

مطالعه برهمکنش پروتئین تیمیدین کیناز ویروس آبله میمونی با ترکیبات طبیعی با استفاده از داکینگ مولکولی

طوبی عبدی زاده

ایران، شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، پژوهشکده علوم پایه سلامت، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸

چکیده

آبله‌میمونی یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که در اثر عفونت با ویروس آبله‌میمونی ایجاد می‌شود. تیمیدین‌کیناز پروتئینی است که توسط ویروس آبله‌میمونی کدگذاری شده و دارای فعالیت‌های فسفریله‌کننده تیمیدین و تیمیدیلات است و در تکثیر DNA ویروسی نقش دارد و می‌تواند یک هدف امیدوارکننده برای درمان آبله‌میمونی باشد. این تحقیق به منظور پیش‌بینی و ارزیابی ساختار سه‌بعدی پروتئین تیمیدین‌کیناز در آبله‌میمونی و اثربخشی ترکیبات فنولیک گیاهی بر روی این پروتئین مورد بررسی قرار گرفته است. ساختار سه‌بعدی پروتئین تیمیدین‌کیناز توسط سرورهای Swiss Model و Procheck، به ترتیب، پیش‌بینی و ارزیابی گردید. در روش داکینگ مولکولی، برهمکنش‌های ترکیبات فنولیک گیاهی و داروی استاندارد (گانسیکلوویر) در مدل پیش‌بینی شده تیمیدین‌کیناز با استفاده از نرم‌افزار MOE-2014 بررسی گردید. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی و فعالیت بیولوژی ترکیبات با استفاده از نرم افزارهای Swiss ADME، PASS و Swiss Target Prediction پیش‌بینی گردید. نتایج همولوژی مدلینگ نشان داد که مدل پیشنهادی دارای کیفیت و پایداری مناسبی می‌باشد و مهم‌ترین پیوندهای درگیر در اتصال دارو با گیرنده، پیوند هیدروژنی، برهمکنش‌های هیدروفوب و arene-H می‌باشند. بهترین نتایج داکینگ مربوط به ترکیبات gallic acid، curcumin، caffeic acid و rosmarinic acid با داشتن انرژی اتصال قوی (۱۵/۶۰- تا ۱۷/۹۲- کیلوکالری برمول) در مقایسه با داروی گانسیکلوویر می‌باشد. بنابراین، پروتئین تیمیدین‌کیناز می‌تواند هدف مناسبی برای طراحی داروهای جدید در برابر آبله‌میمونی باشد و ترکیبات فنولیک گیاهی می‌توانند به عنوان داروهای بالقوه ضد آبله‌میمونی در مطالعات *in vitro* و *in vivo* بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی: آبله‌میمونی، همولوژی مدلینگ، داکینگ مولکولی، تیمیدین‌کیناز، ترکیبات فنولیک

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: t.abdizadeh@gmail.com

مقدمه

باشد که مورد دوم با عوارض بیشتر، مرگ و میر و انتقال انسان به انسان همراه است. نام آبله‌میمونی از کشف اولیه ویروس در میمون‌ها در یک آزمایشگاه دانمارکی در سال ۱۹۵۸ نشأت گرفته است و اولین مورد انسانی در یک کودک در کنگو در سال ۱۹۷۰ شناسایی شد و در ادامه نیز رفته‌رفته در مناطقی همچون آفریقای مرکزی و غربی دیده شد (۱۰، ۴۲). تقریباً می‌توان با اطمینان گفت که پس از

آبله‌میمونی یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که در اثر عفونت با ویروس آبله‌میمونی ایجاد می‌شود. ویروس آبله‌میمونی از خانواده ویروس‌هایی است که شامل ویروس واریولا (عامل آبله)، ویروس واکسینیا (مورد استفاده در واکسن آبله) و ویروس آبله‌گاو است (۳۵). دو کلاد از ویروس آبله میمونی وجود دارد که شامل کلاد آفریقای غربی و کلاد حوضه کنگو (آفریقای مرکزی) می‌-

رسد در برخی افراد، مانند کودکان، زنان باردار یا افرادی که به دلیل سایر شرایط سلامتی دچار سرکوب سیستم ایمنی هستند مانند افراد ایدزی، شدیدتر می‌باشد. عفونت‌های انسانی با گونه غرب آفریقا باعث بیماری با عوارض کمتری نسبت به گونه کنگو با نرخ مرگ و میر پایین‌تر می‌شود (۸). (۴۴، ۵۴).

دوره کمون آبله‌میمونی معمولاً ۶ تا ۱۳ روز است اما می‌تواند بین ۵ تا ۲۱ روز نیز متغیر باشد. معمولاً بیماری با پیش‌درآمد همراه با علائم متعددی از جمله تب، سردرد شدید، تورم غدد لنفاوی، دردهای ماهیچه‌ای، لنفادنوپاتی و احساس خستگی آغاز می‌شود (۶). به دنبال آن بیمار دچار بثورات پوستی می‌شود که در عرض ۱ تا ۱۰ روز پس از آن ظاهر می‌شوند، که اغلب از صورت شروع می‌شود و سپس به سایر قسمت‌های بدن گسترش می‌یابد. زمان قرارگرفتن در معرض ویروس تا شروع نشانه‌ها حدود ۱۰ روز است. مدت زمان نشانه‌های بیماری معمولاً دو تا چهار هفته است (۲۱). ضایعات پوستی در بیماران مبتلا یک شکل، به اندازه نخود و سفت ظاهر می‌شوند (۳، ۷). تشخیص ژنتیکی این بیماری شامل استفاده از Real-Time PCR است و توصیه می‌شود که این آزمایش در یک مرکز ایمنی زیستی سطح سه انجام شود (۳۱).

یک هدف دارویی ضروری برای این عفونت ویروسی، پروتئین تیمیدین‌کیناز است. تیمیدین‌کیناز یک پروتئین فسفوترانسفراز است که در اکثر سلول‌های زنده وجود دارد و مسئول کاتالیز کردن انتقال گروه‌های فسفات از ATP به دئوکسیتیمیدین برای تشکیل دئوکسیتیمیدین مونوفسفات است. تیمیدین‌کیناز پروتئینی است که توسط ویروس‌هایی مانند واریسلا زوستر و آبله‌میمونی کدگذاری شده و دارای فعالیت‌های فسفریله‌کننده تیمیدین و تیمیدیلات است. این پروتئین در تکثیر DNA ویروسی نقش دارد و آن را به طور یکپارچه در مکانیسم‌های عفونت سلولی میزبان درگیر می‌کند و نقش اساسی در حفظ تکثیر ویروس ایفا می‌کند،

این ماجراها، موارد ابتلای مشاهده‌شده در خارج از آفریقا، به دلیل سفرهای بین‌المللی و یا ورود حیوانات وارداتی گزارش شده‌اند. شیوع آبله‌میمونی در سال ۲۰۲۲ نشان‌دهنده اولین شیوع انتقال گسترده جامعه در خارج از آفریقا است که در می ۲۰۲۲ در بریتانیا آغاز شد و موارد بعدی در اروپا، آمریکای شمالی و استرالیا تایید شد (۸، ۳۶). ویروس آبله‌میمونی متعلق به جنس orthopoxvirus از خانواده poxviridae است. یک خانواده بزرگ و متنوع از ویروس‌های DNA دورشته‌ای که در سیتوپلاسم سلول‌های آلوده تکثیر می‌شوند. ویروس‌های آبله دارای ساختارهای آجری یا بیضی شکل به طول ۴۵۰-۲۲۰ نانومتر و عرض ۲۶۰-۱۴۰ نانومتر هستند (۴، ۴۸).

انتقال ویروس آبله‌میمونی از طریق تماس با حیوان، انسان یا مواد آلوده به ویروس اتفاق می‌افتد. ویروس می‌تواند از طریق پوست آسیب‌دیده (حتی اگر آسیب قابل مشاهده نباشد)، دستگاه تنفسی یا مخاط (چشم، بینی یا دهان) وارد بدن شود. انتقال از حیوان به انسان ممکن است از طریق گاز گرفتن یا زخمی کردن، فراوری گوشت، تماس مستقیم با خون و ترشحات بدن حیوان، یا تماس غیرمستقیم با مواد دفعی حیوان رخ دهد. تصور بر این است که انتقال از انسان به انسان عمدتاً از طریق قطرات تنفسی بزرگ اتفاق می‌افتد. سایر روش‌های انتقال از انسان به انسان شامل تماس مستقیم با ترشحات یا مواد دفعی و نیز تماس غیرمستقیم مثلاً از طریق لباس‌ها یا ملحفه‌های آلوده است (۳۴، ۲۵). میزبان اصلی بیماری آبله‌میمونی هنوز ناشناخته است، اگرچه تصور بر این است که جوندگان آفریقایی ممکن است در انتقال این بیماری نقش داشته باشند و گونه‌های مختلف جانوری به عنوان میزبان حساس به ویروس آبله‌میمونی شناسایی شده‌اند. عدم قطعیت در مورد تاریخچه طبیعی ویروس آبله‌میمونی وجود دارد و مطالعات بیشتری برای شناسایی دقیق و نحوه حفظ گردش ویروس در طبیعت مورد نیاز است. خوردن گوشت کم پخته شده و سایر محصولات حیوانات آلوده یک عامل خطر احتمالی است. آبله‌میمونی به نظر می‌-

این منظور، ترکیبات فنولیک مشتق شده از گیاهان مانند ترکیب Epigallocatechin gallate (EGCG) به عنوان یک ترکیب موثر برای درمان عفونت‌های ویروسی مانند ویروس هرپس سیمپلکس استفاده شده است (۱۱) و ترکیب فنولی، اپی گالوکاتچین-۳ گالات پتانسیل استفاده به عنوان یک عامل ضد ویروس هپاتیت B موثر با سمیت کم را دارد (۲۶). همچنین، روزراترول یک ترکیب فنولی طبیعی می‌باشد که برای درمان عفونت ویروسی هرپس انسانی نوع ۳ (ویروس واریسلا زوستر) استفاده می‌شود (۱۲). دو ترکیب هارینگتونین (Harringtonine) و هوموهارینگتونین (Homoharringtonine)، استرهای آلکالوئیدی جدا شده از *genus Cephalotaxus*، اثرات ضد ویروسی قوی علیه یک ایزوله بالینی ویروس واریسلا زوستر (VZV) (*Varicella-Zoster Virus*) نشان می‌دهند (۲۷). در حالی که ترکیب کاتچین (Catechin) قدرت ضد ویروسی را در برابر ویروس هرپس سیمپلکس، آنفلوآنزا و هاری نشان می‌دهد (۳۰). قهوه حاوی مقادیر قابل توجهی از مواد شیمیایی مانند اسید کلروژنیک (chlorogenic acid)، کافئین و اسید کافئیک (caffeic acid) است. گزارش‌ها نشان می‌دهد که این ترکیبات می‌توانند ویروس‌هایی مانند *Herpes simplex virus (HSV)*، *Hepatitis B virus (HBV)* و ویروس آنفلوآنزا را مهار کنند (۵۰، ۵۲). رسوراترول (Resveratrol) یک ترکیب فنولی طبیعی است که بیشتر در پوست انگور یافت می‌شود. اثر ضد ویروسی رسوراترول به دلیل فعالیت آن در برابر طیف گسترده‌ای از ویروس‌های حیوانی و انسانی از جمله ویروس‌های DNA و RNA مانند *Epstein-Barr virus (EBV)*، *cytomegalovirus* ویروس واریسلا زوستر (VZV) و *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)* سیتومگالوویروس انسانی (HCMV) *Human cytomegalovirus* ویروس واریسلا زوستر (VZV) و *Adenovirus* می‌باشد (۱۲، ۱۶، ۱۷، ۵۵). ترکیب کورکومین (Curcumin)، یک پلی فنول مشتق شده از زردچوبه است و تحقیقات و آزمایش‌های بالینی در حال انجام ثابت کرده‌اند

بنابراین، درمان ضد ویروسی با هدف قرار دادن تیمیدین کیناز، تکثیر ویروس را سرکوب می‌کند و از فعال شدن مجدد ویروس در طول دوره نهفته ویروس جلوگیری می‌کند (۹، ۲۸، ۵۳). در حال حاضر هیچ داروی ضد ویروسی برای درمان عفونت آبله‌میمونی انسانی وجود ندارد. اخیراً، انجمن پزشکی اروپا (European Medical Association) مجوز داروی Tecovirimat را جهت درمان آبله‌میمونی در سال ۲۰۲۲ بر اساس یافته‌های حاصل از مطالعات حیوانی و انسانی صادر کرده است که نشان می‌دهد این دارو بی‌خطر و قابل تحمل بوده و تنها عوارض جانبی جزئی دارد. Tecovirimat، به طور کلی در دسترس نیست و عمدتاً برای درمان آبله طراحی شده است (۴۸، ۴۵).

کشف اثرات درمانی یک ترکیب شیمیایی، تازه آغاز راهی است که ممکن است تحقیق، توسعه و اجرای آن سالیان زیادی به طول بیانجامد. در حقیقت زمان بر بودن، پرهزینه بودن و عدم دسترسی آسان به مواد اولیه دارویی جهت سنتز و داشتن عوارض جانبی متعدد داروهای شیمیایی از معایب داروهای شیمیایی می‌باشد. یکی از راهکارهای جدید درمانی، غیر از طراحی و سنتز شیمیایی داروها، جستجوی مواد موثره دارویی در بین منابع طبیعی به منظور دستیابی به داروهایی با کمترین اثرات جانبی و صرف هزینه و زمان کوتاهتر است. امروزه روش‌های *in Silico* به عنوان یکی از کم هزینه‌ترین و سریع‌ترین راهکارها برای رسیدن به ترکیب الگو و یا دارو موثر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۶).

ترکیبات فنولیک دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه هستند که به طور گسترده در گیاهان توزیع می‌شوند. فنول‌های گیاهی صدها سال است که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و به‌عنوان یک دسته اصلی از ترکیبات طبیعی که فعالیت زیادی در برابر ویروس‌های مختلف مانند هرپس سیمپلکس، ویروس اپشتین بار، ویروس هرپس اکوید، ویروس هپاتیت B، ویروس نقص ایمنی انسانی، سنسیشیال تنفسی و ویروس‌های دیستمپر سگ دارند عمل کرده‌اند (۳۰، ۳۳، ۴۰). برای

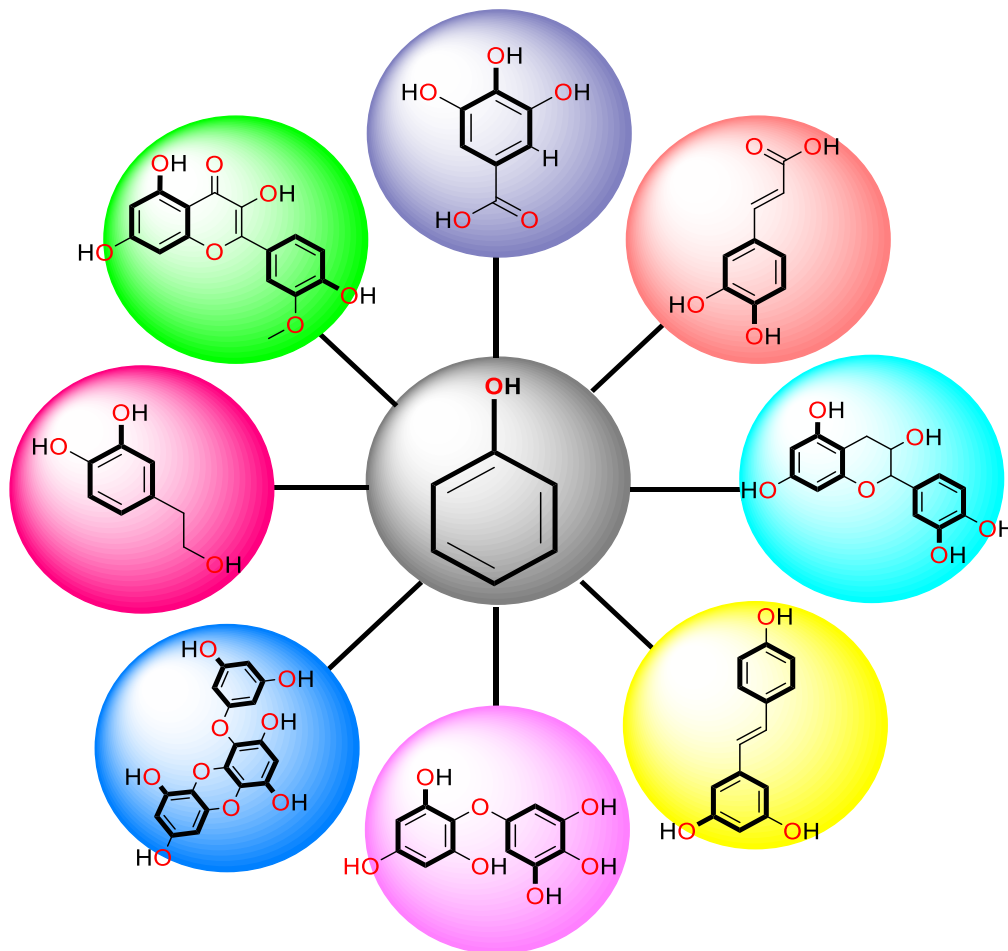
فعال پروتئین، روش داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار (MOE-2014) Molecular Operating Environment اجرا و نتایج به دست آمده از آن مورد تجزیه و تحلیل و در نهایت پیش‌بینی خطر سمیت و فعالیت بیولوژیک ترکیبات توسط سرور SwissADME، PASS، Swiss Target Prediction و ارزیابی گردید.

مواد و روشها

هدف اصلی این مطالعه ارزیابی ترکیبات فنولیک به عنوان مهارکننده‌های پروتئین تیمیدین‌کیناز در جهت شناسایی دارویی موثر به منظور درمان آبله‌میمونی بود. پروتئین تیمیدین‌کیناز به دلیل نقش مهم آن در سنتز DNA و تقسیم سلولی در آبله‌میمونی انتخاب گردید.

که این ترکیب فنولیک طبیعی دارای قدرت ضد ویروسی خوبی در برابر HSV و HBV می‌باشد (۵۶، ۴۱).

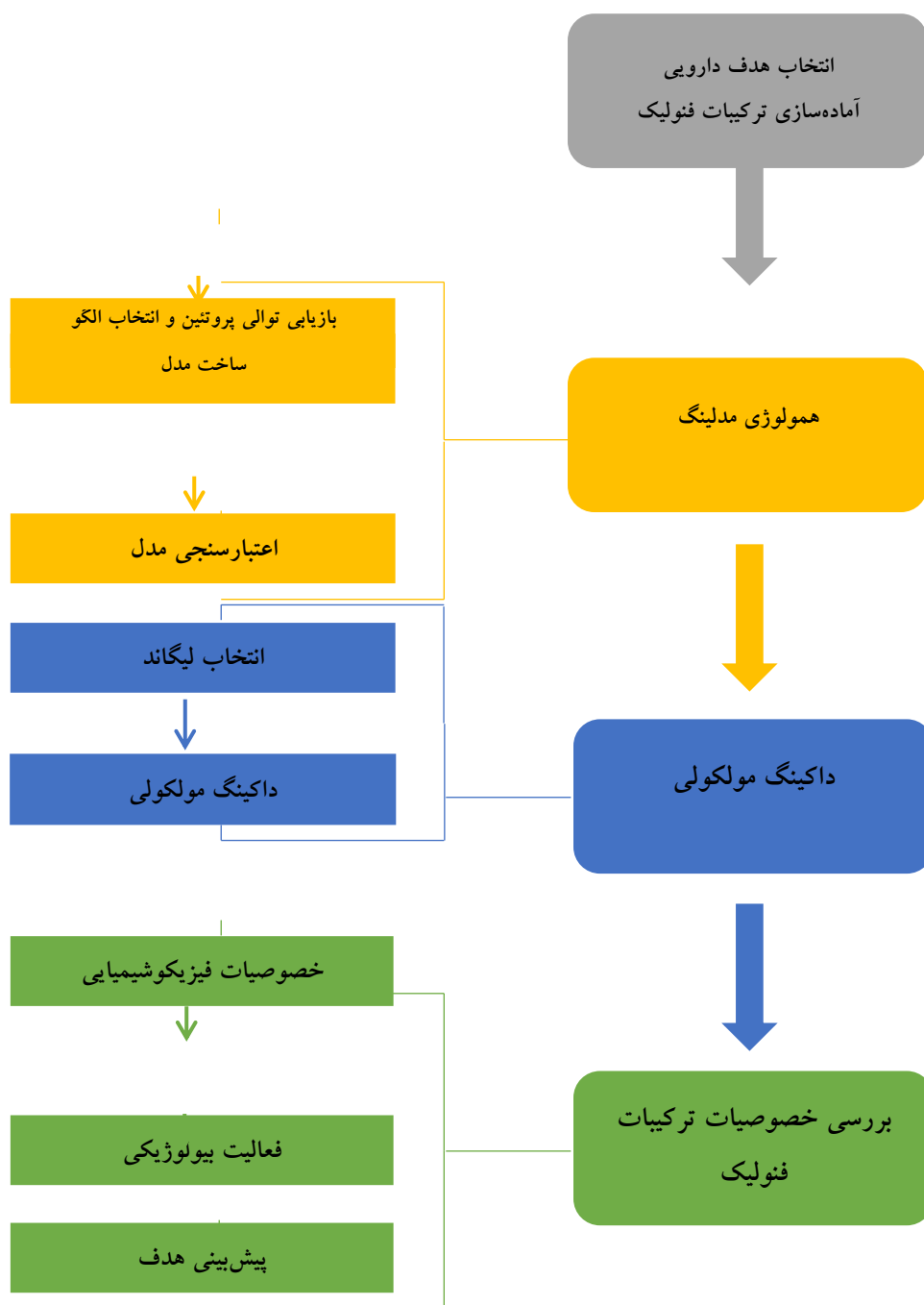
بنابراین، در این مطالعه سعی شده است که با توجه به اهمیت این پروتئین در بیماری آبله‌میمونی و با توجه به اینکه ساختار پروتئین کریستالوگرافی نشده است، مدل‌سازی آن برای بررسی اثر داروهای احتمالی در جهت مهار پروتئین انجام می‌گیرد. سپس، میزان فعالیت مهارکنندگی ترکیبات فنولیک گیاهی (شکل ۱) بر روی پروتئین تیمیدین‌کیناز آبله‌میمونی با استفاده از داکینگ مولکولی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و اثربخشی هر کدام از این ترکیبات در محیط *in Silico* به منظور پیدا کردن یک ترکیب موثر در درمان آبله‌میمونی بررسی شود. با هدف بررسی و شناسایی دقیق مکانیسم اتصال ترکیبات فنولیک با اسکلت ساختاری فنولی به جایگاه



شکل ۱- ساختار اصلی ترکیبات فنولیک

تیمیدین‌کیناز نشان دادند برای تحقیقات بیشتر توسط همولوژی مدلینگ پیش‌بینی و مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات فنولیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داکینگ مولکولی تمام ترکیبات فنولیک با پروتئین تیمیدین‌کیناز انجام شد و ترکیبات با اثر مهاری بهتر که میل اتصال قوی‌تری برای

ساختار سه بعدی پروتئین تیمیدین‌کیناز به روش همولوژی مدلینگ پیش‌بینی و مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات فنولیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داکینگ مولکولی تمام ترکیبات فنولیک با پروتئین تیمیدین‌کیناز انجام شد و ترکیبات با اثر مهاری بهتر که میل اتصال قوی‌تری برای



شکل ۲- نمای شماتیکی از رویکرد محاسباتی مورد استفاده برای شناسایی ترکیبات فنولیک به عنوان مهارکننده‌های پروتئین تیمیدین‌کیناز آبله‌میمونی

رشته‌های بتا، پیچش‌های آلفا و ساختار کویل از سرور GOR4 استفاده گردید.

پیش‌گویی ساختار سوم تیمیدین‌کیناز با روش همولوژی مدلینگ و نمایش ساختار سه‌بعدی پروتئین: به منظور تعیین مدل ساختاری این پروتئین در آبله‌میمونی، ابتدا توالی آمینواسیدی آن با کد شناسایی P04363 از پایگاه داده NCBI به فرمت FASTA ذخیره شد. سپس با استفاده از ابزار (Basic Local Alignment Search Tool) BLASTP و PSIBLAST در پایگاه داده پروتئین (PDB) جستجو جهت انتخاب بهترین الگو (توالی همولوگوس) برای انجام مشابهت مدلینگ انجام گرفت (۴۳). سعی شد در انتخاب الگو معیارهایی نظیر حد تفکیک پائین‌تر از ۳ آنگستروم مربوط به کریستالوگرافی اشعه ایکس، R-value پائین‌تر از ۰/۳، شباهت بالای ۳۵ درصد الگو با توالی مورد مطالعه و E-value پائین اعمال شود تا اعتبار و اطمینان‌پذیری مدل افزایش یابد. بعد از هم‌ردیفی توالی الگو با توالی مورد مطالعه، مدل‌سازی به روش مدلینگ و با استفاده از پایگاه داده Swiss Model انجام شد (۳۸، ۲۹).

اعتبارسنجی مدل ساخته شده: برای ارزیابی ساختار و کیفیت شیمی فضائی مدل ساخته شده از نمودار رام‌اچانداران با استفاده از سرور Procheck و سرور ProSA استفاده شد. سرور ProSA کیفیت مدل تولید شده را با محاسبه Z-score بیان می‌کند. Z-score، معیاری است که کیفیت کلی مدل را نشان می‌دهد (۵۱). هم‌ردیفی ساختاری دو ساختار مدل شده و الگو با استفاده از نرم افزار Chimera1.11.2 انجام گرفت.

بررسی ترکیبات با قانون لیپینسکی (Lipinski): برای ارزیابی اینکه یک ترکیب می‌تواند خواص دارویی داشته باشد و برای پیش‌بینی میزان جذب، برای تمام ترکیبات، قانون لیپینسکی در نظر گرفته می‌شود. قانون لیپینسکی (Lipinski's rule of five) پیش‌بینی می‌کند که جذب یا نفوذ مناسب در مواردی اتفاق می‌افتد که ترکیب مورد نظر

آماده‌سازی لیگاندها: این پژوهش به شیوه توصیفی-تحلیلی انجام شد. ابتدا، از میان ترکیبات موثر گیاهان دارویی، ترکیبات فنولیک (۲۰ ترکیب) که دارای خاصیت ضد ویروسی بودند انتخاب شدند. جهت مقایسه عملکرد ترکیبات فنولیک ذکر شده و دستیابی به نتایج قابل اطمینان برهمکنش مولکولی، داروی ضد ویروس گانسیکلوویر به عنوان استاندارد مورد مطالعه قرار گرفت. ساختار سه بعدی ترکیبات و داروی استاندارد از پایگاه PubChem به آدرس (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) دریافت شدند (جدول ۳) و ساختارها توسط نرم‌افزار 7 Hyperchem در میدان نیروی مکانیک مولکولی (Molecular Mechanics (MM+)) و روش نیمه تجربی AM1 و الگوریتم Polak-Ribiere از نظر انرژی بهینه شدند.

آماده‌سازی پروتئین

جستجوی پایگاه اطلاعاتی PDB: به منظور بررسی برهمکنش ترکیبات فنولیک با پروتئین تیمیدین‌کیناز، ابتدا وجود ساختار کریستالی آن به روش آزمایشگاهی در آبله-میمونی بررسی شد. به دلیل موجود نبودن ساختار سوم مبتنی بر داده‌های آزمایشگاهی در پایگاه اطلاعاتی (PDB) Protein Data Bank، ساختار سوم این پروتئین با استفاده از یک روش مبتنی بر همولوژی مدلینگ تعیین شد. به این منظور، توالی آمینو اسید تیمیدین‌کیناز با کد شناسایی P04363 از پایگاه داده UniProt به فرمت FASTA تهیه شد.

بررسی ساختار اولیه و ثانویه تیمیدین‌کیناز: خصوصیات فیزیکوشیمیایی ساختار اولیه تیمیدین‌کیناز شامل وزن مولکولی، تعداد آمینواسید پروتئین، میزان حلالیت، شاخص پایداری، نقطه ایزوالکتریک، تعداد باقیمانده‌های بار مثبت و منفی و (Grand Average Hydropathicity) GRAVY با استفاده از سرور ExPasy ProtParam مورد بررسی قرار گرفت. برای پیش‌بینی ساختار ثانویه تیمیدین‌کیناز مانند

داکینگ مولکولی: ساختار سه بعدی پروتئین تیمیدین کیناز توسط روش همولوژی مدلینگ دریافت شد. در طول فرآیند آماده‌سازی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار MOE-2014 (۵)، هیدروژن‌های قطبی و بارهای گستگیگر (بارهای الکتریکی اتم که به صورت تجربی محاسبه می‌گردد) به پروتئین اضافه و هیدروژن‌های غیر یونیزه در اتم کربن مجاور ادغام شدند. ساختار پروتئین توسط الگوریتم کمینه سازی انرژی MOE با استفاده از میدان نیروی MMFF94X با روش گرادیان مزدوج به حداقل رسید. سپس، ساختار پروتئین برای مطالعات داکینگ مولکولی ذخیره شد. به منظور ارزیابی ترکیبات فنولیک و داروی استاندارد (گانسیکلوویر) در مهار پروتئین تیمیدین کیناز از روش داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار MOE-2014 استفاده شد. در MOE، تمایل اتصال گیرنده-لیگاند با تمام هندسه-های اتصال ممکن بر اساس یک مقدار عددی به نام E-score اولویت بندی می‌شوند. MOE می‌تواند پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش‌های آبگریز، گوگرد-LP، کاتیون و قرار گرفتن کمپلکس در معرض حلال را شناسایی کند. بنابراین، در این کار، برهمکنش‌های بین ترکیبات و پروتئین گیرنده بر اساس E-score پیش‌بینی می‌شوند. در طول فرآیند شبیه سازی داکینگ مولکولی، پروتئین تیمیدین کیناز به عنوان یک ساختار صلب در نظر گرفته شد، در حالی که لیگاندها کاملاً انعطاف پذیر بودند. داکینگ مولکولی با استفاده از الگوریتم مکان‌یابی تطبیق مثلث در ترکیب با تابع امتیازدهی London dG برای اختصاص انرژی‌های اتصال آزاد نظری مجتمع‌های پروتئین-لیگاند و میدان نیرو به عنوان روش پالایش انجام شد. بررسی‌های کمی از حیث انرژی پیوندی توسط بهترین کنفورماسیون ترکیبات با انرژی‌های آزاد اتصال (E-score kcal/mol) ارزیابی شدند و بررسی‌های کیفی از حیث برهمکنش بین لیگاندها و پروتئین شامل برهمکنش-های هیدروژنی و هیدروفوبی و با آمینواسیدهای موجود در پاکت اتصال پروتئین توسط ماژول LigX در نرم

دارای ویژگی‌های مانند وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون، فاکتور چربی دوستی (LogP) کمتر از ۵، تعداد اتمهای پذیرنده هیدروژن کمتر از ۱۰ و تعداد اتمهای دهنده هیدروژن کمتر از ۵ باشد. لذا ترکیبی که این ویژگیها را داشته باشد و از قانون لیپینسکی برخوردار باشد، جذب بیشتر و اثربخشی بیشتری دارد (۳۲) لذا برای بررسی ترکیبات از لحاظ این قانون از پایگاه SwissADME استفاده شد.

پیش بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بیولوژیک ترکیبات مورد بررسی: بطور کلی، دارا بودن خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب در کنار اثر بخشی دارویی از شاخص‌های مهم جهت ارزیابی یک مولکول به عنوان یک کاندید دارویی مناسب است. لذا در این مطالعه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل حلالیت در آب، مساحت قسمت‌های قطبی مولکول ((Topological (TPSA Polar Surface Area) و قابلیت مهار سیتوکرومی که در طراحی پیش دارو بصورت خوراکی یا تزریقی ویریدی یا جذب پوستی نقش دارند با استفاده از پایگاه SwissADME بر اساس قانون لیپینسکی پیش‌بینی شد. برای پیش‌بینی طیف فعالیت و برای یافتن اهداف (مکانیسم) جدید برای برخی لیگاندها و برعکس، برای آشکار کردن لیگاندهای جدید برای برخی از اهداف بیولوژیکی و مطالعه هدف مولکولی برای یافتن عوارض جانبی فنوتیپی یا واکنش متقابل بالقوه ناشی از عمل لیگاندها از پایگاه‌های PASS-Way2Drug و Swiss Target Prediction استفاده شد. سرورهای مذکور نرم افزارهای آنلاین هستند که با دریافت اطلاعات مولکول شیمیایی در قالب فایل Structure Data File (SDF) یا Simplified (Smile) molecular-input line-entry system امکان پیش بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی را فراهم می‌آورند (۱۴، ۲۰). (۳۷)

افزار MOE آنالیز شد. خاطر نشان می‌شود که در کنار محیط‌های *in vivo* و *in vitro* محیط *in silico* به عنوان یک محیط کارآمد در خصوص تجزیه و تحلیل جزئیات فرایندهای پیچیده زیستی محسوب می‌شود.

نتایج

بررسی ساختار اولیه و ثانویه پروتئین تیمیدین کیناز:

نتایج آنالیز ساختار اولیه پروتئین تیمیدین کیناز نشان می‌دهد که این پروتئین دارای وزن مولکولی ۱۹/۹۹ kDa و ۱۷۷ آمینواسید می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک این پروتئین (۶/۷۲) در دامنه اسیدی (پائین‌تر از ۷) می‌باشد و خاصیت اسیدی دارد. دانستن نقطه ایزوالکتریک در ارزیابی حالیت و نحوه حرکت پروتئین در میدان الکتریکی مهم است. همچنین محاسبه عدد بالا (۹۳/۶۲) برای شاخص آلفاتیک پروتئین تیمیدین کیناز نشان‌دهنده پایداری این پروتئین در محدوده مناسبی از دماها می‌باشد. شاخص ناپایداری (۳۴/۴۶) پروتئین تیمیدین کیناز بیان‌گر پایداری این پروتئین و قابلیت تحمل شرایط آزمایشگاهی جهت بررسی روی آن می‌باشد. علاوه بر این، هیدروفیل بودن (GRAVY) پروتئین، قابلیت مناسب پروتئین در ارتباط با محیط آبی پیرامون آن را نشان می‌دهد. در نهایت فراوان‌ترین آمینواسیدها برای این پروتئین به ترتیب ایزولوسین و لوسین می‌باشند (اطلاعات تکمیلی، جدول ۱s).

ساختارهای ثانویه پروتئین معمولاً ساختارهای تکرار شونده موضعی (محلی) می‌باشند که به وسیله پیوندهای هیدروژنی پایدار می‌شوند. نتایج بررسی ساختار دوم پروتئین تیمیدین کیناز به صورت منحنی و توالی در شکل ۱s و جدول ۲s (اطلاعات تکمیلی) نشان می‌دهد که در واقع ۴۲ آمینواسید در ناحیه هلیکس، ۴۸ آمینواسید در ناحیه بتا و ۸۷ آمینواسید در ناحیه کویل پروتئین می‌باشد.

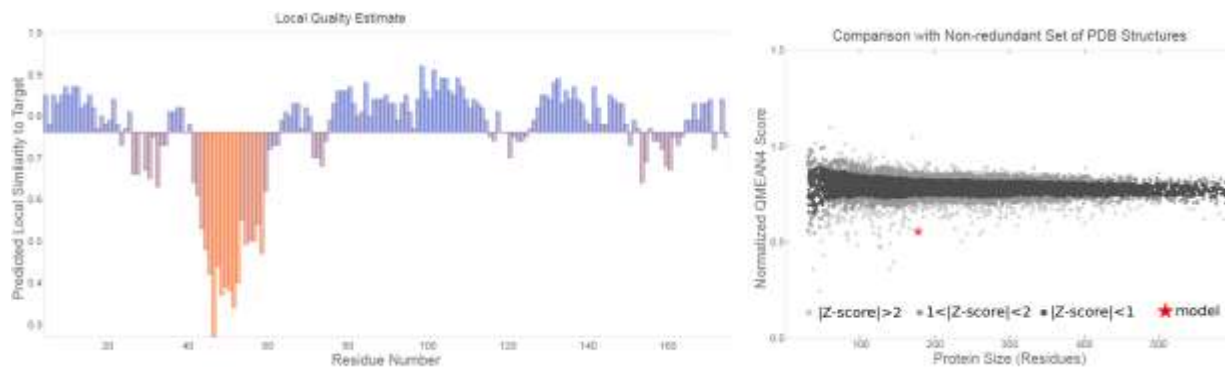
بررسی ساختار سوم با روش همولوژی مدلینگ و

نمایش سه بعدی پروتئین: از آنجایی که ساختار پروتئین

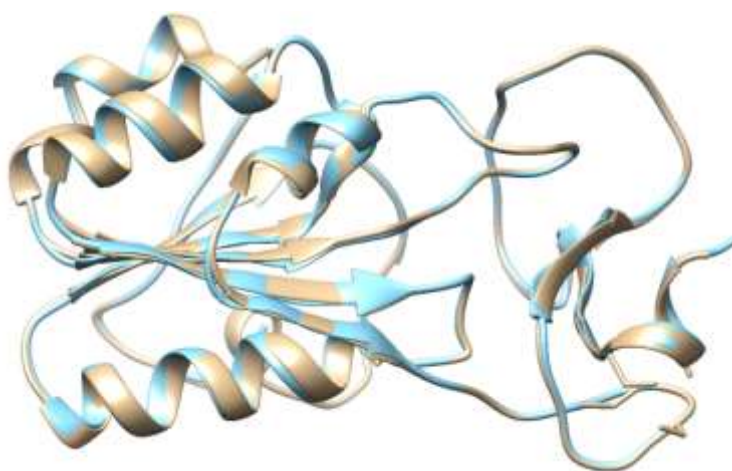
توسط کریستالوگرافی اشعه ایکس یا رزونانس مغناطیسی هسته ای تعیین نشده است، ساختار سوم این پروتئین با استفاده از یک روش مبتنی بر همولوژی مدلینگ تعیین شد (۱). مدل‌سازی ساختار سوم براساس انتخاب یک الگو با شباهت بالا با پروتئین هدف با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Swiss Model انجام شد. الگوی منتخب برای مدل‌سازی پروتئین کیناز برای آبله میمونی، پروتئین تیمیدین کیناز واکسینا ویروس (PDB ID: 2J87) با ۱۷۷ آمینواسید می‌باشد. درصد هویت (percentage identity) الگوی 2J87 با پروتئین هدف ۹۳/۷۹ درصد و مقدار E-value ۳-e-۱۲۱ می‌باشد که هویت توالی (sequence identity) ۹۳/۹۰ درصد به دست آمده از همولوژی مدلینگ را تأیید می‌کند. با توجه به میزان شباهت بالای الگوی 2J87 با پروتئین هدف این احتمال وجود دارد که مدل‌سازی به صورت مناسبی انجام شده است.

اعتبارسنجی و ارزیابی مدل پروتئین تیمیدین کیناز:

ارزیابی مدل پیشنهادی شده در Swiss Model بر اساس شاخص‌های Global Model quality Estimation (GMQE) و GMEAN می‌باشد. تابع QMEAN، یک تابع حسابی مرکب برای ارزیابی کیفیت ساختار کلی و آمینواسید ساختار مدل‌سازی شده می‌باشد. نمودار کیفیت برای هر آمینواسید در مدل (محور X) شباهت مورد انتظار به ساختار طبیعی (Native structure) (محور Y) را نشان می‌دهد. به طور معمول، آمینواسیدهایی که اسکور زیر ۰/۶ را نشان بدهند، از کیفیت پایینی برخوردار هستند. GMQE، یک ارزیابی کیفی است که خصوصیات همترازی مدل الگو را ترکیب می‌کند. بر این اساس، مقادیر GMQE و QMEAN برای مدل پیش‌بینی شده تیمیدین کیناز به ترتیب برابر با ۰/۸۱ و ۰/۸- می‌باشد. همچنین در شکل ۳ شاخص‌های Local Quality Estimate و Comparison نیز بیان‌گر شباهت ترکیب مدل سه‌بعدی بدست آمده توسط سرور Swiss Model براساس الگوی توالی پروتئین تیمیدین کیناز مورد مطالعه می‌باشد.



شکل ۳- ارزیابی شاخص‌های Local Quality Estimate و Comparison ساختار سوم پروتئین تیمیدین کیناز توسط سرور Swiss Model



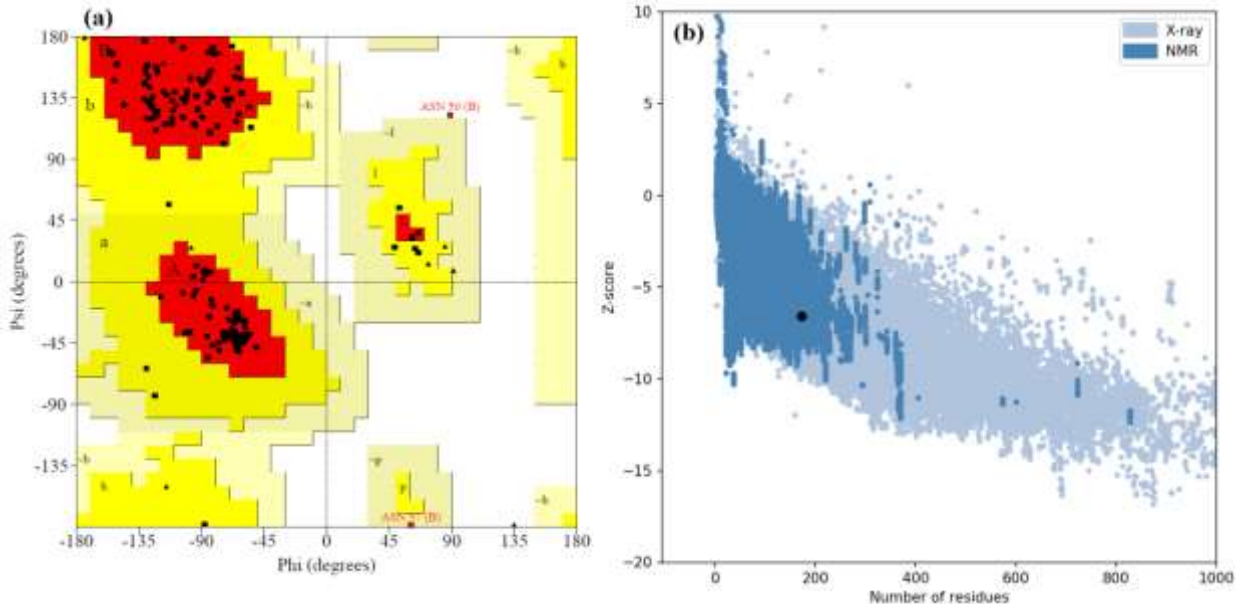
شکل ۴- هم‌ردیفی ساختاری دو ساختار پروتئین الگو و مدل‌سازی شده که بر روی هم منطبق شده‌اند. ساختار الگو با رنگ آبی و ساختار مدل‌سازی شده با رنگ برنزه

نماید. نمودار رامچاندردان زاویه‌ی Φ بر حسب Ψ را در ساختار پروتئین نشان می‌دهد. زنجیره‌های کناری بلندتر سبب محدودیت احتمالات نمی‌گردد و در نمودار رامچاندردان ناحیه‌ی مربوط به این زنجیره‌ها کوچکتر نمی‌گردد. در عمل گروه متیلن در موقعیت β سبب محدودیت می‌شود و زاویه‌ی Ψ بر حسب Φ برای آمینواسیدها محدوده کوچکتری را در بر می‌گیرد (۲۴). نتایج نشان دادند که در مدل تیمیدین‌کیناز ۹۱ درصد آمینواسیدها در منطقه ایده‌آل، ۷/۷ درصد در منطقه قابل‌قبول (۱/۳ درصد) را با چشم‌پوشی از خطا می‌توان قابل‌قبول در نظر گرفت) و صفر درصد در منطقه غیرقابل‌قبول می‌باشد (شکل ۵a) و این بدان معنی است که مدل کیفیت بالایی دارد و قابل‌قبول

همچنین، شاخص Root-Mean-Square-Deviation (RMSD) میزان انحراف دو ساختار را از یکدیگر نشان می‌دهد که مقدار RMSD هر چه کمتر باشد نشان‌دهنده انحراف کمتر این ساختارها از یکدیگر است. پس از هم‌ردیفی ساختاری برای ساختار مدل شده و الگو مقدار RMSD بین دو مدل \AA ۰/۳۴۶ گزارش شده است که نشان‌دهنده عدم انحراف در ساختار پروتئین مدل‌شده با ساختار الگو است (شکل ۴) (۳۹).

کیفیت ساختار مدل شده با استفاده از نمودار رامچاندردان و سرور Pro-SA اعتبارسنجی شد. نمودار رامچاندردان با محاسبه درصد آمینواسیدهای قرار گرفته در نواحی ایده‌آل، قابل‌قبول و غیرقابل‌قبول، کیفیت مدل ورودی را تعیین می‌-

پروتئین بدست‌آمده از کریستالوگرافی و یا NMR (ناحیه رنگی) باشد. ارزش Z-score برای مدل ۶/۴۸- برآورد شده است و نشان می‌دهد که ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی شده از کیفیت بالایی برخوردار است (شکل ۵b).



شکل ۵- (a) نمودار رامچاندردان ساختار تیمیدین‌کیناز مدل‌سازی شده. ناحیه کاملاً سفید ناحیه غیرقابل قبول است و هر نقطه قرمز رنگ در نمودار نشان‌دهنده یک آمینواسید با زاویه فی و سای می‌باشد، (b) نمودار Pro-SA برای نتیجه ارزیابی ساختار پروتئین تیمیدین‌کیناز مدل‌سازی شده

به غیر از ترکیبات carmalol، epigallocatechin gallate و phloroethol از قانون لیبینسکی پیروی می‌کنند.

همچنین، ترکیبات فنولیک از لحاظ خصوصیات فیزیکوشیمیایی دیگر و پارامترهای فارماکوکیتیک مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۲). Logs میزان حلالیت ماده را نشان می‌دهد که میزان بالای صفر آن، نشان دهنده حلالیت بالا و میزان کمتر از ۱۰-، نشان دهنده نامحلول بودن ماده مورد نظر است. فاکتور مهم دیگری که نقش مستقیمی در نفوذپذیری ترکیبات زیست فعال دارد مساحت‌های قطبی مولکول (TPSA) می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام شده، نفوذپذیری ترکیبات با افزایش جرم ماده و کاهش Polar Surface Area (PSA) بیشتر می‌شود. ترکیباتی که PSA بزرگتر از ۱۴۰ آنگستروم دارند فاقد نفوذپذیری مناسب می‌باشند.

است. سرور Pro-SA با استفاده از برآورد Z-score انرژی کلی را برای مدل پروتئین محاسبه می‌کند. روش Pro-SA مجموع فولد صحیح و غیر صحیح را به طور جداگانه و دقیق حساب می‌کند و این سرور کیفیت مدل پروتئینی را محاسبه کرده و باید کیفیت پروتئین در محدوده کیفیت

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پارامترهای

فارماکوکیتیک: براساس قانون لیبینسکی و تعریف قانون ۵ تایی، پیش بینی قابل جذب بودن ترکیبات از راه خوراکی بر اساس وزن مولکولی، فاکتور چربی‌دوستی و تعداد اتم‌های دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی ارائه می‌شود. Logp، میزان لیپوفیلیسیتی ماده را نشان می‌دهد که می‌بایست بین ۱ الی ۵ باشد، پس، هر اندازه میزان آن از ۵ بزرگتر باشد میزان چربی‌دوستی ماده بیشتر و جذب گوارشی آن کمتر خواهد بود. توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی پارامتر دیگری برای نفوذپذیری دارو است، که برای جذب ایده‌آل تعداد دهندگان پیوند هیدروژنی و پذیرندگان پیوند هیدروژنی باید به ترتیب کمتر از ۵ و ۱۰ باشد. نتایج به دست آمده از قانون لیبینسکی با توجه به پایگاه SwissADME در جدول ۱ آورده شده است. طبق این نتایج، تمام ترکیبات فنولیک

جدول ۱- پارامترهای لیپینسکی داروی استاندارد و ترکیبات فنولیک

Lipinski	Logp	دهندگان پیوند هیدروژنی	پذیرندگان پیوند هیدروژنی	وزن مولکولی	نام ترکیب
بله	۲/۶۲	۵	۶	۲۸۷/۲۴	Anthocyanidin
بله	۰/۹۷	۳	۴	۱۸۰/۱۶	Caffeic acid
خیر	۲/۸۴	۱۱	۱۵	۶۳۴/۵۰	Carmalol
بله	۱/۴۷	۵	۶	۲۹۰/۲۷	Catechin
بله	۰/۹۶	۶	۹	۳۵۴/۳۱	Chlorogenic acid
بله	۰/۹۵	۲	۳	۱۶۴/۱۶	p-coumaric acid
بله	۳/۲۷	۶	۸	۳۶۸/۳۸	Curcumin
بله	۱/۴۷	۵	۶	۲۹۰/۲۷	EC
بله	۱/۷۸	۶	۹	۳۷۲/۲۸	Eckol
خیر	۱/۸۷	۸	۱۱	۴۵۸/۳۷	Epigallocatechin gallate
بله	۰/۹۸	۶	۷	۳۰۶/۲۷	Epigallocatechin
بله	۰/۹۲	۹	۹	۳۷۴/۳۰	Fucol
بله	۱/۷۲	۸	۹	۳۷۴/۳۰	Fucophloretol A
بله	۰/۷۹	۶	۷	۲۶۶/۲۰	Fuhalol
بله	۰/۲۱	۴	۵	۱۷۰/۱۲	Gallic acid
بله	۱/۲۸	۳	۳	۱۵۴/۱۶	Hydroxytyrosol
بله	۲/۵۳	۰	۱	۲۰۸/۲۶	Isorhamnetin
خیر	۲/۳۳	۸	۱۲	۴۹۶/۳۸	Phloroethol
بله	۱/۷۱	۳	۳	۲۲۸/۲۴	Resveratrol
بله	۱/۱۷	۵	۸	۳۶۰/۳۱	Rosmarinic acid
بله	۰/۱۶	۴	۶	۲۵۵/۲۳	Ganciclovir

جذب پوستی باید برآیندی از فاکتورهای ذکر شده را در نظر گرفت. براساس جدول ۲، داروی گانسیکلوویر دارای حلالیت و نفوذپذیری مناسبی می‌باشد و اما جذب گوارشی پایین دارد و قابلیت مصرف خوراکی ندارد. همچنین، مشاهده شد که از میان ترکیبات فنولیک، carmalol، fucol، epigallocatechin gallate، fucophloretol A و phloroethol با داشتن حلالیت نسبی، نفوذپذیری نامناسب و جذب گوارشی کم، قابلیت مصرف خوراکی نداشته و می‌بایست به صورت تزریق وریدی استفاده شوند و

سیتوکروم‌ها از آنزیم‌های مهم در بدن هستند که بطور عمده در کبد و روده یافت می‌شوند و مولکول‌های آلی خارجی مانند سموم یا داروها را اکسید می‌کنند تا بتوانند از بدن خارج شوند. بنابراین بررسی این سیتوکروم‌ها در جذب و اثربخشی دارو بسیار موثر است و چنانچه ترکیب کاندید شده، مهارکننده این سیتوکروم‌ها نباشد می‌توان عنوان کرد که دارو قابلیت جذب گوارشی خوبی دارد و بصورت خوراکی قابل مصرف می‌باشد. در نهایت برای اثربخشی یک دارو به صورت خوراکی، تزریق وریدی یا

برهمکنش هیدروفوبی و arene-H ذکر شده است. آمینواسیدهای مهمی که در جایگاه فعال با مهارکننده‌ها برهمکنش دارند عبارتند از Met13-Ser18، Tyr40-Lys39، Asp82، His53، Thr52، Leu50، Thr48، Asn42-Arg45، Ser148، Phe118، Gly111-Phe113، Leu109، Glu83 و Ile157-Gly162 و Arg150

بررسی خصوصیات بیولوژی ترکیبات فنولیک: مطالعات طراحی دارو، PASS را به عنوان یک ابزار محبوب استفاده شده در تقریباً هر صنعت دارویی با توجه به تجزیه و تحلیل رابطه ساختار-فعالیت در نظر گرفته‌اند. امتیاز پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیکی را بر اساس نسبت احتمال فعال بودن ((Pi)) (Prediction of activity (Pa)) و احتمال غیرفعال بودن ((Pi)) (Probable inactivity) می‌دهد. Pa بالاتر به این معنی است که فعالیت بیولوژیکی احتمال بیشتری برای یک ترکیب دارد. علاوه بر این، محققان طیف‌های فعالیت بیولوژیکی ترکیبات *rosmarinic acid* و *gallic acid*، *curcumin*، *caffeic acid* را شناسایی کردند که در پایگاه داده PASS ذخیره شده‌اند. جدول ۴ نتایج پیش‌بینی دوازده فعالیت بیولوژیکی را برای ترکیبات فنولیک انتخاب شده نشان می‌دهد. شایان ذکر است، نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده کاربرد عمده طرح PASS برای پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیکی *caffeic acid*، *curcumin*، *gallic acid* و *rosmarinic acid* بر اساس ساختار فنولی ترکیبات مربوطه است که با ضریب پیش‌بینی متوسط برابر با ۰/۸۰ (Pa در محدوده ۰/۲۰۹ تا ۰/۹۵۶ است، هنگامی که $Pa > Pi$) برای این ترکیبات نشان داده شده است.


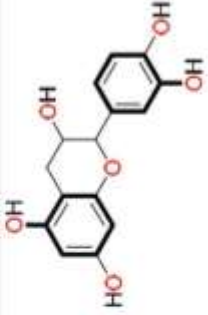
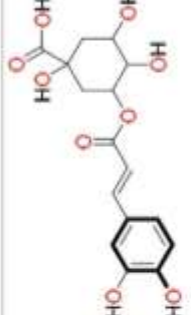
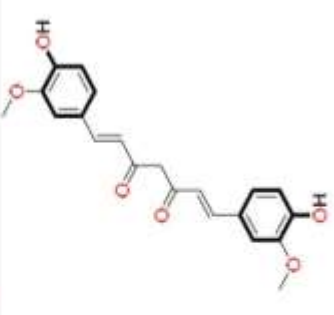
پیش‌بینی هدف: مطالعات هدف مولکولی برای یافتن عوارض جانبی فنوتیپی یا واکنش متقابل بالقوه ناشی از عمل ترکیبات *rosmarinic acid*، *gallic acid*، *curcumin*، *caffeic acid* بر روی پروتئین‌ها به عنوان بهترین ترکیبات فنولیک مهم هستند. شکل ۶، درصد زیست‌فعالی ترکیباتی با اثر مهاری بهتر را با توجه به اهداف پروتئینی انتخاب شده نشان می‌دهد.

همچنین ترکیبات *rosmarinic acid* و *eckol* با جذب گوارشی پایین و ترکیب *chlorogenic acid* با نفوذپذیری پایین، قابلیت مصرف خوراکی ندارند و باید به صورت تزریق وریدی استفاده شوند، اما دیگر ترکیبات بررسی شده در جدول با داشتن حلالیت و نفوذپذیری مناسب و جذب گوارشی بالا، قابلیت مصرف خوراکی دارند. به خاطر ایمن بودن بیشتر، میزان نفوذ سد خونی- مغزی، فعالیت سیستم عصبی- مرکزی و خطر سمیت ترکیبات نیز محاسبه شد. مغز توسط سد خونی-مغزی از گردش سیستمیک محافظت می‌کند. همه ترکیبات فنولیک به غیر از *p-coumaric acid* و *resveratrol* بر سیستم عصبی- مرکزی غیرفعال بودند، لذا اختلالی روی سیستم عصبی- مرکزی ایجاد نمی‌کنند و محدوده نرمالی را نشان دادند، همچنین پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات نشان داد که فقط ترکیبات *fuco*، *hydroxytyrosol* و *resveratrol* دارای خطرات سمیت جهش-زا و تومورزا، سمیت کبدی و حساسیت پوستی می‌باشند. بنابراین بیشتر ترکیبات طبیعی فنولی انتخاب شده، خواص فارماکوکینتیکی و فیزیوشیمیایی مناسبی را از خود نشان دادند.

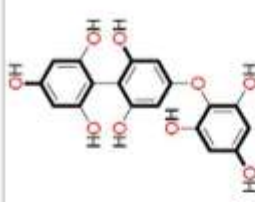
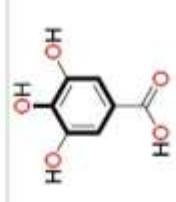
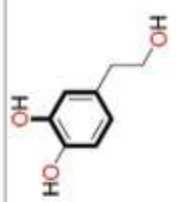
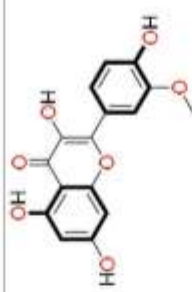

داکینگ مولکولی: داکینگ مولکولی یک روش بیوانفورماتیکی است که جهت‌گیری مطلوب لیگاند را هنگام برهمکنش با یک ماکرومولکول زیستی (گیرنده، آنزیم و یا اسیدنوکلئیک) پیش‌بینی می‌کند و یک کمپلکس پایدار را تشکیل می‌دهد (۲، ۲۳). ساختار سه‌بعدی ترکیبات فنولیک و داروی استاندارد در جایگاه فعال آنزیم تیمیدین‌کیناز داک شدند. نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی میان آنزیم تیمیدین‌کیناز با هرکدام از ترکیبات فنولیک و داروی استاندارد در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اکثر ترکیبات فنولیک، با توجه به انرژی حاصل از برهمکنش لیگاند-گیرنده، اتصال مناسبی با آنزیم مذکور دارند و در جدول مهمترین آمینواسیدهای درگیر در جایگاه فعال آنزیم و کلیه برهمکنش‌های لیگاندها شامل پیوندهای هیدروژنی،

جدول ۳- انرژی اتصال و برهمکنش‌های موجود بین ترکیبات مورد مطالعه و آمینواسیدهای جایگاه فعال پروتئین تیمپین-کیناز

برهمکنش arene-II, Arene-cation	برهمکنش‌های هیدروفوب	پیوند هیدروژنی	انرژی آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول)	نام ترکیب	ساختار
Ser18	Ile160, Met13, Leu14, Phe86, Phe118, Leu109	Lys17, Asp82, Glu83, ile159	-۱۲/۶۵	Anthocyanidin	
His53	Met13, Leu14, Ser18, Asn42, Asp43, Arg45	Lys17, Asn44, Asp82	-۱۱/۰۵	p-Coumaric acid	
Ser18	Leu14, Phe86, ile160, Asn142, Asp82, Tyr166	Met13, Lys17, Glu83, Gly161	-۱۶/۲۸	Caffeic acid	

	Leu14, Glu83, Gly162, Tyr46, Thr48, Lys17, Ser18	Met13, Asp44, Gly47, Asp82	-14/44	Carmalol	
	Pro12, Met13, Leu14, Leu50, Asp43, Asn42, Asp82, Gly16	Lys17, Glu83, Ser148, Gly162	-14/47	Catechin	
Lys17	Ile157, Phe118, Glu158, Tyr166, Phe86, Leu14, Phe113, Phe118, Glu83, Ser18	Met13, Thr112, Ser148, Arg150, Ile159, Ile160, Gly161	-17/47	Chlorogenic acid	
Ser18, Phe118	Met13, Leu50, Ile159, Phe113, Leu109, Asp43, Ser148, Glu158	Lys17, Glu83, Ile157	-17/47	Curcumin	

Val370, Cys437	Val373, Pro429, Leu372, Phe430, Leu477, Phe134, Trp224	Arg115, Met374,	-۱۳/۶۱	EC	
-	Met13, Leu14, Leu50, Ile159, Leu109, gly162, Phe86, Ile160, Asp82	Lys17, Ser18, Asn44	-۱۳/۶۲	Eckol	
Ser18	Pro12, Leu14, Met13, Leu50, Leu109, Asp43, Arg45, Gly161	Lys17, Asp82, Glu83, Gly162	-۱۳/۸۰	Epigallocatechin gallate	
Ser18	Asp43, Leu50, Leu14, Pro12, Met13, Gly161, Asp43, His53	Lys17, Glu83, Gly162	-۱۳/۸۱	Epigallocatechin	

Cys437	Phe113, Ile157, Phe118, Leu109, Leu14, Phe86, Asn42, Glu83, Ile160, Ile159	Met13, Lys17, Asp82	-11/6*	Fucophloretinol A	
-	Pro12, Leu14, Asp43, Leu109, Glu83	Met13, Lys17, Asp82, Gly161	-15/6*	Gallie acid	
Phe118	Phe113, Leu109, Phe86, Ile160, Ile159, Tyr166, Ser18, Glu83, Asp43	Met13, Lys17, Asn42, Asp82	-11/11	Hydroxytyrosol	
-	Ile160, Met13, Leu109, Phe118, Ile159, Phe113, Lys17, Asn42, Arg150, Phe86	Asp82, Ile157, Gly161	-13/33*	Isorhamnetin	
Ile160	Leu14, Met13, Leu50, Ser18, Lys17, Asp43, Gly162, Glu83	Asn42, Asp82	-17/17*	Phloroethol	

Lys17	Phe118, Leu109, Phe86, Ile157, Glu83, Ser18, Met13, Ile159, Leu14	Gly161	-۱۳/۸۷	Resveratrol	
Ser18	Leu50, Ile160, Ile150, Leu109, Met13, Phe86	Lys17, Leu14, Asp43	-۱۶/۳۷	Rosmarinic acid	
-	Phe118, Leu109, Ile159, Ile160, Met13, Phe86, Leu14	Lys17, Ser18, Gly161	-۱۱/۳۵	Ganciclovir	

جدول ۴- نتایج پیش‌بینی PASS از فعالیت‌های بیولوژیکی ترکیبات rosmarinic acid و gallic acid, curcumin, caffeic acid

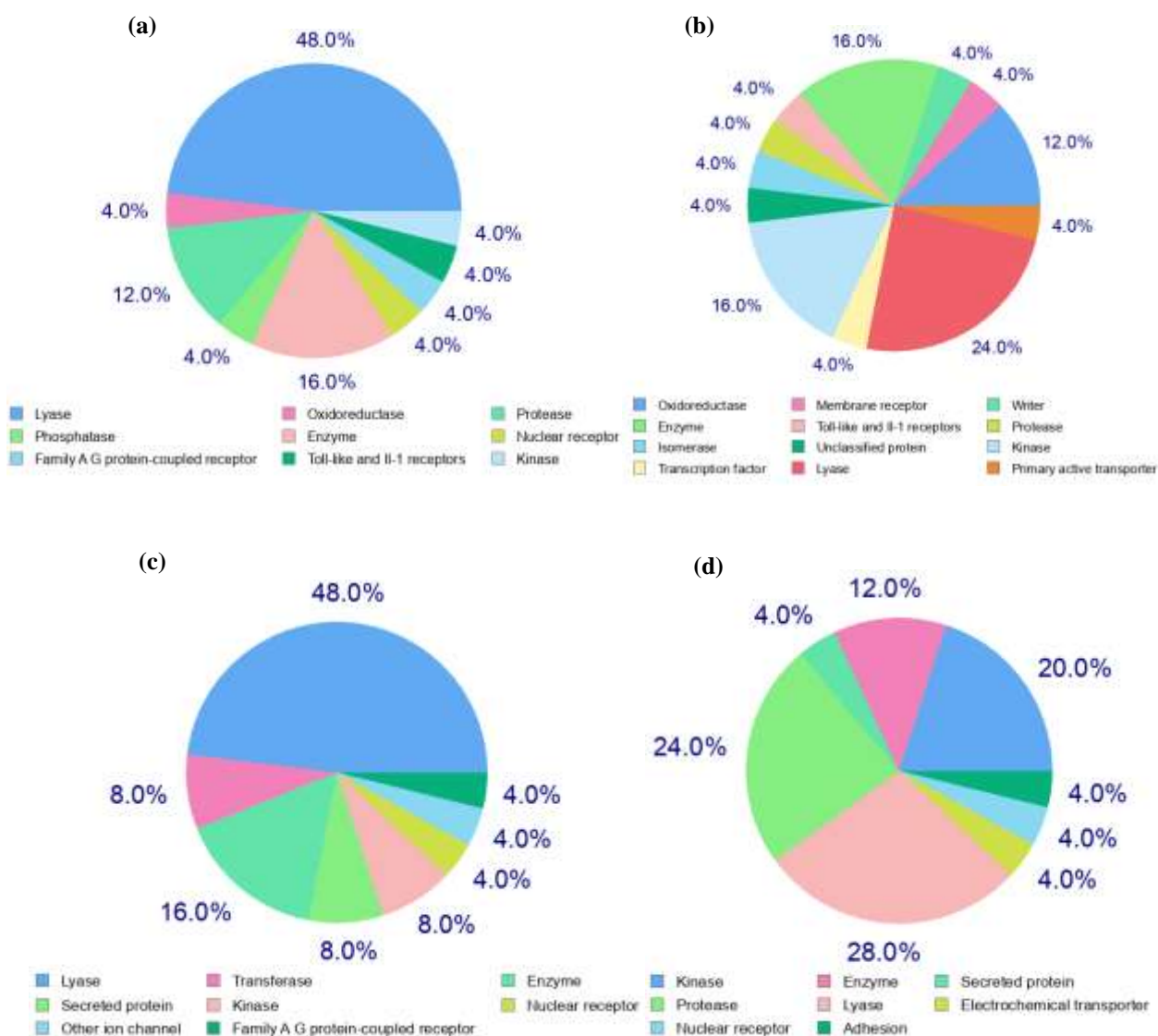
Rosmarinic acid		Gallic acid		Curcumin		Caffeic acid		فعالیت بیولوژیکی	ردیف
Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi		
۰/۹۵۶	۰/۰۰۳	۰/۸۹۰	۰/۰۱۴	۰/۸۸۷	۰/۰۱۴	۰/۹۵۵	۰/۰۰۳	Membrane integrity agonist	۱
۰/۶۶۶	۰/۰۱۲	۰/۷۳۲	۰/۰۰۵	۰/۸۲۶	۰/۰۰۳	۰/۷۹۹	۰/۰۰۴	HMOX1 expression enhancer	۲
۰/۶۸۶	۰/۰۲۲	۰/۷۱۲	۰/۰۱۹	۰/۶۲۱	۰/۰۳۰	۰/۸۴۱	۰/۰۰۹	HIF1A expression inhibitor	۳
۰/۳۹۷	۰/۰۵۳	۰/۵۱۳	۰/۰۲۶	۰/۳۱۷	۰/۰۹۱	۰/۵۰۸	۰/۰۲۷	Histidine kinase inhibitor	۴
۰/۲۹۳	۰/۰۹۷	۰/۹۰۱	۰/۰۰۴	۰/۶۲۳	۰/۰۲۸	۰/۶۱۰	۰/۰۳۱	Aldehyde oxidase inhibitor	۵
۰/۷۲۲	۰/۰۰۵	۰/۵۹۷	۰/۰۱۰	۰/۸۱۴	۰/۰۰۴	۰/۸۴۵	۰/۰۰۳	Antimutagenic	۶
۰/۷۷۹	۰/۰۲۴	۰/۸۱۴	۰/۰۱۵	۰/۸۱۶	۰/۰۱۴	۰/۹۴۵	۰/۰۰۳	Mucomembranous protector	۷
۰/۶۳۲	۰/۰۴۱	۰/۷۱۸	۰/۰۲۳	۰/۶۷۱	۰/۰۳۲	۰/۷۷۶	۰/۰۱۴	TP53 expression enhancer	۸
۰/۵۵۸	۰/۰۱۲	۰/۴۰۶	۰/۰۲۲	۰/۶۹۲	۰/۰۰۷	۰/۵۵۱	۰/۰۱۲	Chemopreventive	۹
۰/۴۹۶	۰/۰۰۸	۰/۶۸۰	۰/۳۳۷	۰/۶۷۷	۰/۰۱۹	۰/۶۵۱	۰/۰۲۳	Antiinflammatory	۱۰
۰/۳۹۹	۰/۰۹۲	۰/۶۸۱	۰/۴۷۶	۰/۳۲۶	۰/۲۰۱	۰/۳۸۹	۰/۱۰۳	Antiviral (Rhinovirus)	۱۱
۰/۴۸۱	۰/۰۲۲	۰/۵۰۴	۰/۰۲۰	۰/۴۶۹	۰/۰۲۳	۰/۴۶۱	۰/۰۲۴	Hepatoprotectant	۱۲
۰/۲۶۸	۰/۱۱۹	۰/۵۲۲	۰/۰۰۵	۰/۲۰۹	۰/۱۹۶	۰/۳۶۹	۰/۰۴۳	Antiviral (Adenovirus)	۱۳
۰/۳۲۷	۰/۱۸۷	۰/۵۸۲	۰/۰۲۳	-	-	۰/۵۰۸	۰/۰۴۷	Antiviral (Picornavirus)	۱۴

شوند، کیناز، اکسیدوردوکتاز، آنزیم‌ها، پروتئازها و لیازاها هستند که واکنش دارویی را بر این اساس تحریک می‌کنند. همچنین، این تجزیه و تحلیل توضیحی برای استفاده rosmarinic acid و gallic acid, curcumin, caffeic acid به- عنوان مهارکننده‌های تیمیدین‌کیناز ارائه می‌کند.

بحث

تیمیدین‌کیناز در ویروس آبله میمونی، پروتئینی است که توسط این ویروس کدگذاری شده و دارای فعالیت فسفریله کننده تیمیدین است. تیمیدین‌کینازها نقش کلیدی در سنتز DNA و بنابراین در تقسیم سلولی دارند، زیرا بخشی از زنجیره واکنش برای وارد کردن تیمیدین به DNA هستند. بنابراین، آبله‌میمونی را می‌توان با مهار سنتز DNA با کمک مهارکننده‌های تیمیدین‌کیناز درمان کرد.

تجزیه و تحلیل نمودارهای دایره‌ای نشان داد که پروتئازها، لیازاها، کینازها، آنزیم‌ها و گیرنده هسته‌ای اهداف اصلی پیش‌بینی شده برای همه ترکیبات پیشنهادی بودند. همچنین نمودار دایره‌ای caffeic acid، ۴ درصد گیرنده‌های جفت- شده با پروتئین خانواده A، اکسیدوردوکتازها، فسفاتازها و گیرنده‌های ایتترلوکین ۱ را پیش‌بینی کرد. برای curcumin، نمودار دایره‌ای ۱۲ درصد اکسیدوردوکتازها، ۴ درصد ایزومراز، فاکتور رونویسی، گیرنده غشایی، ناقل فعال اولیه و گیرنده‌های ایتترلوکین ۱ را نشان داد. برای gallic acid، نمودار دایره‌ای ۸ درصد ترانسفراز و پروتئین ترشحی و ۴ درصد گیرنده‌های جفت شده با پروتئین خانواده A و کانال یونی را پیش‌بینی کرد و نمودار دایره‌ای برای rosmarinic acid، ۴ درصد ناقل الکتروشیمیایی، پروتئین ترشحی و چسبندگی را پیش‌بینی کرد. مکان‌های احتمالی هدف که ممکن است ترکیبات فنولیک انتخاب شده به آن‌ها متصل



شکل ۶-۲۵ هدف پیش‌بینی شده برای ترکیبات (a) Caffeic acid، (b) Curcumin، (c) Gallic acid و (d) Rosmarinic acid

کریستالوگرافی به‌خصوص در مورد پروتئین‌های مانند تیمیدین‌کینازها که نقش‌های حیاتی در مسیرهای شناخته شده دارند، پیش‌گویی ساختار آن از طریق ابزار *in silico* به منزله میان‌بری برای مطالعات بعدی و بررسی جزئیات ساختاری آن خواهد بود. به عبارت دیگر طراحی یک لیگاند موثر برای فعال‌سازی یا مهار پروتئین در یک مسیر خاص، با شبیه‌سازی ساختار سوم آن پروتئین مقرون‌به-صرفه بوده و روند مطالعات را تسریع می‌کند. با توجه به نتایج ارزیابی کیفی مدل‌های ایجاد شده، می‌توان با ضریب

در روش مشابهت مدلینگ یا مدل‌سازی مقایسه‌ای، ساختمان پروتئین براساس مشابهت توالی با ساختمان‌های شناخته‌شده با روش‌های تجربی پیش‌بینی می‌شود، در حقیقت، روش یادشده براین اصل استوار است که اگر دو پروتئین مشابهت توالی زیادی داشته باشند، احتمالاً ساختمان سه‌بعدی بسیار مشابهی دارند. ساختار سه‌بعدی پروتئین منبع مهم اطلاعاتی برای درک بهتر عملکرد پروتئین و برهمکنش آن با اجزای دیگر (لیگاندها، پروتئین و ...) می‌باشد. به‌علت سختی و پرهزینه بودن فرایند

داروی گانسیکلوویر با آمینواسیدهای Ser18, Lys17 و Gly161 پیوند هیدروژنی و با آمینواسیدهای Phe118, Leu109, Ile160, Met13, Phe86 و Leu14 برهمکنش هیدروفوبی برقرار کرده است (شکل ۷e).

براساس جدول ۳، از میان ۲۰ ترکیب فنولیک، اثرمهارى ترکیبات caffeic acid, curcumin, gallic acid و rosmarinic acid به ترتیب با انرژی‌های مهارى ۱۶/۲۸-، ۱۷/۷۲-، ۱۵/۶۰- و ۱۶/۳۲- کیلوکالری برمول نسبت به داروی استاندارد بکاررفته بر روی تیمیدین‌کیناز قوی‌تر است. همچنین، دیگر ترکیبات فنولیک با انرژی‌های مهارى ۱۱/۰۵- تا ۱۴/۹۲- کیلوکالری برمول، اثر مهارى تقریباً بهتری نسبت به داروی استاندارد دارند. بنابراین می‌توان گفت اثر مهارى ترکیبات فنولیک بر روی تیمیدین‌کیناز نسبت به داروی استاندارد تقریباً بیشتر می‌باشد.

مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که در میان ترکیبات فنولیک، ترکیب caffeic acid به پروتئین تیمیدین‌کیناز با پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوبی متصل می‌گردد. استخلاف هیدروکسیل در کربن موقعیت ۴ و گروه کربوکسیلیک اسید ترکیب caffeic acid با آمینواسیدهای Lys17, Met13, Glu83 و Gly161 پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند و این گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیلیک اسید باعث افزایش میزان حلالیت این ترکیب می‌شوند و در صورت مصرف خوراکی برای انسان جذب گوارشی خوبی نشان می‌دهد. علاوه بر این، ترکیب caffeic acid قادر به ایجاد برهمکنش arene-H است که بین حلقه فنیل ترکیب با آمینواسید Ser18 ایجاد می‌گردد (شکل ۷a). این یک ترکیب تقریباً هیدروفیل با Logp برابر ۰/۹۷ می‌باشد و براساس ساختار، ترکیب caffeic acid با آمینواسیدهای Leu14, Ile160, Tyr166, Asp82 و Gly161 برهمکنش‌های هیدروفوبی تشکیل می‌دهد.

ترکیب curcumin به دلیل دارا بودن بخش‌های هیدروفیل (استخلاف هیدروکسیل و کربونیل) و هیدروفوب (حلقه

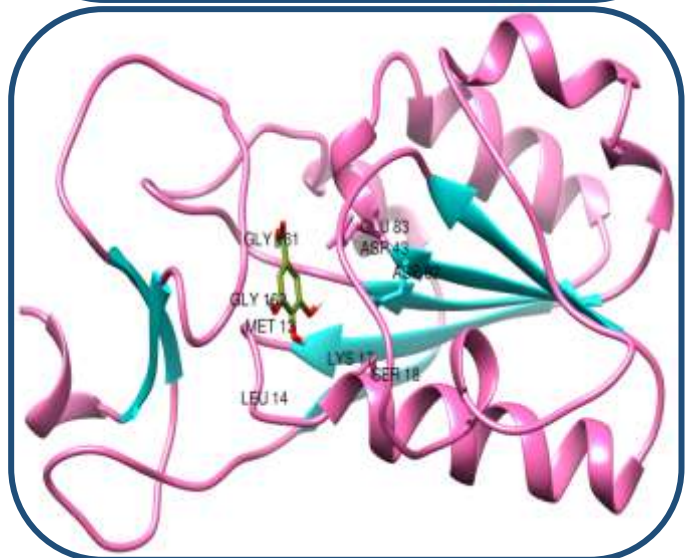
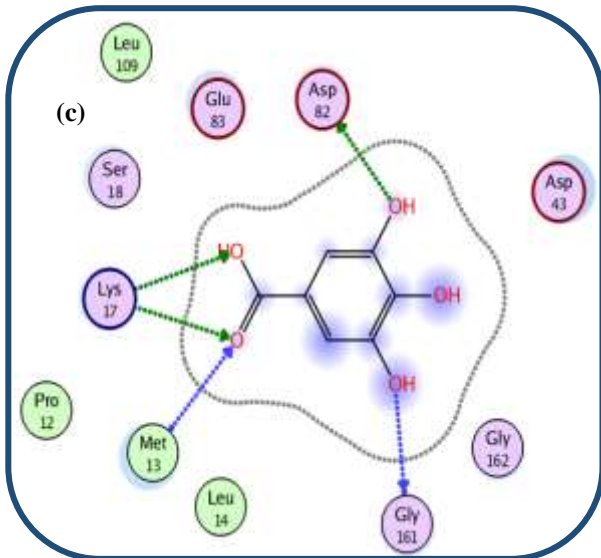
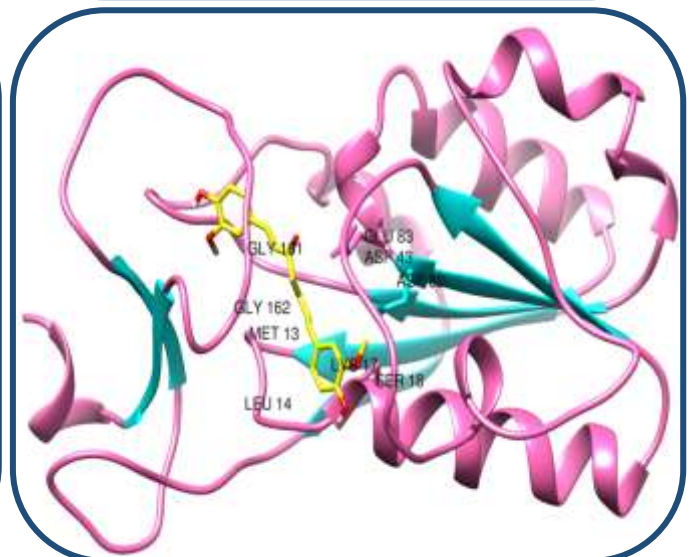
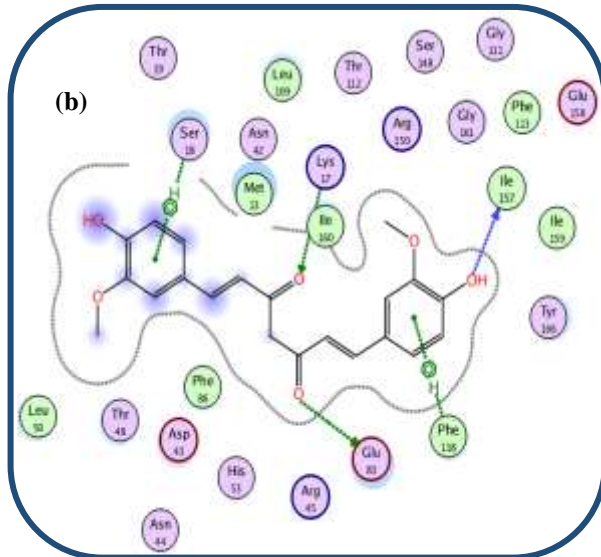
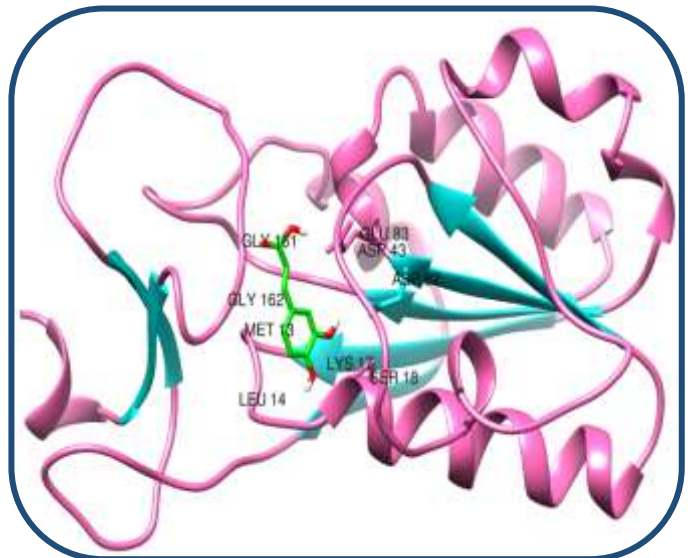
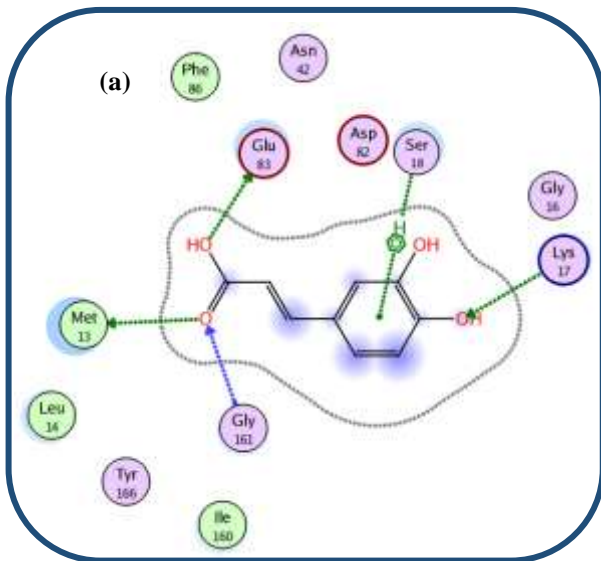
اظمینان بالای از این مدل‌ها در آنالیزها و طراحی‌های بعدی استفاده نمود. برای مقایسه دو ساختار مدل‌شده و الگو، همدردیفی ساختاری ساختاری براساس توپولوژی پروتئین (جهت‌گیری رشته‌ها و هلیکس‌ها) انجام شد. RMSD نسبتاً پایین گزارش شده نشان‌دهنده این است که ساختار پروتئین مدل‌شده مشابه ساختار پروتئین الگو می‌باشد.

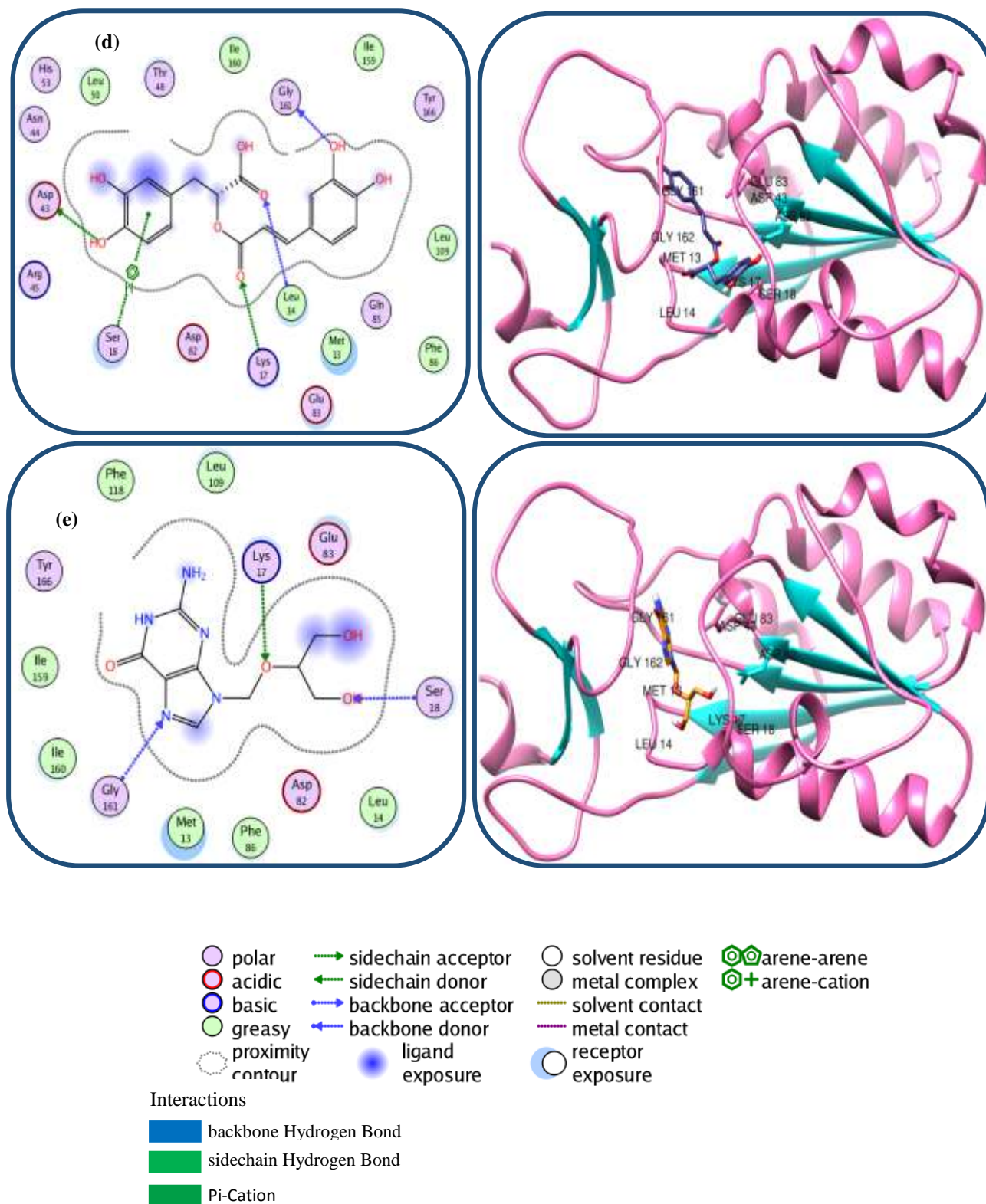
داکینگ مولکولی نشان دهنده یک رویکرد پرکاربرد برای بررسی حالت اتصال و تمایل اتصال لیگاندها به پروتئین‌های هدف است (۲۲) و برای بررسی برهمکنش پروتئین تیمیدین‌کیناز و ترکیبات فنولیک مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، پس از مدل‌سازی پروتئین تیمیدین‌کیناز، مکانیسم مهارى ترکیبات فنولیک بر روی پروتئین مدل‌شده و نحوه برهمکنش این ترکیبات با جایگاه فعال تیمیدین‌کیناز در جستجوی مهارکننده‌های قوی و انتخابی مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج این بررسی‌ها نشان داد که ترکیبات مورد مطالعه می‌توانند با اتصال به جایگاه فعال آنزیم تیمیدین‌کیناز موجب مهار آن گردند. همچنین، نتایج داکینگ نشان داد که تمامی ترکیبات مورد مطالعه عملکرد خوبی داشته و انرژی مهارى قابل قبولی دارند و می‌توانند در درمان آبله‌میمونی مفید باشند.

پس از پیش‌بینی و ارزیابی مدل پروتئین، بررسی نتایج داکینگ ترکیبات فنولیک نشان داد که تمام ترکیبات، فضای مشابهی را درون جایگاه فعال پروتئین اشغال می‌کنند. براساس نتایج جدول ۳ و شکل ۸، دو معیار مهم در تعیین بهترین حالت داک شده، بیشترین (منفی‌ترین) انرژی اتصال آزاد تخمین‌زده شده و همچنین بیشترین برهمکنش‌های مناسب با آمینواسیدهای اصلی جایگاه فعال تیمیدین‌کیناز می‌باشند. نتایج حاصل از بررسی داروی استاندارد بکار رفته به عنوان کنترل مثبت در جدول شماره ۴، حاکی از برهمکنش گانسیکلوویر با انرژی مهارى ۱۱/۳۵- کیلوکالری برمول با جایگاه فعال پروتئین تیمیدین‌کیناز بود.

برای ترکیب gallic acid، نتایج داکینگ نشان داد که برهمکنش‌های عمده این ترکیب مشابه caffeic acid و curcumin از نوع برهمکنش‌های هیدروفوب و پیوند هیدروژنی می‌باشند. Gallic acid توانایی تشکیل ۵ پیوند هیدروژنی توسط استخلاف‌های هیدروکسیل کربن‌های ۳، ۴ و ۵ حلقه فنیل و گروه کربوکسیلیک‌اسید با آمینواسیدهای Met13، Lys17، Asp82 و Gly161 را دارد (شکل Vc). این ترکیب به دلیل وجود حلقه فنیل و استخلاف‌های هیدروکسیل در ساختار خود مشابه با caffeic acid و curcumin اثر ضدویروسی خوبی را نشان می‌دهد و دارای ساختار قابل انعطاف‌پذیر است و برهمکنش‌های مناسبی با آمینواسیدهای جایگاه فعال دارد که احتمالاً کانسروم مناسب در فضای سه بعدی جایگاه فعال، باعث افزایش این برهمکنش‌ها شده است. مقدار لیوفیلیسیته gallic acid (Logp برابر ۰/۲۱) تقریباً برابر با لیوفیلیسیته caffeic acid است و به دلیل عدم وجود استخلاف‌های متوکسی و پیوندهای دوگانه و حلقه‌های فنیل کمتر انرژی اتصال کمتری نسبت به caffeic acid و curcumin نشان می‌دهد. ترکیب rosmarinic acid یک ترکیب فنولی گیاهی است که به واسطه ایجاد پیوندهای هیدروژنی زیاد سبب مهار فعالیت تیمیدین‌کینازی ویروس می‌شود. این ترکیب علاوه بر برهمکنش‌های هیدروفوب با آمینواسیدهای Leu50، Met13، Phe86، Thr48، Ile160، Leu109، Glu83، Ile159 و Phe113، سه پیوند هیدروژنی از طریق گروه کربوکسیلیک‌اسید و استخلاف‌های هیدروکسیل با آمینواسیدهای Lys17، Leu14، Asp43 و Gly161 تشکیل می‌دهد و یک برهمکنش arene-H با Ser18 برقرار می‌کند. این ترکیب مشابه ترکیبات caffeic acid و curcumin، احتمالاً با هیدروفیلیسیته مناسب (Logp برابر ۱/۱۷) و برقراری پیوندهای هیدروژنی از طریق استخلاف‌های هیدروکسیل جهت‌گیری فضایی مناسبی در جایگاه فعال پروتئین دارد و اثر مهاری قوی‌تری نسبت به داروی استاندارد نشان می‌دهد (شکل Vd).

فنیل) توانایی تشکیل پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوبی با آمینواسیدهای جایگاه فعال پروتئین را دارد و لازم به ذکر است که این حلقه‌های فنیل و زنجیره ۷ کربنه با پیوند دوگانه در موقعیت‌های ۱ و ۶ باعث افزایش لیوفیلیسیته ترکیب می‌شوند و لیوفیلیسیته ترکیب curcumin (Logp برابر ۳/۲۷) بیشتر از لیوفیلیسیته caffeic acid است می‌تواند روی برهمکنش‌های هیدروفوبی با تیمیدین‌کیناز تاثیر داشته باشد. همچنین، حلقه‌های فنیل، زنجیره ۷ کربنه و گروه‌های متوکسی ترکیب curcumin با آمینواسیدهای Phe113، Ile159، Phe80، Leu50، Met13، Glu158 و Tyr160 برهمکنش‌های هیدروفوبی تشکیل می‌دهند. Curcumin، در مقایسه با سایر ترکیبات فنولیک و داروی استاندارد اثر ضد تیمیدین‌کیناز و انرژی اتصال قوی‌تری را نشان می‌دهد. این ترکیب قادر به تشکیل پیوند هیدروژنی توسط گروه‌های کربونیل کربن‌های ۳ و ۵ و استخلاف‌های هیدروکسیل کربن ۴ حلقه فنیل با آمینواسیدهای Lys17، Glu83 و Ile157 می‌باشد. ترکیب curcumin نیز مشابه caffeic acid دارای برهمکنش arene-H بین حلقه‌های فنیل ترکیب و آمینواسیدهای Ser18 و Phe118 می‌باشد (شکل Vb). یکی از تفاوت‌های مهم این دو ترکیب در حلقه‌های فنیل و پیوندهای دوگانه است. در curcumin، دارای دو حلقه فنیل با استخلاف‌های هیدروکسیل و متوکسی در کربن موقعیت ۳ و ۴ و پیوندهای دوگانه در موقعیت‌های ۱ و ۶ می‌باشد، درحالی‌که ترکیب caffeic acid دارای یک حلقه فنیل با استخلاف‌های هیدروکسیل در کربن موقعیت ۳ و ۴ می‌باشد. بنابراین حلقه‌های فنیل و استخلاف‌های هیدروکسیل و متوکسی حلقه فنیل و گروه‌های کربونیل در curcumin بر روی جهت‌گیری فضایی ترکیب در جایگاه اتصال پروتئین موثر است و احتمالاً برای سیستم مفید است و این امر می‌تواند یکی از دلایل افزایش انرژی اتصال و افزایش اثر ضد ویروسی این ترکیب نسبت به caffeic acid شود.





شکل ۷- نمایش برهمکنش‌های مجموعه لیگاند-پروتئین به صورت دو بعدی و سه بعدی، (a) Caffeic acid، (b) Curcumin، (c) Gallic acid و (d) Rosmarinic acid و (e) Ganciclovir

همکاران (۲۰۲۲) به مطالعه ترکیبات جدید برای ویروس واریولا پرداختند و اظهار داشتند که سه ترکیب 3SG، 4SG و 6SG اتصال مناسبی با انرژی‌های آزاد اتصال $-71/9$ تا $-11/10$ کیلوکالری بر مول با تیمیدیلات کیناز ویروس واکسینیا دارند و دارای برهمکنش‌های اتصال گیرنده-لیگاند بالایی هستند (۱۹). علاوه بر این، Kwofie و همکاران (۲۰۲۱) به شناسایی و بررسی مکانیسم مهار گیاهان مربوط به اتنوفارماکولوژیک در برابر تیمیدین کیناز ویروس واریسلا-زوستر در بیماری آبله مرغان با استفاده از رویکردهای مختلف مانند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و داکینگ مولکولی پرداختند. نتایج نشان داده است که از ۶۵ ترکیب گیاهی بررسی شده، ۴۲ مورد از این ترکیبات دارای انرژی‌های اتصال کمتر از $-0/7$ کیلوکالری بر مول هستند، با این حال تنها ۲۰ مورد مشاهده شد که برهمکنش پیوند هیدروژنی با پروتئین دارند. این فعل و انفعالات با استفاده از تجزیه و تحلیل نتایج دینامیک مولکولی و داکینگ مولکولی با آمینواسید Ala134 که برای اتصال حیاتی پیش بینی شده بود، روشن شد (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر، همولوژی مدلینگ و مطالعات داکینگ مولکولی بر روی تیمیدین کیناز ویروس واریسلا زوستر (VZV) توسط Spadola و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد و نتایج این مطالعات منجر به یک مدل قابل اعتماد شد با توجه به ویژگی‌های اتصال این پروتئین که تفاوت‌های جزئی در نحوه اتصال تیمیدین کیناز VZV به بسترها در رابطه با تیمیدین کیناز HSV-1 وجود دارد، این تفاوت‌ها می‌توانند برای طراحی لیگاند به منظور دستیابی به داروهای انتخابی بیشتر برای مداخلات ضد ویروسی و ژن درمانی مورد استفاده قرار گیرند (۴۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه مشخص کرد که از میان ترکیبات فنولیک، ترکیبات caffeic acid، curcumin، gallic acid و rosmarinic acid به دلیل ویژگی‌های فارماکوکینتیکی مناسب و سمی

مطالعات داکینگ نشان داد که قرارداد برخی استخلاف‌ها بر روی قسمت‌های خاصی از این ترکیبات موجب ایجاد اتصالات هیدروفوبی یا پیوند هیدروژنی بین ترکیبات و گیرنده می‌شوند که این امر قدرت ترکیبات را افزایش می‌دهد. نتایج داکینگ مولکولی نشان می‌دهد که گروه‌های فنولی و استخلاف‌های هیدروکسیل و کربوکسیلیک‌اسید برای فعالیت مهار تیمیدین کیناز می‌توانند موثر باشند. همچنین، در بررسی نتایج بدست آمده، مشخص شد در مجموع، این ترکیبات کاندید شده فعالیت بیولوژیک، خواص فیزیوشیمیایی و اثر مهار خوب تا قوی را بر روی پروتئین تیمیدین کیناز نشان می‌دهند که نتایج داکینگ هم این فعالیت‌ها را تأیید می‌کند. علاوه بر این، بررسی برهمکنش‌های داکینگ حاکی از آن است که آمینواسیدهای Met13، Asp43، Asp82، Glu83، Phe118، Ile157، Gly161 و به‌ویژه آمینواسیدهای Lys17 و Ser18 نقش کلیدی در برهمکنش ترکیبات فنولیک با پروتئین تیمیدین کیناز دارند و می‌توان این‌طور استنباط کرد که تشکیل پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوب از عوامل مهم در مهار پروتئین تیمیدین کیناز می‌باشند.

در سال ۲۰۲۰ El-Halim و همکاران اثر ترکیب curcumin را با استفاده از داکینگ مولکولی در مهار پروتئین تیمیدین-کیناز ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) نشان دادند. نتایج نشان داد که ترکیب curcumin با انرژی اتصال $(-5/4)$ کیلوکالری بر مول) با آمینواسیدهای جایگاه فعال پروتئین از قبیل Glu225، Glu83، Gln125، Tyr101، Met128، Arg176، Arg163 و Tyr172 برهمکنش‌های موثری دارد (۱۵). در تحقیق Fahmy و همکاران (۲۰۲۰) خاصیت ضدویروسی ترکیب طبیعی ویتکسین در *Erythrina speciosa* بر روی پروتئین تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) با استفاده از داکینگ مولکولی بررسی شده است. نتایج مطالعه نشان داد که آمینواسیدهای Glu83، Tyr101، Arg176، His58 و Arg163 نقش مهمی را در اتصال ترکیبات طبیعی به این پروتئین دارند (۱۸). Gercek و

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.SKUMS.REC.1401.064 در معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می‌باشد. بدین وسیله از آن معاونت محترم و مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد نهایت قدردانی را به عمل می‌آوریم. طبق نظر نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

نبودن، خواص بیولوژیک مطلوب و امتیاز داکینگ منفی و اتصالات قوی با پروتئین می‌تواند باعث مهار پروتئین تیمیدین‌کیناز شوند. هرچند انتظار می‌رود که با بررسی بیشتر و مطالعه دقیقتر این ترکیبات در شرایط *in vitro* و *in vivo* بتوان از این منابع طبیعی به‌عنوان مهارکننده‌های بالقوه در مهار پروتئین تیمیدین‌کیناز استفاده نمود.

سپاسگزاری

منابع

- ۱-برهانی، م. اعتمادی فر، ز. (۱۴۰۱). افزایش پایداری دمائی پروتئاز سالینی و ویرو پروتئولیتیکوس AF-2004 با استفاده از جهش‌زایی هدفمند مکانی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۵(۴)، ۵۴۲-۵۵۸.
- ۲- لطفی، ص. رضوان نژاد، الف، لنجانیان، ح. (۱۴۰۰). بررسی میانکنش ترکیبات فلاونوئیدی برهم‌موم با آنزیم استیل کولین استراز انسانی با استفاده از روش داکینگ مولکولی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۴(۳)، ۳۲۲-۳۳۷.
3. Adler H. Gould S. Hine P. Snell L.B. Wong W. Houlihan C.F. et al, (2022). Clinical features and management of human monkeypox: a retrospective observational study in the UK. *Lancet Infect Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00228-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00228-6)
4. Alakunle E. Moens U. Nchinda G. Okeke M.I. (2020). Monkeypox virus in Nigeria: infection biology, epidemiology, and evolution. *Viruses.* 12(11): 1257.
5. Al-Karmalawy A.A. Dahab M.A. Metwaly A.M. Elhady S.S. Elkaeed E.B. Eissa I.H. et al, (2021). Molecular Docking and Dynamics Simulation Revealed the Potential Inhibitory Activity of ACEIs Against SARS-CoV-2 Targeting the h ACE2 Receptor. *Front Chem.* 9: 661230.
6. Beer, E. M., Rao, V. B., 2019, A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy, *PLOS Negl Trop Dis.*,13(10): e0007791.
7. Brown K. Leggat P.A. (2016). Human monkeypox: current state of knowledge and implications for the future. *Trop Med Int Dis.* 1(1): 8.
8. Bunge E.M. Hoet B. Chen L. Lienert F. Weidenthaler H. Baer L.R. et al, (2022). The changing epidemiology of human monkeypox-A potential threat? A systematic review. *PLOS Negl Trop Dis.* 16(2): e0010141.
9. Cui Q. Shin W.S. Luo Y. Tian J. Cui H. Yin D. (2013). Thymidylate kinase: an old topic brings new perspectives. *Curr Med Chem.* 20(10):1286-305.
10. Damon, I. K., 2011, Poxviruses, *J Clin Microbiol.*, 1647-1658.
11. De Oliveira A. Adams S.D. Lee L.H. Murray S.R. Hsu S.D. Hammond J.R. et al, (2013). Inhibition of herpes simplex virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate. *Food Chem. Toxicol.* 52: 207-215.
12. Docherty J.J. Sweet T.J. Bailey E. Faith S.A. Booth T. (2006). Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication in vitro. *Antivir Res.* 72(3): 171-177.
13. Dyson O.F. Walker L.R. Whitehouse A. Cook P.P. Akula S.M. (2012). Resveratrol inhibits KSHV reactivation by lowering the levels of cellular EGR-1. *PloS one.* 7(3): e33364.
14. Egan W.J. Merz K.M. Baldwin J.J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem.* 43(21): 3867-3877.
15. El-Halim S.M.A. Mamdouh M.A. El-Haddad A.E. Soliman S.M. (2020). Fabrication of anti-HSV-1 curcumin stabilized nanostructured proniosomal gel: molecular docking studies on thymidine kinase proteins. *Sci Pharm.*88(1): 9.
16. Espinoza J.L. Takami A. Trung L.Q. Kato S. Nakao S. (2012). Resveratrol prevents EBV transformation and inhibits the outgrowth of EBV-immortalized human B cells. *PLoS One.* 7(12): e51306.
17. Evers, D. L., Wang, X., Huang, S-M., Huang, D. Y., Huang, E-S., 2004, 3, 4', 5-Trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) inhibits human cytomegalovirus replication and virus-induced cellular signaling, *Antivir Res.*, 63(2): 85-95.
18. Fahmy N.M. Al-Sayed E. Moghannem S. Azam F. El-Shazly M. Singab A.N. (2020). Breaking down the barriers to a natural antiviral agent: Antiviral activity and molecular docking of Erythrina speciosa extract, fractions, and the major compound. *Chem Biodivers.* 17(2): e1900511.

19. Gercek Z. Jumamyradova S. Senturk A. M. (2022). The Synthesis and Docking Study of Novel Compounds for Variola Virus, *Eur J Adv Chem Res.*3(2): 1-7.
20. Goel, R. K. Singh, D. Lagunin A. Poroikov V. (2011) PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Med Chem Res.* 20(9): 1509-1514.
21. Grant R. Nguyen L-BL. Breban R. (2020). Modelling human-to-human transmission of monkeypox. *Bull World Health Organ.* 98(9): 638.
22. (a) Morris G.M. Lim-Wilby M. (2008). Molecular docking. *Methods Mol Biol.* 443:365-382; (b) Hashemi-Shahraki F. Shareghi B. Farhadian S. Yadollahi E. (2023). A comprehensive insight into the effects of caffeic acid (CA) on pepsin: Multi-spectroscopy and MD simulations methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 289: 122240.
23. Heibati-Goojani F. Farhadian S. Shareghi B. Shahraki F.H. Ziaee E. (2021). Insights into the binding mechanism of Putrescine on α -amylase by multiple spectroscopic techniques and molecular docking. *J Mol Struct.* 1242:130702.
24. Hovmöller S. Zhou T. Ohlson T. (2002). Conformations of amino acids in proteins. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58: 768-776.
25. Kabuga A.I. El Zowalaty M.E. (2019). A review of the monkeypox virus and a recent outbreak of skin rash disease in Nigeria. *J Med Virol.* 91(4):533-540.
26. Karamese M. Aydogdu S. Karamese S.A. Altöparlak U. Gundogdu C. (2015). Preventive effects of a major component of green tea, epigallocatechin-3-gallate, on hepatitis-B virus DNA replication. *Asian Pac J Cancer Prev.*16(10): 4199-4202.
27. Kim J-E. Song Y-J. (2019). Anti-varicella-zoster virus activity of cephalotaxine esters in vitro. *J Microbiol.* 57: 74-79.
28. Kwofie, S. K., Annan, D. G., Adinortey, C. A., Boison, D., Kwarko, G. B., Abban, R. A., et al, 2021, Identification of novel potential inhibitors of varicella-zoster virus thymidine kinase from ethnopharmacologic relevant plants through an in-silico approach, *J Biomol Struct Dyn.*1-16.
29. Li Q. Peng W. Ou, Y. (2020). Prediction and analysis of key protein structures of 2019-nCoV. *Future Virol.* 15(6): 349-357.
30. Li W-F. I Chik W. Wang D-Y. Pan L-T. (2017). Plant phenolic compounds as potential lead compounds in functional foods for antiviral drug discovery. *Curr Org Chem.* 21(18): 1847-1860.
31. Li Y. Zhao H. Wilkins K. Hughes C. Damon I.K. (2010). Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *J Virol Methods.*169(1): 223-227.
32. Lipinski C.A. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 44(1):35-249.
33. Loaiza-Cano V. Monsalve-Escudero L.M.,Filho CdSMB. Martinez-Gutierrez M. Sousa DPd. (2020). Antiviral role of phenolic compounds against dengue virus: A review. *Biomolecules.* 11(1): 11.
34. Mahase, E., 2022, Monkeypox: What do we know about the outbreaks in Europe and North America? *BMJ.*, 377: o1274.
35. McCollum A.M. Damon I.K. (2015). Human monkeypox. *Clin Infect Dis.* 58(2): 260-267.
36. Minhaj F.S. Ogale YP. Whitehill F. Schultz J. Foote M. Davidson W. et al, (2022). Monkeypox outbreak-nine states. *Morbidity and Mortality Weekly Report.*71(23): 764.
37. Muegge I. Heald S.L. Brittelli D. (2011) Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J Med Chem.* 44(12): 1841-1846.
38. Muhammed M.T. Aki-Yalcin E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chem Biol Drug Des.* 93(1): 12-20.
39. Rabbi M.F. Akter S.A. Hasan M.J. Amin A. (2021). In Silico characterization of a hypothetical protein from *Shigella dysenteriae* ATCC 12039 Reveals a Pathogenesis-Related Protein of the Type-VI Secretion System. *Bioinform Biol Insights.* 15: 11779322211011140.
40. Rahman M.M. Rahaman M.S. Islam M.R. Rahman F. Mithi F.M. Alqahtani T. et al, (2021). Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. *Molecules.* 27(1): 233.
41. Rechtman M.M. Har-Noy O. Bar-Yishay I. Fishman S. Adamovich Y. Shaul Y. et al, (2010). Curcumin inhibits hepatitis B virus via down-regulation of the metabolic coactivator PGC-1 α . *FEBS Lett.* 584(11): 2485-2490.
42. Reynolds M.G. Carroll D.S. Karem K.L. (2012). Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era. *Curr Opin Virol.* 2(3): 335-343.
43. Rezvannejad E. Lotfi S. Boustan A. (2020). Modeling of heat stress protein 70 (HSP70) of honey bee by homology modeling and molecular simulation method and interaction to HSP40. *Cell Mol Research (Iran J Biol).* 32(4): 482-491.
44. Rezza G. (2019). Emergence of human monkeypox in west Africa. *Lancet Infect Dis.*19(8): 797-799.
45. Rizk J.G. Lippi G. Henry B.M. Forthal D.N. Rizk Y. (2022). Prevention and Treatment of Monkeypox. *Drugs.* 1-7.
46. Romano J.D. Tatonetti N.P. (2019). Informatics and computational methods in natural product drug discovery: a review and perspectives. *Front genet.*10: 368.
47. Sarkar M. Saha S. (2020). Structural insight into the putative role of novel SARS CoV-2 E protein in viral infection: a potential target for LAV development and therapeutic strategies. *Plos One.* 15(8): e0237300.

48. Saxena S.K. Ansari S. Maurya V.K. Kumar S. Jain A. Paweska J.T. et al, (2022). Re-emerging human monkeypox: a major public-health debacle. *J Med Virol*. <https://doi.org/10.1002/jmv.27902>
49. Spadola L. Novellino E. Folkers G. Scapozza L. (2003). Homology modelling and docking studies on Varicella Zoster Virus Thymidine kinase, *Eur J Med Chem.*, 38(4): 413-419.
50. Wang G-F. Shi L-P. Ren Y-D. Liu Q-F. Liu H-F. Zhang R-J. et al, (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antivir Res.* 83(2): 186-190.
51. Wiederstein, M., Sippl MJ. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research.*, 35(suppl_2): W407-10.
52. Xie Y. Huang B. Yu K. Shi F. Liu T. Xu W. (2013). Caffeic acid derivatives: a new type of influenza neuraminidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 23(12): 3556-3560.
53. Yang L. Mo X. Yang H. Dai H. Tan F. (2014). Testing the sensitivities of noncognate inhibitors to varicella zoster virus thymidine kinase: implications for postherpetic neuralgia therapy with existing agents. *J Mol Model.* 20:1-10.
54. Yinka-Ogunleye A. Aruna O. Ogoina D. Aworabhi N. Eteng W. Badaru S. et al. (2018). Reemergence of human monkeypox in Nigeria. 2017. *Emerg Infect Dis.* 24(6): 1149.
55. Yiu C-Y. Chen S-Y. Chang L-K. Chiu Y-F. Lin T-P. (2010). Inhibitory effects of resveratrol on the Epstein-Barr virus lytic cycle. *Molecules.* 15(10): 7115-7124.
56. Zandi K. Ramedani E. Mohammadi K. Tajbakhsh S. Deilami I. Rastian Z. et al. (2010). Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line. *Nat Prod Commun.* 5(12): 1934578X1000501220.

Study of monkeypox virus thymidine kinase interaction with natural compounds using molecular docking

Abdizadeh T.

Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. of Iran.

Abstract

Monkeypox is a disease that can be transmitted between humans and animals, caused by infection with the monkeypox virus. Thymidine kinase is a protein encoded by the monkeypox virus. It has thymidine and thymidylate phosphorylating activities, and it plays a role in viral DNA replication and can be a promising target for the treatment of monkeypox. This study, to predict and assess the three-dimensional structure of thymidine kinase protein in monkeypox and the efficacy of plant phenolic compounds on this protein. The three-dimensional structure of the thymidine kinase protein was predicted and assessed for the protein by the Swiss Model and Procheck servers, respectively. In the molecular docking method, the interactions of plant phenolic compounds and the standard drug (ganciclovir) were investigated in the predicted model of thymidine kinase using MOE-2014 software. Then the physicochemical properties and biological activity of the compounds were predicted using Swiss ADME, PASS and Swiss Target Prediction software. The results of homology modeling showed that the proposed model has appropriate quality and stability and the best docking results are related to caffeic acid, curcumin, gallic acid and rosmarinic acid compounds with strong binding energy (-15.60 to -17.92 kcal/mol) compared to ganciclovir drug. Therefore, thymidine kinase protein could be a suitable target for designing novel drugs against monkeypox and plant phenolic compounds could be investigated as potential anti-monkeypox drugs in in vitro and in vivo studies.

Keywords: Monkeypox, Homology modeling, Molecular docking, Thymidine kinase, Phenolic compounds