عروقی و ایمنی بدن یافت شده است (۷-۴ و ۱). ER به عنوان عضوی از یک خانواده بزرگ فاکتورهای رونویسی گیرنده‌های هسته‌ای (NRs)^(۵) در تنظیم عملکردهای مختلف

- 1-Estrogen Receptors
- 2-Transactivational
- 3-Thecal Cell
- 4-Granulosa Cells
- 5-Nuclear Receptors (NRs)
- 6-Domains
- 7-N-terminal Transactivation (AF-1)
- 8-Ligand Binding Domain (LBD)
- 9-Harboring
- 10-Ligand-Dependent (AF-2) Transactivation

می‌شوند و می‌توانند هم به عنوان آگونیست و هم به عنوان آنتاگونیست عمل کنند که بستگی به بافت سلولی و پروموتور و هم‌چنین ایزوفرم ER دارد(۸). تاموکسیفن^(۷) و رالوکسیفن^(۸)، به عنوان SERM، امروزه مؤثرترین و گسترده‌ترین داروهای ضد استروژن می‌باشد که برای این منظور به طور بالینی در درمان پوکی استخوان و سرطان پستان وابسته به هورمون به کار می‌روند. با این حال، چندین بیمار تحت درمان با تاموکسیفن شروع سریع مقاومت را نشان می‌دهند(۶). رالوکسیفن، یک آنتی‌استروژن بسیار مؤثر در بافت‌های تولید مثل است، اما به عنوان یک آگونیست نسبی^(۹) ER در استخوان عمل می‌کند و هم‌چنین سطح کلسترول خون را کاهش می‌دهد. انواع مختل‌کننده‌های غدد درون ریز موجود در محیط نیز ER را هدف قرار می‌دهند. بنابراین، شناسایی ترکیبات ضد استروژن جدید که قادر به غلبه بر شروع مقاومت باشند، هم‌چنان مورد تقاضا است(۵):

با توجه به عوارض جانبی ناشی از این داروها، شناسایی و تهیه داروهای جایگزین دارای اهمیت زیادی است. از زمان‌های قدیم در طب سنتی همواره توجه خاصی به گیاهان دارویی بوده و امروزه با بررسی‌های متعددی که تحت عنوان طب

ساختاری با توانایی^(۱) و تمایل اتصال^(۲) متفاوت به ERS متصل می‌شوند. برخی از این ترکیبات، مانند لیگاند طبیعی ER، 17β-استرادیول(E2)^(۳)، فقط به عنوان آگونیست کامل^(۴) گیرنده عمل می‌کنند، در حالی که برخی دیگر، مانند EM-800 و ICI-164384 به عنوان آنتاگونیست خالص عمل می‌کنند(۸). تعدادی از ترکیبات شیمیایی مشتق شده از گیاهان، معروف به فیتواستروژن‌ها دارای تأثیرات مهاری بر روی ترشح گنادوتروپین‌های انسانی و حیوانی هستند(۱۰). استروژن‌ها یا فیتواستروژن‌ها ترکیباتی مشابه لیگاند طبیعی E2 می‌باشند که بیشترین مقدار استروژن در گردش خون می‌باشد(۱۱). فیتواستروژن‌ها در منابع گیاهی مختلف، توانایی اتصال به ERS را، با ایجاد فعالیت استروژنی یا ضد استروژنی نشان می‌دهند(۱۶-۱۲ و ۵، ۱). اثرات بالقوه ضد تکثیر آنها می‌تواند برای فرمولاسیون مواد مغذی یا دارویی مفید باشد(۶). در حقیقت، این ترکیبات می‌توانند به ERS متصل شده و پاسخ‌های استروژنی را تعدیل کنند. برای مثال در فاز تخمک‌گذاری چرخه قاعدگی در زنان قبل از دوره یائسگی که سطح استروژن در گردش خون بالا است، فیتواستروژن‌ها از طریق اتصال به ERS به عنوان آنتاگونیست استروژن عمل می‌کنند و موجب کاهش آزادسازی هورمون لوتئینی یا LH^(۵)

هیپوفیزی می‌شوند. بعد از یائسگی که سطح استروژن پایین است، فیتواستروژن‌ها به عنوان آگونیست استروژن عمل می‌کنند(۱۱). در حقیقت دسته سوم، تعدیل‌کننده انتخابی گیرنده استروژن(SERM)^(۱) نامیده

- 1-Potency
- 2-Binding Affinities
- 3-Estradiol (E2) or 17β-Estradiol
- 4-Full Agonist
- 5-Luteinizing Hormone, Lutropin(LH)
- 6-Selective Estrogen-Receptor Modulator(SERM)
- 7-Tamoxifen
- 8-Raloxifene
- 9-Partial Agonist

گیاهی^(۱) به عمل می‌آید، به اثرات مفید و ارزنده گیاهان بسیاری دست یافته‌اند (۱۷). امروزه گیاهان دارویی به دلیل ارزان‌تر بودن و عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای سینتتیک، کاربرد زیادی در درمان و کنترل بیماری‌ها دارند، از جمله این گیاهان، گیاه گل‌راعی با نام علمی *Hypericum perforatum L.* متعلق به خانواده گل‌راعی (*Hypericaceae*) می‌باشد. چند مواد مؤثره این گیاه شامل هیپریسین^(۲)، سودوهیپریسین^(۳) و فیتواستروژن‌هایی چون کامپفرول^(۴)، کوئرسیتین^(۵)، میریستین^(۶)، رسوراترول^(۷) و تترامتیل‌استیلبن^(۸) می‌باشد (۱۹ و ۱۸). گیاه شوید با نام علمی *Anethum graveolens L.* متعلق به خانواده چتریان (*Apiaceae*) می‌باشد که گل و دانه آن دارای ترکیبات مونوتروپنی^(۹) شامل لیمونن^(۱۰)، ترانس‌آنتول^(۱۱)، کاروون^(۱۲) و ترکیبات فلاونوئیدی^(۱۳) از جمله کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین و ترکیبات دیگر می‌باشد. از میان این ترکیبات مونوتروپنی، ترانس - آنتول و لیمونن دارای خاصیت فیتواستروژنی می‌باشد (۲۳-۲۰). فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، استیلبن‌ها و مونوترپن‌ها که از ترکیبات اصلی بسیاری از گیاهان از جمله؛ گل‌راعی، شوید، خار مریم، خارخسک، شنبلیله، گینکو، شبدرد قرمز، سویا، شیرین‌بیان و رازیانه می‌باشند، به دسته‌ای از مواد مؤثره گیاهی به نام فیتواستروژن‌ها تعلق دارند. فیتواستروژن‌ها منبع اصلی طبیعی اگزوژن از ترکیبات استروژنیک هستند که در درجه اول به عنوان عوامل ضد باکتری و قارچ کش به

وسيله گیاهان تولید می‌شوند. به نظر می‌رسد وجود چنین ترکیباتی در رژیم غذایی انسان مفید باشد و حتی ممکن است خطر ابتلا به سرطان پستان و پروستات وابسته به هورمون و بیماری قلبی را کاهش دهند و علایم مرتبط با یائسگی را کاهش دهد (۸). داکینگ مولکولی در جامعه علمی به عنوان ابزاری مهم برای بررسی برهمکنش‌های مقرون به صرفه لیگاند-گیرنده (رسپتور) در یک بازه زمانی بسیار کوتاه محبوبیت پیدا کرده است (۲۴). اساس خیلی از پروژه‌های کاربردی در سطوح مختلف می‌تواند پژوهش‌های تئوریک باشد، این رویکردهای نظری به عنوان پیش‌آگهی به پژوهش‌های تجربی در جای خود نیز موجب کم کردن هزینه‌های مطالعاتی خواهند شد (۲۶ و ۲۵). با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک، می‌توان محاسبات برهمکنش‌های مولکولی را انجام داد که اساس کار این روش‌ها بر منطق بیوفیزیکی استوار است. استفاده از نتایج روش‌های نظری نرم افزارهای کامپیوتری در کنار روش‌های آزمایشگاهی باعث تسریع درک ما از برهمکنش و اثر متقابل مولکول‌ها خواهد شد (۲۷ و ۱). بنابراین، به عنوان یک روش

- 1-Herbal medicine
- 2-Hypericin
- 3-Pseudohypericin
- 4-Kaempferol
- 5-Quercetin
- 6-Myricetin
- 7-Resveratrol
- 8-Tetramethyl stilbene
- 9-Monoterpens
- 10-Limonene
- 11-trans-Anethole
- 12-Carvone
- 13-Flavonoid

گیرنده‌های مرتبط با هورمون جنسی استروژن انسانی شامل ER α و ER β ، از طریق داکینگ مولکولی انجام شد تا اطلاعاتی از نحوه برهمکنش اولیه، باقی مانده‌های اسیدآمینو درگیر در برهمکنش، انرژی آزاد اتصال و ثابت^(۲) اتصال به دست آید. لذا هدف از این پژوهش تعیین و مقایسه برهمکنش مولکولی ترکیبات فیتواستروژنی گل راعی و شوید با دو ایزوفرم رسپتور استروژنی بود.

روش بررسی

این مطالعه داکینگ مولکولی در سال ۱۴۰۰ انجام شد. در این پروژه از نرم افزار اتوداک نسخه ۴/۲^(۳) استفاده شد که از قدیمی‌ترین و مشهورترین برنامه‌های داکینگ مولکولی می‌باشد^(۳۳). محاسبات کامپیوتری بر طبق پروتکل‌های گزارش شده در منابع انجام شدند^(۲۵). این مطالعه با استفاده از دو ایزوفرم ER به عنوان گیرنده‌های مرتبط با هورمون‌های جنسی انجام شد، توالی انسانی رسپتورها از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)^(۴) دریافت شد. ساختار اشعه ایکس سه بعدی (3D)^(۵) رسپتورهای انسانی از بانک داده‌های پروتئین (PDB)^(۶) در مرکز همکاری پژوهشی بیوانفورماتیک ساختاری (RCSB)^(۷) دانلود شد.

- 1-Genistein (4',5,7-trihydroxyflavone)
- 2-Constant
- 3- AutoDock 4.2
- 4- National Center for Biotechnology Information (NCBI)
- 5-Three-dimensional (3D)
- 6-Protein Data Bank (PDB)
- 7-Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)

آلترناتیو، شناسایی مهم‌ترین ترکیبات فیتواستروژنی هر گیاه و برهمکنش‌های مهم آنها با گیرنده‌های هورمونی به عنوان تنظیم کننده‌های هورمونی از طریق داکینگ مولکولی قابل بررسی است.

لازم به ذکر است که اثر گل راعی و دانه شوید به طور جداگانه بر اختلالات مرتبط با سطح هورمون‌های جنسی بررسی شده است و پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این گیاهان در درمان برخی از اختلالات سیستم تولید مثلی مؤثر بوده‌اند^(۲۸-۳۱)، به طوری که شوید را می‌توان به عنوان یک عامل تنظیم کننده چرخه قاعدگی برای زنان با چرخه نامنظم یا به عنوان یک عامل ضد باروری استفاده کرد^(۳۲ و ۲۹). بنابراین، به علت وجود ترکیبات فیتواستروژنی در این گیاهان با استدلال بر این که گیاه گل راعی در طب سنتی به عنوان ضدالتهاب و مؤثر بر سندرم پیش از قاعدگی^(۳۱) و گیاه شوید در طب سنتی به عنوان قاعده‌آور، مؤثر بر هورمون‌های جنسی، سیستم تولید مثل زنان و دیسمنوره^(۳۲ و ۲۸-۳۰) می‌باشد، در این مطالعه، سعی شد برای تعیین مکانیسم، جایگاه اتصال نظری مواد مؤثره فیتواستروژنی گیاهان مورد بررسی شامل ترکیبات فیسیتین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین، تترامیل‌استیلین، ترانس - آنتول، لیمونن، رسوراترول و ترکیب نماینده ایزوفلاونوئیدی جنیستین^(۱) به عنوان یک آگونیست یا آنتاگونیست استروژنی بر هر دو ایزوفرم ER مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور بررسی برهمکنش مواد مؤثره فیتواستروژنی گیاهان موردنظر با

با استفاده از الگوریتم Polak-Ribiere تا زمان رسیدن به گرادیان ریشه میانگین مربعی برابر با $0.1 \text{ kcal}/(\text{\AA} \text{ mol})$ بهینه‌سازی شد. جزییات روش بهینه‌سازی قبلاً توصیف شد (۳۵ و ۲۵).

پژوهش‌های داکینگ مولکولی برای این ترکیبات برای درک برهم کنش‌های لیگاند- پروتئین به طور مفصل انجام شد. ترکیبات فیتواستروژنی بر روی مکان‌های پیوندی (اتصال) رسپتورها با استفاده از نرم‌افزار اتوداک نسخه ۴٫۲^(۳) قرار گرفت (۳۳). داکینگ با استفاده از روش معمول و پارامترهای پیش فرض این نرم‌افزار انجام شد (۳۳). در پروتکل داکینگ، لیگاند به عنوان یک مولکول انعطاف‌پذیر برای چرخش همه پیوندهای قابل چرخش لیگاند و به دست آوردن بهترین و بهینه‌ترین کانفورمر لیگاند درون مکان‌های فعال رسپتورها در نظر گرفته شد. در مرحله اول، فایل‌های مختصاتی^(۱) رسپتور و لیگاند آماده شد که این فایل‌ها اطلاعات مورد نیاز اتوگرید^(۲) و اتوداک^(۳) را در بردارد. در مرحله بعد، گرید مپ‌ها^(۴) با استفاده از اتوگرید (بخشی از بسته نرم‌افزاری اتوداک) ترسیم گردید. چون موقعیت محل اتصال لیگاند در کمپلکس از طریق موتاژن یا جهش‌زایی هدایت یافته مکانی (SDM)^(۵) مشخص شده است، گرید باکس^(۱) برای دو ایزوform $ER\alpha$ و $ER\beta$ بر روی اتم C_{353} -Glu از $ER\alpha$ با رزولوشن $2/00$ آنگستروم ($1X7R$) (۳۴) در مختصات $Z=18/146$ ، $Y=22/415$ ، $X=12/293$ و بر روی میانگین اتم C_{α} سه باقی مانده اسید آمینه‌های

- 1-Coordinate
- 2-AutoGrid
- 3-AutoDock
- 4-Grid map
- 5-Site-directed mutagenesis
- 6-Grid box

ساختار کریستال (بلورین) $ER\alpha$ با شناسه (PDB ID:1X7R) (۳۴ و ۵) و $ER\beta$ با شناسه (PDB ID:1QKM) (۸ و ۵) در کمپلکس با جنیستئین به عنوان فیتواستروژن انتخابی بتا رسپتور (آگونیسست نسبی) به عنوان تارگت انتخاب شد. پروتئین‌ها از نظر استوکیومتری مونومر بوده، هر دو ایزوform $ER\alpha$ و $ER\beta$ فقط دارای یک زنجیره A می‌باشد. هر واحد مونومری دارای یک فیتواستروژن جنیستئین، لیگاند متصل به پروتئین می‌باشد (۳۴). زنجیره A رسپتورهای مورد نظر برای داکینگ انتخاب شده و لیگاند پیوندی از قسمت فعال رسپتورها حذف شد (۳۴ و ۸).

ساختار شیمیایی فلاون و ایزوفلاون به عنوان ساختار پایه فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها در شکل ۱ نشان داده می‌شود.

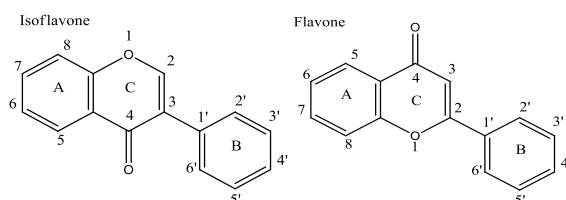
ساختار 2D ترکیبات مواد مؤثره فیتواستروژنی گیاهان مورد بررسی شامل؛ فیستئین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین، تترامتیل‌استیلبن، ترانس-آنتول، لیمونن، رسوراترول، و جنیستئین به عنوان لیگاند با استفاده از ChemOffice 2015 ترسیم شد (جدول ۱) و با استفاده از نرم افزار HyperChem7.0 بهینه‌سازی گردید (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA; <http://www.hyper.com>).

با استفاده از میدان نیروی مکانیکی مولکولی MM^+ محاسبات بهینه‌سازی هندسی 3D برای لیگاند تا زمان به دست آمدن گرادیان ریشه میانگین مربعی کم‌تر از $0.1 \text{ kcal}/(\text{\AA} \text{ mol})$ انجام شد. کنفورماسیون نهایی با روش AM1 نیمه تجربی محاسبه شد. ساختار مولکولی

ابزار های گرافیکی قابل مشاهده است و در تحلیل و به دست آوردن بهترین حالت از لیگاند برای برهمکنش با ماکرومولکول به ما کمک می‌کند. در میان کنفورماسیون‌های مختلف، کنفورماسیون با بهترین حالت و با کم‌ترین انرژی پیوندی (برحسب کیلوکالری بر مول) انتخاب شد.

در بخش بیوانفورماتیک، اتوداک تولز^(۳) دارای چندین روش برای آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی داکینگ^(۳) است که شامل ابزاری برای دسته‌بندی نتایج بر اساس شباهت کنفورماسیون، دیدن کنفورماسیون‌ها، دیدن برهمکنش‌های بین لیگاندها و پروتئین‌ها و دیدن پتانسیل‌های تمایلی^(۴) ایجاد شده به وسیله اتوگرید است. آنالیز انرژی‌های محاسبه شده و منطقی بودن نتایج دست به دست هم داده تا بهترین جواب را تعیین کنند. در همه این مراحل ساختارهای مولکولی با استفاده از نرم افزار 3D مانند VMD^(۳۷) قابل مشاهده است. طرح شماتیک 2D نتایج داکینگ به طور بصری (نموداری) برای درک الگوی برهم کنش با نرم افزار لیگ پلات (LigPlot) تجزیه تحلیل شد^(۳۸). نتایج داکینگ مولکولی بایستی با نتایج SDM و مقالات مقایسه و ارزیابی شود^(۴۰ و ۳۹).

کلیدی Glu305، Arg346 و His475، از ER β با رزولوشن ۱/۸۰ آنگستروم (1QKM) در مختصات $Z=111/755$ ، $X=26/039$ ، $Y=8/477$ قرار گرفت^(۸). با استفاده از اتوگرید^۴، فایل پارامتر شبکه از طریق مقادیر محورهای Z ، Y و X با ابعاد گرید باکس $50 \times 50 \times 50$ تنظیم شد. فاصله نقطه شبکه 0.375 آنگستروم به صورت مقدار پیش فرض در نظر گرفته شد. برای سیستم‌های معمولی، اتوداک چندین بار اجرا می‌شود تا چندین کنفورماسیون داک شده به دست آید. تحلیل خوشه‌ای با ۲۰۰ اجرا انجام شد^(۲۵). داکینگ با استفاده از چندین متد جستجو انجام می‌شود. از بین سه الگوریتم متفاوت جستجوی نوع پیوندها و گروه‌های عاملی درگیر ترکیبات فیتواستروژنی گل راعی و شوید به این دو ایزوفرم، از برنامه الگوریتم ژنتیک لامارکی (LGA)^(۱) استفاده شد، کارآمدترین متد LGA است^(۳۶). انرژی پیوندی برهمکنش نیز با استفاده از اتوداک نسخه ۴،۲ محاسبه شد. در نهایت، در این مرحله انرژی آزاد حاصل از برهمکنش ترکیبات فیتواستروژنی گل راعی و شوید با دو ایزوفرم گیرنده هورمونی و اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش به دست آمد. نتایج به دست آمده از داکینگ شامل فایل خروجی داکینگ و اشکال 3D از لیگاند متصل شده به ماکرومولکول (رسپتور) می‌باشد که با



شکل ۱: ساختار شیمیایی فلاون و ایزوفلاون

- 1-Lamarckian genetic algorithm
- 2- AutoDock Tools
- 3-Docking simulation
- 4- Affinity potentials

یافته‌ها

این مطالعه با هدف شناسایی جایگاه اتصال ترکیبات فیتواستروژنی مورد مطالعه با گیرنده هورمونی ER α با استفاده از داکینگ مولکولی انجام شد.

شکل ۲، برهمکنش‌های فیتواستروژن‌های مورد بررسی شامل؛ فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین، سوراترول و جنیستین را در داخل اکتیو سایت ER α نشان می‌دهد. فیستین، کامپفرول و کوئرسیتین مشابه آگونیست‌های نسبی ER α مانند جنیستین، دو پیوند هیدروژنی قوی از طریق هیدروکسیل موقعیت ۷ حلقه A و یک هیدروکسیل متصل به فنیل حلقه B (شکل ۲) با اسید آمینه‌های His524 و Glu353 در فواصل مختلف با ایزوفرم ER α تشکیل می‌دهند. البته جنیستین دو پیوند هیدروژنی دیگر از طریق Arg394 در فاصله ۲/۷۲ آنگستروم و Gly521 (مانند کامپفرول) در فاصله ۲/۹۶ آنگستروم با همین دو بخش تشکیل می‌دهد و برهمکنش پایدارتری ایجاد می‌کند. Leu346 پیوند هیدروژنی دیگری با جنیستین در فاصله 2.71 آنگستروم تشکیل می‌دهد. ثابت اتصال جنیستین، $K_i=156/70$ نانومولار، انرژی آزاد اتصال $-9/28$ کیلوکالری بر مول و نیروی الکترواستاتیک برابر با $-0/46$ کیلوکالری بر مول است (جدول ۱). نتایج داکینگ نشان داد که فیستین در یک کنفورماسیون مطلوب، که در ناحیه‌ای با فواصل بیشتر از

Leu384، Arg394، Met421 می‌باشد، واقع شده است، اما این برهمکنش مطلوب باعث فعال‌سازی ER α شده است. اتصال کامپفرول به ER α از طریق اسید آمینه‌های Glu353، Gly521 و His524 باعث القاء تغییرات کنفورماسیونی می‌شود که در نتیجه باعث فعال شدن ER α می‌شود. بر طبق ثابت اتصال کامپفرول ($K_i=3/35$ میکرومولار)، برهم کنش با انرژی آزاد پیوندی $-7/47$ کیلوکالری بر مول و با نیروی الکترواستاتیک برابر با $-0/38$ کیلوکالری بر مول است که نشان دهنده برهم کنش خوب بین پروتئین-لیگاند است (جدول ۱). کنفورماسیون‌های پیوندی پیش‌بینی شده نشان داد که این ترکیب هم دارای پتانسیل فعال‌سازی ارزشمندی می‌باشد. با توجه به نتایج داکینگ، حلقه فنیل و کرومن در این ترکیبات باعث افزایش تماس‌های وان دروالس می‌شود. اگرچه Arg394 یک اسید آمینه اصلی برای اتصال لیگاند به ER α است، اما در سه برهمکنش فیستین، کامپفرول و کوئرسیتین، چنین برهمکنشی مشاهده نشده است. میریستین مشابه این ترکیبات، از طریق همان اکسیژن هیدروکسیل موقعیت 7 حلقه A پیوند هیدروژنی مشابه‌ای با Glu353 تشکیل می‌دهد (شکل ۱)، اما دو پیوند هیدروژنی متفاوت دیگر با اسید آمینه‌های Pro324 و Trp393 و دو اکسیژن هیدروکسیل متصل به فنیل حلقه B بین این دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی، نقش‌های مهمی در تثبیت و پایدارسازی کمپلکس ER α - میریستین ایفا می‌کنند (شکل ۲).

شناسایی جایگاه اتصال ترکیبات فیتواستروژنی مورد مطالعه با گیرنده هورمونی ER β با استفاده از داکینگ مولکولی، شکل ۳ برهمکنش‌های فیتواستروژن‌های مورد بررسی شامل؛ فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین، رسوراترول و جنیستین را در داخل اکتیو سایت ER β نشان می‌دهد. کامپفرول و کوئرسیتین مشابه آگونیست‌های نسبی ER β مانند جنیستین دو پیوند هیدروژنی قوی از طریق اکسیژن هیدروکسیل موقعیت ۷ بخش فلاون حلقه A و هیدروکسیل حلقه B (شکل ۱) با اسیدآمینه‌های Glu305 و His475 از ER β تشکیل می‌دهند. His475 پیوند هیدروژنی دیگری با یکی از دو هیدروکسیل بخش دی هیدروکسی فنیل حلقه B کوئرسیتین تشکیل می‌دهد (جدول ۲).

پیوندهای هیدروژنی مشابه‌ای از طریق جنیستین در موقعیت متناظر از بخش ایزوفلاون حلقه A با اسیدآمینه‌های Glu305 و His475 به ترتیب در فواصل ۲/۸۷ و ۲/۸۹ آنگستروم تشکیل شده است. علاوه بر این، فیستین هم مشابه کامپفرول و کوئرسیتین و آگونیست‌های ER β مانند جنیستین، پیوند هیدروژنی قوی از طریق اکسیژن هیدروکسیل فنیل در موقعیت ۴ (شکل ۱) با اسیدآمینه Glu305 از ER β در فاصله ۲/۶۹ آنگستروم تشکیل می‌دهد. نتایج داکینگ نشان داد که فیستین در یک کنفورماسیون مطلوب، که در ناحیه‌ای کمی متفاوت از Arg346 و His475 واقع شده است، اما همین برهمکنش مطلوب حلقه B با Glu305 باعث فعال‌سازی ER β شده است. بر طبق ثابت اتصال خیلی خوب فیستین ($K_i=614/61$) نانومولار)، برهمکنش با انرژی آزاد اتصال

همان‌طور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، تترامتیل‌استیلین و لیمونن هیچ برهمکنشی با ER α نشان نمی‌دهند، اما باقی مانده‌های اسیدآمینه مشابه‌ای به طور عمده مسئول برهمکنش این ترکیبات هستند. ترانس‌آنتول از طریق بخش متوکسی، یک پیوند هیدروژنی با Leu327 در فاصله ۲/۸۵ آنگستروم تشکیل می‌دهد. هر دو ایزومر رسوراترول مشابه آگونیست‌های فیتواستروژنی ER α ، دو پیوند هیدروژنی قوی از طریق یک اکسیژن هیدروکسیل با اسیدآمینه‌های Glu353 و Arg394 داخل شیار ER α در فواصل مختلف ایجاد می‌کنند. دو پیوند هیدروژنی دیگر از طریق دو اکسیژن هیدروکسیل دیگر هر دو ایزومر رسوراترول با اسیدآمینه‌های Leu327 و Lys449 تشکیل شده است. دیده می‌شود که ۷-۸ باقی مانده اسیدآمینه دیگر به طور عمده مسئول اتصال هیدروفوبیک رسوراترول هستند (شکل ۲ و جدول ۱).

این مطالعه با هدف تعیین میزان انرژی‌های اتصال ترکیبات فیتواستروژنی مورد مطالعه با گیرنده هورمونی ER α با استفاده از داکینگ مولکولی انجام شد. جزییات اتصال ترکیبات و باقی مانده‌های اسیدآمینه درگیر در پیوند هیدروژنی، فواصل اتصال انرژی آزاد اتصال، انرژی الکتروستاتیک و ثابت اتصال به دست آمده از داکینگ مولکولی برای مواد مؤثره گیاهان مورد نظر بر روی گیرنده مرتبط با هورمون جنسی استروژن انسانی ER α در جدول ۱ نشان داده می‌شود. در میان کنفورماسیون‌های مختلف برهم‌کنش‌های بین این ترکیبات و ER α ، کنفورماسیون با بهترین حالت و با کم‌ترین انرژی پیوندی (برحسب کیلوکالری بر مول) انتخاب شد.

۸/۴۷- کیلوکالری بر مول و با نیروی الکترواستاتیک برابر با ۰/۴۹- کیلوکالری بر مول بود (جدول ۲) که نشان دهنده برهم کنش خوب بین پروتئین - لیگاند است. با توجه به نتایج داکینگ، حلقه فنیل و کرومن این ترکیبات باعث افزایش تماس‌های وان دروالس می‌شود. علاوه بر اسیدآمینه‌های ذکر شده، فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین برهمکنش‌های وان دروالس را با اسیدآمینه‌هایی از ER β تشکیل دادند که به طور کلی مسئول اصلی برهمکنش‌های آب‌گریز بین مولکولی هستند (شکل ۳). اگرچه Arg346, Glu305 و His475 سه اسید آمینه اصلی برای اتصال آگونیست‌های نسبی به ER β است، اما در مورد فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین، برهمکنش با Arg346 مشاهده نشده است.

شکل ۳ - برهمکنش شماتیک بهترین کنفورماسیون فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین، رسوراترول و جنیستین حاصل از نرم‌افزار اتوداک ارائه شده توسط نرم افزار لیگ پلات (LigPlot) برای رسپتورهای ER β . در این شکل، ترکیب لیگاند با رنگ آبی نشان داده شده است. پیوند هیدروژنی به رنگ سبز و برهمکنش‌های وان دروالس با دایره‌های قرمز نشان داده شده‌اند.

یک پیوند هیدروژنی مشابه از طریق اسیدآمینه Arg346 با میریستین و دو ایزومر رسوراترول در فواصل مختلف به طور مشابه با جنیستین، تشکیل شده است (جدول ۲). اتصال میریستین به ER β ، باعث القاء تغییرات کنفورماسیونی می‌شود که در نتیجه ممکن است باعث فعال شدن ER β شود (شکل ۳). از آن جایی که میریستین مانند آگونیست‌های ER β ، چهار پیوند هیدروژنی با هیدروکسی کرومن و

اکسیژن‌های هیدروکسیل از هر سه حلقه و اسیدآمینه‌های Arg346 و Gly342, His279, Pro278 رسپتور ER β در فواصل مناسب تشکیل می‌دهند (جدول ۲).

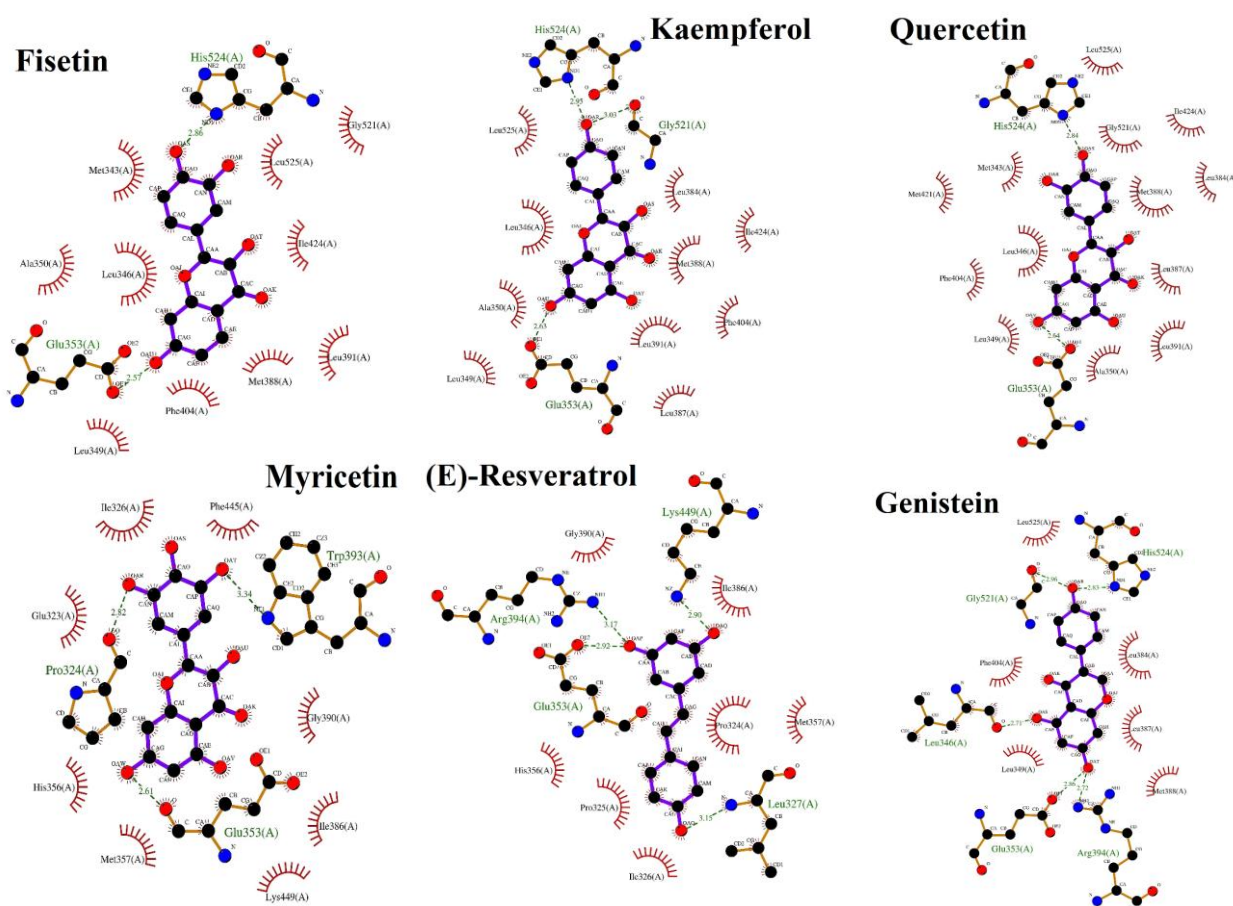
همان طور که در شکل ۳ قابل مشاهده است، دو پیوند هیدروژنی دیگر بین اسید آمینه‌های Leu298 و Arg346 و دو اکسیژن هیدروکسیل بخش ایزوفالون جنیستین به عنوان دهنده‌ها و پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی، نقش‌های مهمی در تثبیت و پایدارسازی کمپلکس ER β - جنیستین ایفا می‌کنند. همان‌طوری که در جدول ۲ نشان داده شده است، به طور مشابه دو ایزومر رسوراترول، پیوندهای هیدروژنی مشابهی از طریق اسیدآمینه‌های Leu298 و Arg346 تشکیل داده‌اند (شکل ۳). ثابت اتصال جنیستین، $K_i=102/44$ نانومولار و انرژی آزاد پیوندی ۹/۳۰- کیلوکالری بر مول است. نیروی الکترواستاتیک برابر با ۰/۴۵- کیلوکالری بر مول است (جدول ۲).

تترامتیل‌استیلین، ترانس - آنتول و لیمونن هیچ برهمکنش هیدروژنی با ER β نشان نمی‌دهند (جدول ۲). قابل ذکر است که چندین اسیدآمینه مهم از ER β ، به طور عمده مسئول اصلی برهمکنش‌های آب‌گریز بین مولکولی هستند. سه پیوند هیدروژنی از طریق دو اکسیژن هیدروکسیل هر دو ایزومر رسوراترول با اسیدآمینه‌های Leu298, Leu339 و Arg346 داخل شیار ER β در فواصل مختلف ایجاد می‌شود، دیده می‌شود که باقی مانده‌های اسیدآمینه Met295, Thr299, Leu301, Glu305, Met336, Met340 و Phe356 به طور عمده مسئول اتصال هیدروفوبیک این دو ایزومر هستند که اسیدآمینه‌های Leu298, Leu339 و Arg346 علاوه بر

داکینگ مولکولی برای مواد مؤثره گیاهان مورد نظر بر روی گیرنده مرتبط با هورمون جنسی استروژن انسانی ER β در جدول ۲ نشان داده می‌شود. در میان کنفورماسیون‌های مختلف برهم کنش‌های بین این ترکیبات و ER β ، کنفورماسیون با بهترین حالت و با کم‌ترین انرژی پیوندی (برحسب کیلوکالری بر مول) انتخاب شد.

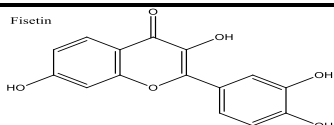
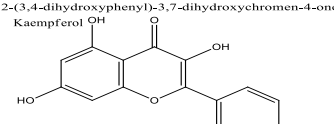
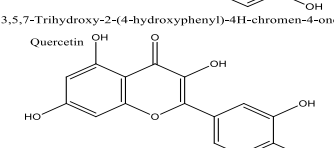
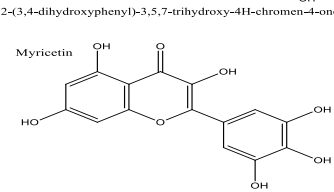
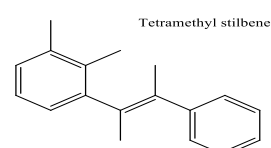
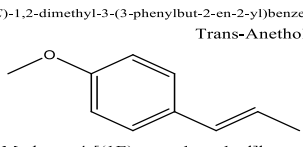
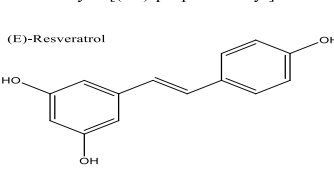
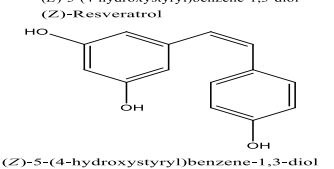
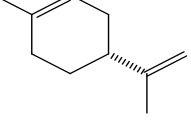
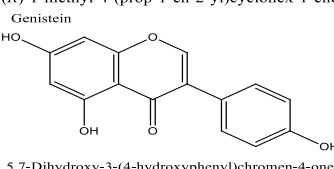
پیوند هیدروژنی از این طریق هم برهمکنش دارند (شکل ۳).

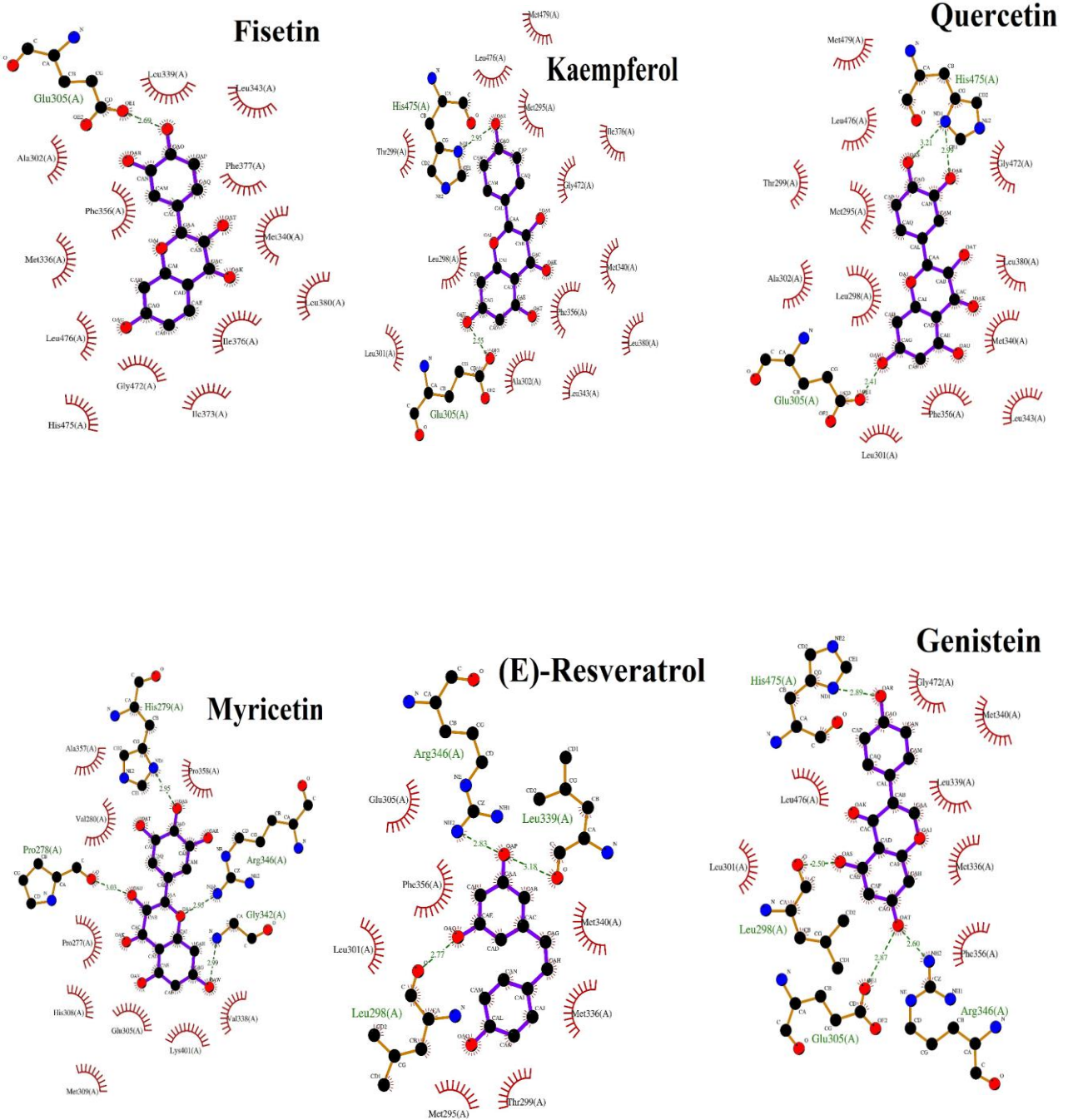
تعیین میزان انرژی‌های اتصال ترکیبات فیتواستروژنی گل راعی و شوید با گیرنده هورمونی ER β با استفاده از داکینگ مولکولی، جزییات اتصال ترکیبات و باقی مانده‌های اسید آمینه درگیر در پیوند هیدروژنی، فواصل اتصال، انرژی آزاد اتصال، انرژی الکتروستاتیک و ثابت اتصال به دست آمده از



شکل ۲: برهمکنش شماتیک بهترین کنفورماسیون فیسیتین، کامپفرول، کوئرستین، میریستین، رسوراترول و جنیستین حاصل از نرم افزار اتوداک ارایه شده به وسیله نرم افزار لیگ پلات برای رسپتور استروژنی آلفا (ER α) در این شکل، ترکیب لیگاند با رنگ آبی نشان داده شده است. پیوند هیدروژنی به رنگ سبز و برهمکنش‌های وان دروالس با دایره‌های قرمز نشان داده شده‌اند.

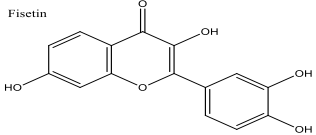
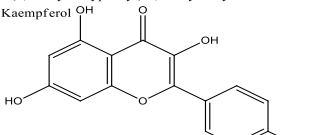
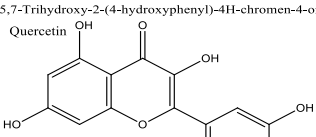
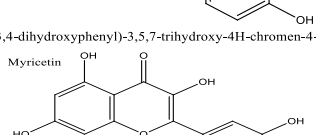
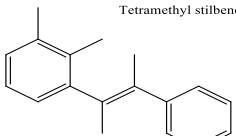
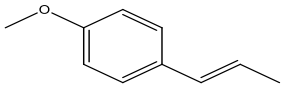
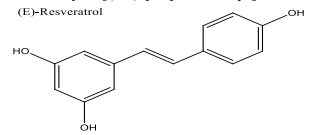
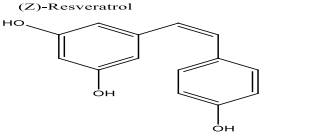
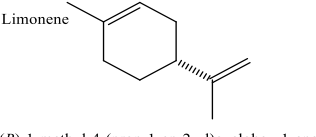
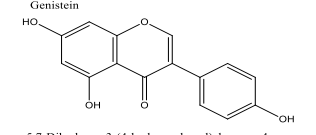
جدول ۱: جزئیات برهمکنش‌های بر اساس انرژی از ترکیبات فیتواستروژنی مورد مطالعه با گیرنده هورمونی ER α

لیگاند	انرژی آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول)	انرژی الکترواستاتیک (کیلوکالری بر مول)	ثابت مهار (K _i)	جزئیات برهمکنش‌ها		فاصله (Å)	
				لیگاند	رستپور		
 Fisetin	-۷/۴۴	-۰/۲۶	۳/۰۳ μ M	OAU	Glu353	OE1	۲/۰۷
				OAS	His524	ND1	۲/۸۶
 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-one Kaempferol	-۷/۴۷	-۰/۳۸	۳/۳۰ μ M	OAU	Glu353	OE1	۲/۶۳
				OAR	Gly521	O	۳/۰۳
				OAR	His524	ND1	۲/۹۰
 3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one Quercetin	-۷/۲۶	-۰/۳۷	۴/۷۷ μ M	OAV	Glu353	OE1	۲/۶۴
				OAS	His524	ND1	۲/۸۴
 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one Myricetin	-۶/۳۹	-۰/۳۸	۲۰/۶۸ μ M	OAR	Pro324	O	۲/۸۲
				OAW	Glu353	O	۲/۶۱
				OAT	Trp393	NE1	۳/۳۴
 Tetramethyl stilbene	-۸/۲۰	-۰/۰۰	۸۹۴/۸۲ nM	-	-	-	-
 (E)-1,2-dimethyl-3-(3-phenylbut-2-en-2-yl)benzene Trans-Anethole	-۰/۰۰	-۰/۰۹	۸۰/۹۳ μ M	OAJ	Leu327	N	۲/۸۰
 (E)-Resveratrol	-۷/۹۹	-۰/۴۱	۱/۳۹ μ M	OAO	Leu327	N	۳/۱۰
OAP				Glu353	OE2	۲/۹۲	
OAP				Arg394	NH1	۳/۱۷	
OAQ				Lys449	NZ	۲/۹۰	
 (E)-5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol (Z)-Resveratrol	-۷/۹۳	-۰/۴۴	۱/۰۳ μ M	OAO	Leu327	N	۳/۱۴
OAO				Glu353	OE2	۲/۸۸	
OAO				Arg394	NH1	۳/۳۰	
OAP				Lys449	NZ	۲/۸۸	
 (Z)-5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol Limonene	-۰/۷۰	+۰/۰۰	۶۱/۱۶ μ M	-	-	-	-
 (R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-ene Genistein	-۹/۲۸	-۰/۴۶	۱۰۶/۷۰ nM	OAS	Leu346	O	۲/۷۱
OAT				Glu353	OE1	۲/۸۶	
OAT				Arg394	NH2	۲/۷۲	
OAR				Gly521	O	۲/۹۶	
OAR				His524	ND1	۲/۸۳	



شکل ۳: برهمکنش شماتیک بهترین کنفورماسیون فیسیتین، کامپرفول، کوئرسیتین، میریسیتین، رسوراترول و جنیستین حاصل از نرم افزار اتوداک ارایه شده به وسیله نرم افزار لیگ پلات برای رسپتور استروژنی بتا (ERβ). در این شکل، ترکیب لیگاند با رنگ آبی نشان داده شده است. پیوند هیدروژنی به رنگ سبز و برهمکنش‌های وان دروالس با دایره‌های قرمز نشان داده شده‌اند.

جدول ۲: جزئیات برهمکنش‌های بر اساس انرژی از ترکیبات فیتواستروژنی مورد مطالعه با گیرنده هورمونی ERβ

لیگاند	انرژی آزاد اتصال (کلوکالی بر مول)	انرژی الکترواستاتیک (کلوکالی بر مول)	ثابت مهار (K _i)	جزئیات برهمکنش‌ها		فاصله (Å)
				لیگاند	رستپور	
Fisetin 	-۸/۴۷	-۰/۴۹	۶۱۴/۶۱ nM	OAS	Glu305	OE1 ۲/۶۹
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-one Kaempferol 	-۷/۷۹	-۰/۳۲	۱/۹۰ μM	OAU OAR	Glu305 His475	OE1 ۲/۵۵ ND1 ۲/۹۵
3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one Quercetin 	-۷/۹۹	-۰/۳۰	۱/۳۸ μM	OAV OAR OAS	Glu305 His475 His475	OE1 ۲/۴۱ ND1 ۲/۹۹ ND1 ۳/۲۱
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one Myricetin 	-۷/۴۷	-۰/۱۸	۲/۳۶ μM	OAU OAS OAW OAJ	Pro278 His279 Gly342 Arg346	O ۳/۰۳ ND1 ۲/۹۵ N ۲/۹۹ NH1 ۲/۹۵
3,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4-chromenone Tetramethyl stilbene 	-۸/۲۸	+۰/۰۰	۸۵۴/۸۳ nM	-	-	-
(E)-1,2-dimethyl-3-(3-phenylbut-2-en-2-yl)benzene Trans-Anethole 	-۵/۲۹	-۰/۱۳	۱۳۱/۶۲ μM	-	-	-
1-Methoxy-4-[(1E)-prop-1-en-1-yl]benzene (E)-Resveratrol 	-۷/۳۳	-۰/۳۷	۴/۲۱ μM	OAQ OAP OAP	Leu298 Leu339 Arg346	O ۲/۷۷ O ۳/۱۸ NH2 ۲/۸۳
(E)-5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol (Z)-Resveratrol 	-۷/۳۲	-۰/۳۸	۴/۳۳ μM	OAP OAQ OAQ	Leu298 Leu339 Arg346	O ۲/۸۵ O ۳/۲۵ NH2 ۲/۷۶
(Z)-5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol Limonene 	-۵/۶۳	+۰/۰۲	۷۵/۲۰ μM	-	-	-
(R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-ene Genistein 	-۹/۳۰	-۰/۴۵	۱۵۲/۴۴ nM	OAS OAT OAT OAR	Leu298 Glu305 Arg346 His475	O ۲/۵۰ OE1 ۲/۸۷ NH2 ۲/۶۰ ND1 ۲/۸۹
5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one						

بحث

استروژن‌ها نقشی اساسی در رشد، توسعه و نگهداری طیف متنوعی از بافت‌ها دارند. پاسخ‌های فیزیولوژیکی به هورمون استروژن در بافت‌های ویژه به واسطه حداقل دو ایزوفرم $ER\alpha$ و $ER\beta$ در بافت‌های خاص می‌باشد. اثر گل راعی و دانه شوید به طور جداگانه بر اختلالات مرتبط با سطح هورمون‌های جنسی بررسی شده است و پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این گیاهان در درمان برخی از اختلالات سیستم تولید مثلی مؤثر بوده‌اند (۲۸-۳۱)، لذا به علت وجود ترکیبات فیتواستروژنی در این گیاهان، هدف از این پژوهش تعیین و مقایسه برهمکنش مولکولی ترکیبات فیتواستروژنی گل راعی و شوید با دو ایزوفرم رسپتور استروژنی با استفاده از داکینگ مولکولی بود. در این پروژه برهمکنش پیوندی و تمایل‌های اتصال فیتواستروژن‌های فیسستین، کامپفرول، کوئرسستین، میریسستین، تترامتیل‌استیلین، ترانس-آنتول، لیمونن، رسوراترول و جنیستین بر روی پروتئین‌های هورمونی استروژن انسانی از طریق داکینگ مولکولی تجزیه و تحلیل شد. داکینگ مولکولی یک روش مفید برای بررسی ارتباط لیگاندها با یک پروتئین هدف است و قبلاً برای شفاف‌سازی جزئیات خاصیت اتصال ER ها استفاده شده است (۴۱ و ۵). اتصال یک لیگاند به ER اولین عامل تعیین کننده برای پتانسیل آن برای عملکرد به عنوان یک آگونیست یا آنتاگونیست ER است (۴۲). پژوهش‌های کامپیوتری مربوط به بررسی رنگینگ

تمایل‌های اتصال به طور بالقوه نشان داد که کوئرسستین، فیسستین، کامپفرول و میریسستین و دو ایزومر رسوراترول بالاترین تمایل اتصال را به $ER\alpha$ و $ER\beta$ نسبت به تترامتیل‌استیلین، ترانس-آنتول و لیمونن دارند و کوئرسستین، فیسستین، کامپفرول و میریسستین یک ارجحیت مشخص^(۱) به $ER\beta$ نشان دادند. دو ایزومر رسوراترول تمایل کمتری به $ER\beta$ نسبت به $ER\alpha$ نشان دادند که سازگار با یافته‌های دیگران است (۴۲).

از نظر شیمیایی، فلاونوئیدها ساختار کلی اسکلت ۱۵ کربنی دارند که از دو حلقه فنیل (A و B) و یک حلقه هتروسیکل (C) تشکیل شده است. در حالی که فلاونوئیدها، بک بن^(۲) یا هسته‌ی اصلی ۲- فنیل کرومن-۴-اون^(۳) دارند، ایزوفلاونوئیدها دسته‌ای از ترکیبات فنلی فلاونوئید هستند و هسته اصلی آنها ۳- فنیل کرومن-۴-اون بدون گروه استخلافی هیدروکسیل در موقعیت ۲ است که بسیاری از آنها از نظر بیولوژیکی فعال هستند. ایزوفلاونوئیدها و مشتقات آنها گاهی اوقات به عنوان فیتواستروژن نامیده می‌شوند، زیرا بسیاری از ترکیبات ایزوفلاونوئید از طریق ER اثرات بیولوژیکی دارند. همان‌طور که در بالا ذکر شد، چندین ترکیب طبیعی فعالیت استروژنی جالبی را نشان داده‌اند که اکثر آنها متعلق به خانواده ایزوفلاون‌ها از فلاونوئیدها هستند. نماینده آنها، جنیستین می‌باشد که اثرات ضد تکثیر

1-Distinct preference
2- Backbone
3-Phenylchromen-4-one

را روی سلول‌های سرطانی حساس به هورمون از جمله سلول‌های پستان، تخمدان و پروستات نشان داده است (۴۳ و ۵). جنیستین در سطح قابل توجهی در دانه‌های سویا و محصولات سویا یافت می‌شود، به هر دو ایزوفرم ER با میل متوسط متصل می‌شود، اما ER β را ترجیح می‌دهد که در توافق با نتایج مطالعه حاضر است. فیستین، یک گیاه فلاونول از گروه پلی‌فنول‌های فلاونوئید است. میریستین از نظر ساختاری شبیه به فیستین، کامپفرول و کوئرستین است و گزارش شده است که عملکردهای مشابه سایر اعضای گروه فلاونول از فلاونوئیدها را دارد (۴۴).

ساختار ایزوفلاون جنیستین شباهت زیادی به ۱۷ β -استرادیول و مواد مؤثره فیتواستروژنی فلاونی گیاهان مورد مطالعه حاضر دارد و این می‌تواند توانایی آن‌ها را در اتصال به ERs در همان اکتیوسایت (جایگاه فعال) توضیح دهد. در این مطالعه ثابت شد که انرژی برهم کنش بین جنیستین و ER β کمی کمتر از ER α است. این نشان می‌دهد که جنیستین می‌تواند با هر دو گیرنده ارتباط برقرار کند، اما در مورد ER β نسبتاً آسان‌تر است و این نوع پیوند با ER β پیوند پایدارتری را در مقایسه با ER α نشان می‌دهد. این یافته در توافق با گزارش‌های قبلی بیان می‌کند که به دلیل وجود این اتصالات ساختاری، جنیستین می‌تواند به هر دو ایزوفرم ER متصل شود و متعاقباً باعث تحریک استروژن شود (۴۵ و ۴۲، ۱۲). پژوهش‌های داکینگ مولکولی مطالعه حاضر، همچنین اثر متقابل مواد مؤثره گیاهان مورد نظر را در مقایسه

با جنیستین در برابر ER α و ER β ثابت کرد. انرژی برهمکنش و نوع پیوندهای تشکیل شده نشان می‌دهد که فیستین و کامپفرول، سطح تمایل بیشتری نسبت به کوئرستین و میریستین برای ER α دارد، اما کوئرستین و فیستین مانند جنیستین سطح تمایل بیشتری نسبت به کامپفرول و میریستین برای ER β دارد که نشان دهنده برهم کنش خوب بین پروتئین-لیگاند است (۴۶). پیوندهای هیدروژنی در مقایسه با پیوند هیدروفوبیک قوی‌تر است. پیوندهای هیدروژنی به عنوان پایدار کننده‌های برهمکنش لیگاند-پروتئین محسوب می‌شوند (۴۶). هرچه پیوندهای تشکیل شده بین دو مولکول قوی‌تر باشد، پایداری برهمکنش‌ها بیشتر است (۱۲). از این رو، در صورت مقایسه تمایل به تشکیل پیوند هیدروژنی بین کوئرستین و فیستین و ER β ، گمان می‌رود که ترکیبات فیتواستروژنی گیاهان مورد مطالعه دارای کوئرستین نسبت به فیستین تمایل بیشتری به ER β دارد. برهمکنش پایدارتر اغلب ترکیبات فیتواستروژنی گیاهان مورد بررسی با ER β در مقایسه با ER α ممکن است بدین علت باشد که ER β عمدتاً در سلول‌های گرانولوزای تخمدان بیان شده است (۴۷ و ۶، ۵، ۱) و فیتواستروژن‌ها هم دارای قابلیت‌های تنظیمی در سلول‌های گرانولوزا هستند (۴۷)، بنابراین، به نظر می‌رسد که فیتواستروژن‌ها، ممکن است بیشتر به واسطه تمایل بیشتر به ایزوفرم ER β نسبت به ER α ، دارای قابلیت تنظیمی در سلول‌های گرانولوزا هستند و در نهایت باعث ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژیکی به هورمون

ساختار کلی ER β -LBD بسیار شبیه به همان چیزی است که قبلاً برای ER α و دیگر NRها گزارش شده است (۵۰ و ۴۹، ۸). هسته موتیف ساندویچ کانونیکال NR-LBD (H2-H11) تنها با تفاوت‌های جزئی در طول و جهت گیری مارپیچ‌ها حفظ می‌شود. یک لایه مرکزی از مارپیچ‌های کاملاً بسته بندی شده، متشکل از H5، H6، H9 و H10، از یک طرف به وسیله H7، H8 و H11 و از طرف دیگر به وسیله H2-H4 قرار دارد (۱۳). یک حفره مهم اتصال به هورمون مستقیماً زیر H6 قرار دارد و بین لایه‌های کناری خارجی قرار دارد. موقعیت اتخاذ شده به وسیله H12، در دو کمپلکس با آگونیست و آنتاگونیست بسیار متفاوت است (۸).

قرار دادن Val487 در ورودی حفره، H12 را وادار می‌کند تا در مقایسه با آنچه در کمپلکس آنتاگونیست رالوکسیفن-ER β مشاهده می‌شود، جهت‌گیری متفاوتی را در امتداد شیار آبگریز اتخاذ کند. بین دو کمپلکس آگونیست و یا آنتاگونیست ۲۵ درجه اختلاف در جهت مارپیچ وجود دارد (۸). هر لیگاند با یک مجموعه منحصر به فرد از اسید آمینه‌ها در حفره اتصال هورمون برهمکنش برقرار می‌کند و جهت‌گیری متمایزی را در مارپیچ (H12) AF-2 القاء می‌کند. به نظر می‌رسد که تعیین کننده اصلی موقعیت

استروژنی می‌شوند. همان‌طور که قبلاً بیان شده است، فیتواستروژن‌ها ممکن است با عمل به عنوان آگونیست یا آنتاگونیست ER، فرآیندهای وابسته به غدد درون ریز را مختل کنند، زیرا ساختار دو فنولی آنها برای ارتباط گیرنده — لیگاند لازم است (۴۷) و چندین فیتواستروژن تعدیل کننده ERS انتخابی هستند و تمایل بیشتری به ER β نسبت به ER α دارند (۴۸).

آنالیزهای کریستالوگرافی قبلی تعدادی از NR-LBD^(۱)های با لیگاند و بدون لیگاند، یک فولد کانونیکال^(۲) برای NR-LBD نشان داده است (۸). یازده مارپیچ بزرگ با هم در یک توپولوژی ساندویچ سه لایه آنتی پارالل^(۳) قرار گرفته‌اند. در هر حالت، هورمون وابسته به گیرنده در یک حفره آبگریز مدفون در هسته متصل می‌شود. اتصال آگونیست باعث القاء یک بازآرایی کنفورماسیونی در LBD می‌شود (۴۹) که در نتیجه باعث تشکیل یک جایگاه اتصال ویژه برای بخش مارپیچ NR-box کوآکتیواتورهای هسته‌ای^(۴) می‌شود. در مورد آنتاگونیست‌های متصل به ER، مانند رالوکسیفن، از لحاظ استریکی از اسمبل صحیح ناحیه AF-2 و شکاف اتصال NR-box جلوگیری می‌کنند (۵۰ و ۸). لازم به ذکر است فعال شدن رونویسی وابسته به لیگاند به وسیله NRS به واسطه کوآکتیواتورهای هسته‌ای صورت می‌گیرد.

آگونیست‌های گیرنده باعث اتصال کوآکتیواتورهای هسته‌ای می‌شوند و آنتاگونیست‌ها اتصال کوآکتیواتور را مسدود می‌کنند (۵۰).

1-Nuclear Receptor- Ligand-binding Domain (NR-LBD)
2-Canonical Fold
3- Antiparallel
4-Nuclear Coactivators
5- Diethylstilbestrol (DES)

H12، دفن بخش آبگریز آن در برابر پروتئین و در نتیجه، گیرانداختن لیگاند در حفره اتصال باشد. موقعیت H12 در حضور آگونیست کامل، مانند 17 β - استرادیول (E2) و دی اتیل استیل بسترول (DES)^(۵) و آنچه در کمپلکس ER β - جنیستئین دیده می‌شود، هر دو این هدف را برآورده می‌کنند (۵۰). زنجیره جانبی حجیم آنتاگونیست رالوکسیفن از حفره بیرون زده و از نظر فیزیکی از تراز H12 بر روی لیگاند متصل شده جلوگیری می‌کند (۵۰). در مقابل، جنیستئین به طور کامل در هسته آبگریز پروتئین دفن شده و به روشی مشابه آنچه برای هورمون اندروژن ER، 17 β - استرادیول مشاهده شده متصل می‌شود. با این حال، در کمپلکس ER β - جنیستئین، H12 موقعیت متمایزی برای آگونیست اتخاذ نمی‌کند، اما در عوض، در یک جهت‌گیری مشابه به وسیله آنتاگونیست‌های ER القاء می‌شود. چنین ترازبندی زیر بهینه^(۱) از مارپیچ ترانس اکتیواسیون^(۲) با ویژگی آگونیست نسبی جنیستئین در ER β سازگار است و نشان می‌دهد که چگونه پاسخ رونویسی ER به برخی از لیگاندهای متصل شده تغییر می‌یابد (۱۴ و ۸).

گزارش شده است که کوئرستین با فعال کردن ERs، فعالیت‌های استروژنی (مانند هورمون جنسی زنانه) دارد. کوئرستین به ترتیب ER α و ER β را با مقادیر IC₅₀ اتصال ۱۰۱۵ نانومولار و ۱۱۳ نانومولار فعال می‌کند (۵۱). از این رو کوئرستین تا حدودی انتخابی ER β است (۹ برابر)، که از لحاظ انتخابی بودن

و تمایل بیشتر برای ER β ، سازگار با مطالعه حاضر است. کوئرستین تقریباً دو تا سه مرتبه از هورمون استروژنی درون‌زا 17 β - استرادیول توانایی اتصال کمتر دارد (۵۲)، فیتواستروژن‌ها می‌توانند به طور ضعیف‌تری به ERs متصل شوند، که معمولاً تمایل اتصال ۱۰۰۰ برابر کمتر از 17 β - استرادیول می‌باشد (۴۷). علاوه بر این، برهمکنش بالقوه مشاهده شده از کوئرستین در مطالعه حاضر در راستای نتایج تجربی می‌باشد. در رده‌های سلولی سرطان پستان انسان نیز مشخص شده است که کوئرستین به عنوان آگونیست ER جفت شده با G پروتئین (GPCR)^(۳) عمل می‌کند (۵۳). هم‌چنین گزارش شده است که فیتواستروژن‌های طبیعی و چندین آنالوگ اصلاح شده دارای قدرت انتخاب ۴۰ برابر برای گیرنده ER β هستند (۱۵).

عملکرد کربن‌های ۷ روی حلقه A و ۴ روی حلقه B کوئرستین تا حدودی از نظر ساختار و عملکرد مشابه گروه‌های OH روی فیستئین، کامپفرول و میریسیتین است. گروه‌های OH فنولی حلقه B و اکسیژن هیدروکسیل موقعیت ۷ حلقه A یک تماس مهم با ER α و ER β مشابه آگونیست‌های نسبی ER β جنیستئین ایجاد می‌کنند. به طور مثال هیدروکسیل موقعیت ۷ حلقه A در کامپفرول و کوئرستین به ترتیب Glu353 و Glu305 از ER α و ER β و هیدروکسیل موقعیت ۴ حلقه B در کوئرستین به His524 و His547

1-Sub-Optimal Alignment
2-Transactivation Helix
3-G protein-Coupled Estrogen Receptor(GPCR)

و پیوندهای قوی با لیگاند طبیعی برقرار می‌کند (۳۴) و ۱۵، ۸، ۵). علاوه بر این، اسیدآمینه‌های کلیدی Glu305، Arg346 و His475 از ER β برهم کنش‌ها و پیوندهای قوی با آگونیست نسبی جنیستین برقرار می‌کند (۸). همان طور که در نتایج نشان داده شده است، ترکیبات مورد بررسی با اسیدآمینه‌های زیادی برهمکنش‌های هیدروفوب و هیدروژنی تشکیل می‌دهد که در توافق با پژوهش‌های گذشته می‌باشد (۳۴ و ۱۶، ۱۵، ۱۳، ۵).

بنابراین، این مطالعه یافته‌های قبلی را تأیید می‌کند که برهمکنش‌های ترکیبات فیتواستروژنی مورد بررسی با دو ایزوفرم ER شامل برهمکنش با اسیدآمینه‌های Glu353 (۵۰ و ۴۱، ۳۴، ۱۵، ۸)، Arg394 (۳۴ و ۱۵، ۱۳، ۸) و His524 (۵۰ و ۴۱، ۱۵، ۸، ۵) از ER α و اسیدآمینه‌های Glu305 (۳۴ و ۱۵، ۸)، Arg346 (۱۵) و His475 (۴۱ و ۱۵، ۱۲، ۸، ۱) از ایزوفرم ER β است، اما برای ترکیبات مورد مطالعه هیچ برهمکنشی با اسیدآمینه Asp303 که پیوند هیدروژنی با آنتاگونیست رالوکسیفن تشکیل می‌دهد، مشاهده نشده است. Glu305 از ER β (Glu353 از ER α) و Arg346 از ER β (Arg394 از ER α) و His475 از ER β (His524 از ER α) درگیر در شبکه پیوند هیدروژنی با آگونیست کامل E2 می‌باشند (۳۴ و ۱۶، ۱۳، ۸)، ترکیبات مورد مطالعه با این اسیدآمینه‌ها پیوند هیدروژنی داشته‌اند، اما هر ترکیب به طور کامل با هر سه اسیدآمینه کلیدی به صورت یک شبکه برهمکنش هیدروژنی نداشته است، ولی برهمکنش هیدروفوبیک داشته‌اند که برای فعالیت آگونیست نسبی بودن و نه آگونیست کامل

از ER β و ER α متصل می‌شود و فیستین با تمایل اتصال زیاد در این موقعیت فقط به Glu305 متصل می‌شود، با این حال، ساختار کمپلکس ER β فیستین نشان می‌دهد که برهمکنش‌های نمایش داده شده به وسیله فیستین هم مشابه یافته‌های دیگران است (۳۴)، اما نحوه اتصال میریستین و دو ایزومر رسوراترول کمی متفاوت است و از اسیدآمینه‌های کلیدی به Arg346 از ER β متصل می‌شوند و اکسیژن دو ایزومر رسوراترول به اسیدآمینه‌های Glu353 و Arg394 در ER α متصل می‌شود و میریستین از اسیدآمینه‌های کلیدی فقط به Glu353 از ER α متصل می‌شود، با این حال، ساختار کمپلکس ER α میریستین نشان می‌دهد که برهمکنش‌های نمایش داده شده به وسیله میریستین مشابه یافته‌های دیگران است (۸). برهمکنش‌های تترامتیل‌استیلبن، ترانس-آنتول و لیمونن در مطالعه حاضر در ناحیه‌ای متفاوت از ساختارهای مشابه؛ میریستین، فیستین، کامپرفول، کوئرستین و رسوراترول است. فیتواستروژن‌های غذایی حاوی گروه‌های هیدروکسیل، فعالیت استروژنی ضعیفی را نسبت به آگونیست اندوژن 17 β - استرادیول نشان داده‌اند (۴۷).

لازم به ذکر است Glu353، Leu384، Arg394، Met421 و His524 از ER α برای اتصال آگونیست‌ها ضروری هستند (۳۴ و ۵). آمینواسیدهای Glu353 و His524 از ER α بقایای متداولی هستند که با آگونیست‌های ER α واکنش می‌دهند و علاوه بر آن آمینواسیدهای Leu384، Arg394 و Met421 برهم کنش‌ها

می‌تواند مناسب باشد. از آن جایی که در داکینگ مولکولی، ترکیبات دارای آزادی کنفورماسیونی متفاوتی در اتصال به گیرنده هستند، برخی از جهت‌های آلترناتیو نامناسب برای اتصال این ترکیبات به ERs با انرژی کمی پایین‌تر ممکن است، اما با انتخاب گرید باکس بهینه در این مطالعه، امکان رسیدن به کنفورماسیون مطلوب فراهم شده است.

جنیستین و فلاون‌های مشابه میریستین، فیستین، کامپفرول، کوئرستین و هر دو ایزومر رسوراترول به شکلی از میان حفره بین H3 و H11 متصل می‌شود که یادآوری آن برای E2 است (۸). بخش قطبی فیستین، کامپفرول، کوئرستین و رسوراترول موقعیتی مشابه E2 را اشغال می‌کند و جهت‌گیری آن به گونه‌ای است که فیستین، کامپفرول، کوئرستین علاوه بر Glu305 با His475 (به جز فیستین) پیوند هیدروژنی دیگری در انتهای دیستال حفره ایجاد می‌کند که یافته‌های قبلی را برای His475 پشتیبانی می‌کند (۴۵ و ۵). این برهمکنش‌ها، موقعیت تقریباً مشابه‌ای را در داخل حفره مانند مطالعه قبلی اشغال می‌کند (۸). پتانسیل پیوند هیدروژنی دیگر بخش‌های قطبی دو ایزومر رسوراترول با برهمکنش هیدروژنی با پروتئین از طریق Glu305 رضایت‌بخش نیست (پیوند هیدروژنی نمی‌دهد)، اما از طریق Arg346, Leu339 و Leu298 می‌تواند برهمکنش مطلوبی را ایجاد کند. در پژوهش‌های قبلی رسوراترول به عنوان یک آگونیست بر آنتاگونیست مخلوط ER α و ER β شناسایی شده است (۵۴ و ۴۲، ۱۴). در غلظت‌های کم، فعالیت ER α و

ER β را افزایش می‌دهد و در غلظت‌های زیاد، فعالیت آنها را مهار می‌کند (۴۲). در فقدان E2، به عنوان یک آگونیست/آنتاگونیست مخلوط در برخی از رده‌های سلولی سرطانی و به عنوان ضداستروژن در حضور E2 عمل می‌کند (۵۴). این مطالعه از یافته‌های قبلی پشتیبانی می‌کند که فعل و انفعالات این ترکیبات شبیه به جنیستین - ER β است (۱۵ و ۸). شباهت‌های ساختاری بین جنیستین و استرادیول هم‌چنین می‌تواند نقش بالقوه جنیستین را در درمان علائم یائسگی مانند کاهش واژنیت توده استخوان و گرگرفتگی روشن کند (۴۵).

همسو بودن نتایج مطالعه حاضر با نتایج پژوهش‌های بیوشیمیایی مرتبط با هورمون استروژن، مؤثر بودن گیاه گل راعی را بر سندرم پیش از قاعدگی (۳۱) و مؤثر بودن گیاه شوید را بر هورمون‌های جنسی و دیسمنوره به عنوان قاعده‌آور (۳۲ و ۲۸-۳۰)، پشتیبانی می‌کند. هم‌سو با نتایج حاضر، داده‌های دیگر نشان داد که افزایش سطح هورمون استروژن (دوز بالا) و پروژسترون در گروه تیمار با عصاره آبی دانه شوید، نیز مؤید تغییرات مذکور می‌باشد. اثر عصاره آبی و الکلی دانه شوید بر هورمون‌های استروئیدی و بررسی فراساختاری ارگانل‌های سلول‌های گرانولوزای جسم زرد در پژوهش‌های گذشته (۳۲ و ۲۹، ۲۸) با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد. دانه شوید از طریق افزایش مدت زمان سیکل سلولی استروس و

ارزشمندی داشت، به نظر می‌رسد که منابع گیاهی دارای ترکیبات فیتواستروژنی فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین و رسوراترول، کاندیدهای خوبی برای ارزیابی بیشتری به عنوان جایگزین هورمونی باشند که نیاز به پژوهش‌های بیشتری برای ارزیابی فعالیت آگونیستیک ترکیبات فیتواستروژنی مورد نظر برای ERS می‌باشد.

محدودیت اصلی داکینگ مولکولی عدم اطمینان در توانایی نمره گذاری توابع برای ایجاد انرژی اتصال صحیح است. یکی از چالش‌های عمده دیگر وجود گیرنده سفت و سخت می‌باشد، طیف فعالیت در برابر پروتئین‌های خارج از هدف چیزی است که حتی در صفحه‌های محاسباتی به ندرت دیده می‌شود و فقط توسط آزمایشات انسانی و حیوانی مورد بررسی قرار می‌گیرد. بنابراین، پژوهش‌های بیشتری به منظور ارزیابی فعالیت آگونیستیک این ترکیبات برای ERS پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

با بررسی انرژی اتصال و کنفورماسیون‌های مختلف ترکیبات فیتواستروژنی مورد بررسی در دو ایزوفرم ERS، ترکیبات فیستین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریستین و رسوراترول به عنوان بهترین لیگاندهای بالقوه انتخاب شدند. فیتواستروژن‌های مورد مطالعه نسبت به 17β -استرادیول و جنیستین به طور ضعیف‌تری به ERS متصل شدند. اما، نتایج داکینگ مولکولی، تأیید می‌کند که این ترکیبات از نظر استریکی

فاز دای استروس و غلظت استروژن و پروژستروژن در رت باعث القاء تخمک گذاری شده است (۲۹).

ترکیبات مورد مطالعه می‌توانند به طور نسبتاً مؤثری به ERS در همان جایگاه اتصال آگونیست اندوژن 17β -استرادیول به عنوان آگونیست کامل و آگونیست نسبی جنیستین متصل شوند و بر اساس شواهد بالقوه اولیه ممکن است به عنوان آگونیست‌های نسبی GPCR عمل کنند. علاوه بر این، آنها یک سازگاری کنفورماسیونی مطلوبی در هندسه اتصال خود در مقایسه با جنیستین، در هر دو $ER\alpha$ و $ER\beta$ نشان می‌دهند، اما با مقایسه تمایل اتصال ترکیبات مورد بررسی با جنیستین نسبت به ERS، گمان می‌رود که جنیستین تمایل به اتصال بیشتری به ERS دارد. تعامل با هر دو ایزوفرم ER از طریق داکینگ مولکولی بر روی ساختارهای کریستالوگرافی آنها نشان می‌دهد که جنیستین، کامپفرول، کوئرسیتین و میریستین تا حدودی انتخابی $ER\beta$ هستند و فیستین و هر دو ایزومر رسوراترول می‌توانند تا حدودی انتخابی $ER\alpha$ باشند. بنابراین، این ترکیبات به عنوان بهترین لیگاندهای بالقوه ERS انتخاب شده‌اند. اتصال ترکیبات به گیرنده‌های هدف و برهمکنش‌های آنها به عنوان آگونیست نسبی این دو پروتئین می‌تواند تأیید کننده نتایج تجربی پژوهش‌های هورمونی گیاهان مورد مطالعه باشد (۲۸-۳۲).

از آن جایی که مطالعه داکینگ مولکولی در شناسایی مهم‌ترین ترکیبات فیتواستروژنی مورد مطالعه به عنوان آگونیست نسبی ERS، نتایج

نسبتاً با محل قرارگیری در اکتیوسایت (جایگاه فعال) اشغال شده به وسیله آگونیست اندوژن 17 β - استرادیول به عنوان آگونیست کامل و آگونیست نسبی جنیستین سازگار هستند. به نظر می‌رسد که دیگر منابع گیاهی دارای ترکیبات فیتواستروژنی فیسیتین، کامپفرول، کوئرسیتین، میریسیتین و رسوراترول، کاندیدهای خوبی برای ارزیابی بیشتر به عنوان جایگزین هورمونی باشند. این ترکیبات می‌توانند به عنوان ترکیبات lead (رهبر) یا پیشرو برای بهینه‌سازی بیشتر، با هدف طراحی لیگندهایی با تمایل اتصال افزایش یافته به ERs باشند. این نتایج احتمالاً می‌توانند به عنوان سرنخ‌های مناسبی در طراحی منطقی دارو برای توسعه عوامل درمانی جدید برای تشریح سیگنالینگ ERs در کنترل بیماری‌های حساس به استروژن مورد توجه باشند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از طرح پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1396.132 می‌باشد، بدین وسیله از همکاری حوزه معاونت پژوهش دانشگاه علوم پزشکی یاسوج در جهت اجرای آن تقدیر و تشکر می‌شود.

REFERENCES

1. Tangyuenyongwatana P, Gritsanapan W. Identification of potential phytoestrogen of selected compounds from zingiber cassumunar roxb. Rhizomes Using PharmMapper and Molecular Docking. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 2021; 11(1): 7826-34.
2. Naganuma M, Yokoo H, Misawa T, Matsuno K, Tsuji G, Demizu Y. Design and synthesis of 4-(2-pyrrolyl)-4-phenylheptane derivatives as estrogen receptor antagonists. *Heterocycles* 2020; 101(2): 429-34.
3. Amenyogbe E, Chen G, Wang Z, Lu X, Lin M, Lin AY. A review on sex steroid hormone estrogen receptors in mammals and fish. *International Journal of Endocrinology* 2020; 2020: 9.
4. Farzaneh S, Zarghi A. Estrogen receptor ligands: a review (2013–2015). *Scientia Pharmaceutica* 2016; 84(3): 409-27.
5. Grande F, Rizzuti B, Occhiuzzi MA, Ioele G, Casacchia T, Gelmini F, et al. Identification by molecular docking of homoisoflavones from *Leopoldia comosa* as ligands of estrogen receptors. *Molecules* 2018; 23(4): 894.
6. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2015; 29(4): 557-68.
7. Jiang H, Yamashita Y, Nakamura A, Croft K, Ashida H. Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes. *Scientific Reports* 2019; 9(1): 1-15.
8. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engström O, et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO Journal* 1999; 18(17): 4608-18.
9. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and biology* 2017; 16(1): 4-20.
10. Jowhari H, Yazdanpour F. Effects of hydro-alcoholic seed extract of *Coriandrum sativum* L. on pituitary-ovary hormones in rat. *Medical Science Journal of Islamic Azad University-Tehran Medical Branch* 2013; 22(4): 237-43.
11. Soni M, Rahardjo TBW, Soekardi R, Sulistyowati Y, Yesufu-Udechuku A, Irsan A, et al. Phytoestrogens and cognitive function: a review. *Maturitas* 2014; 77(3): 209-20.
12. Yuseran H, Hartoyo E, Nurseta T, Kalim H. Molecular docking of genistein on estrogen receptors, promoter region of BCLX, caspase-3, Ki-67, cyclin D , and telomere activity. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 2019; 14(1): 79-87.
13. Bafna D, Ban F, Rennie PS, Singh K, Cherkasov A. Computer-Aided ligand discovery for estrogen receptor alpha. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(12): 4193.
14. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 2000; 141(10): 3657-67.
15. Jiang W, Chen Q, Zhou B, Wang F. In silico prediction of estrogen receptor subtype binding affinity and selectivity using 3D-QSAR and molecular docking. *Medicinal Chemistry Research* 2019; 28(11): 1974-94.
16. Powers CN, Setzer WN. A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *In Silico Pharmacology* 2015; 3(1): 1-63.
17. Shamsi M, Nejati V, Najafi G. Therapeutic effects of Licorice extract on in vitro maturation and in vitro fertilization in Mice model of polycystic ovary syndrome. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2016; 25(132): 113-21.
18. Schwarz D, Kisselev P, Schunck WH, Roots I. Inhibition of 17 β -estradiol activation by CYP1A1: genotype-and regioselective inhibition by St. John's Wort and several natural polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 2011; 1814(1): 168-74.
19. Kim Y, Narayanan S, Chang KO. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research* 2010; 88(2): 227-35.
20. Parandin R, Yousofvand N. *Foeniculum vulgare* (fennel) effects on puberty timing, reproductive function and behaviour in adult female mice following neonatal exposure. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research* 2019; 27(121): 16-22.
21. Monsefi M, Ghasemi A, Alaei S, Aliabadi E. Effects of *Anethum graveolens* L.(dill) on oocyte and fertility of adult female rats. *Journal of Reproduction & Infertility* 2015; 16(1): 10-7.
22. Malihezaman M, Mojaba M, Elham H, Farnaz G, Ramin M. Anti-fertility effects of different fractions of *Anethum graveolens* L. extracts on female rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 2012; 9(3): 336-41.

23. Shyu YS, Lin JT, Chang YT, Chiang CJ, Yang DJ. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. *Food Chemistry* 2009; 115(2): 515-21.
24. Gupta M, Sharma R, Kumar A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Computational Biology and Chemistry* 2018; 76: 210-7.
25. Mansourian M, Fassihi A, Saghaie L, Madadkar-Sobhani A, Mahnam K, Abbasi M. QSAR and docking analysis of A 2B adenosine receptor antagonists based on non-xanthine scaffold. *Medicinal Chemistry Research* 2015; 24(1): 394-407.
26. Wang Y, Wu C, Zhang Q, Shan Y, Gu W, Wang S. Design, synthesis and biological evaluation of novel β -pinene-based thiazole derivatives as potential anticancer agents via mitochondrial-mediated apoptosis pathway. *Bioorganic Chemistry* 2019; 84: 468-77.
27. Taheri S, Nazifi M, Mansourian M, Hosseinzadeh L, Shokoohinia Y. Ugi efficient synthesis, biological evaluation and molecular docking of coumarin-quinoline hybrids as apoptotic agents through mitochondria-related pathways. *Bioorganic Chemistry* 2019; 91: 103147.
28. Abpeikar Z, Lohrasbi P, Monsefi M. The comparison of dill seed and leaf aqueous extracts (*Anethum graveolens* L.) on histomorphometrical changes of rat uterus and ovaries. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)* 2015; 28(2): 116-24.
29. Monsefi M, Ghasemi M, Bahaoddini A. The effects of *Anethum graveolens* L. on female reproductive system. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 2006; 20(10): 865-8.
30. Mohammadinia N, Rezaei M, Salehian T, Dashipoor A. Comparing the effect of *Anethum graveolens* with mefenamic acid consumption on treatment of primary dysmenorrhea. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 2013; 15(5): 57-64.
31. Salehi A, Momeni H, Seraji A. Comparison of the effects of *Hypericum* and *Vitex agnus premenstrual syndrome* compared with vitamin E: a randomized clinical trial. *Complementary Medicine Journal* 2013; 3(1): 395-405.
32. Monsefi M, Ghasemi M, Bahaoddini A. The effects of *Anethum graveolens* L. on female reproductive system of rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 14(3): 131-5.
33. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 2009; 30(16): 2785-91.
24. Manas ES, Xu ZB, Unwalla RJ, Somers WS. Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor- β using X-ray crystallography and computational methods. *Structure* 2004; 12(12): 2197-207.
35. Nasab RR, Mansourian M, Hassanzadeh F, Shahlaei M. Exploring the interaction between epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and some of the synthesized inhibitors using combination of in-silico and in-vitro cytotoxicity methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2018; 13(6): 509-22.
36. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 1998; 19(14): 1639-62.
37. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 1996; 14(1): 33-8.
38. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection* 1995; 8(2): 127-34.
39. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition* 1996; 9(1): 1-5.
40. Nadendla RR. Molecular modeling: A powerful tool for drug design and molecular docking. *Resonance* 2004; 9(5): 51-60.
41. Yugandhar P, Kumar KK, Neeraja P, Savithamma N. Isolation, characterization and in silico docking studies of synergistic estrogen receptor a anticancer polyphenols from *Syzygium alternifolium* (Wt.) Walp. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 2017; 6(3): 296.
42. Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells. *Toxicological Sciences* 2004; 80(1): 14-25.
43. Lee JY, Kim HS, Song YS. Genistein as a potential anticancer agent against ovarian cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2012; 2(2): 96-104.
44. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 2002; 22(1): 19-34.

45. Mukund V, Mukund D, Sharma V, Mannarapu M, Alam A. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2017; 119: 13-22.
46. Mahdavi M, Lavi MM, Yekta R, Moosavi MA, Nobarani M, Balalaei S, et al. Evaluation of the cytotoxic, apoptosis inducing activity and molecular docking of spiroquinazolinone benzamide derivatives in MCF-7 breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 2016; 260: 232-42.
47. Solak KA, Wijnolts FM, Nijmeijer SM, Blaauboer BJ, van den Berg M, van Duursen MB. Excessive levels of diverse phytoestrogens can modulate steroidogenesis and cell migration of KGN human granulosa-derived tumor cells. *Toxicology Reports* 2014; 1: 360-72.
48. Lorand T, Vigh E, Garai J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17(30): 3542-74.
49. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 1995; 375(6530): 377-82.
50. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998; 95(7): 927-37.
51. Moutsatsou P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones(Athens)* 2007; 6(3): 173.
52. Van der Woude H, Ter Veld MG, Jacobs N, Van der Saag PT, Murk AJ, Rietjens IM. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005; 49(8): 763-71.
53. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014; 389(1-2): 71-83.
54. Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Research* 2001; 61(20): 7456-63.

A Molecular Docking Study of Phytoestrogenic Compounds from *Hypericum perforatum L.* and *Anethum graveolens L.* with Two Isoforms of Estrogen Receptor

Mansourian M*

Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 22 July 2021 Accepted: 23 Aug 2021

Abstract

Background & aim: Estrogens play a key role in the growth, development and maintenance of a wide range of tissues. Physiological responses to estrogen in specific tissues are mediated by at least two isoforms of the estrogen receptor alpha (ER α) and beta (ER β). Currently, medicinal plants are widely used in the treatment and control of diseases due to their lower cost and fewer side effects than synthetic drugs, including *Hypericum perforatum L.* and *Anethum graveolens L.* *Hypericum perforatum L.* is effective in premenstrual syndrome, and *Anethum graveolens L.* as a regulator, effective in sex hormones and dysmenorrhea. The main purpose of the present study was to compare the molecular interaction of phytoestrogenic compounds of the studied plants with these two isoforms of estrogen receptor through molecular docking.

Methods: This molecular docking study was performed in 2021. The Molecular docking method was used to calculate the molecular interaction with the aim of additional investigation of the possible hormonal effects of phytoestrogenic compounds in the studied plants. Evaluation of theoretical binding site of flavonoid phytoestrogenic compounds fisetin, kaempferol, quercetin, myricetin, tetramethyl stilbene, trans-Anethole, limonene, resveratrol, and genistein as an agonist or antagonist was performed by ER α and ER β . The amino acid residues involved in the interaction, the free binding energy and the binding constant were determined. The collected data were analyzed using different software and compared with the results of related articles.

Results: By examining the binding energy and different conformations of phytoestrogenic compounds into ERs, fisetin, kaempferol, quercetin, myricetin and resveratrol were selected as the best potential ligands. The results confirm that these compounds were quite sterically compatible with the location at the active site occupied by the 17 β -estradiol endogenous agonist as full agonist and partial agonist genistein. The results of molecular docking provided evidence of the binding of phytoestrogenic compounds to ER α and ER β with a bond-free energy of -5.26 to -8.47 kcal/mol and a binding constant of 131.62 μ M to 614.61 nM and their interaction with key residues of active site including Glu353, Arg394 and His524 of ER α and Glu305, Arg346 and His475 of ER β as partial agonist.

Conclusion: The interaction of the best phytoestrogenic compounds with the key amino acids of active site ERs such as the partial agonist of genistein was desirable. Valuable results of molecular docking in identifying the most important phytoestrogenic compounds can be considered as a starting point for optimization in the rational design of drugs in the treatment of estrogen-sensitive diseases.

Keywords: *Hypericum perforatum L.*, *Anethum graveolens L.*, Estrogen receptor, Phytoestrogen, 17 β -estradiol, Partial agonist, Molecular docking

*Corresponding author: Mansourian M, Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Email: mahboubehmansourian90@gmail.com

Please cite this article as follows: Mansourian M. A Molecular Docking Study of Phytoestrogenic Compounds from *Hypericum perforatum L.* and *Anethum graveolens L.* with Two Isoforms of Estrogen Receptor. Armaghane-danesh 2022; 26(6): 915-940.