

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی فیزیک

داکینگ، غربالگری مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی جهت شناسایی مشتقات دارویی جدید ضد سرطان از ترکیبات کینازولین

نگارنده: الهه سادات موسوی

اساتید راهنما:

دکتر محسن سرگلزایی

دکتر حسین نیکوفرد

بهمن ۱۳۹۸

شماره: ۱۴۱۱ الفزیر
تاریخ: ۹۹/۳/۲۵

باسمه تعالی



فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم الهه سادات موسوی با شماره دانشجویی ۹۶۱۴۳۱۴ رشته شیمی گرایش شیمی فیزیک تحت عنوان داکینگ، غربالگری مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی جهت شناسایی مشتقات دارویی جدید ضد سرطان از ترکیبات کینازولین که در تاریخ ۹۸/۱۱/۵ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

<input type="checkbox"/> الف) درجه عالی: نمره ۱۹-۲۰	<input type="checkbox"/> ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸/۹۹-۱۸
<input checked="" type="checkbox"/> ج) درجه خوب: نمره ۱۷/۹۹-۱۶	<input type="checkbox"/> د) درجه متوسط: نمره ۱۵/۹۹-۱۴
<input type="checkbox"/> ه) کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد	
نوع تحقیق: <input checked="" type="checkbox"/> نظری <input type="checkbox"/> عملی	

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر محسن سرگلزایی	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر حسین نیکوفرد	دانشیار	
۳- استاد مشاور	-	-	-
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد باخرد	استاد	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر زینب موسوی	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر زهرا کلاتر	استادیار	



نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر مهدی میوزایی

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تقدیم :

به خدایی که آفرید، جهان را، انسان را، علم را، معرفت را، عشق را
به مقدس ترین واژه یاد لغت نامه دلم، به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است، به
آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم، موهای شان سپید شد تا ما رو سپید شویم و عاشقانه سوختند تا گرما بخش
وجود ما و روشکر راهمان باشند. به استوارترین تکیه گاهم، دستان پر مهر پدرم، به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان

نازنین مادرم

به خواهر مهربانم

که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است.

به برادر نازنینم

که گرمای امید بخش وجودش بهترین پشتیبان من است.

به همسر عزیزم

دلیل بودنم و پناه خشکیم که بمسفری ست مهربان و وجودش نشانه لطف الهی در

زندگی من، او که مسج و ارباب صبرش در تمامی سختی رفیق راه بود.

شکر و قدردانی

پاس خداوندی را که پروردگار جهانیان است، پروردگاری که سخنران در ستودن او بماند و شمارندگان، شمارش نعمت‌های او را ندانند و کوشندگان از ادای حق او در مانده اند. خدایی که انکار شرف اندیش، ذات او را درک نمی‌کنند و دست غواصان دریای علوم به او نخواهد رسید.

اکنون که به یاری پروردگار منان و راه‌نمایی اساتید بزرگوارم موفق به اتمام این رساله شده‌ام بر خود واجب می‌دانم که، نهایت سپاسگزاری را از تمامی عزیزانی که مراد این راه‌یاری نمودند به عمل آورم. از استاد بزرگ و دانشمند جناب آقای دکتر محسن سرگلزایی که راه‌نمای بنده در تمامی مراحل این پایان نامه بودند، به پاس زحمات بی‌شائبه‌شان کمال شکر را دارم. از استاد که اقدار و پربایه جناب آقای دکتر حسین نیکوفرد که باره‌نمایی‌های بی‌دریغشان مراد این راه‌یاری نمودند سپاسگزار و متشکرم.

پسندیدم از اساتید بزرگوارم سرکار خانم دکتر زهره اکلاتر و سرکار خانم دکتر زینب موسوی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند کمال سپاس و قدردانی را دارم.

از پدر و مادری، همسر عزیزم برای تلاش‌های بی‌وقفه و بی‌دریغشان برای آرامش و موفقیت اینجانب سپاسگزارم و دستان پر مهرشان را که همیشه یاریگر من بوده اند با عشق می‌بوسم.

از خداوند متعال برای تمامی عزیزانی که مراد می‌بودن این راه‌یاری نمودند سلامت و سعادت آرزو مندم.

تعمدنامه

اینجانب الهه سادات موسوی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی فیزیک دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه داکینگ، غربالگری مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی جهت شناسایی مشتقات دارویی جدید ضد سرطان از ترکیبات کینازولین تحت راهنمایی دکتر محسن سرگلزایی و دکتر حسین نیکوفرد متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

بیماری سرطان با کنترل نامنظم و رشد غیرطبیعی سلول‌ها ایجاد می‌شود. یکی از دلایل مهم بروز تعداد فراوانی از سرطان‌ها تولید بیش از حد پروتئین کیناز است، که منجر به فسفریلاسیون بیش از حد پروتئین‌ها شده و می‌تواند عملکرد و فعالیت سلولی را تغییر دهد. گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال یکی از اعضای مهم پروتئین کینازها می‌باشد که در فرایندهایی از جمله تکثیر سلولی، تحرک سلول، رگ‌زایی و مقاومت در برابر آپوپتوز نقش دارد. طی تحقیقات صورت گرفته، مشخص شده است که در اکثر تومورها بیان بیش از حد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال نقش اساسی دارد. به همین دلیل شناسایی و درک برهمکنش

مهارکننده‌های این گیرنده‌ها اهمیت زیادی در کنترل سرطان دارد. امروزه شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای از بهترین روش‌ها برای مطالعه این برهمکنش‌ها هستند. در بخش اول این پایان نامه براساس مطالعات صورت گرفته از میان مشتقات کینازولین‌ها که به عنوان قوی‌ترین مهارکننده‌های پروتئین 1M17 شناخته شده‌اند ترکیبی با ثابت مهارکننده‌گی مطلوب و قدرت مهارکننده‌گی بالا انتخاب و از آن به عنوان داروی مرجع استفاده شد. این ترکیب (۶-فلوئورو-۲-۴-فلوئوروفنیل)-۳-۲-اکسواپندول-۳-ایلیدین(آمینو)کینازولین-۴(H³)-یک می‌باشد. در قسمت دوم پایان نامه ۲۶۴ ترکیب از مشتقات کینازولین‌ها با استفاده از غربالگری مجازی مورد بررسی قرار گرفتند که از میان آن‌ها سه ترکیب با انرژی اتصال منفی‌تر به عنوان داروهای پیشنهادی برای مهار پروتئین 1M17 انتخاب شده و با استفاده از روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، نتایج مشاهده شده در فرایند داکینگ مولکولی را تایید کرده و داروی یک که N-(۲و۴) دی متوکسی فنیل)-۲-(۶-فلوئورو-۲-۴-فلوئوروفنیل) کینازولین-۴-ایل(تیو) استامید نام دارد به عنوان داروی برتر و قوی‌ترین مهارکننده انتخاب شد. با توجه به مقادیر انرژی‌های به دست آمده به روش MMGBSA برای کمپلکس داروها مشخص شد که بیشترین سهم در انرژی آزاد اتصال مربوط به انرژی واندروالسی است. همچنین نیروهای آب‌گریز در انرژی اتصال نقش مهمی دارند.

کلمات کلیدی: فاکتور رشد اپیدرمال، کینازولین‌ها، داکینگ مولکولی، دینامیک مولکولی، انرژی اتصال.

مقاله مستخرج از پایان نامه

Docking, virtual screening and molecular dynamics simulation for determination of new derivatives of anti-cancer drugs from Quinazoline compounds.

در بیست و دومین کنفرانس شیمی فیزیک انجمن شیمی ایران، دانشگاه زنجان، در مرداد ماه ۹۸ ارائه گردید.

فهرست مطالب

۱	فصل ۱: مقدمه
۲	۱-۱ مقدمه ای بر آنزیم ها
۳	۱ ۲ تاریخچه
۴	۱ ۳ کوفاکتورها
۴	۱-۳-۱ گروه پروستتیک
۵	۲-۳-۱ کوآنزیمها
۵	۳-۳-۱ اکتیویتورها
۵	۴-۱ طبقه بندی آنزیم ها
۸	۵-۱ سینتیک آنزیم ها
۱۰	۶-۱ ساختار آنزیم ها
۱۱	۱-۶-۱ مدل قفل و کلید
۱۲	۲-۶-۱ مدل تناسب القایی
۱۲	۷-۱ عوامل موثر بر سرعت واکنش های آنزیمی
۱۳	۸-۱ مهارکننده ها
۱۴	۹-۱ مهارکننده های برگشت ناپذیر
۱۴	۱۰-۱ مهارکننده های برگشت پذیر
۱۵	۱۱-۱ تیروزین کینازها
۱۶	۱۲-۱ گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال

۱۷	۱۳-۱ نقش گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال در سرطان
۱۷	۱۴-۱ مکانیسم عمل پروتئین EGFR
۱۸	۱۵-۱ کینازولین ها
۱۹	۱۶-۱ داکینگ مولکولی
۲۱	۱۷-۱ فرایند انجام داکینگ مولکولی
۲۱	۱۸-۱ نرم افزارهای رایج داکینگ مولکولی
۲۲	۱۹-۱ شبیه سازی های رایانه ای
۲۴	۲۰-۱ شبیه سازی دینامیک مولکولی
۲۵	۲۱-۱ کمیت های مهم در شبیه سازی
۲۵	۱-۲۱-۱ انرژی
۲۶	۲-۲۱-۱ دما
۲۶	۲۲-۱ مزیت های استفاده از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی
۲۸	۲۳-۱ ماهیت دارو
۲۸	۲۴-۱ دینامیک مولکولی و طراحی دارو
۲۹	۲۵-۱ روش های طراحی دارو با استفاده از کامپیوتر
۳۰	۱-۲۵-۱ روش مبتنی بر لیگاند
۳۰	۲-۲۵-۱ روش مبتنی بر گیرنده
۳۱	۳-۲۵-۱ روش طراحی دی نوو
۳۱	۲۶-۱ قانون پنجتایی لیپینسکی
۳۳	فصل ۲: روش محاسبات
۳۴	۱-۲ آماده سازی فایل ورودی پروتئین
۳۵	۲-۲ داروی مرجع

۳-۲ پایگاه داده ZINC.....	۳۶
۴-۲ ترسیم و بهینه سازی مهارکننده ها.....	۳۷
۵-۲ آماده سازی فایل ورودی مهارکننده ها.....	۳۸
۶-۲ فرایند داکینگ مولکولی.....	۳۸
۱-۶-۲ معرفی پارامترها و روش کار با نرم افزار مولگرو.....	۳۸
۲-۶-۲ روش انجام فرایند داکینگ.....	۴۰
۷-۲ غربالگری مجازی مجموعه ای از مشتقات کینازولین با استفاده از نرم افزار مولگرو.....	۴۶
۸-۲ انحراف از جذر میانگین مربعات (RMSD).....	۴۷
۹-۲ ریشه‌ی متوسط مجذور افت و خیزها (RMSF).....	۴۷
۱۰-۲ محاسبه انرژی آزاد پیوندی به روش مکانیک مولکولی مساحت سطح تعمیم یافته‌ی بورن (MMGBSA).....	۴۸
۱۱-۲ نرم افزار امبر و پارامترهای آن.....	۴۹
۱-۱۱-۲ میدان های نیرو.....	۵۰
۲-۱۱-۲ ابزارهای آماده سازی.....	۵۰
۳-۱۱-۲ ابزارهای تجزیه و تحلیل نتایج.....	۵۱
۱۲-۲ پارامترهای مورد استفاده در انجام شبیه سازی.....	۵۱

۵۳ فصل ۳: بحث و نتیجه گیری

۱-۳ بررسی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل برهمکنش تعدادی از مشتقات کینازولین به عنوان مهارکننده با آنزیم 1M17.....	۵۴
۲-۳ تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از برهمکنش مجموعه‌ای از مشتقات کینازولین با آنزیم 1M17 به روش غربالگری مجازی.....	۵۶
۳-۳ بررسی نتایج مربوط به پارامترهای ترمودینامیکی در طول زمان انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی.....	۶۱

۴-۳ بررسی نتایج حاصل از شبیه سازی اتصال لیگاندها با پروتئین توسط نمودارهای RMSD.....۶۹

۵-۳ بررسی اتصال لیگاندها و پروتئین با استفاده از نمودار RMSF.....۷۱

۶-۳ نتایج محاسبات انرژی آزاد پیوندی با استفاده از روش MMGBSA.....۷۴

۷-۳ نتیجه گیری.....۷۷

آینده نگری.....۷۹

۸۰ پیوست

۸۱ مراجع

فهرست جداول

- جدول ۱-۱. عددهای گمارش (کمیسیون) آنزیم (EC) ۷
- جدول ۱-۲. معادله های حرکت سیستم های مختلف ۲۵
- جدول ۱-۳. نرم افزارهای اصلی و پرکاربرد در حوزه ی دینامیک مولکولی و میدان های نیروی مورد استفاده در آن ها ۲۷
- جدول ۳-۱. مقادیر ثابت مهارکنندگی چندین ترکیب دارویی از مشتقات کینازولین ۵۵
- جدول ۳-۲. مقادیر انرژیهای اتصال ۱۹ ترکیب برتر و داروی مرجع با پروتئین 1M17 ۵۶
- جدول ۳ ۳. مقادیر میانگین پارامترها برای کمپلکس داروها ۶۸
- جدول ۳ ۴. مقادیر RMSF آمینو اسیدهای موجود در اطراف جایگاه اتصال پروتئین برای چهار کمپلکس برحسب Å ۷۴
- جدول ۳ ۵. مقایسه مقادیر انرژی گازی و انرژی حلال داروها (kcal/mol) ۷۵
- جدول ۳ ۶. انرژیهای بدست آمده از روش MMGBSA برای کمپلکس داروها (kcal/mol) ۷۶
- جدول پ-۱. نامگذاری یک حرفی و سه حرفی اسیدهای آمینه ۸۰

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱. ساختار پروتئینی آنزیم ها..... ۲
- شکل ۱-۲. نمودار میکائیلیس منتن..... ۹
- شکل ۱-۳. نمودار لاینویور- برک..... ۱۰
- شکل ۱-۴. مدل قفل و کلید امیل فیشر..... ۱۱
- شکل ۱-۵. مدل تناسب القایی..... ۱۲
- شکل ۱-۶. نحوه عملکرد مهارکنندهها..... ۱۴
- شکل ۱-۷. ساختار کینازولین..... ۱۹
- شکل ۱-۲. تصویری از سایت RCSB..... ۳۴
- شکل ۲-۲. ساختار دو بعدی و سه بعدی لیگاند اختصاصی پروتئین در پایگاه داده ZINC..... ۳۶
- شکل ۲-۳. تصویری از ساختارهای متفاوت لیگاندها در پایگاه داده ZINC..... ۳۷
- شکل ۲-۴. صفحه اصلی نرم افزار مولگرو به همراه پروتئین و لیگاند..... ۳۹
- شکل ۲-۵. وارد کردن پروتئین و لیگاند به نرم افزار مولگرو جهت انجام فرایند داکینگ..... ۴۱
- شکل ۲-۶. برچسب گذاری پروتئین..... ۴۲
- شکل ۲-۷. نمایش سطح مولکول..... ۴۲
- شکل ۲-۸. مشخص کردن محل برهمکنش لیگاند و پروتئین..... ۴۴
- شکل ۲-۹. آغاز انجام فرایند داکینگ..... ۴۵
- شکل ۲-۱۰. وارد کردن نتایج حاصل از برهمکنش لیگاند و پروتئین به نرم افزار مولگرو..... ۴۵
- شکل ۲-۱۱. نمایش برهمکنش های بین لیگاند و پروتئین به صورت دو بعدی..... ۴۶
- شکل ۳-۱. ساختارهای شیمیایی الف) دارو ۱ ب) دارو ۲ ج) دارو ۳ د) دارو مرجع..... ۵۹
- شکل ۳-۲. جایگیری دو دارو الف) دارو ۱ ب) دارو ۲ در محل اتصال پروتئین IM17 از دو نمای متفاوت..... ۶۰
- شکل ۳-۳. نمودار چگالی برای داروی مرجع در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۱
- شکل ۳-۴. نمودار چگالی برای داروی ۱ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۲
- شکل ۳-۵. نمودار چگالی برای داروی ۲ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۲
- شکل ۳-۶. نمودار چگالی برای داروی ۳ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۲
- شکل ۳-۷. نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو مرجع در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۳
- شکل ۳-۸. نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو ۱ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۳
- شکل ۳-۹. نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو ۲ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۳
- شکل ۳-۱۰. نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو ۳ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۴

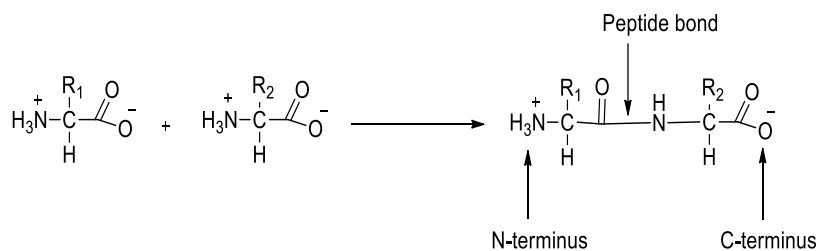
- شکل ۳-۱۱. نمودار انرژی کل برای دارو مرجع در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۴
- شکل ۳-۱۲. نمودار انرژی کل برای دارو ۱ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۴
- شکل ۳-۱۳. نمودار انرژی کل برای دارو ۲ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۵
- شکل ۳-۱۴. نمودار انرژی کل برای دارو ۳ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۵
- شکل ۳-۱۵. نمودار دما برای دارو مرجع در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۵
- شکل ۳-۱۶. نمودار دما برای دارو ۱ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۶
- شکل ۳-۱۷. نمودار دما برای دارو ۲ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۶
- شکل ۳-۱۸. نمودار دما برای دارو ۳ در طول فرایند شبیه سازی..... ۶۶
- شکل ۳-۱۹. نمودار RMSD دارو مرجع در مدت زمان انجام فرایند شبیه سازی..... ۶۹
- شکل ۳-۲۰. نمودار RMSD دارو ۱ در مدت زمان انجام فرایند شبیه سازی..... ۷۰
- شکل ۳-۲۱. نمودار RMSD دارو ۲ در مدت زمان انجام فرایند شبیه سازی..... ۷۰
- شکل ۳-۲۲. نمودار RMSD دارو ۳ در مدت زمان انجام فرایند شبیه سازی..... ۷۰
- شکل ۳-۲۳. نمودار RMSF کمپلکس دارو مرجع در زمان انجام شبیه سازی..... ۷۱
- شکل ۳-۲۴. نمودار RMSF کمپلکس دارو ۱ در زمان انجام شبیه سازی..... ۷۲
- شکل ۳-۲۵. نمودار RMSF کمپلکس دارو ۲ در زمان انجام شبیه سازی..... ۷۲
- شکل ۳-۲۶. نمودار RMSF کمپلکس دارو ۳ در زمان انجام شبیه سازی..... ۷۲

فصل ۱: مقدمه

۱-۱ مقدمه‌ای بر آنزیم‌ها

مطالعه آنزیم‌ها دارای اهمیت علمی زیادی است. بسیاری از بیماری‌ها، بخصوص ناهنجاری‌های ژنتیکی ارثی ممکن است به علت وجود یا عدم وجود یک یا چند آنزیم و یا در مورد حالات دیگر بیماری، ممکن است علت افزایش فعالیت یک آنزیم باشد. اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها در پلاسما و نمونه‌های بافتی در تشخیص بعضی از بیماری‌ها دارای اهمیت است. بسیاری از داروها اثر خود را از طریق انجام واکنش با آنزیم‌ها اعمال می‌کنند. مطالعه آنزیم‌ها در پزشکی، صنایع شیمیایی، مواد غذایی و کشاورزی از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین آنزیم‌ها مهم‌ترین گروه از پروتئین‌ها هستند که واکنش‌های بیولوژیک را کatalیز می‌کنند. در شکل ۱-۱ ساختار پروتئینی آنزیم‌ها نشان داده شده است.

تقریباً تمام فرایندهای متابولیک موجود در سلول به تجزیه و تحلیل توسط آنزیم‌ها نیاز دارند تا با سرعت کافی انجام شوند و زندگی ادامه یابد، زیرا اکثر واکنش‌ها در شرایط فیزیکی سلول (pH، دما و محیط یونی) رخ نمی‌دهند [۱]. مولکول‌هایی که آنزیم‌ها می‌توانند روی آن‌ها عمل کنند سوبسترا نامیده می‌شوند. آنزیم سوبسترا را به مولکول‌های مختلفی که به عنوان محصولات معروف هستند تبدیل می‌کند. یک کatalیست، سرعت واکنش شیمیایی را افزایش می‌دهد و می‌تواند ترکیبی آلی یا غیر آلی باشد. آنزیم‌ها کatalیست‌های باکفایتی هستند زیرا علاوه بر افزایش سرعت تبدیل سوبسترا به محصول، در حضور ساختارهای مشابه یک ساختار اختصاصی را شناسایی کرده تا یک محصول منحصر به فرد را تولید کنند [۲].



شکل ۱-۱. ساختار پروتئینی آنزیم‌ها

آنزیم‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند سرعت انجام واکنش‌های شیمیایی را میلیون‌ها برابر افزایش دهند، که این کار را با پایین آوردن انرژی فعال سازی واکنش انجام می‌دهند [۳ و ۴]. این انرژی فعال سازی با بزرگی سد تبدیل سوبسترا به محصول ارتباط دارد. آنزیم‌ها هیچ‌گونه تغییری در مسیر واکنش ایجاد نمی‌کنند و دارای یک یا چند محل نفوذ سطحی هستند که سوبسترا به این نواحی متصل می‌شود، این نواحی جایگاه فعال آنزیم نام دارند [۵-۷]. تا کنون آنزیم‌های زیادی برای کاتالیز بیش از ۵۰۰۰ نوع واکنش بیوشیمیایی شناخته شده‌اند [۸]. فعالیت آنزیم‌ها را می‌توان تحت تاثیر مولکول‌های دیگر قرار داد. مهارکننده‌ها مولکول‌هایی هستند که باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شوند و فعال کننده‌ها مولکول‌هایی هستند که فعالیت آن را افزایش می‌دهند. بسیاری از داروهای درمانی و سموم، مهارکننده آنزیم هستند [۹].

۱-۲ تاریخچه

در اواخر قرن هفدهم میلادی، هضم گوشت توسط ترشحات معده و تبدیل نشاسته به قند توسط عصاره‌های گیاهی و بزاق شناخته شد، اما مکانیسم آن‌ها ناشناخته ماند [۱۰]. چند دهه بعد لویی پاستور^۱ دریافت که تخمیر قند به الکل در حضور ارگانیزم‌های زنده کپک صورت می‌گیرد. در سال ۱۸۷۸ میلادی فیزیولوژیست آلمانی به نام ویلهلم کوهن^۲ اولین بار از واژه آنزیم که در یونانی به معنای "خمیر مایه" است برای توضیح این رویداد استفاده کرد. ادوارد بوخنر^۳ اولین مقاله خود در مورد مطالعه عصاره‌های مخمر را در سال ۱۸۹۷ میلادی ارائه داد. وی دریافت که قندها حتی در شرایط بدون کپک زنده هم تخمیر می‌شوند. در سال ۱۹۰۷ وی موفق به کسب جایزه نوبل در زمینه یافته‌های بیوشیمیایی و کشفیات تخمیر بدون سلول زنده شد [۱۱]. جداسازی و کریستالیزه کردن

¹ Louis pasteur

² Wilhelm kuhne

³ Eduard Buchner

آنزیم «اوره آز» در سال ۱۹۲۶ توسط جیمز سامند^۱ منجر به رفع موانع در مطالعات اولیه آنزیم‌شناسی گردید. مطالعه آنزیم‌ها را علم آنزیم‌شناسی^۲ گویند. می‌توان گفت نقطه عطف در علم آنزیم‌شناسی، در سال ۱۹۶۵ توسط فیلیپس و همکارانش انجام گرفت که با مطالعه بر روی لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، ساختار کریستالی آن ارائه شد [۱۲].

۱-۳-۱ کوفاکتورها^۳

کوفاکتورها اجزای غیر پروتئینی برخی آنزیم‌ها هستند. برای اینکه آنزیم‌ها بتوانند نقش کاتالیزوری خود را ایفا کنند، به کوفاکتورها نیاز دارند. برخی از این کوفاکتورها مولکول‌های غیر آلی هستند، مانند یون‌های آهن، روی، مس. برخی دیگر مولکول‌های آلی هستند که گاهی به آن‌ها ویتامین می‌گویند. از آنجا که کوفاکتورها نقش کاتالیزوری دارند، هنگام واکنش‌های زیستی مصرف نمی‌شوند. کوفاکتورها به سه دسته گروه پروستتیک^۴، کوآنزیم‌ها^۵ و اکتیویتورها^۶ که در ادامه راجع به هر کدام به اختصار توضیح داده خواهد شد تقسیم می‌شوند:

۱-۳-۱-۱ گروه پروستتیک

گروه یا ریشه پروستتیک در بیوشیمی به ساختاری می‌گویند که با اتصال‌های محکم به یک پروتئین متصل و می‌تواند نقش‌های عملکردی پروتئین را بر عهده گیرد. گروه‌های پروستتیک شامل قند، اسید نوکلئیک، چربی و فسفر می‌باشند.

¹ James Samand

² Enzymatic science

³ Cofactors

⁴ Prosthetic group

⁵ Coenzymes

⁶ Actuators

۱-۳-۲ کوآنزیم‌ها

ترکیباتی آلی هستند که با اتصالات قوی (در مواقعی کووالانسی) به قسمت پروتئینی آنزیم متصل می‌شوند. کوآنزیم‌ها مولکول‌های غیرپروتئینی، آلی و از اجزای برخی آنزیم‌ها هستند که انتقال گروه‌های شیمیایی از یک ترکیب به ترکیب دیگر را برعهده دارند. ویتامین‌های فسفوریله شده محلول در آب و برخی مولکول‌های غیرویتامینی و آلی دیگر مانند هم (در هموگلوبین و میوگلوبین) جزء این دسته از ترکیبات قرار می‌گیرند [۱۳] کوآنزیم‌ها شامل:

۱-۳-۲-۱ آپوآنزیم^۱

آنزیم بدون کوآنزیم، آپوآنزیم نامیده می‌شود.

۱-۳-۲-۲ هالوآنزیم^۲

هنگامی که کوآنزیم وارد ساختار آنزیم می‌شود، آنزیم کامل، هالوآنزیم نام دارد.

۱-۳-۳ اکتیویتورها

یون‌های فلزی هستند که با اتصالات ضعیفی به قسمت پروتئینی آنزیم متصل می‌شوند و برای فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها وجود آن‌ها ضروری می‌باشد.

۱-۴ طبقه‌بندی آنزیم‌ها

برای نامگذاری هر آنزیم به طور معمول از سوبسترای آن آنزیم یا از مشتق نام واکنش شیمیایی مربوط به آن استفاده و در انتها یک پسوند از به آن اضافه می‌شود. مثل: لاکتاز^۱، DNA^۲

^۱ Apoenzyme

^۲ Holoenzyme

پلیمراز و الکل‌دهیدروژناز. اتحادیه بین‌المللی زیست‌شیمی و زیست‌مولکولی برای طبقه‌بندی آنزیم‌ها فهرست واژگان عدد EC^۳ را پیشنهاد می‌نماید. آنزیم‌ها بر اساس مکانیزم عملشان به شش دسته طبقه‌بندی می‌شوند:

۱- اکسیدوردوکتازها^۴

کاتالیز واکنش‌های اکسایش-کاهش، انتقال اکسیژن، هیدروژن یا الکترون از یک ماده به ماده دیگر را انجام می‌دهند.

۲- ترانسفرازها^۵

آنزیمی است که انتقال یک گروه عاملی (مثل گروه متیل یا فسفات) را از یک ماده به ماده دیگر کاتالیز می‌کند.

۳- هیدرولازها^۶

این آنزیم آبکافت پیوندهای شیمیایی را کاتالیز می‌کند. به بیان دیگر هیدرولازها با افزودن یک مولکول آب به ترکیبات مختلف آن‌ها را تجزیه می‌کنند.

۴- لیازها^۷

آنزیمی است که شکستن پیوندهای شیمیایی مختلف را، از راه‌هایی جز آبکافت و اکسیداسیون کاتالیز و اغلب باعث ایجاد یک پیوند دوگانه جدید یا یک ساختمان حلقوی می‌شود. برای مثال آنزیم آدنیلات سیکلاز که تجزیه آدنوزین تری فسفات را به آدنوزین مونو فسفات حلقوی و دو فسفات کاتالیز می‌کند یک لیاز است.

¹ Lactase

² Deoxyribo Nucleic Acid

³ Enzyme commission number

⁴ Oxidoreductases

⁵ Transferases

⁶ Hydrolases

⁷ Lyases

۵- ایزومرازها^۱

این آنزیم تبدیل ایزومرهای یک مولکول را به یکدیگر کاتالیز می‌کند.

۶- لیگازها^۲

آنزیم‌هایی هستند که با کاتالیز یک مولکول بزرگ اولیه و ترکیب قسمتهایی از آن با همه یا قسمتهایی از یک مولکول دیگر، مولکول‌های جدیدی را می‌سازند. لیگازها معمولاً گرماگیر هستند و ATP (آدنوزین تری فسفات) مصرف می‌کنند [۱۴]. در جدول ۱-۱ عددی گمارش (کمپسیون) آنزیم (EC) نمایش داده شده است.

جدول ۱-۱. عددی گمارش (کمپسیون) آنزیم (EC)

نمونه	واکنش شیمیایی شماتیک	گروه
لاکتات دهیدروژناز، اکسیداز	$AH + B \rightarrow A + BH$ (reduced) $A + O \rightarrow AO$ (oxidized)	EC 1 اکسیدوردوکتازها
ترانس آمیناز، کیناز	$AB + C \rightarrow A + BC$	EC 2 ترانسفرازها
لیپاز، آمیلاز، پپتیداز	$AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$	EC 3 هیدرولازها
دکربوکسیلاز، آلدولاز	$RCO_2COOH \rightarrow RCOH + CO_2$ or $[X - A - B - Y] \rightarrow$ $[A = B + X - Y]$	EC 4 لیازها
ایزومراز، موتاز	$AB \rightarrow BA$	EC 5 ایزومرازها
سینتتاز، DNA لیگاز	$X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$	EC 6 لیگازها

¹ Isomerases

² Ligases

۵-۱ سینتیک آنزیم‌ها

روش‌های متعددی جهت مطالعه مکانیسم عمل آنزیم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. دانش مربوط به ساختمان سه‌بعدی پروتئین اطلاعات مهمی را فراهم نموده و ارزش اطلاعات ساختمانی به میزان زیادی توسط شیمی پروتئینی کلاسیک و جهش‌زایی هدایت شده به محل، افزایش یافته است. این فناوری به آنزیم‌شناسان امکان می‌دهد که نقش هر اسیدآمینو را در ساختار و عمل آنزیم مورد بررسی قرار دهند. قدیمی‌ترین و مهم‌ترین روش برای درک ساز و کارهای آنزیمی، تعیین سرعت واکنش و بررسی چگونگی تغییر این سرعت در پاسخ به تغییر پارامترهای آزمایشگاهی است که تحت عنوان سینتیک آنزیمی شناخته می‌شود. سینتیک میکائلیس-منتن^۱ ساده‌ترین و شناخته‌شده‌ترین سینتیک پیشنهادی برای واکنش‌هایی است که با اثر آنزیم همراه هستند. با استفاده از این روش خصوصیات سینتیکی بسیاری از آنزیم‌ها توجیه می‌شود. این مدل برای نخستین بار توسط دانشمند آلمانی، لیونور میکائلیس^۲ و دانشمند کانادایی مادمنتن^۳ معرفی شد. در این معادله آنزیم (E) با سوبسترا (S) ترکیب و کمپلکس آنزیم-سوبسترا (ES) ایجاد می‌شود، و می‌تواند به سمت تولید محصول (P) یا تفکیک به آنزیم و سوبسترا پیشرفت کند. سینتیک میکائلیس-منتن به شکل زیر نمایش داده می‌شود.



با استفاده از معادله میکائلیس-منتن سرعت تشکیل محصول (V_0) به صورت زیر مشخص می‌شود.

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2-1)$$

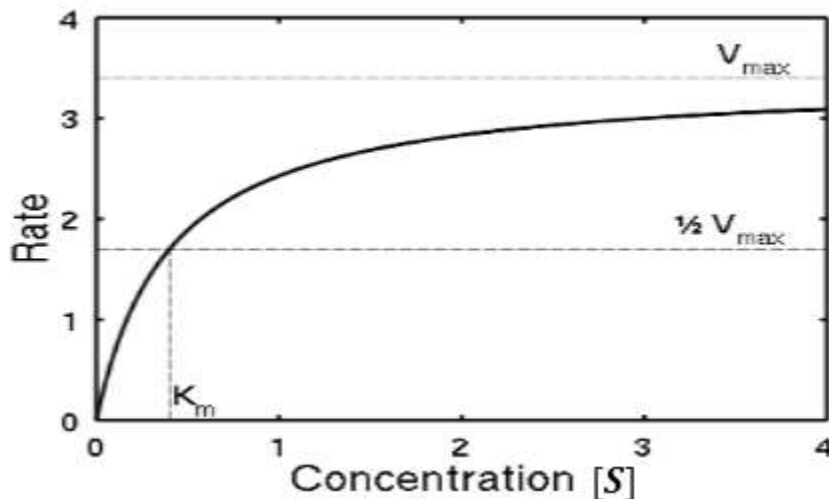
افزایش غلظت سوبسترا، سرعت واکنش را تا زمانی که تمام جایگاه‌های فعال توسط سوبسترا اشباع شوند بالا می‌برد. سرعت واکنش در این نقطه سرعت بیشینه نام دارد که به صورت V_{max} نشان داده

¹ Michaelis-Menten kinetics

² Leonor Michaelis

³ Maud menten

می‌شود. ثابت میکائلیس یا K_m غلظت سوبسترای است که در آن، سرعت واکنش آنزیمی به نصف سرعت حداکثری رسیده و بیانگر میل ترکیبی آنزیم به سوبسترایش می‌باشد. شکل ۱-۲ نمودار میکائلیس-منتن را نشان می‌دهد.



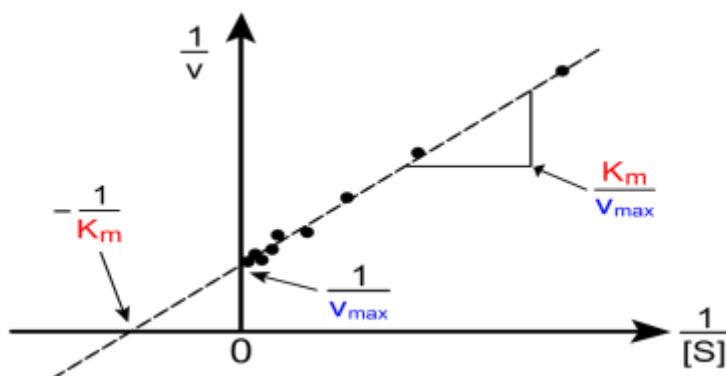
شکل ۱-۲ نمودار میکائلیس-منتن

این معادله در مورد بسیاری از آنزیم‌ها صدق می‌کند. اما امکان دارد بزرگی و مفهوم واقعی V_{max} و K_m از آنزیمی به آنزیم دیگر تفاوت داشته باشد که محدودیت مهمی برای حالت پایدار و سینتیک آنزیم‌ها است. پارامترهای V_{max} و K_m را به صورت تجربی می‌توان برای هر آنزیم خاص محاسبه نمود. از آنجایی که منحنی میکائلیس-منتن یک منحنی سهمی است در تعیین دقیق پارامترهای V_{max} و K_m ایجاد مشکل می‌کند. برای حل این مشکل منحنی خطی لینویور-برک^۱ ارائه شده که در این معادله از معکوس غلظت سوبسترا و سرعت واکنش استفاده می‌شود [۱۵].

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3-1)$$

¹ Lineweaver-Burk

این معادله، معادله لینیور-برک می‌باشد. زمانی که $\frac{1}{V_0}$ را در برابر $\frac{1}{[S]}$ رسم کنیم، خط مستقیمی حاصل می‌شود. شیب این خط برابر $\frac{K_m}{V_{max}}$ می‌باشد. در شکل ۱-۳ نمودار لینیور-برک نمایش داده شده است.



شکل ۱-۳ نمودار لینیور-برک

مزیت نین نموداری این است که مقدار V_{max} را به صورت دقیق‌تر تعیین می‌کند. نمودار لینیور-برک، نمودار معکوس مضاعف^۱ نیز نامیده می‌شود، که کاربرد وسیعی در ارزیابی مهارکننده‌های آنزیمی دارد [۱۶].

۱-۶ ساختار آنزیم‌ها

اکثر آنزیم‌ها از سوبستراهایی که روی آنها واکنش می‌دهند بزرگتر هستند، و فقط تعداد کمی از اسیدآمین‌های موجود بر روی آنزیم به طور مستقیم درگیر کار کاتالیز می‌باشند. به این نواحی از آنزیم که حدود ۳ یا ۴ اسید آمینه را شامل می‌شود جایگاه فعال^۲ گویند. برخی از آنزیم‌ها، دارای جایگاه-هایی برای اتصال به مولکول‌های کوچک هستند که در اکثر مواقع به طور مستقیم و گاهی به طور غیرمستقیم سوبستراها را در طول انجام واکنش به محصول تبدیل می‌کنند، که از این اتصالات به

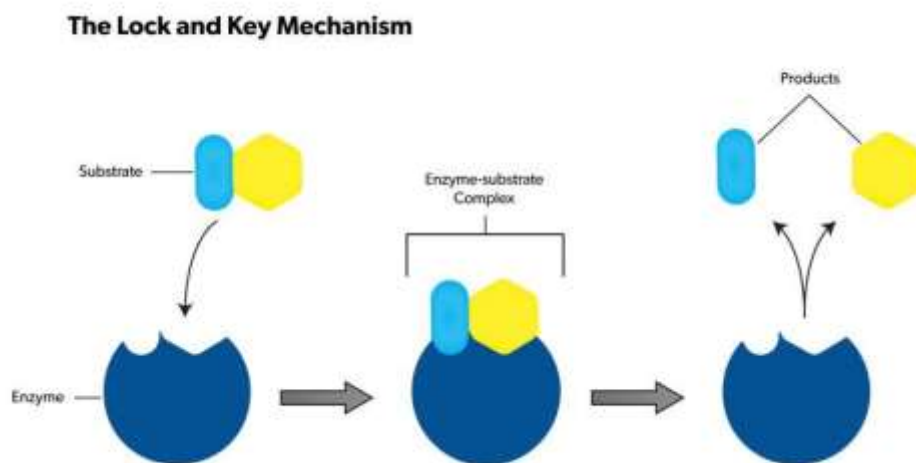
^۱ Double-reciprocal plot

^۲ Active site

عنوان ابزار مفیدی جهت تنظیم افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم می‌توان استفاده نمود. هر واحد آمینو اسید، ساختاری خاص به آنزیم داده که باعث ایجاد خصلت منحصر به فرد در آن می‌شود. در اغلب آنزیم‌ها حرارت یا برخی از واکنش‌های شیمیایی، موجب ایجاد تغییرات در ساختار آنزیم می‌گردد که بسته به ماهیت آنزیم تغییر ایجاد شده می‌تواند برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر باشد [۱۷]. از جمله مدل‌هایی که برای بیان چگونگی عملکرد آنزیم ارائه شده است، می‌توان به مدل قفل و کلید و مدل تناسب القایی اشاره کرد:

۱-۶-۱ مدل قفل و کلید

در این مدل که توسط امیل فیشر^۱ پیشنهاد شده است جایگاه کاتالیز آنزیم و سوبسترا دارای ساختمان مکمل یکدیگر هستند، طوری که هر آنزیم فقط به سوبسترای خاص خود متصل می‌شود، مثل قفل و کلید. در شکل ۱-۴ مدل قفل و کلید امیل فیشر نمایش داده شده است. یکی از نواقص این مدل، انعطاف ناپذیری جایگاه کاتالیز آنزیم است.

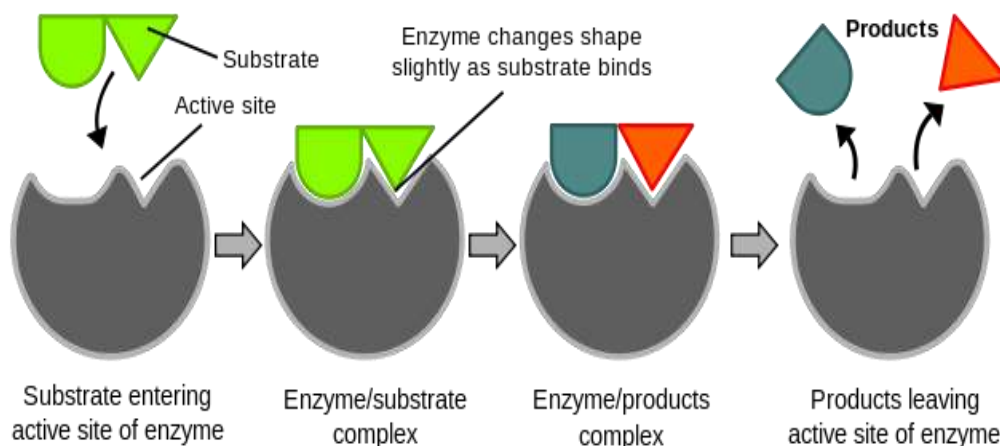


شکل ۱-۴ مدل قفل و کلید امیل فیشر

^۱ Hermann Emil Fischer

۲-۶-۱ مدل تناسب القایی^۱

دانیل کوشلند^۲ در سال ۱۹۵۸ بر روی مدل قفل و کلید فیشر اصلاحاتی را انجام داد. او بر این عقیده بود که آنزیم‌ها نسبتاً انعطاف‌پذیر هستند و جایگاه فعال آنزیم بعد از بهمکنش با سوبسترا می‌تواند تغییر شکل یابد. طبق این نظریه سوبسترا سبب القاء یک تغییر شکل مولکولی در ساختمان پروتئینی آنزیم می‌گردد و با این عمل، آنزیم اسیدهای آمینه و گروه‌های دیگر را در جهت مناسبی قرار می‌دهد تا اتصال و یا کاتالیز (یا هردو) به بهترین شکل انجام شود [۱۸]. شکل ۱-۵ شمایی از نظریه دانیل کوشلند را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۵ مدل تناسب القایی

۷-۱ عوامل موثر بر سرعت واکنش‌های آنزیمی

۱- دما: در موجودات مختلف دمایی که آنزیم در آن بیشترین فعالیت و بالاترین سرعت را دارد (دمای بهینه) متفاوت است.

۲- غلظت آنزیم: هرچه غلظت آنزیم بیشتر باشد، سرعت واکنش‌های آنزیمی بیشتر می‌شود.

¹ Induced Fit

² Daniel Edward Koshland

۳ غلظت سوبسترا: هرچه میزان غلظت سوبسترا افزایش یابد سرعت واکنش‌های آنزیمی نیز بیشتر می‌شود، اما این مقدار محدود است زیرا تعداد آنزیم‌ها محدود است.

۴ غلظت کوفاکتورها و کوآنزیم‌ها: بعضی از آنزیم‌ها برای انجام عمل خود نیاز به کوفاکتور یا کوآنزیم دارند.

۵ غلظت یون‌ها و نمک‌ها

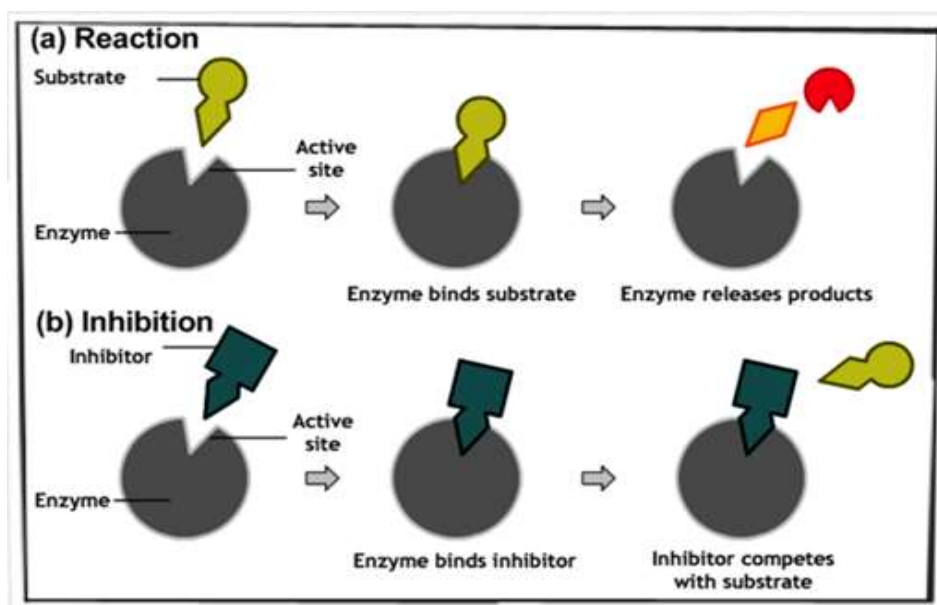
۸-۱ مهارکننده‌ها

مهارکننده‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل فارماکولوژیکی هستند که تاکنون شناخته شده‌اند. مهارکننده آنزیم، مولکولی است که به آنزیم متصل می‌شود و می‌تواند مانع ورود سوبسترا به محل فعال آنزیم شود. مهارکننده‌ها موجب تداخل در فرایند کاتالیز شده و باعث می‌شوند واکنش‌های آنزیمی آهسته یا متوقف شوند. از آنجا که مسدود کردن فعالیت آنزیم می‌تواند یک عامل بیماری‌زا را از بین ببرد و یا عدم تعادل متابولیک را اصلاح کند، بسیاری از داروها مهارکننده آنزیم هستند. یک مهارکننده آنزیم دارویی، اغلب با توجه به انتخاب پذیری^۱ (عدم اتصال به سایر پروتئین‌ها) و ثابت تفکیک آن، که نشان‌دهنده غلظت مورد نیاز برای مهار آنزیم است مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. مطالعه مهارکننده‌های آنزیمی از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا اطلاعات مهمی در مورد مکانیسم‌های آنزیمی فراهم کرده و به تعیین بعضی مسیرهای متابولیکی کمک نموده است. مهارکننده‌ها به دو گروه مهارکننده‌های برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر تقسیم می‌شوند، که مهارکننده‌های برگشت‌پذیر خود می‌توانند رقابتی و غیررقابتی باشند. در شکل ۱ نحوه عملکرد مهارکننده‌ها نشان داده شده است.

¹ Selectivity

۹-۱ مهارکننده‌های برگشت‌ناپذیر

این مهارکننده‌ها از نظر ساختاری هیچ‌گونه شباهتی به سوبسترا ندارند و به صورت برگشت‌ناپذیر به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شوند، که این اتصالات معمولاً به صورت دائم و از نوع اتصالات کووالانسی است و احتمال تخریب جایگاه فعال آنزیم وجود دارد. در این نوع مهارکننده‌ها، آنزیم و مهارکننده به شکل کمپلکس غیرفعال در می‌آیند. به عنوان مثال پنی‌سیلین به صورت برگشت‌ناپذیر به آنزیم‌های دیواره‌ای باکتری‌ها متصل شده و از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند.



شکل ۱-۶ نحوه عملکرد مهارکننده‌ها

۱۰-۱ مهارکننده‌های برگشت‌پذیر

این نوع مهارکننده‌ها از طریق پیوندهای غیرکووالانسی مانند پیوندهای یونی، پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های آبگریز به آنزیم‌ها متصل می‌شوند. برخلاف سوبسترا و مهارکننده‌های برگشت‌ناپذیر غالباً هنگام اتصال به آنزیم، تحت واکنش‌های شیمیایی قرار نمی‌گیرند و با رقیق شدن یا دیالیز به راحتی از بین رفته و فعالیت آنزیم با برداشت مهارکننده به حالت اولیه خود باز می‌گردد. دو نوع اصلی از مهارکننده‌های برگشت‌پذیر، مهارکننده‌های رقابتی و غیررقابتی هستند [۱۹].

۱-۱۱ تیروزین کینازها^۱

بیماری سرطان با رشد غیرطبیعی سلول‌ها که منجر به تشکیل توده‌های تهاجمی می‌شود و می‌تواند در سراسر بدن گسترش پیدا کنند، ایجاد می‌شود. سرطان می‌تواند به علت فرایندهای مختلفی ایجاد شود. یکی از آن‌ها تولید بیش از حد پروتئین کیناز است، که منجر به فسفریلاسیون بیش از حد پروتئین‌ها می‌شود و می‌تواند عملکرد و فعالیت سلولی را تغییر دهد.

تیروزین کیناز آنزیمی است که کارش، انتقال یک گروه فسفات از مولکول آدنوزین تری فسفات (ATP) به پروتئین است. این آنزیم مهم نقش یک کلید «خاموش» - «روشن» را در بسیاری از فعالیت‌های سلولی ایفا می‌کند. تیروزین کینازها از زیرمجموعه‌های پروتئین کینازها هستند که کارشان اتصال گروه‌های فسفاتی به اسید آمینه‌های دیگر همچون سرین^۲ و ترئونین^۳ است. گروه فسفات به اسید آمینه تیروزین در پروتئین‌ها متصل است و فسفریلاسیون پروتئین‌ها توسط کینازها یکی از مراحل مهم پیام‌رسانی در سلول‌ها می‌باشد. اگر در اثر جهش ژنی، آنزیم‌های تیروزین کیناز در حالت «روشن» باقی بمانند، سلول به میزان غیرقابل کنترل، رشد کرده که یکی از ویژگی‌های سلول‌های سرطانی است.

هر تیروزین کیناز، یک پروتئین تیروزین فسفاتاز مخصوص دارد که گروه فسفات را جدا می‌کند. ژنوم پروتئین کیناز انسانی که به کینوم معروف است، شامل ۵۱۸ ژن کد کننده پروتئین کیناز است که این ژن‌ها باعث بیان دو نوع تیروزین کیناز، رسپتور تیروزین کیناز ۲ و ۳ و تیروزین کیناز سیتوپلاسمی می‌شوند [۲۰ و ۲۱]. در انسان ۵۸ رسپتور تیروزین کیناز شناخته شده است که در ۲۰ زیر گروه جای می‌گیرند و از معروف‌ترین اعضای این گروه می‌توانیم به مواردی چون گیرنده انسولین،

^۱ Tyrosine kinases

^۲ Serine

^۳ Threonine

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال^۱ (EGFR)، گیرنده فاکتور رشد مشتق از پلاکت^۲ (PDGFR) اشاره

کنیم. تیروزین کینازها در انسان شامل چهار پروتئین هستند که عبارت اند از:

- ErbB-1 که تحت عنوان HER1 یا EGFR هم شناخته می‌شود.

- ErbB-2 که در انسان HER2 و در جوندگان neu نامیده می‌شود.

- ErbB-3 که HER3 نیز نامیده می‌شود.

- ErbB-4 که HER4 نیز نامیده می‌شود [۲۲ و ۲۳].

۱-۱۲ گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال

فاکتور رشد اپیدرمال^۳ EGF در سال ۱۹۶۲ توسط استنلی کوهن^۴ در موش کشف شد. وی و همکارانش در سال ۱۹۸۰ موفق به کشف گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) شدند. در این تحقیق به منظور کشف گیرنده‌های سطح سلول برای EGF از کشت سلول‌های انسانی که توانایی اتصال به فاکتور رشد اپیدرمال نشان‌دار شده را داشتند استفاده شد و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال در سطح سلول یافت شد. گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال یک گیرنده بزرگ بین غشایی در سطح سلول است که از نظر ساختاری، گلیکوپروتئین ۱۷۰ کیلودالتونی، به طول ۱۱۸۶ اسیدآمینو و محصول پروتوانکوژن C-ERBB می‌باشد. ژن کدکننده این پروتئین بر روی کروموزوم شماره ۷ انسان و در موقعیت 7P21 قرار دارد. این پروتئین عضو خانواده گیرنده‌های تیروزین کیناز است. ساختار گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال به این صورت است که هر رسپتور شامل سه دامنه^۵ است، یک دامنه خارج سلولی اتصال یابنده به لیگاند (انتهای آمینی)، یک دامنه منفرد هیدروفوبیک عبور کننده از غشا و یک ناحیه سیتوپلاسمی حاوی دامنه تیروزین کینازی (انتهای کربوکسیلی) می‌باشد [۲۴].

¹ Epidermal growth factor reseptor

² Platelet-Derived grows factor receptor

³ Epidermal growth factor

⁴ Stanley Cohen

⁵ Domain

۱-۱۳ نقش گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال در سرطان

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال در فرایندهایی از جمله تکثیر سلولی، تحرک سلول، رگزایی و مقاومت در برابر آپوپتوز نقش دارد. جهش در ژنهای مسئول این پروتئینها باعث بروز بسیاری از سرطانها می‌شود. طی تحقیقات صورت گرفته، مشخص شده است که در اکثر تومورها بیان بیش از حد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. این گیرندهها اهداف بسیار مهمی برای فعالیت عوامل ضد سرطان می‌باشند [۲۵-۲۸]. تغییرات ژنتیکی که منجر به سرطان می‌شوند توسط سازوکارهای مختلفی فعالیت کتالیزوری رسپتور تیروزین کینازها را برهم می‌زنند. از جمله شایع‌ترین تغییراتی که ژنهای رسپتور تیروزین کینازی را تحت تأثیر قرار می‌دهند می‌توان به جهش‌های نقطه ای و تکثیر ژنی اشاره کرد. تغییرات گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال در بسیاری از سرطانها به عنوان نتیجه‌ای از جهش یا تکثیر ژنی توصیف می‌شود که القاکننده‌ی بیان بالای پروتئین و بازآرایی‌های ساختاری می‌باشد [۲۹]. در سال ۲۰۰۳ تأثیر سطوح EGFR در پیشرفت تومور و پیش آگاهی بقا در ۳۸ نمونه بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ، با استفاده از روش اتصال رسپتور رادیویی مورد بررسی واقع شد و ارتباط معناداری بین کاهش بقا و پیشرفت تومور با افزایش سطح EGFR مشاهده گردید [۳۰].

۱-۱۴ مکانیسم عمل پروتئین EGFR

رفتار سلول‌های بدن به دقت توسط سیگنال‌های محیطی تنظیم می‌گردد. هر سلول می‌تواند به بعضی از سیگنال‌های ویژه پاسخ دهد و این سیگنالها می‌بایست وضعیت نهایی سلول را برای تمایز، تکثیر و یا مرگ برنامه‌ریزی شده مشخص کنند. نوع پاسخ سلول به سیگنال خارجی سلولی، برحسب نوع گیرنده سلول و سیستم علامت‌دهی متفاوت است. اتصال لیگاند به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال موجب راه‌اندازی سیگنال‌های داخل سلولی پیچیده و مهمی شده، که بدین ترتیب اطلاعاتی که از

سطح غشای پلاسمایی دریافت می‌شوند به دستگاه رونویسی هسته و سایر بخش‌های سلول ابلاغ می‌گردند. کاهش پیام‌رسانی در گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال و سایر تیروزین‌کینازهای گیرنده با بروز بیماری‌هایی چون آلزایمر در ارتباط می‌باشد. همچنین افزایش پیام‌رسانی در این گیرنده‌ها با بروز تعداد زیادی از سرطان‌ها مرتبط می‌باشد. در سالهای ۱۹۸۳ و ۱۹۸۰ بررسی‌هایی در زمینه‌ی اثبات فعالیت کینازی گیرنده فاکتور رشد صورت گرفت. نتایج نشان داد که در زمان اتصال EGF به گیرنده خود، EGFR با تشکیل دایمر با دیگر مولکول EGFR فعال شده و دامنه داخل سلولی به صورت یک کیناز عمل کرده و بخشی از پروتئین به صورت یک آنزیم فعالیت خود را آغاز می‌کند تا خود و سپس دیگر پروتئین‌های داخل سلولی را فسفریله کند [۳۱].

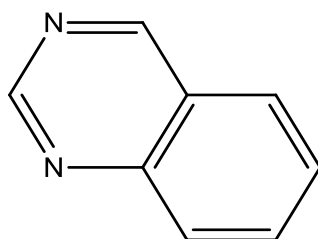
۱-۱۵ کینازولین‌ها^۱

بسیاری از کینازولین‌ها مانند gefitinib، lapatinib، erlotinib و canertinib به عنوان مهارکننده‌های قوی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال شناخته شده‌اند و از پتانسیل درمانی بالایی در درمان سرطان برخوردارند. کینازولین‌ها متعلق به یک دسته معروف از ترکیبات هتروسیکلیک هستند که دامنه وسیعی از فعالیت‌های درمانی را نشان می‌دهند [۳۲ و ۳۳]. آن‌ها به عنوان عوامل ضد فشار خون، ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد درد، ضد تشنج و داروهای ضد سرطان استفاده می‌شوند [۳۴-۳۷].

بسیاری از کینازولین‌ها به عنوان عوامل ضد سرطان دارای چند هدف گزارش شده‌اند که این اهداف عبارتند از: مهار آنزیم‌های مختلف مانند گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR)، آلدوز ردوکتاز (AR)، دی‌هیدروفلوات ردوکتاز (DFR)، فولات تیمیدیلات سنتاز (FTS)، گانوزین مونوفسفره چرخه‌ای (cGMP) فسفودی استراز، اریتروبلاستوز آنکوژن (erB2)، تیروزین کیناز و سارکوم سلولی

¹ Quinazolines

(c- Src) تیروزین کیناز [۴۲ ۳۸]. سایر کینازولین‌ها فعالیت ضد سرطانی خود را با مهار سیستم ترمیم DNA یا توبولین تولید می‌کنند. بسیاری از مشتقات دیگر دارای مهارکننده‌های پلیمراز دوگانه EGFR/توبولین هستند، مانند مشتقات آمیدوکینوکسیالین. مطالعه مدلسازی این داروها نشان داد که تمام این مدل‌های ضد سرطانی دارای قطعات کینازولین حاوی جایگزین‌های مختلف هستند. هسته کینازولین حاوی یک دامنه هیدروفوب (سیستم حلقه آروماتیک) و دو اتم دهنده الکترون N متصل شده به یک حلقه هتروسیکل است در شکل ۱-۷ ساختار کینازولین نمایش داده شده است. قسمت هیدروفوب به استخلاف‌های مختلف حلقه آلیفاتیک یا هتروسیکل با محیط‌های الکترونیکی مختلف متصل می‌شود، در حالی که قسمت حلقوی هتروسیکل در موقعیت‌های ۲ یا ۴ استخلاف می‌شود. تنظیم ساختار از طریق استخلاف هالوژن در موقعیت ۶ کینازولین و همچنین استخلاف فنیل در موقعیت ۳ فعالیت ضد سرطانی این ترکیبات را بهبود می‌بخشد [۴۳-۴۵].



quinazoline

شکل ۱-۷ ساختار کینازولین

۱-۱۶ داکینگ مولکولی^۱

امروزه علم بیوانفورماتیک^۲ در تعامل با سایر رشته‌ها مانند علوم زیستی، کامپیوتر، شیمی و فیزیک (کاربرد مکانیک کوانتومی و مکانیک مولکولی، معادلات شرودینگر، معادلات فیزیک نیوتن و ...) به

^۱ Molecular Docking

^۲ Bioinformatics

عنوان یک علم چندرشته ای در شاخه‌های مختلفی چون مطالعات اُمیک^۱ (ژنومیک^۲، ترانسکریپتومیک^۳، اینترکتومیک^۴ و ...)، کموانفورماتیک^۵، شیمی محاسباتی و... نقش چشمگیری را در علوم آنالیز توالی و ساختار، بررسی برهمکنش بین ملکول‌ها در سطح اتمی، مدل سازی و پیشگویی عملکرد سیستم ایمنی، طراحی دارو و واکسن های جدید و... ایفا کرده است. این علم علاوه بر این که سبب تسریع تحقیقات علمی شده به دلیل تعامل با پروژه‌های ژنوم منجر به دستیابی به اطلاعات بسیار زیادی در زمینه‌های مختلف علوم زیستی گردیده است. در این راستا شناسایی برهمکنش میان ماکرومولکول‌های مختلف در سطح اتمی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. روش‌های بیوانفورماتیکی با تکیه بر ابزارهای ساختاری و پایگاه داده‌های موجود، اغلب توانایی پیش‌بینی و تکمیل نتایج آزمایشگاهی در رابطه با برهمکنش میان ماکرومولکول‌های زیستی را دارند و به عنوان پلی میان آزمایشات تجربی و رهیافت‌های محاسباتی، سبب صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها در فرایند تحقیقات علمی می‌شوند [۴۶].

یکی از این روش‌های بیوانفورماتیکی روش داکینگ ملکولی است، که یک روش کلیدی برای پیش‌بینی ساختار کمپلکس و برهمکنش ماکرومولکول‌ها با یکدیگر (گیرنده-لیگاند) در سطح اتمی است. داکینگ مولکولی، یکی از روش‌های کلیدی شیمی محاسباتی است که به طور معمول در فرایند اکتشاف دارو از آن استفاده می‌شود. با استفاده از این روش، می‌توان به اطلاعاتی مانند محل اتصال لیگاند به پروتئین، نقش هر یک از آمینواسیدهای پروتئین یا اتم‌های لیگاند در برهمکنش و انرژی-های اتصال دست یافت. هم‌چنین ارزیابی برهم‌کنش دو پروتئین با یکدیگر و یا لیگاند با DNA نیز با این تکنیک امکان‌پذیر است. یافتن بهترین جهت‌گیری لیگاند نسبت به سایت فعال گیرنده و تخمین انرژی پیوندی دو جنبه مهم الگوریتم داکینگ هستند. اساساً هدف از داکینگ ملکولی، پیش‌بینی

¹ Omic

² Genomics

³ Transcriptomic

⁴ Interactomic

⁵ Chemoinformatics

ساختار پیچیده لیگاند-گیرنده با استفاده از روش‌های محاسباتی است. این روش نخستین بار در سال ۱۹۸۲ مورد استفاده قرار گرفت و امروزه به طور گسترده به عنوان ابزار جستجوی مجازی در مراحل اولیه فرایند توسعه دارو به کار برده می‌شود [۴۷، ۵۰].

۱-۱۷ فرایند انجام داکینگ مولکولی

فرایند داکینگ شامل دو مرحله اصلی می‌باشد: مرحله اول، مرحله نمونه‌گیری^۱ شامل ایجاد کنفورماسیون‌های مختلف یک لیگاند و بررسی جهت‌گیری آن‌ها نسبت به جایگاه فعال گیرنده می‌باشد. در این مرحله الگوریتم‌های جستجو برای ایجاد صورت‌بندی‌های مختلف یک لیگاند و بررسی جهت‌گیری آن‌ها نسبت به جایگاه فعال گیرنده استفاده می‌گردند. الگوریتم‌ها به سه دسته کلی جستجو براساس تطابق شکل، جستجوی سیستماتیک و جستجو به صورت تصادفی تقسیم می‌شوند.

مرحله دوم، مرحله امتیازدهی است که از آن برای انتخاب بهترین ترکیب و یا بهترین صورت‌بندی لیگاند و همچنین به عنوان مرحله سنجش تمایل اتصال لیگاند به گیرنده استفاده می‌گردد. در طول مرحله نمونه برداری، الگوریتم داکینگ کنفورماسیون‌های مختلفی از لیگاند را در جایگاه فعال گیرنده قرار می‌دهد و براساس تابع امتیازدهی آن‌ها را رتبه بندی می‌کند. در حالت ایده‌آل تابع امتیازدهی بهترین امتیاز (منفی ترین انرژی آزاد اتصال لیگاند-گیرنده) را به کنفورماسیونی از لیگاند متصل به گیرنده اختصاص می‌دهد که از لحاظ سطح انرژی در بهترین حالت خود (حداقل مقدار) باشد.

۱-۱۸ نرم افزارهای رایج داکینگ مولکولی

نرم افزارهای زیادی جهت انجام داکینگ مولکولی توسعه یافته است. هرکاربر بسته به نوع محاسبه و دقتی که از تابع امتیازدهی و الگوریتم جستجو انتظار دارد نرم‌افزار مورد نیاز خود را انتخاب می‌کند.

¹ Sampling

چند نرم‌افزار کاربردی که جهت غربالگری مجازی مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: Dock, Ligmach و ICM, Plants, Glide htvs, flex, Molgero, Auto dock, blaster [۵۶-۵۱].

پرکاربردترین نرم‌افزار جهت انجام داکینگ مولکولی نرم‌افزار اتوداک است که بیشتر به عنوان یک نرم‌افزار داکینگ مولکولی در آزمایش‌های مجازی به منظور پیش‌بینی چگونگی اتصال مولکول‌های کوچک به گیرنده‌ای که ساختار سه بعدی آن مشخص است استفاده می‌شود. این نرم‌افزار در پیش‌بینی پیکربندی کمپلکس‌های آنزیم-مهارکننده، پپتید-آنتی‌بادی و حتی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین با موفقیت استفاده شده است [۵۷]. این برنامه از الگوریتم‌های شبیه‌سازی اتصال، الگوریتم ژنتیک و الگوریتم ژنتیک لانمارکین^۱ به عنوان الگوریتم‌های جستجو استفاده می‌کند. اتوداک نسبت به سایر رقبای خود دارای پایگاه اطلاعاتی قوی‌تری است و رایگان بودن این نرم‌افزار آن را به یک نرم‌افزار محبوب دانشگاهی تبدیل کرده است. به دلیل تولید حجم بسیار بالایی از داده‌ها و اطلاعات، سازماندهی و ذخیره‌ی آن‌ها امری ضروری است. بنابر این پایگاه‌های داده‌ای ایجاد شده‌اند که در آن‌ها حجم بسیار زیادی از اطلاعات زیستی ذخیره شده و به جوامع علمی اجازه می‌دهند که از آن‌ها استفاده نمایند. طبق گزارشی که در سال ۲۰۱۷ در مجله پژوهش‌های نوکلئیک‌اسید ارائه شد، حدود ۱۷۳۹ پایگاه داده‌ای زیستی وجود دارد که از بین آن‌ها می‌توان به پایگاه داده bind PDB [۵۸] و [۵۹] و پایگاه داده ZINC [۶۰] اشاره کرد.

۱-۱۹ شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای

امروزه شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای یکی از بهترین روش‌های موجود برای بررسی ساختار و رفتار مواد هستند و نقش مهمی را در پیشرفت تمامی زمینه‌های علوم و مهندسی ایفا می‌کنند. در گذشته بررسی‌های علمی تنها از روش‌های تجربی امکان‌پذیر بود. روش‌های تجربی فقط برای ترکیباتی که

^۱ Lamarckian genetic

در شرایط موجود پایدار هستند به کار می‌روند در صورتی که روش‌های محاسباتی برای ترکیبات ناپایدار و حتی ترکیباتی که هنوز ناشناخته‌اند نیز قابل استفاده هستند. اولین شبیه‌سازی رایانه‌ای در سال ۱۹۴۹ توسط متروپولیس^۱ و همکارانش بر روی سیالات انجام گرفت که منجر به پیدایش روش شبیه‌سازی

مونت‌کارلو شد. در اواخر دهه ۱۹۵۰ آلدرا^۲ و وین‌رایت^۳ اولین شبیه‌سازی دینامیک مولکولی را با مطالعه یک مدل کره سخت^۴ انجام دادند [۶۱ و ۶۲]. یکی از مهم‌ترین اهداف شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای،

شبیه‌سازی شرایط آزمایش به منظور آشکار ساختن مکانیزم مولکولی در ابعاد میکروسکوپی است. شبیه‌سازی می‌تواند جزئی‌ترین اطلاعات را پیرامون جنبش ذرات به عنوان تابعی از زمان فراهم کند. به عنوان مثال با استفاده از روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌توان خواص پروتئین‌ها و اسیدنوکلئیک‌ها را بررسی و مکانیسم عمل آنزیم‌ها را شناسایی کرد و در طراحی دارو از این روش‌ها بهره برد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یک جعبه‌ابزار بسیار قدرتمند در مدل‌سازی مولکولی مدرن است و ما را قادر می‌سازد تا دینامیک و ساختار را با جزئیات بالا، در ابعادی که حرکت یک اتم تنها بتواند دنبال شود، درک کنیم.

شبیه‌سازی مولکولی از دو روش محاسباتی مونت کارلو (MC) و دینامیک مولکولی (MD) تشکیل شده است، که این دو روش مکانیک آماری محاسباتی نیز نامیده می‌شوند. در هر دو روش با به کارگیری مدل مولکولی مناسب که همان انرژی پتانسیل بین مولکولی است، می‌توان خواص ماکروسکوپی ماده را با انجام محاسبات رایانه‌ای و به دست آوردن مسیرهای مولکولی محاسبه نمود. بنابراین می‌توان گفت نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به نوع مدل مولکولی مورد

¹ Metropolis

² Alder

³ Wainwright

⁴ Hard sphere

استفاده بستگی دارد. از طرف دیگر با مقایسه نتایج حاصل از شبیه‌سازی با نتایج تجربی، می‌توان دقت مدل مولکولی بکار گرفته شده برای سیستم مورد مطالعه را تعیین کرد [۶۳ ۶۶].

۲۰-۱ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

آغاز شبیه‌سازی در سیستم‌های حیاتی به سال ۱۹۷۷ بر می‌گردد، که شبیه‌سازی بر روی تریپسین^۱ گاوی انجام شد. در واقع شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ارزیابی رفتار وابسته به زمان سیستم، با بکارگیری مکانیک کلاسیکی است. دینامیک مولکولی روشی برای شبیه‌سازی رفتار ترمودینامیکی مواد در سه فاز جامد، مایع و گاز با استفاده از نیرو، سرعت و مکان ذرات است. در بین این عوامل، مهم‌ترین عامل، میدان نیرو است. در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کلاسیک، میدان نیرو از پتانسیل کلاسیک به دست می‌آید. پتانسیل کلاسیکی، تابعی از مکان اتم‌ها یا هسته‌ها است و به موقعیت الکترون‌ها در اتم‌ها وابسته نیست [۶۷]. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، سیستمی با اندازه کوچک در حد چند نانومتر را در نظر گرفته و رفتار سیستم را با محاسبه برهمکنش‌های انجام شده بین اجزای سازنده سیستم مشخص می‌کند. با استفاده از این روش می‌توانیم فرایندهای پیچیده‌ای که در سیستم‌های زنده اتفاق می‌افتد را مورد بررسی قرار دهیم. این فرایندها می‌تواند شامل، دینامیک و ترمودینامیک مولکول‌های حیاتی، تغییرات صورت‌بندی آن‌ها و یا مطالعه مکانیسم اثر دارو باشد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اطلاعاتی را در سطح میکروسکوپی از جمله موقعیت و سرعت اتم‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد. برای تبدیل خواص میکروسکوپی به خواص ماکروسکوپی مانند انرژی، فشار، گرمای ویژه و غیره به مکانیک آماری نیاز است. در واقع مکانیک آماری پلی بین خواص میکروسکوپی و ماکروسکوپی می‌باشد که با بیان ریاضی، خواص مشاهده‌پذیر سیستم را به توزیع و حرکت اتم‌ها و مولکول‌های سیستم ارتباط می‌دهد و با استفاده از آن اطلاعاتی درباره خواص مختلف سیستم از جمله

¹ Trypsin

انرژی، خواص ساختاری، دینامیکی، مکانیکی و غیره به دست می‌آید. در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با انتگرال‌گیری از قوانین حرکت نیوتن، پیکربندی پی‌درپی سیستم به دست می‌آید [۶۸].

معادله حرکت، تحول زمانی یک سیستم فیزیکی را توصیف می‌کند. چند نوع معادله حرکت وجود دارد، که با روش‌های مختلفی حرکات را بررسی می‌کنند، که در جدول ۱-۲ نشان داده شده است.

جدول ۱-۲ معادله‌های حرکت سیستم‌های مختلف

معادله حرکت	نوع سیستم
معادله شرودینگر وابسته به زمان	سیستم مکانیک کوانتومی
معادله نیوتن	سیستم مکانیک کلاسیکی
معادله لانژوین ^۱	سیستم کاتوره ای

۱-۲۱-۱ کمیت‌های مهم در شبیه‌سازی

کمیت‌های مهم در شبیه‌سازی به دو دسته کمیت‌های فیزیکی و کمیت‌های اجرایی تقسیم می‌شوند. کمیت‌های فیزیکی به آن دسته از کمیت‌ها گفته می‌شود که می‌توان آن‌ها را مستقیماً در آزمایشگاه اندازه‌گیری کرد مانند دما، فشار و انرژی. کمیت‌های اجرایی نیز کمیت‌هایی هستند که در حین اجرای برنامه شبیه‌سازی برای محاسبه برخی کمیت‌های فیزیکی دیگر به آن‌ها نیاز است.

۱-۲۱-۱-۱ انرژی

انرژی به دو انرژی جنبشی و پتانسیل تقسیم می‌شود. محاسبه مقادیر انرژی پتانسیل لحظه ای و نیرو به صورت همزمان تقریباً کار ساده‌ای است. محاسبه مقدار انرژی جنبشی لحظه ای از رابطه زیر امکان پذیر است.

$$k(t) = \frac{1}{2} \sum_i m_i (v_i(t))^2 \quad (۴-۱)$$

^۱ Langevin

که در این رابطه، m_i و V_i به ترتیب جرم میانگین و سرعت میانگین در لحظه‌ی t هستند. به دلیل وجود افت و خیز در مقادیر لحظه‌ای انرژی جنبشی و پتانسیل در طول انجام شبیه‌سازی، ممکن است مقادیر انرژی کل نیز دارای افت و خیز شود. البته در بعضی مجموعه‌ها، مثل مجموعه میکروکانونیکال انرژی کل ثابت است و این باعث می‌شود تا با محاسبه آن در هر گام زمانی درستی شبیه‌سازی بررسی شود.

۱-۲۱-۲ دما

با استفاده از قضیه همبخشی انرژی، دمای لحظه‌ای $T(t)$ به شکل زیر تعریف می‌شود:

$$T(t) = \frac{2}{3NK_B} K(t) \quad (۵-۱)$$

در رابطه فوق K_B ثابت بولتزمن و $3N$ تعداد درجات آزادی دستگاه است. با گذشت زمان، دمای لحظه‌ای افت و خیز می‌کند و دمای ماکروسکوپی T از میانگین‌گیری زمانی دمای لحظه‌ای محاسبه می‌شود [۶۹].

$$T = \frac{1}{3NK_B} \sum_{i=1}^N m_i \langle v_i^2(t) \rangle \quad (۶-۱)$$

۱-۲۲ مزیت‌های استفاده از روش شبیه‌سازی دینامیک

مولکولی

- امکان شبیه‌سازی در شرایط حدی^۱ (فشار، چگالی و دماهای بسیار بالا یا بسیار کم) که دستیابی به آن‌ها در آزمایشگاه مشکل است.

- آزمون مدل خاصی که برای برهمکنش بین ذره‌ها در نظر گرفته شده و بهسازی آن.

^۱ Extreme

- ارزیابی نظریه‌های میکروسکوپی، مثل نظریه‌های ذوب در مقیاس‌هایی که در آزمایشگاه ممکن نیست.

- امکان کنترل فرایند در مقیاس میکروسکوپی.

- دسترسی به جزئیات دستگاه در هر لحظه

- امکان اعمال تغییرات لحظه‌ای متغیرهای ترمودینامیکی مثل دما، فشار و حجم.

- هزینه کم و تقریباً بدون هزینه اجرایی.

امروزه برنامه‌های شبیه‌سازی بدون نیاز به کدنویسی طاقت‌فرسا، زمان‌بر و استخراج داده‌های تجربی، باعث سرعت گرفتن مدل‌سازی شده‌اند. نرم‌افزارهای اصلی و پرکاربرد در حوزه دینامیک مولکولی و میدان‌های نیروی مورد استفاده در آن‌ها در جدول ۱-۳ نشان داده شده است [۷۰ و ۷۱].

جدول ۱-۳ نرم افزارهای اصلی و پرکاربرد در حوزه دینامیک مولکولی و میدان‌های نیروی مورد استفاده در آن‌ها

میدان نیرو	مجموعه MD	گروه توسعه دهنده نرم‌افزار
GROMOS	GROMACS	گرونینگن
CHARMM	CHARMM	هاروارد
AMBER	AMBER	سانفرانسیسکو
GROMOS	GROMOS	زوریخ
OPLS	-	پوردو/بیل آمریکا
-	NAMD	اوربان آمریکا
-	ACEMD	بارسلون
-	DESMOND	نیویورک

۲۳- ۱ ماهیت دارو

دارو به ماده‌ای گفته می‌شود که با اثر بر گیرنده‌ای خاص در داخل، خارج یا دیواره سلول باعث شروع یا مهار عملکردی خاص می‌گردد. قدرت اثر دارو با میزان و تعداد این تعامل نسبت مستقیم دارد. ترکیبات دارویی دارای یک سری ویژگی هستند که، از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ایجاد پیوندهای شیمیایی قوی با گیرنده

- پیکربندی صحیح

- گزینش پذیری زیاد

- قطبیت مناسب [۷۲].

۲۴- ۱ دینامیک مولکولی و طراحی دارو

دینامیک مولکولی و مکانیک سیستم‌های زیستی کاربرد فراوانی در زمینه طراحی دارو دارند. در حال حاضر طراحی دارو و بهینه‌سازی ساختار به صورت گسترده‌ای مبتنی بر علم کموانفورماتیک است. این حوزه از علم عبارت است از استفاده از کامپیوتر و تکنیک‌های محاسباتی جهت حل مسائل مرتبط با علم شیمی و در برگیرنده چندین شاخه مهم از جمله غربالگری مجازی^۱، کیوسار یا ارتباط کمی عملکرد- ساختار^۲، جستجوی فارماکوفور^۳ و طراحی دنوو^۴ می‌باشد [۷۳]. به طور کلی، زمانی که میان یک ترکیب مولکولی کوچک (داروئی / لیگاند) با ماکرومولکول دیگری چون پروتئین که می‌تواند (آنزیم، پذیرنده و غیره باشد)، DNA، RNA، پپتید یا مولکول کوچک دیگری باشد برهمکنش (داکینگ) صورت گیرد، باید علاوه بر بررسی انرژی واکنش و پیوندهای هیدروژنی، آبگریز، کوالانسی و

¹ Virtual screening

² Quantitati structure-activity relationship

³ Pharmacophore search

⁴ De novo design

غیره و همچنین بررسی طرز برقراری پیوند و حرکت عناصر واکنش‌دهنده در جایگاه اتصال، جهت اطمینان از صحت و اعتبارسنجی این میانکنش، از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده گردد. در واقع می‌توان گفت دینامیک مولکولی معادل تست‌های تایید تشخیص در آزمایشگاه عمل می‌کند.

امروزه طراحی دارو بر اساس ساختار پروتئین‌های هدف، یک روش موفق در کشف دارو است. روش معمول طراحی دارو شامل طراحی مولکول‌هایی است که می‌توانند به صورت اختصاصی به دامنه ساختاری پروتئین هدف متصل شده و با تنظیم فعالیت پروتئین متصل در روند بیماری اختلال ایجاد کرده و باعث توقف و یا کند شدن آن شوند. به عنوان مثال، طراحی مولکول‌هایی که برهمکنش مکمل را در جایگاه فعال پذیرنده به بیشترین میزان برسانند، به عنوان یک روش مفید و کاربردی در طراحی ساختار مهارتی استفاده می‌شود [۷۴]. همچنین مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌تواند منجر به شناسایی دیگر جایگاه‌های احتمالی اتصال دارو بر روی گیرنده هدف گردد. این جایگاه‌ها تنها از طریق ساختارهای تجربی حاصل از روش‌هایی مانند بلورشناسی پرتو ایکس^۱ قابل دستیابی نیستند. اسکامس و همکارانش با استفاده از روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، محل اتصال جدیدی را در HIV-1 پینتگراز شناسایی کردند که در نهایت منجر به کشف داروی Raltegravir، به عنوان نخستین دارو از سری جدید داروهای ضد ایدز شد [۷۵].

۲۵-۱ روش‌های طراحی دارو با استفاده از کامپیوتر

امروزه طراحی دارو به کمک کامپیوتر که در واقع شامل طراحی دارو از روی ساختار می‌باشد، توانسته زمان مورد نیاز جهت شناسایی و طراحی ترکیبات دارویی، نوع آن‌ها و بهینه‌سازی ساختارشان را به حداقل برساند. طی ۲۰ سال گذشته این روش توسعه و گسترش فراوانی یافته و به یکی از شاخه‌های علمی مهم در شیمی دارویی تبدیل شده است. روش‌های طراحی دارو به وسیله کامپیوتر به سه دسته تقسیم می‌شوند، که هر سه بر مبنای لیگاند و گیرنده هستند.

^۱ Crystallography ray-x

۱-۲۵-۱ روش مبتنی بر لیگاند^۱

در صورتی که ساختار سه بعدی گیرنده مشخص نباشد ولی ساختار لیگاندها معلوم باشد از روش مبتنی بر لیگاند استفاده می‌گردد. در این روش با مطالعه بر روی ترکیباتی که با مولکول‌های زیستی واکنش انجام می‌دهند به دنبال طراحی ترکیباتی هستند که از لحاظ فارماکولوژیکی فعال هستند. در روش‌های طراحی دارو مبتنی بر لیگاند، در فقدان ساختار مولکول‌های زیستی با مطالعه لیگاندهای مشخص به دنبال شناخت ویژگی‌های ساختاری و فیزیکوشیمیایی ترکیبات بوده تا بتوان ترکیب مورد نظر را بر اساس داده‌هایی که از مطالعه ترکیبات قبلی استخراج شده، طراحی نمود. این روش به نوعی طراحی دارو بر اساس فارماکوفور^۲ است (فارماکوفور به قسمتی از دارو اطلاق می‌شود که اثر دارو وابسته به آن بخش از مولکول است) مطالعه روابط کمی ساختار با فعالیت آن‌ها می‌تواند داروها را به وسیله این روش طراحی نمود، به طوریکه می‌توان گفت روشی برای طراحی فارماکوفور داروهاست [۷۶].

۱-۲۵-۲ روش مبتنی بر گیرنده^۳

در صورتی که ساختار سه بعدی مولکول‌های لیگاند و گیرنده آن مشخص باشد روش مبتنی بر گیرنده، بهترین روش جهت شناسایی و یا بهینه کردن داروها است که روش به کار گرفته شده در این پایان نامه می‌باشد. در این روش به دلیل حضور ساختارهای سه بعدی ترکیبات دارویی و گیرنده، ماهیت برهم‌کنش بین لیگاند و گیرنده و از طرفی نوع ساختاری که لیگاند می‌تواند داشته باشد تا بر هم‌کنش بین آن‌ها در شرایط مطلوبی صورت پذیرد را می‌توان تشخیص داد. ترکیب بر روی جایگاه فعال داک شده و بر هم‌کنش لیگاند با رسپتور به وسیله مکانیک و دینامیک مولکولی شبیه‌سازی می‌شود. بر اثر

¹ Ligand Based Approach

² Pharmacophore

³ Dock Reseptor Based Approach

داک شدن لیگاند در جایگاه فعال، لیگاند از لحاظ کنفورماسیونی تغییر پیدا کرده و در شرایط مختلف وضعیتش عوض می‌شود و در انواع حالات مختلف با گیرنده برهم‌کنش نشان می‌دهد. برای تعیین نوع لیگاندهایی که می‌توانند به جایگاه گیرنده داک شوند، تطابق شکل و نیز مکمل بودن قسمت‌های آبگریز، آبدوست و باردار در هر دو باید مورد بررسی قرار گیرد. از نرم افزارهایی مثل AUTODOCK، Glide، LUDI و Ligandfit در این روش می‌توان استفاده نمود [۷۷].

۳-۲۵-۱ روش طراحی دی نوو

این روش زمانی که ساختار لیگاند نامشخص و ساختار گیرنده مشخص باشد کاربرد دارد. در این روش اطلاعاتی از ساختار ترکیب اصلی که با جایگاه فعال گیرنده بتواند برهم‌کنشی داشته باشد در دسترس نیست، اما اطلاعاتی مربوط به ساختار گیرنده یا شبیه به گیرنده موجود است. یکی از راه‌های طراحی دارو با این روش ارائه ترکیبی است که مکمل جایگاه فعال باشد. اساس این روش استفاده از پایگاه داده ساختارهای سه بعدی، جهت یافتن مولکول‌های کوچکی است که بتوانند از لحاظ اندازه، ژئومتری و گروه‌های عاملی واکنش مناسبی با جایگاه فعال گیرنده داشته باشند. از نرم افزارهایی مانند GROW و LEGEND برای طراحی دارو به وسیله این روش استفاده می‌شود [۷۸].

۳-۲۶ قانون پنج تایی لیپینسکی^۱

این قاعده توسط کریستوفر لیپینسکی در سال ۱۹۹۷ تدوین شد. این قانون خواص مولکولی مهم را برای فارماکوکینتیک دارو در بدن انسان از جمله جذب، توزیع، متابولیسم و دفع آن‌ها توصیف می‌کند [۷۹]. این قانون بیان می‌کند، مولکول‌هایی دارای خاصیت دارویی هستند که مشخصات زیر را دارا باشند:

¹ Lipinski's rule of five

۱- گروه‌هایی که در پیوند هیدروژنی می‌توانند دهنده اتم هیدروژن باشند نباید بیشتر از ۵ باشند (گروه‌های آمین و هیدروکسیل).

۲- گروه‌هایی که در پیوند هیدروژنی می‌توانند گیرنده اتم هیدروژن باشند بیشتر از ۱۰ نباشند (اتم‌های نیتروژن و اکسیژن).

۳- شکست مولی^۱ در محدوده ۴۰ تا ۱۳۰ باشد.

۴- وزن مولکولی نباید بالاتر از ۵۰۰ دالتون باشد.

۵- (لگاریتم ضریب تقسیم بین آب و ۱-اکتانول)^۲ مولکول بیشتر از ۵ نباشد [۸۰].

¹ Molar refractivity

² cLogP

فصل ۲: روش محاسبات

۱-۲ آماده سازی فایل ورودی پروتئین

آنزیمی که در این پایان نامه روی آن مطالعه و تحقیق صورت گرفته، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال است. در مرحله اول ما باید به ساختار سه بعدی این پروتئین دست پیدا کنیم. این ساختار سه بعدی با استفاده از پایگاه داده RCSB protein data bank قابل دستیابی است. در صفحه اصلی این پایگاه داده، محلی برای جستجوی مولکولها وجود دارد که می توان براساس شناسه آن ماکرومولکول، توالی و لیگاند اختصاصی آن، به ساختار سه بعدی پروتئین دست پیدا کرد.

پس از جستجوی پروتئین، پایگاه داده تعداد زیادی از ساختارهای این پروتئین را در آرگانیزمهای مختلف نمایش می دهد که براساس کدشناسایی پروتئین مورد نظر، آرگانیزم بخصوص انتخاب و فایل مربوط به آن ذخیره گردید. این فایل، ساختار و تمام مشخصات پروتئین را در اختیار قرار می دهد. کد آنزیم گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال 1M17 می باشد. در شکل ۱ ۲ تصویری از سایت RCSB نمایش داده شده است.

The screenshot shows the RCSB PDB website interface for entry 1M17. The main content area displays the protein name 'Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase domain with 4-anilinoquinazoline inhibitor eriotinib' and its DOI: 10.2210/pdb1M17/pdb. It also lists classification as TRANSFERASE, organism as Homo sapiens, and expression system as Spodoptera frugiperda. The experimental data snapshot shows the method as X-RAY DIFFRACTION, resolution as 2.6 Å, R-Value Free as 0.295, and R-Value Work as 0.251. The wwPDB Validation plot shows percentile ranks for various metrics: klfsae (0.256), Clashscore (1.1), Ramachandran outliers (2.3%), Sidechain outliers (2.6%), and RSAD outliers (4.8%).

شکل ۱ ۲. تصویری از سایت RCSB

این پایگاه داده امکان دانلود فایل ساختار پروتئین با فرمت‌های مختلف را فراهم کرده است. فرمت مورد نیاز و قابل خواندن برای نرم افزار مولگرو PDB و mol2 است.

برای انجام بهتر فرایند داکینگ و صحت بیشتر نتایج حاصل از آن، لازم است که یک سری تنظیمات روی متغیرها صورت گیرد و وضعیت زنجیره‌های جانبی، آمینواسیدها، حلقه‌ها و میزان پروتونه بودن ساختار پروتئین مورد بررسی قرار گیرد. به دلیل اینکه حتی بهترین ساختارهای ذخیره شده قدرت تفکیک یک آنگستروم یا بیشتر دارند، اتم‌های هیدروژن در آن‌ها دیده نمی‌شوند و باید هیدروژن‌هایی که در ساختار کریستالوگرافی دیده نمی‌شوند به آن‌ها اضافه و مولکول‌های آب همراه پروتئین حذف شوند.

بعد از تعیین بارهای جزئی پروتئین به روش کلمن^۱، جعبه‌ای شبکه‌ای که مرکز آن در جایگاه فعال پروتئین قرار گرفته بود با ابعاد $۹۹.۸۳۱ \times ۷۱.۸۰۸ \times ۵۸.۰۴۵$ آنگستروم در جهات X، Y و Z تعریف شد. فاصله بین نقاط شبکه ۰.۲۷۵ آنگستروم در نظر گرفته شد. جهت انجام محاسبات، مهارکننده‌ها به صورت انعطاف‌پذیر و پروتئین به صورت انعطاف‌ناپذیر و سخت در نظر گرفته شدند.

۲-۲ داروی مرجع

باتوجه به مطالعات صورت گرفته بر روی تعدادی از مشتقات کینازولین مشخص شده است که ترکیب (۶- فلوتورو-۲- (۴- فلوتوروفنیل)-۳- (۲- اکسواپندولین-۳- ایلیدین) آمینو) کینازولین-۴(H^۳)- آن قوی‌ترین ترکیب جهت مهار آنزیم فاکتور رشد اپیدرمال است [۸۱]. در این پایان نامه از این ترکیب به عنوان داروی مرجع استفاده شده است. با استفاده از پایگاه داده ZINC مشتقات کینازولین که تعداد ۲۶۴ ترکیب بودند برای بررسی با استفاده از نرم افزار مولگرو استخراج شدند تا بعد از انجام فرایند داکینگ از بین این ۲۶۴ ترکیب سه ترکیب با انرژی اتصال مطلوب‌تر برای انجام بررسی‌های

¹ Kollman Charge

بیشتر با نرم افزار امبر انتخاب شوند.

۲-۳ پایگاه داده ZINC

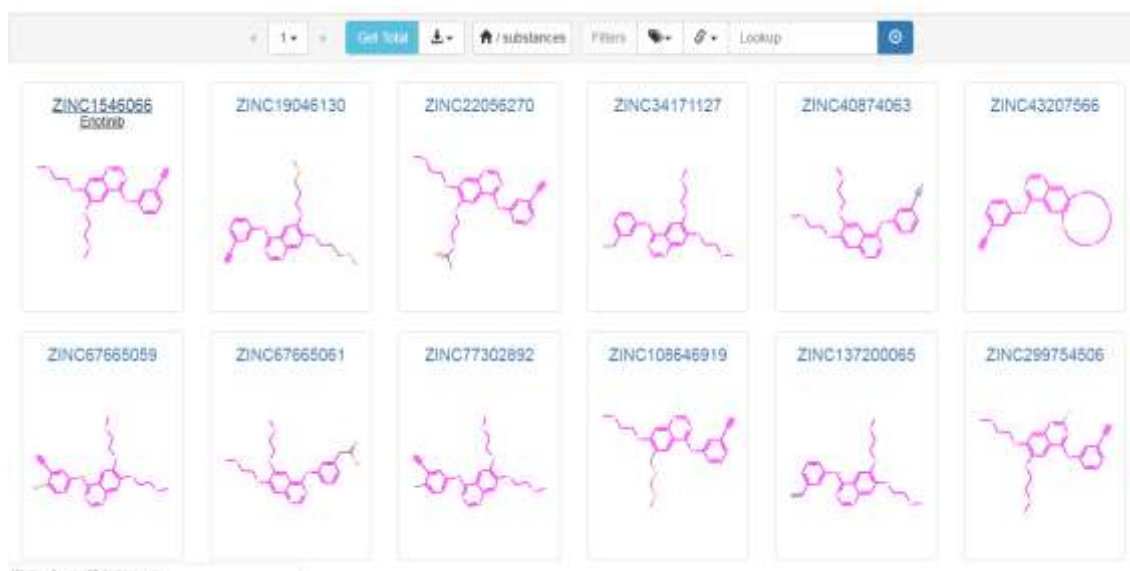
ZINC یک بانک اطلاعاتی رایگان از ترکیبات تجاری موجود برای غربالگری مجازی است، این بانک اطلاعاتی، مولکول‌های سه بعدی را در چندین قالب سازگار با اکثر برنامه‌های داکینگ فراهم می‌کند. برای دسترسی به ساختارهای بیشتری از لیگاندهای یک پروتئین می‌توان از این پایگاه داده استفاده کرد. برای این کار باید لیگاند اختصاصی پروتئین مشخص باش. شکل ۲-۲ ساختار دو بعدی و سه بعدی لیگاند اختصاصی پروتئین 1M17 را نشان می‌دهد.



شکل ۲-۲. ساختار دو بعدی و سه بعدی لیگاند اختصاصی پروتئین در پایگاه داده ZINC

در صفحه اصلی این پایگاه داده گزینه ای با عنوان Substances وجود دارد که ساختار لیگاندها در آنجا جستجو می‌شود. در این قسمت امکان جستجوی ساختار لیگاندها براساس نام آن‌ها، فرمول‌های شیمیایی آن‌ها و یا آپلود فایل لیگاندها وجود دارد، همچنین می‌توان مستقیماً ساختار لیگاند را ترسیم و به ساختارهای بیشتری از آن دست پیدا کرد. بعد از انجام این کار گزینه Substructure را انتخاب

کرده تا ساختارهای دیگری نمایش داده شود که هرکدام از آنها شناسه‌های ZINC متفاوتی دارند و آن لیگاند اختصاصی بخشی از این ساختارها است که با رنگ بنفش نمایش داده شده است. در شکل ۳-۲ تصویری از ساختارهای متفاوت لیگاندها در پایگاه داده ZINC نمایش داده شده است. در این پایگاه داده امکان ذخیره فایل‌ها با فرمت‌های متفاوت وجود دارد. همانطور که قبلاً اشاره شد، فرمت مورد نیاز برای لیگاندها mol2، PDB و SDF است.



شکل ۳-۲ تصویری از ساختارهای متفاوت لیگاندها در پایگاه داده ZINC

۲-۴ ترسیم و بهینه سازی مهارکننده‌ها

در ابتدا براساس جایگاه فعال پروتئین، مهارکننده یا لیگاند اختصاصی آن مشخص می‌شود. قبل از شروع به انجام فرایند داکینگ نیاز است که مولکول دارای یک ساختار مناسب باشد. بنابراین باید ساختار مهارکننده‌ها رسم و بهینه شوند و پایدارترین حالت با حداقل انرژی برای آنها مشخص گردد. مینیمم مقدار انرژی یا بهینه کردن، تکنیک مهمی در محاسبات اتصال مولکولی است. بهینه کردن کمپلکس، به لیگاند این اجازه را می‌دهد تا در جایگاه فعال پروتئین، موقعیتی با کمترین انرژی را

کسب کند. برای این کار ساختار لیگاندها با نرم‌افزار کم‌دراو^۱ رسم و سپس به منظور به حداقل رساندن انرژی آن‌ها از نرم‌افزار گوسین و روش محاسباتی DFT در سطح B3LYP و مجموعه پایه 6-31 G** استفاده شد.

۲-۵ آماده سازی فایل ورودی مهارکننده‌ها

فایل ورودی مهارکننده‌ها برای انجام فرایند داکینگ با نرم‌افزار مولگرو باید از نوع PDB، mol2 و یا SDF باشد. برای تهیه فایل ساختاری لیگاندها، با استفاده از نرم افزار گوس^۲ و یو^۳ ساختار سه بعدی کانفورمر با کمترین انرژی ترسیم شد. هیدروژن‌های قطبی به ساختار مهارکننده‌ها اضافه و بارهای اتمی جزئی گستیگر^۳ برای آن‌ها مشخص گردید. میزان حرکت چرخش‌های فعال برای پیوندهای مهارکننده‌ها، به میزان بیشترین پیوندهای قابل چرخش تنظیم شد. پیوندهای قابل چرخش و بارهای گستیگر در یک فایل با فرمت PDB ذخیره گردید تا در زمان انجام فرایند داکینگ مهارکننده‌ها، از این فایل استفاده شود.

۲-۶ فرایند داکینگ مولکولی

۲-۶-۱ معرفی پارامترها و روش کار با نرم افزار مولگرو

قبل از شروع فرایند، ابتدا می‌بایست فایل‌های ورودی پروتئین و لیگاند را به طریقی که قبلاً گفته شد تهیه نموده، سپس فایل‌ها را وارد نرم افزار مولگرو کرده و فرایند داکینگ انجام می‌شود. در نهایت نرم افزار، کمپلکس داک شده و ترکیبات بهتر و موقعیت‌های مناسب‌تر را تعیین می‌کند. نرم افزار مولگرو

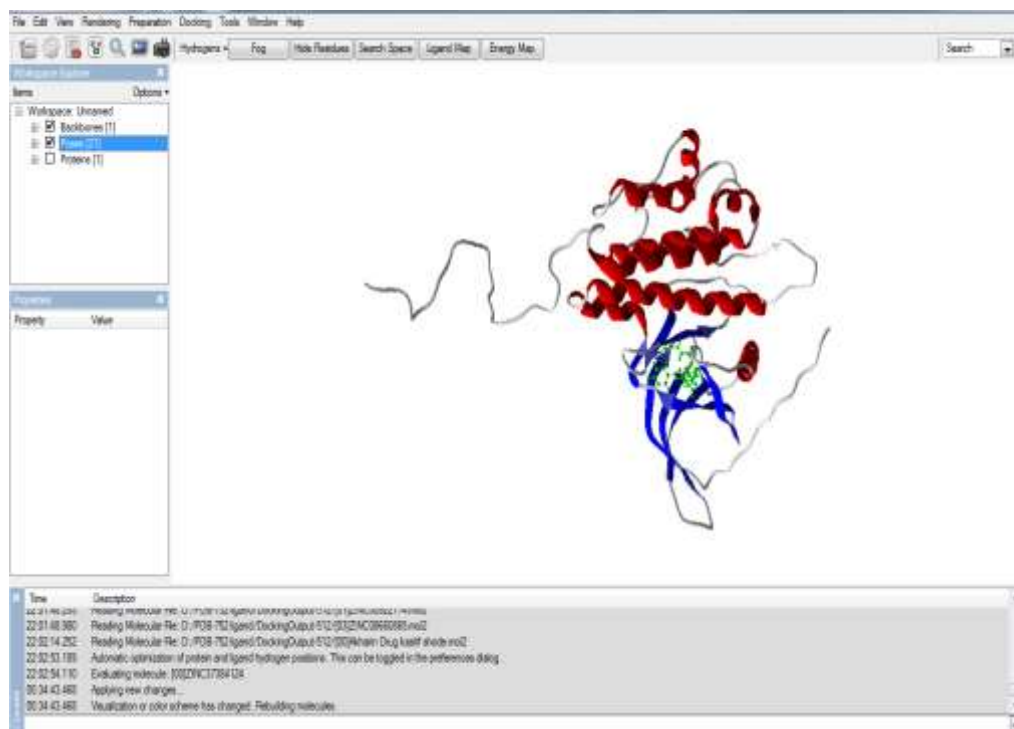
¹ Chem Draw

² Gauss view

³ Gasteiger

یک نرم افزار کاربردی برای شبیه سازی و طراحی اتصالات بین مولکولی ترکیبات و مولکول های مختلف می باشد و همانند سایر نرم افزارها دارای بخش های متفاوتی است که در اینجا به آن ها اشاره می شود.

صفحه اصلی نرم افزار شامل یک کادر اصلی، یک سری پنجره ها و گزینه های مختلف است. کادر اصلی محل قرارگیری مولکول هایی است که می خواهیم عملیات داکینگ را روی آن ها انجام دهیم که به آن Work space گفته می شود شکل ۲-۴.



شکل ۲-۴ صفحه اصلی نرم افزار مولگرو به همراه پروتئین و لیگاند

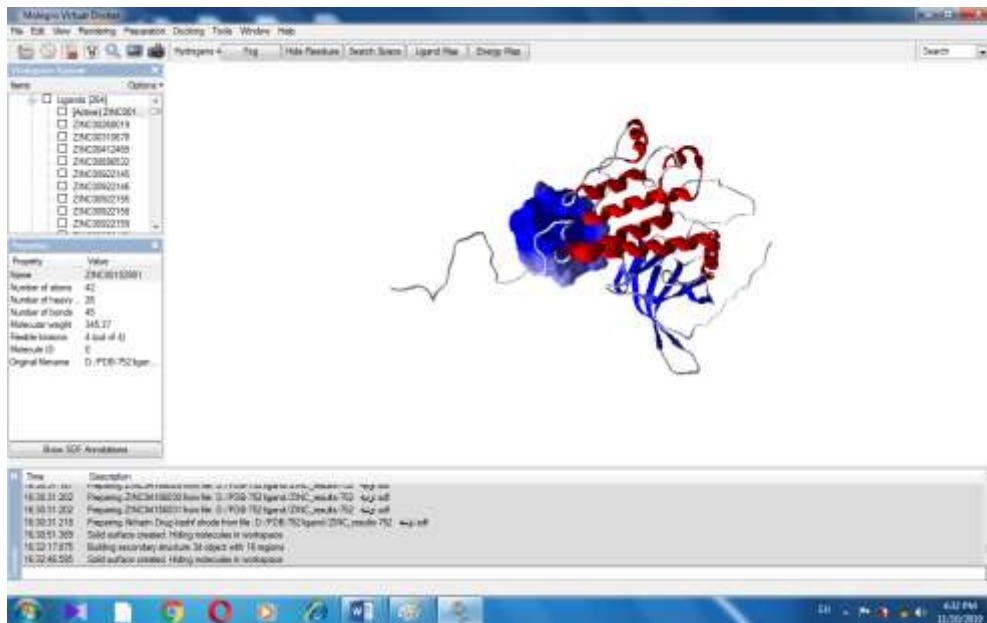
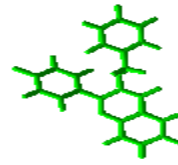
پنجره Work space Explor در سمت چپ و بالای صفحه اصلی قرار دارد و تمام مولکول هایی که برای داکینگ مورد استفاده قرار می گیرند را لیست و نشان می دهد. این مولکول ها می توانند لیگاندها، پروتئین یا ساختارهای مختلفی از پروتئین که انتخاب شده است، باشند. از طریق این پنجره می توان مولکولی را اضافه، حذف و یا اینکه مولکولی را با مولکول دیگر جابه جا نمود.

پنجره properties در زیر پنجره Work space Explor قرار دارد. این پنجره تمام اطلاعات مربوط به مولکول‌هایی که برای داک شدن انتخاب شده‌اند را نشان می‌دهد. بعد از انتخاب مولکول‌ها در Work space با قرار دادن موس روی هر کدام از آنها، اطلاعات مربوط به آن در این پنجره نمایش داده می‌شود. پنجره Console قسمت چپ و پایین صفحه قرار دارد و هر عملیاتی که در حال انجام است نشان می‌دهد. به عنوان مثال نشان می‌دهد که در چه زمانی چه عملیاتی در حال انجام است و اگر خطایی ایجاد شود آن عمل خطا را با رنگ زرد نمایش می‌دهد.

در قسمت بالای نرم‌افزار سربرگ‌هایی وجود دارد که برای دسترسی راحت و سریع‌تر، جهت انجام بعضی از عملیات‌ها استفاده می‌شوند. به عنوان مثال وارد کردن مستقیم مولکول به صفحه نرم‌افزار یا انجام مستقیم داکینگ و غیره.

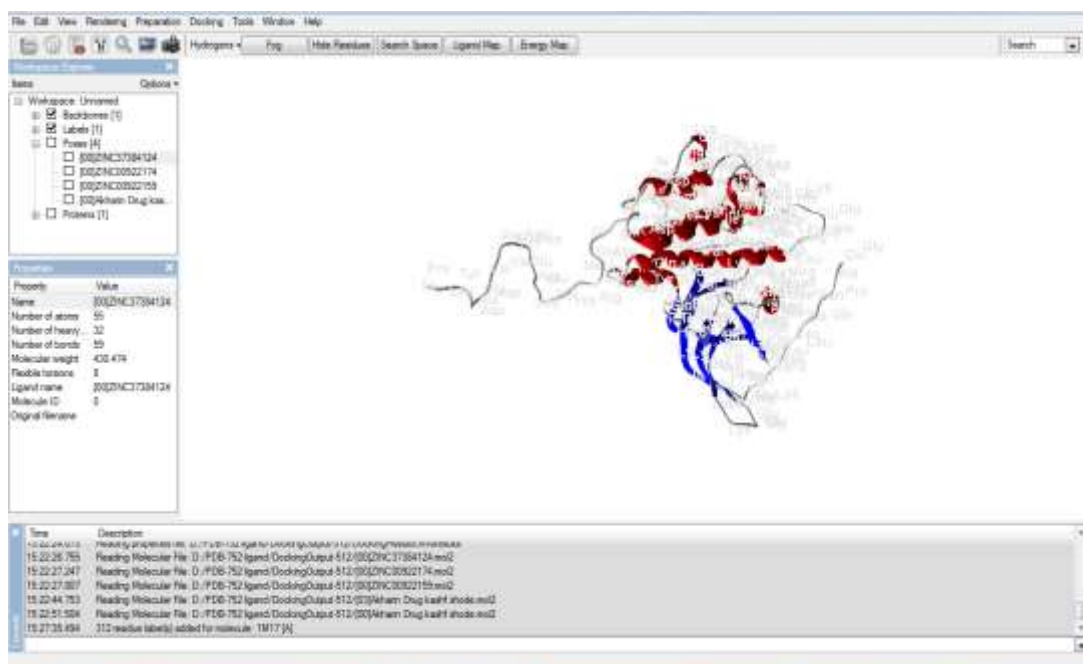
۲-۶-۲ روش انجام فرایند داکینگ

برای شروع فرایند داکینگ ابتدا باید پروتئین و لیگاندهای مورد نظر را وارد نرم‌افزار نمود. این کار با استفاده از زبانه File و سپس گزینه import molecule انجام می‌گیرد. با استفاده از مسیری که فایل پروتئین و لیگاندها ذخیره شده بودند آن‌ها را وارد نرم‌افزار کرده و سپس گزینه import انتخاب می‌شود شکل ۲. گزینه‌ای با عنوان Hydrogens در بالای صفحه وجود دارد که نحوه نمایش هیدروژن‌ها را مشخص می‌کند و با استفاده از آن می‌توان هیدروژن‌های قطبی را اضافه کرد. گزینه بعدی Hide residues است که با استفاده از این گزینه اسیدآمین‌هایی که می‌خواهیم نمایش داده شوند انتخاب می‌گردند.

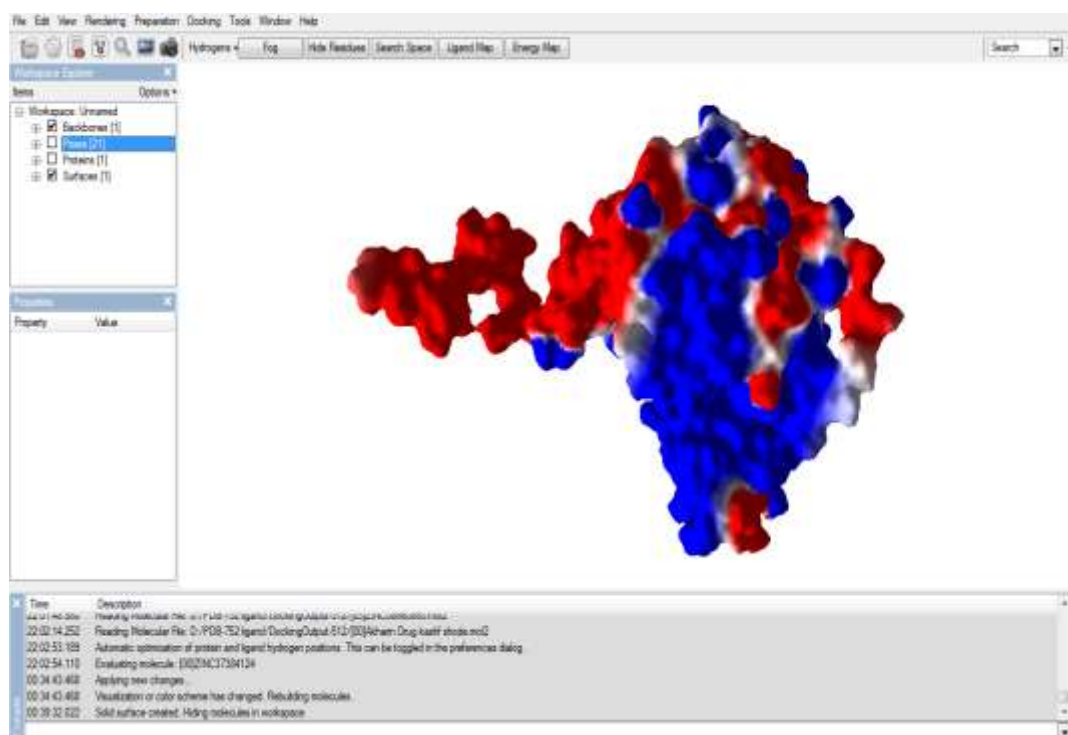


شکل ۲-۵ وارد کردن پروتئین و لیگاند به نرم افزار مولگرو جهت انجام فرایند داکینگ

قبل از شروع فرایند داکینگ باید یک سری آماده سازی‌ها روی پروتئین و لیگاندها انجام گیرد تا فرایند دچار خطا نشود. برای انجام اینکار از زبانه Tools استفاده می‌گردد. در این زبانه با انتخاب گزینه Labels می‌توان مولکول‌ها را نشانه‌گذاری کرد تا قابل افتراق از یکدیگر باشند شکل ۲-۶. گزینه بعد در زبانه Tools گزینه Surfaces می‌باشد که سطح مولکول مورد نظر ما را نشان می‌دهد که این سطح بر اساس شعاع واندروالس هر اتم است شکل ۲-۷.



شکل ۲-۶ برچسب گذاری پروتئین



شکل ۲-۷ نمایش سطح مولکول

گزینه بعدی در این زبانه RMSD Matrices است که نحوه تشابه ساختار سه بعدی دو پروتئین مختلف را نمایش می‌دهد. گزینه بعدی Minimization Sidechaine می‌باشد که از آن برای حداقل کردن انرژی زنجیره‌های جانبی استفاده می‌شود تا این زنجیره‌ها به صورتی قرار بگیرند که کمترین انرژی

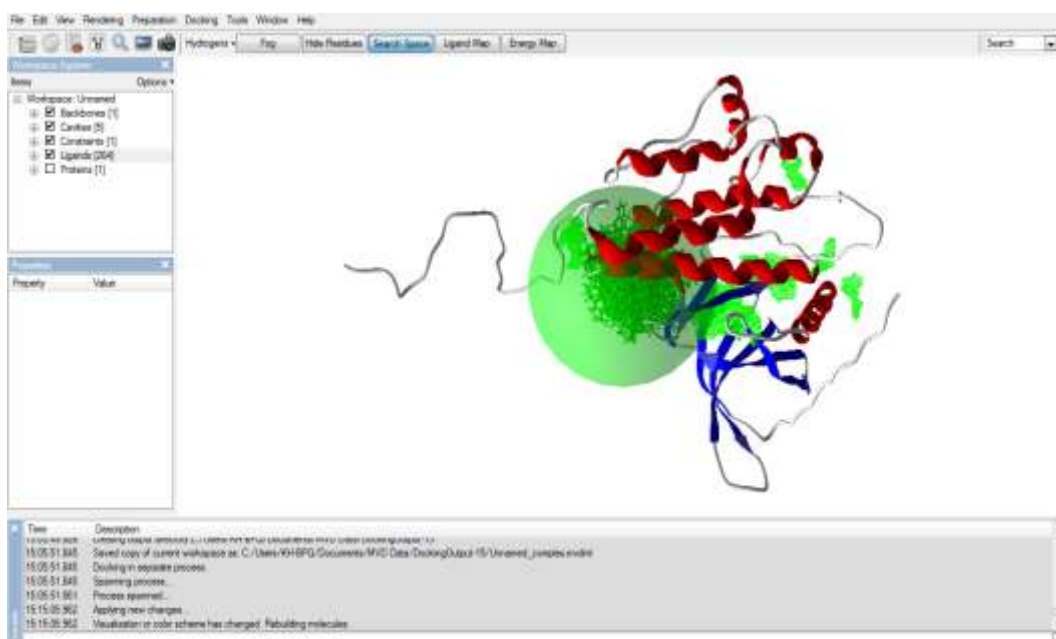
اتصال را داشته باشند. با استفاده از این گزینه تغییری در ساختار پروتئین و لیگاندها ایجاد نمی‌شود و فقط زاویه‌های چرخش به گونه‌ای تغییر می‌کنند که بهترین حالت را داشته باشند.

زبانه Rendering امکان انتخاب نحوه نمایش مولکول‌ها را به ما می‌دهد، که شامل گزینه‌های مختلفی از جمله پروتئین‌ها، لیگاندها، پوزها^۱، کوفاکتورها و ... می‌باشد. بهترین حالت برای پروتئین مدل Ball and Stick است و برای این که پروتئین و لیگاند قابل تشخیص از یکدیگر باشند برای لیگاند مدل Spacefill (CPK) یا فضاپر کن انتخاب می‌شود.

در ادامه برای آماده سازی پروتئین و لیگاند وارد زبانه Preparation شده و گزینه Assign All در حالت Below قرار می‌گیرد. این کار به این جهت انجام می‌شود که اگر در ساختار پروتئین اطلاعات اشتباهی وجود دارد که باعث می‌شود فرایند داکینگ با خطا مواجه شود آن را برای ما تصحیح کند. گزینه بعدی در زبانه Preparation، Detect cavities است که برای مشخص کردن محل برهمکنش لیگاند و پروتئین استفاده می‌شود. ماکسیمم تعداد حفره‌ها روی δ تنظیم می‌گردد. از بین حفره‌ها، حفره‌ای که دقیقاً در محل برهمکنش لیگاند قرار دارد انتخاب و مابقی حذف می‌شود

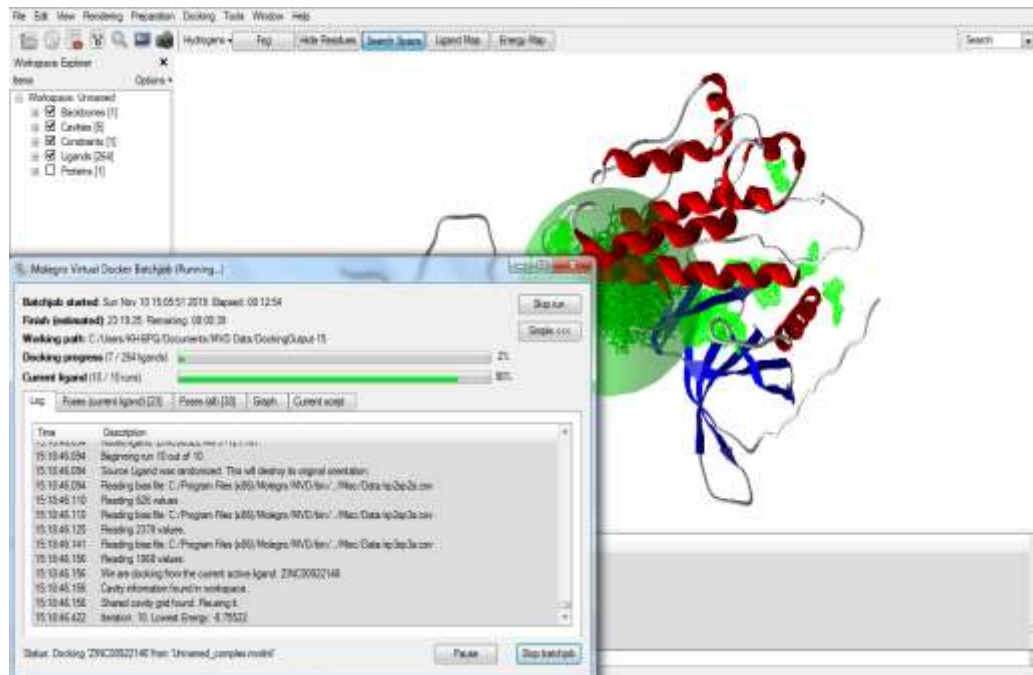
شکل ۲-۸.

¹ Pose

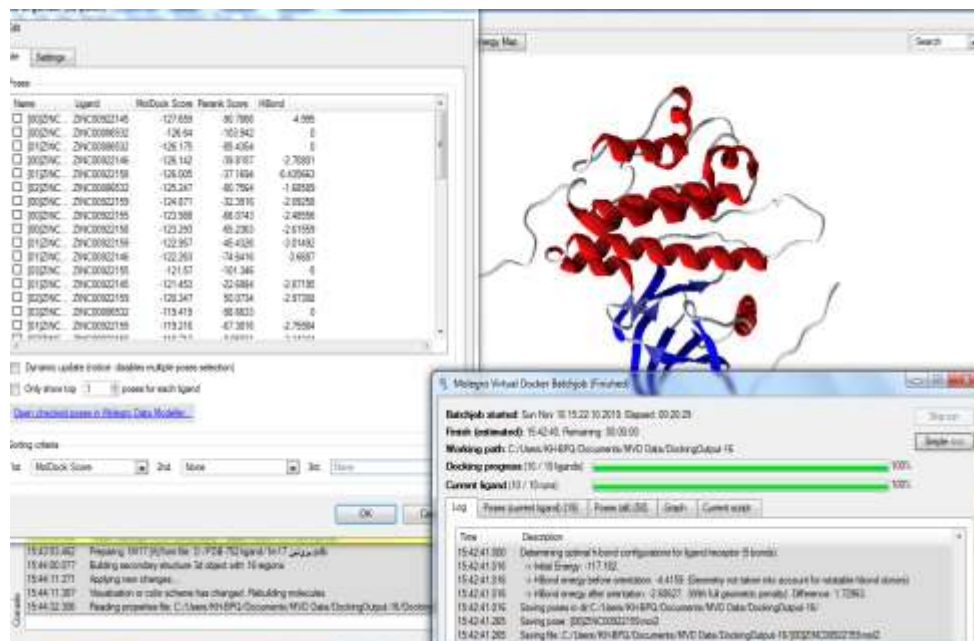


شکل ۲-۸ مشخص کردن محل برهمکنش لیگاند و پروتئین

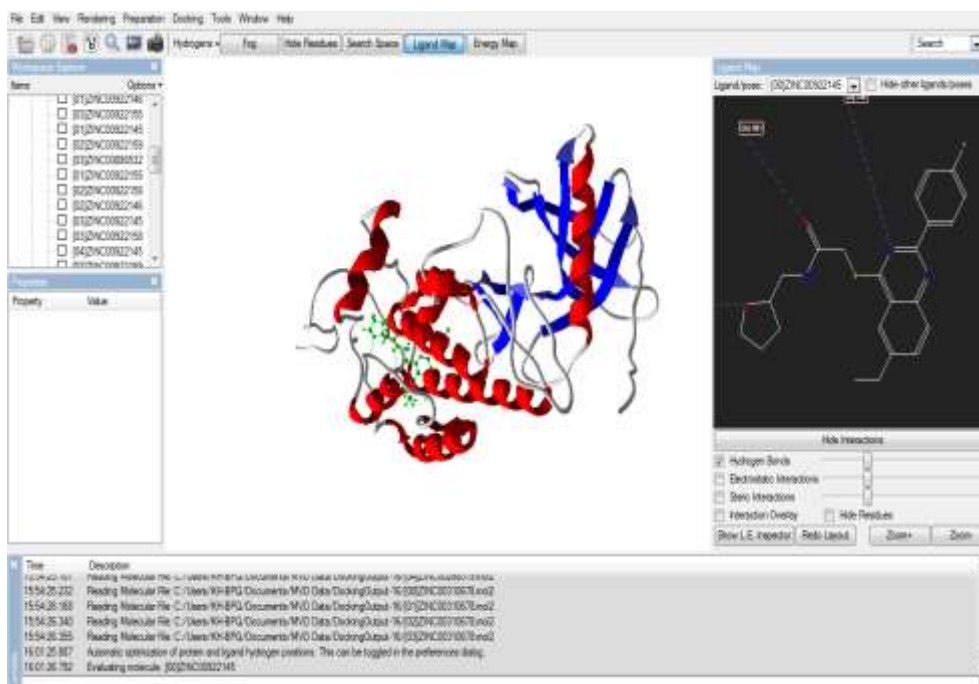
برای شروع فرایند داکینگ وارد زبانه Docking می‌شویم و گزینه Docking Wizard را انتخاب می‌کنیم. صفحه‌ای نمایان می‌شود که تنظیمات مربوط به عملیات داکینگ را انجام می‌دهیم تا فرایند داکینگ شروع شود. بعد از پایان یافتن فرایند باید نتایج را وارد نرم‌افزار مولگرو کرده تا آن‌ها را مورد بررسی قرار دهیم شکل ۲ ۹ برای اینکار نرم‌افزار را بسته و بار دیگر آن را باز می‌کنیم. مجدداً پروتئین را وارد نرم‌افزار کرده و نتایج را روی آن اعمال می‌کنیم. بعد از اعمال نتایج صفحه‌ای نمایان می‌شود و به ما این امکان را می‌دهد که تمام یا هر تعداد لیگاند و موقعیتی را که مد نظرمان است انتخاب و نتایج را بررسی کنیم شکل ۲ ۱۰. برای مشاهده برهمکنش بین پروتئین و لیگاند زبانه‌ای با عنوان Ligand Map وجود دارد که برهمکنش‌های بین لیگاند و پروتئین را به صورت دو بعدی نشان می‌دهد. این زبانه شامل گزینه show interaction است که خود شامل چندین گزینه می‌باشد، که با استفاده از آن‌ها می‌توان به اطلاعات مفیدی از کمپلکس‌ها دستیابی پیدا کرد شکل ۲ ۱۱.



شکل ۲-۹ آغاز انجام فرایند داکینگ



شکل ۲-۱۰ وارد کردن نتایج حاصل از برهمکنش لیگاند و پروتئین به نرم افزار مولگرو



شکل ۲-۱۱ نمایش برهمکنش های بین لیگاند و پروتئین به صورت دو بعدی

۲-۷ غربالگری مجازی مجموعه‌ای از مشتقات کینازولین با استفاده از نرم‌افزار مولگرو

همان‌طور که گفته شد لیگاند اختصاصی آنزیم 1m17 ترکیبات دارای هسته کینازولین هستند. براساس نتایج حاصل از پایگاه داده Zinc تعداد ۲۶۴ ترکیب وجود دارد که از مشتقات کینازولین‌ها بوده و از قانون لپینسکی پیروی می‌کنند. فایل مورد نظر این ترکیبات جهت بررسی‌های بیشتر ذخیره گردید. سپس به روش داکینگ مولکولی و با استفاده از نرم‌افزار مولگرو جهت‌گیری مناسب و شیوه اتصال مهارکننده‌ها به جایگاه فعال پروتئین بررسی و تعیین شد. پس از انجام فرایند داکینگ و محاسبات مورد نیاز، می‌بایست نتایج بدست آمده از نظر مشابهت با شرایط واقعی مورد بررسی قرار گیرند. نتایج حاصل شامل انرژی‌های نمره‌دهی می‌باشند. این رتبه‌دهی‌ها معیاری از اندازه‌گیری انرژی آزاد، انرژی اتصال و یا یک معیار کیفی عددی هستند که باتوجه به این اعداد بهترین ترکیبات

مشخص می‌گردند. ترکیبات براساس انرژی اتصال مرتب شدند. در نهایت سه ترکیب با منفی‌ترین میزان انرژی اتصال، جهت بررسی‌های بیشتر با نرم‌افزار Amber انتخاب شدند.

۲-۸ انحراف از جذر میانگین مربعات^۱ (RMSD)

RMSD کمیتی است که از آن برای مقایسه دو پیکربندی استفاده می‌شود. این کمیت برای هر اتم در یک مولکول از طریق مقایسه با یک ساختار مرجع که معمولاً ساختار اولیه می‌باشد، محاسبه می‌گردد. اندازه‌گیری این کمیت می‌تواند برای تمام یا تعدادی از اتم‌های یک پروتئین انجام شود. این آنالیز اطلاعات مفیدی در زمینه تغییرات ساختار پروتئین طی انجام فرآیند شبیه‌سازی در اختیار ما قرار می‌دهد. در ابتدا نمودار RMSD پروتئین به همراه لیگاندها به عنوان تابعی از زمان رسم می‌شود. با تجزیه و تحلیل این نمودارها و مشاهده میزان افت و خیز اتم‌ها تمام تغییرات ایجاد شده در ساختارهای مختلف پروتئین قابل شناسایی خواهد بود. رابطه (۲-۱) نحوه محاسبه این کمیت را نشان می‌دهد.

$$\text{RMSD} = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i | r_i(t) - r_i^{ref} |^2 \right]^{1/2} \quad (1-2)$$

در این رابطه m_i جرم هر اتم، M مجموع جرم همه اتم‌های مولکول و $r_i(t)$ موقعیت مکانی اتم i در زمان t می‌باشد.

۲-۹ ریشه‌ی متوسط مجذور افت و خیزها^۲ (RMSF)

RMSF متوسط‌گیری زمانی بر روی موقعیت‌های مکانی یک ذره است. این کمیت با استفاده از رابطه (۲-۲) محاسبه می‌شود.

$$\text{RMSF} = \left[\frac{1}{T} \sum_{j=1}^T | r_i(t_j) - r_i^{ref} |^2 \right]^{1/2} \quad (2-2)$$

¹ Root mean squared deviation

² Root mean square fluctuation

در این رابطه t ، r_i^{ref} و r_i به ترتیب نشان دهنده بازه زمانی انجام متوسط‌گیری، موقعیت مکانی مرجع ذره مورد نظر و موقعیت مکانی هر اتم هستند. به طور کلی می‌توان گفت RMSD متوسط‌گیری روی همه اتم‌ها در هر لحظه و RMSF متوسط‌گیری برای هر اتم بر روی کل زمان است.

۱۰-۲ محاسبه انرژی آزاد پیوندی به روش مکانیک مولکولی مساحت سطح تعمیم‌یافته^۱ (MMGBSA)

پربکاربردترین روش‌های محاسباتی در طراحی دارو، داکینگ و امتیازدهی هستند. این روش نحوه اتصال دارو و انرژی پیوندی را محاسبه می‌کند. به دلیل اینکه این روش از دقت چندان بالایی برخوردار نیست، برای محاسبه انرژی پیوندی از روش مکانیک مولکولی مساحت سطح تعمیم یافته بورن یا MMGBSA استفاده شده. برای این منظور انرژی آزاد اتصال لیگاند مورد نظر با در نظر گرفتن انرژی‌های حلال‌پوشی مولکول‌های برهمکنش کننده به همراه انرژی مکانیک مولکولی محاسبه می‌شود. این روش در شبیه سازی دینامیک مولکولی براساس برهمکنش لیگاند و پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ادامه چگونگی محاسبه انرژی‌های آزاد پیوندی در فاز متراکم نشان داده شده است.

$$\Delta G_{bind} = G_{Complex} - (G_{Protein} + G_{Ligand}) \quad (۳-۲)$$

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{gas} + \Delta G_{SOLV} - T\Delta S \quad (۴-۲)$$

$$\Delta G_{gas} = \Delta G_{ele} + \Delta G_{vdw} \quad (۵-۲)$$

$$\Delta G_{nonpolarSol} = \gamma SASA + b \quad (۶-۲)$$

^۱ Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area

در این روابط ΔG_{bind} اختلاف انرژی آزاد بین حالت های پیوندی و غیرپیوندی سیستم و ΔG_{gas} مجموع انرژی های آزاد مکانیک مولکولی است که شامل دو بخش پتانسیل الکتروستاتیکی ΔG_{ele} و پتانسیل واندروالسی ΔG_{vdw} می باشد. SASA سطح قابل دسترس حلال برحسب آنگستروم است که با استفاده از برنامه Molsurf محاسبه گردید و مقادیر ثابت های تجربی γ و b به ترتیب برابر با kcal/mol^{-1} و 0.0072 و $0.92 \text{ kcal/mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ قرار داده شد.

۱۱-۲ نرم افزار امبر و پارامترهای آن

روش دینامیک مولکولی اطلاعاتی را در اختیار ما قرار می دهد که این اطلاعات با استفاده از روش های داکینگ مولکولی قابل دستیابی نیستند. از جمله این اطلاعات می توان به شیوه های اتصال و خواص جایگاه پیوندی پروتئین اشاره نمود. با استفاده از روش دینامیک مولکولی می توان سیستم را به تعادل رساند. تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از این روش اطلاعات مفیدی در رابطه با دینامیک ساختاری آنزیم 1M17 و جایگاه پیوندی آن در اختیار ما قرار داد. همچنین نتایج بدست آمده از روش داکینگ مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این پایان نامه، برای انجام تمام محاسبات شبیه سازی دینامیک مولکولی از نرم افزار Amber16 استفاده شده است. این نرم افزار جهت انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی سیستم های بس ذره ای براساس معادلات حرکت نیوتون گسترش یافته است و به صورت گسترده در بررسی و شبیه سازی سیستم های زیستی استفاده می شود. این نرم افزار از دو بخش Amber و Amber Tools تشکیل شده است. بخش Amber شامل سه موتور مختلف شبیه سازی دینامیک مولکولی sander، pmed و pmemd cuda است. Amber Tools به صورت رایگان و بدون بخش Amber قابل استفاده است، اما عکس این حالت امکان پذیر نیست. Amber Tools از چندین بسته نرم افزاری مستقل مانند ptraj،

Antechamber، Leap، pbsa و¹ NAB تشکیل شده و به طور کلی شامل میدان‌های نیرو، ابزارهای آماده‌سازی و ابزارهای تجزیه و تحلیل نتایج است.

۲-۱۱-۱ میدان‌های نیرو

از جمله میدان‌های نیرو Amber، می‌توان به میدان‌های نیروی ff99SB، ff10، ff12S، charm، Lipid11، GAFF، ZAFF و Amoeba اشاره کرد.

۲-۱۱-۲ ابزارهای آماده‌سازی

Antechamber و Leap از جمله پرکاربردترین ابزارهای آماده‌سازی هستند. Antechamber مجموعه‌ای از ابزارها می‌باشد که از آن جهت تولید فایل‌های مقدماتی مولکول‌های آلی استفاده می‌شود. میدان نیروی مورد استفاده با این ابزار، میدان نیروی GAFF می‌باشد. این ابزار پارامترهای مفقود شده را تولید و نوع اتم‌ها را مشخص می‌کند. اکثر فرمت‌های موجود برای فایل‌های ورودی با این ابزار قابل خوانش هستند و فایل خروجی پروتئین‌های دارای لیگاند آلی را به گونه‌ای که توسط Leap قابل شناسایی باشند تغییر می‌دهد.

با استفاده از Leap کاربران می‌توانند شبیه‌سازی ساختار داده‌های بسیار پیچیده‌ای را ایجاد نمایند. از این ابزار می‌توان جهت تولید فایل‌های ورودی با نرم افزار Amber استفاده کرد. امتیاز اصلی Leap، انعطاف‌پذیری و کاربرد آسان آن است، که این امکان را فراهم می‌کند تا کاربر به راحتی ایده مورد نظر خود را در یک محیط و بستر مجازی (که نماینده بستر انرژی است) بدون ذخیره مدل‌های بسیار پیچیده ارزیابی نماید.

¹ Nucleic Acid Builder

۳-۱۱-۲ ابزارهای تجزیه و تحلیل نتایج

این ابزارها، مجموعه ای از ابزارهای جانبی هستند که با استفاده از آن نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند. قسمتی از Amber tools را تشکیل می‌دهند که عبارتند از: MMGBSA، PBSA، CPPTRAJ، PTRAJ.

۲-۱۲ پارامترهای مورد استفاده در انجام شبیه‌سازی

در این پایان نامه با استفاده از نرم‌افزار Ambea 16 و آخرین نسخه 16 Amber Tools که شامل برنامه‌هایی از قبیل Xleap است شبیه‌سازی انجام شد. ساختار به دست‌آمده از انجام داکینگ به عنوان ساختار اولیه برای شروع شبیه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از روش MMGBSA انرژی اتصال بدست آمد. در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده از نرم‌افزار امبر، ترکیبی که از بیشترین انرژی اتصال برخوردار بود به عنوان داروی برتر انتخاب و برای درمان سرطان پیشنهاد گردید. بارهای جزئی اتم‌های لیگاند با روش پتانسیل‌الکتریکی محدود شده در نرم‌افزار آنتی‌چمبر و در سطح محاسباتی B3LYP/6-31G(d) محاسبه شدند. از میدان‌های نیروی GAFF برای پارامترهای میدان نیروی لیگاند (پیوندی و غیرپیوندی) و جهت فراهم‌کردن پارامترهای پروتئین از میدان‌های نیرو Amber ff99SB استفاده شد. اتم‌های هیدروژن با استفاده از نرم‌افزار Amber16 به سیستم اضافه شدند و سیستم در جعبه‌ای مکعبی با ابعاد ۱۰ آنگستروم که مولکول‌های آب در آن با مدل TIP3P وجود دارند حل شد. سیستم‌های بدست آمده با استفاده از موتور شبیه‌سازی PMEMD در نرم‌افزار Amber16 شبیه‌سازی شدند.

فصل ۳ : بحث و نتیجه گیری

۳-۱ بررسی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل برهمکنش تعدادی از مشتقات کینازولین به عنوان مهارکننده با آنزیم 1M17

رشد و گسترش تومورها به مقدار زیادی به فعالیت گیرنده‌های غشاء سلولی نظیر گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) وابسته است. EGFR نقش کلیدی در اکثر فرایندهای سلولی درگیر در گسترش تومور دارد و به عنوان یک هدف امیدوارکننده برای درمان سرطان است. چندین ترکیب دارویی جهت مهار آنزیم فاکتور رشد اپیدرمال سنتز شده است که از انرژی اتصال قابل ملاحظه‌ای برخوردار هستند. به دلیل اینکه در کارهای تجربی و آزمایشگاهی مکانیزم اتصال این داروها به پروتئین مشخص نمی‌گردد لذا با داکینگ مولکولی قدرت و چگونگی اتصال داروها مورد بررسی قرار گرفت. تا کنون چندین ترکیب دارویی از مشتقات کینازولین به عنوان مهارکننده‌های آنزیم 1M17 مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مقادیر ثابت مهارکنندگی به دست آمده برای این ترکیبات در جدول ۳ ۱ آورده شده است. هرچقدر میزان ثابت مهارکنندگی یک بازدارنده کم‌تر باشد عملکرد آن مؤثرتر است. از این کمیت برای سنجش میزان تأثیر مهارکننده و تعیین غلظت آن برای کاهش فعالیت آنزیم استفاده می‌گردد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شده است که قوی‌ترین دارو جهت غیرفعال کردن آنزیم فاکتور رشد اپیدرمال ترکیب (۶-فلوئورو-۲-(۴-فلوئوروفنیل)-۳-(۲-اکسواپندولین-۳-یلیدین)آمینو) کینازولین-۴(H³)-آن می‌باشد [۸۱]. در این پایان نامه از این ترکیب به عنوان داروی مرجع استفاده شده است و هدف این پایان نامه این است که با مقایسه نتایج حاصل از روش داکینگ مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی برای داروهای پیشنهادی با داروی مرجع، به شناسایی ترکیبات دارویی جدید بپردازیم.

جدول ۳-۱ مقادیر ثابت مهارکنندگی چندین ترکیب دارویی از مشتقات کینازولین [۸۳]

نام ترکیب	ثابت مهارکنندگی
6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)-3-((2-oxoindolin-3-ylidene)amino)quinazolin-4(3H)-one	0.35
3-(4-Chlorobenzylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one.	0.71
3-(4-Fluorobenzylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one	0.89
3-(Benzylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one	0.95
3-((Furan-2-yl)methyleneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one	1.06
3-(4-Hydroxybenzylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one	1.32
3-(4-Nitrobenzylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one	2.61
3-(4-Methylbenzylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazoline-4(3H)-one	5.07
3-(4-Methoxybenzylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one	10.43
3-(3-Phenylallylideneamino)-6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4(3H)-one	36.57

۲-۳ تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از برهمکنش مجموعه‌ای از مشتقات کینازولین با آنزیم 1M17 به روش غربالگری مجازی

۲۶۴ ترکیب از مشتقات کینازولین که در این پایان نامه به عنوان مهارکننده‌های آنزیم 1M17 استفاده شده‌اند، براساس قانون لیپینسکی از پایگاه داده ZINC غربالگری و جهت بررسی‌های بیشتر با استفاده از نرم‌افزار مولگرو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با انجام فرایند داکینگ، شیوه اتصال این لیگاندها درون جایگاه اتصال پروتئین 1M17 بررسی و میزان انرژی‌های اتصال آن‌ها بدست آمد. ترکیباتی که جایگیری و سطح انرژی بهتری را در مقایسه با داروی مرجع نشان دادند مشخص شدند. در جدول ۳-۲ از بین ۲۶۴ ترکیب مورد بررسی قرار گرفته، مقادیر انرژی اتصال ۱۹ ترکیب که از انرژی اتصال منفی‌تری برخوردار هستند به همراه داروی مرجع نشان داده شده است. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده، از بین ۲۶۴ ترکیب سه ترکیب با انرژی اتصال منفی‌تر جهت غربالگری و بررسی‌های بیشتر با استفاده از نرم افزار امبر انتخاب شدند. شکل ۳ ۱ ساختار داروهای ۱ تا ۳ و دارو مرجع را نمایش می‌دهد. همچنین در شکل ۳ ۲ جایگیری دو دارو ۱ و ۲ در محل اتصال پروتئین از دو نمای متفاوت نشان داده شده است.

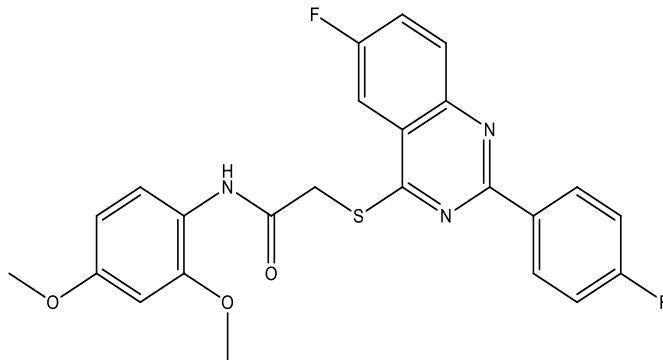
جدول ۲-۳ مقادیر انرژی‌های اتصال ۱۹ ترکیب برتر و داروی

مرجع با پروتئین 1M17

شماره لیگاند	لیگاند	انرژی اتصال (kcal/mol)
1	[00]ZINC00922159	-134.338
2	[02]ZINC12716340	-127.873
3	[00]ZINC01367392	-112.256

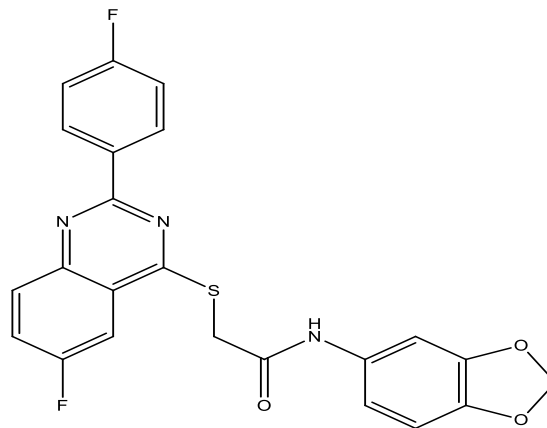
4	[01]ZINC27528393	-111.851
5	[00]ZINC27528051	-111.775
6	[00]ZINC05198466	-111.140
7	[04]ZINC00922155	-110.661
8	[00]ZINC01367697	-110.376
9	[02]ZINC35314389	-110.268
10	[02]ZINC00922165	-109.712
11	[00]ZINC05205941	-109.410
12	[04]ZINC00922169	-108.735
13	[01]ZINC27528049	-108.461
14	[02]ZINC05198466	-107.992
15	[01]ZINC27528052	-107.035
16	[01]ZINC27523032	-106.741
17	[03]ZINC04895214	-105.786
18	[00]ZINC05205939	-104.817
19	[02]ZINC04895172	-104.045
20	داروی مرجع	-103.093

(الف)



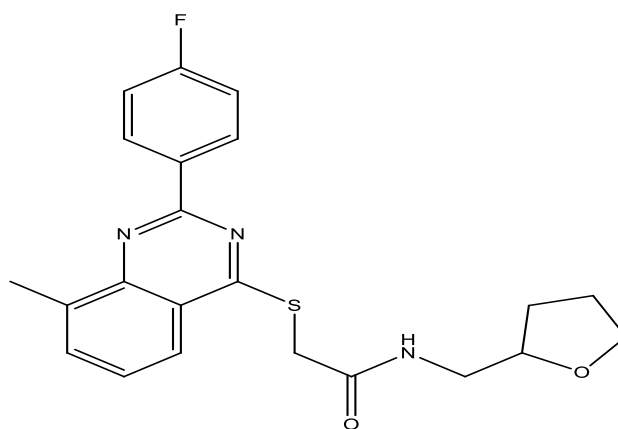
N-(2,4-dimethoxyphenyl)-2-((6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4-yl)thio)acetamide

(ب)



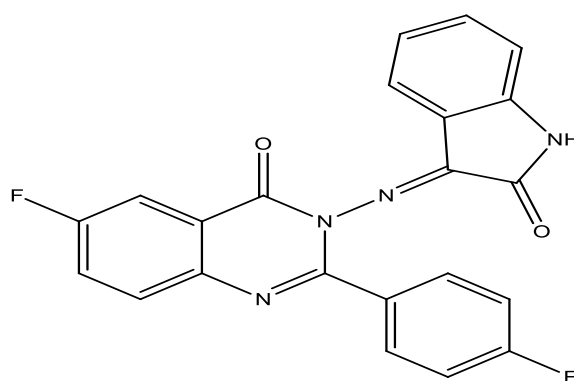
N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-((6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinazolin-4-yl)thio)acetamide

ج



2-((2-(4-fluorophenyl)-8-methylquinazolin-4-yl)thio)-N-((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)acetamide

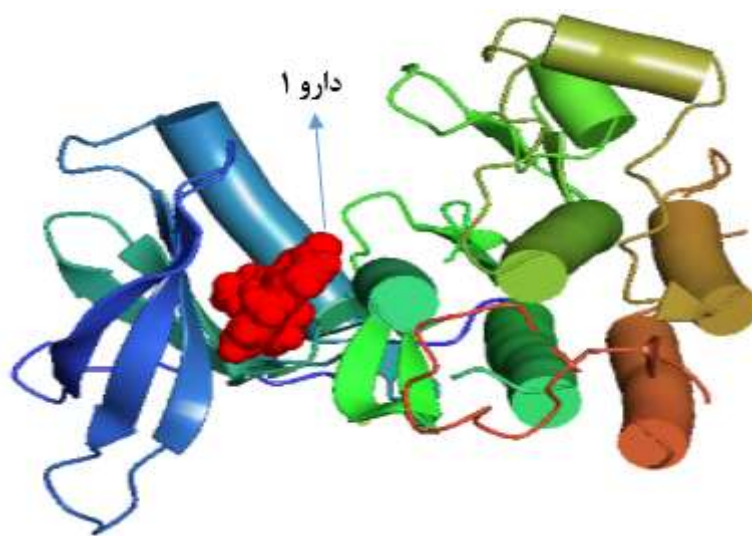
د



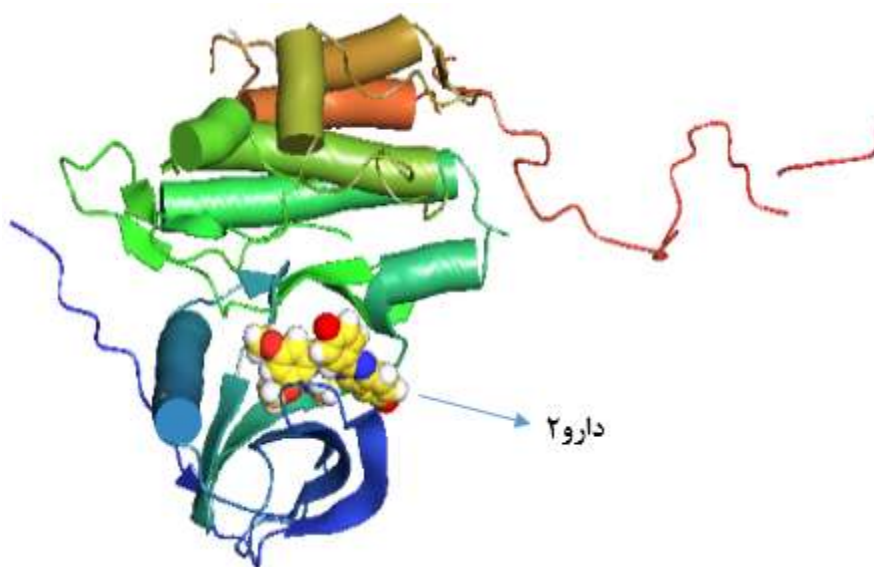
6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)-3-((2-oxoindolin-3-ylidene)amino)quinazolin-4(3H)-one

شکل ۳-۱ ساختارهای شیمیایی الف) دارو ۱ ب) دارو ۲ ج) دارو ۳ د) دارو مرجع

(الف)



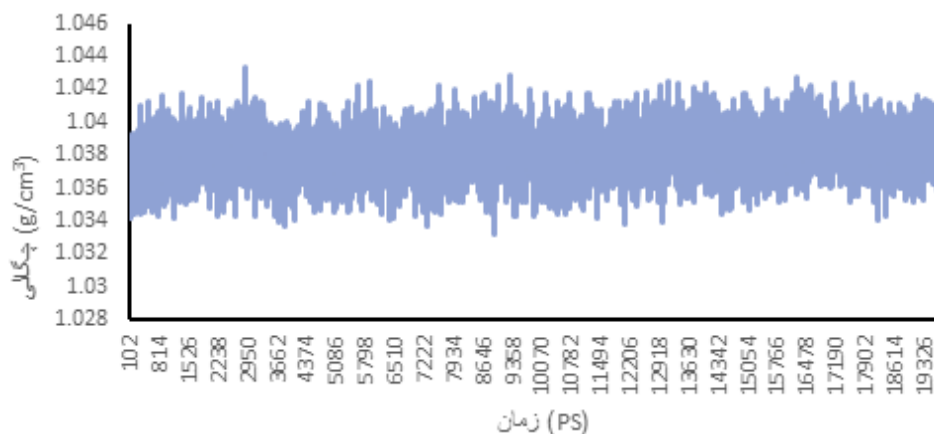
(ب)



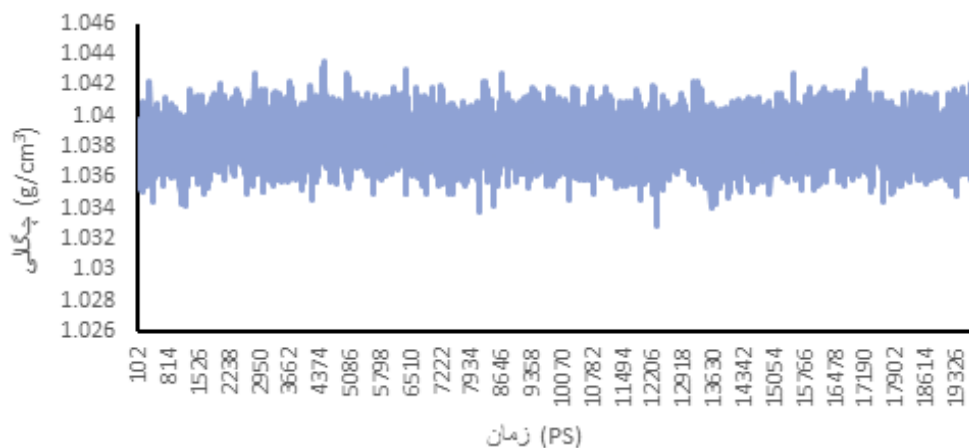
شکل ۳-۲ جایگیری دو دارو الف) دارو ۱ (ب) دارو ۲ در محل اتصال پروتئین 1M17 از دو نمای متفاوت

۳-۳ بررسی نتایج مربوط به پارامترهای ترمودینامیکی در طول زمان انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

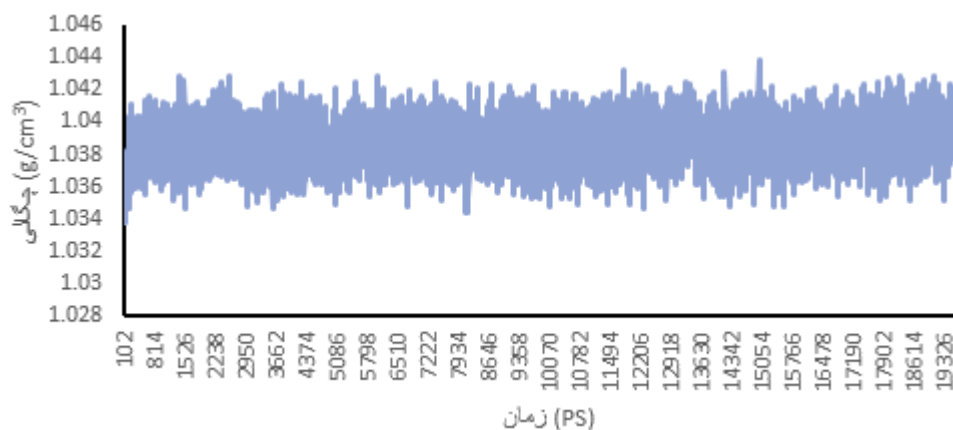
بعد از اتمام فرایند شبیه‌سازی لازم است با توجه به برخی معیارها از صحت انجام شبیه‌سازی اطمینان حاصل شود. در ابتدا سیستم با استفاده از روش دینامیک مولکولی از لحاظ انرژی بهینه می‌گردد. یکی از راه‌هایی که روند صحیح شبیه‌سازی را نشان می‌دهد، بررسی به تعادل رسیدن سیستم در طول انجام فرایند شبیه‌سازی می‌باشد. بدین صورت که همگرایی پارامترهای ترمودینامیکی را با توجه به نتایج به دست‌آمده از شبیه‌سازی مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهیم. در ادامه به بررسی چگالی، دما، انرژی پتانسیل کل و انرژی کل (پیوندی + الکتریکی + جنبشی) کمپلکس داروها می‌پردازیم. شکل‌های ۳ تا ۳ تا ۶ نمودارهای مربوط به چگالی، شکل‌های ۳ تا ۳ تا ۷ تا ۱۰ نمودارهای انرژی پتانسیل کل، شکل‌های ۳ تا ۳ تا ۱۱ تا ۱۴ نمودارهای انرژی کل و شکل‌های ۳ تا ۳ تا ۱۵ تا ۱۸ نمودارهای مربوط به دما را برحسب زمان شبیه‌سازی نشان می‌دهند.



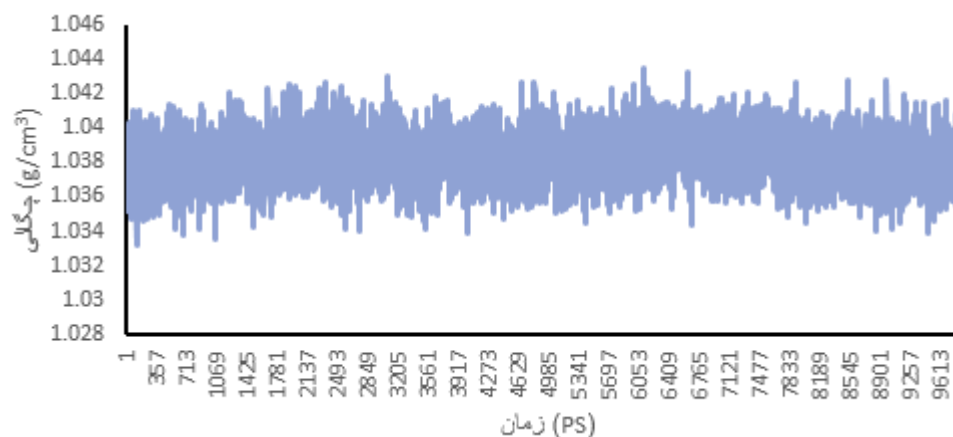
شکل ۳-۳ نمودار چگالی برای داروی مرجع در طول فرایند شبیه‌سازی



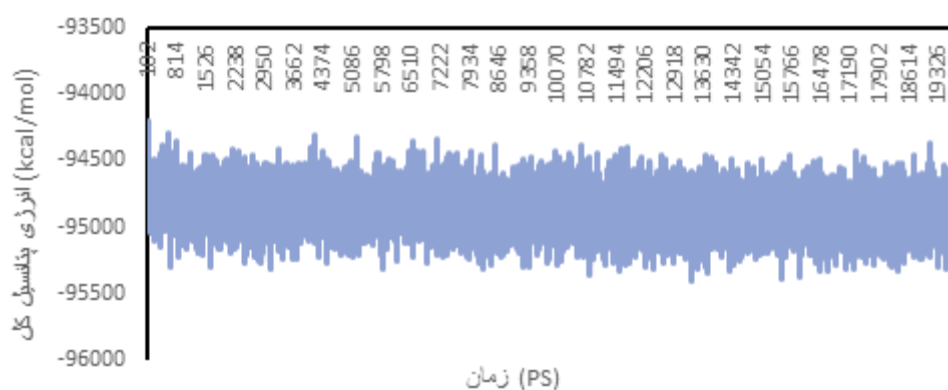
شکل ۳-۴ نمودار چگالی برای داروی ۱ در طول فرایند شبیه‌سازی



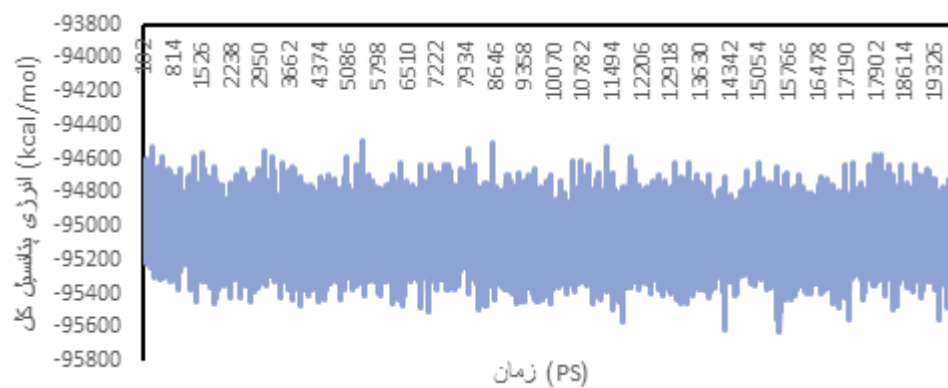
شکل ۳-۵ نمودار چگالی برای داروی ۲ در طول فرایند شبیه‌سازی



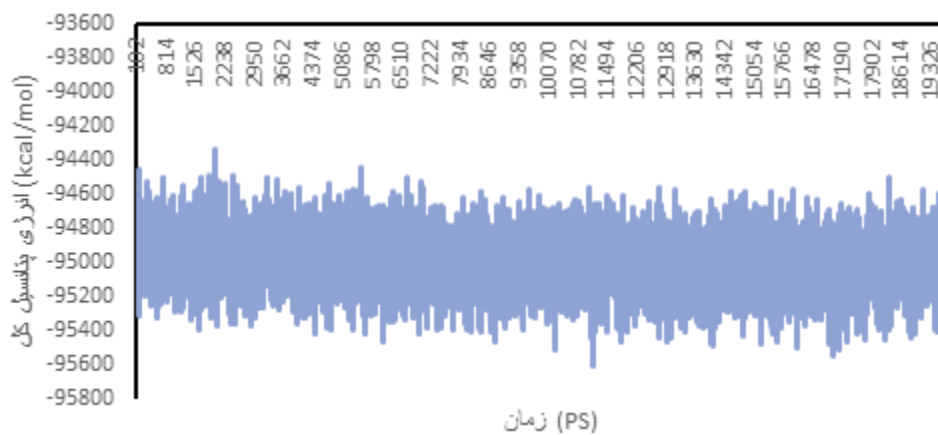
شکل ۳-۶ نمودار چگالی برای داروی ۳ در طول فرایند شبیه‌سازی



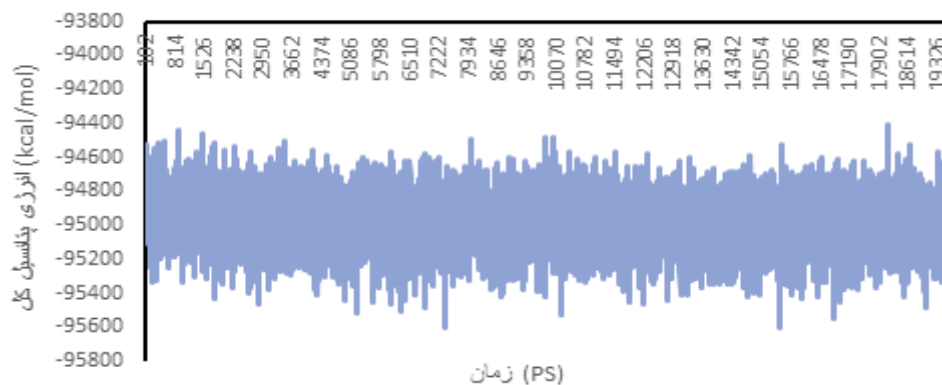
شکل ۳-۷ نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو مرجع در طول فرایند شبیه‌سازی



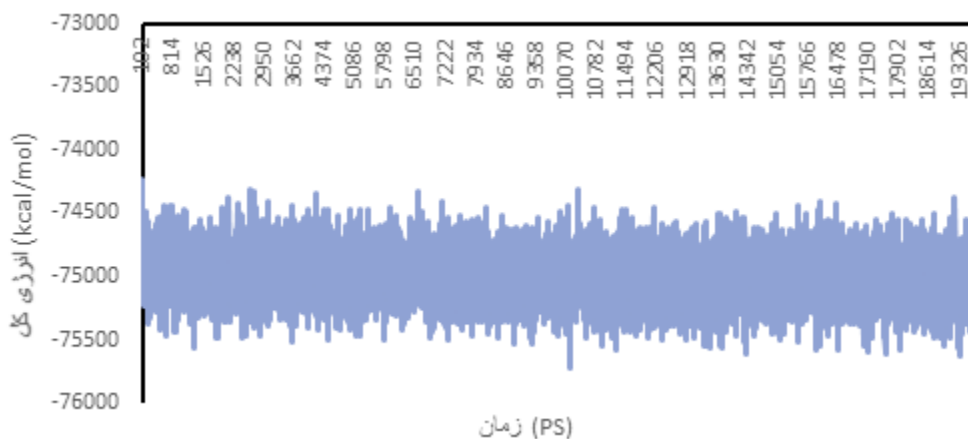
شکل ۳-۸ نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو ۱ در طول فرایند شبیه‌سازی



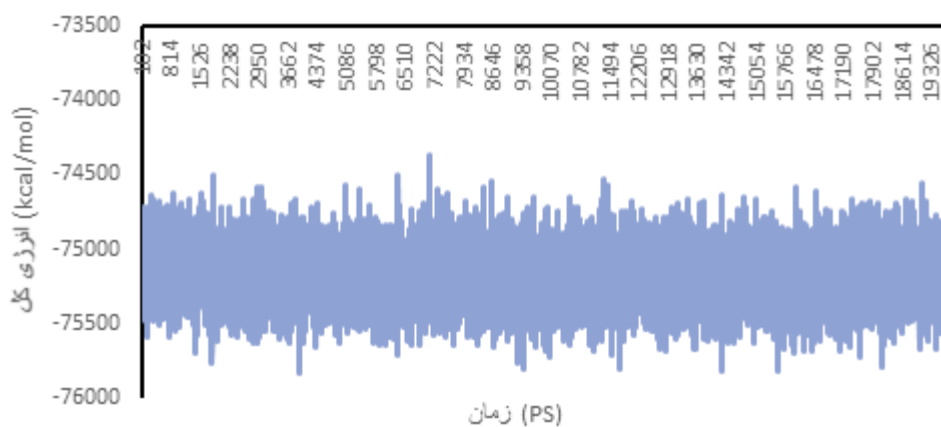
شکل ۳-۹ نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو ۲ در طول فرایند شبیه‌سازی



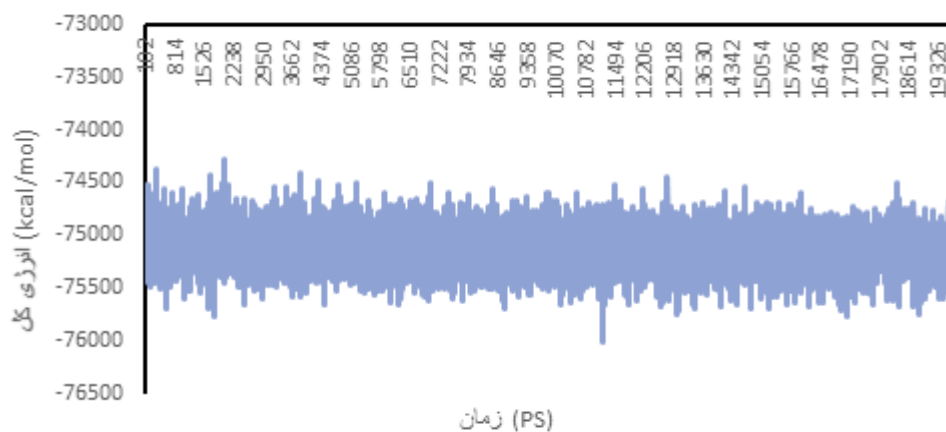
شکل ۳-۱۰ نمودار انرژی پتانسیل کل برای دارو ۳ در طول فرایند شبیه‌سازی



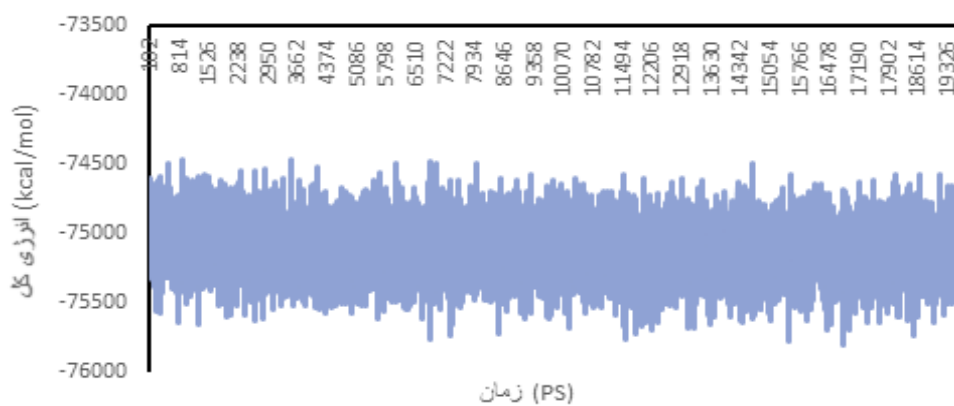
شکل ۳-۱۱ نمودار انرژی کل برای دارو مرجع در طول فرایند شبیه‌سازی



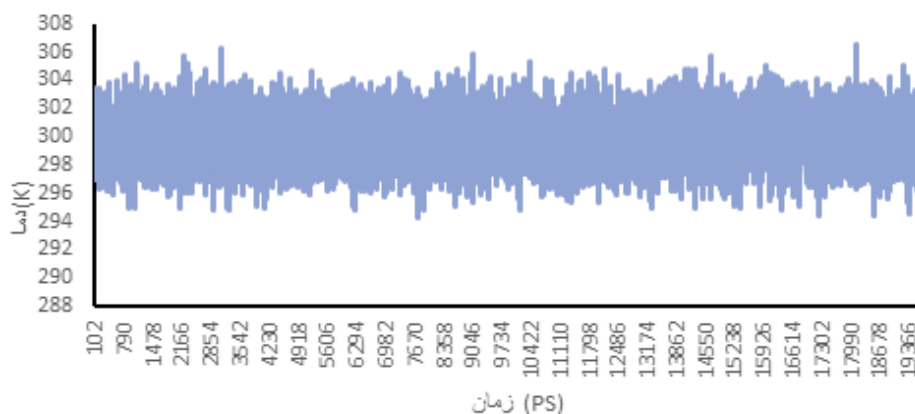
شکل ۳-۱۲ نمودار انرژی کل برای دارو ۱ در طول فرایند شبیه‌سازی



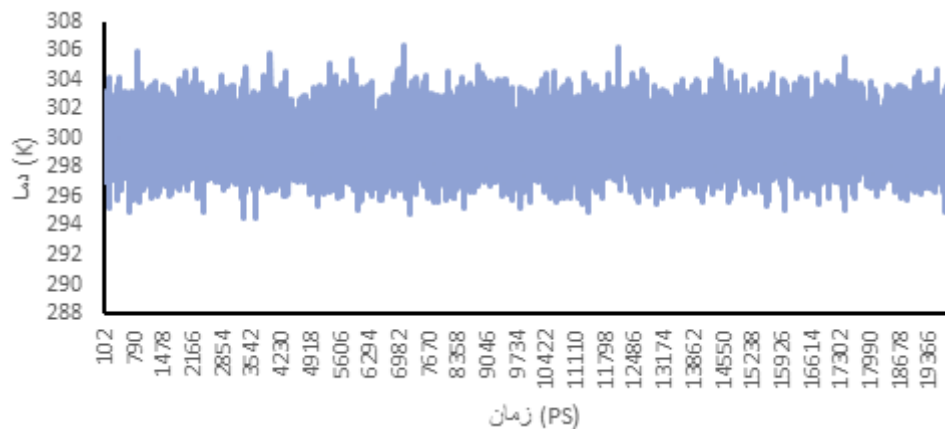
شکل ۳-۱۳ نمودار انرژی کل برای دارو ۲ در طول فرایند شبیه‌سازی



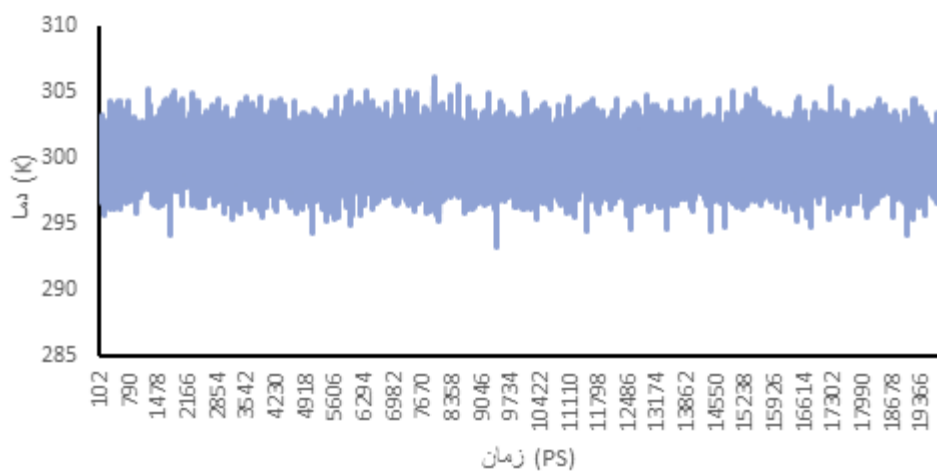
شکل ۳-۱۴ نمودار انرژی کل برای دارو ۳ در طول فرایند شبیه‌سازی



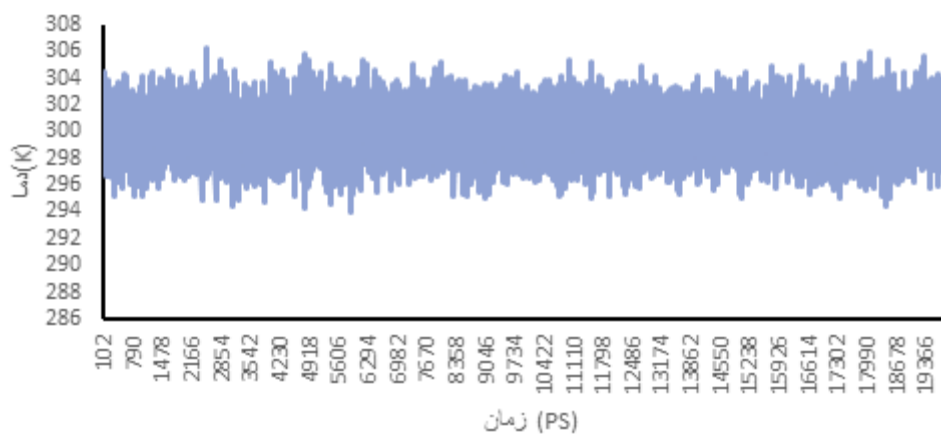
شکل ۳-۱۵ نمودار دما برای دارو مرجع در طول فرایند شبیه‌سازی



شکل ۳-۱۶ نمودار دما برای دارو ۱ در طول فرایند شبیه‌سازی



شکل ۳-۱۷ نمودار دما برای دارو ۲ در طول فرایند شبیه‌سازی



شکل ۳-۱۸ نمودار دما برای دارو ۳ در طول فرایند شبیه‌سازی

نمودارهای ۳ تا ۱۷ نشان می‌دهند که مقادیر دما، چگالی، انرژی پتانسیل کل و انرژی کل برای کمپلکس‌های پروتئین-مهارکننده در مدت زمان انجام شبیه‌سازی در برخی محدوده‌ها دارای نوسانات اندکی می‌باشند، اما در اکثر نقاط ثابت شده‌اند.

از بررسی نمودارهای چگالی مشخص می‌شود که مقادیر آن برای تمام کمپلکس‌ها در محدوده ۱۰۳۴ تا ۱۰۴۴ گرم بر سانتی‌مترمکعب دارای نوسانات اندکی می‌باشد، اما اکثر نقاط در محدوده ۱۰۳۶ تا ۱۰۴۲ گرم بر سانتی‌مترمکعب ثابت شده‌اند که نشان‌دهنده به تعادل رسیدن چگالی در طول شبیه‌سازی است. همچنین بررسی نمودارهای انرژی پتانسیل کل نشان می‌دهد که مقادیر آن برای تمام کمپلکس‌ها دارای نوسانات اندکی در محدوده ۹۴۳۰۰- تا ۹۵۶۰۰- کی‌لوکالری بر مول هستند، با این وجود اکثر نقاط در محدوده ۹۴۷۰۰- تا ۹۵۴۰۰- کی‌لوکالری بر مول ثابت شده‌اند و تالی‌بدکننده به تعادل رسیدن انرژی پتانسیل کل در زمان انجام شبیه‌سازی می‌باشد. با بررسی نمودارهای انرژی کل، مشاهده می‌شود که مقادیر انرژی کل در محدوده ۷۴۳۰۰- تا ۷۵۸۰۰ کی‌لوکالری بر مول دارای نوسانات اندکی می‌باشد اما اکثر نقاط در محدوده ۷۴۷۰۰- تا ۷۵۵۰۰ ثابت شده‌اند که به تعادل رسیدن انرژی کل در مدت زمان انجام شبیه‌سازی را تالی‌بد می‌کنند. با توجه به نمودارهای دما مشاهده می‌شود که، مقادیر آن برای تمام کمپلکس‌ها دارای نوسانات اندکی در محدوده ۲۹۳ تا ۳۰۷ کلوین می‌باشد با این وجود اکثر نقاط در محدوده ۲۹۶ تا ۳۰۴ کلوین ثابت شده‌اند که بی‌ان‌کننده به تعادل رسیدن دما در مدت زمان انجام شبیه‌سازی هستند. این نمودارها همگرایی پارامترهای ترمودینامیکی و به تعادل رسیدن کمپلکس‌ها را در طول انجام فرآیند شبیه‌سازی نمایش می‌دهند. در جدول ۳ مقادیر میانگین چگالی، انرژی پتانسیل کل، انرژی کل و دما برای کمپلکس داروها نمایش داده شده است.

جدول ۳ ۳. مقادیر میانگین پارامترها برای کمپلکس داروها

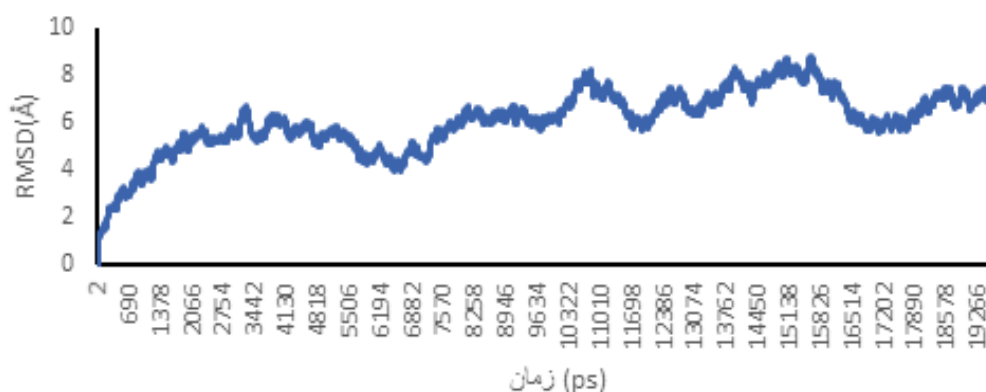
ترکیب	چگالی (g/cm ³)	دما (K)	انرژی کل (kcal/mol)	انرژی پتانسیل کل (kcal/mol)
دارو مرجع	1.0380	299.99	-74992.9	-94868.8
دارو ۱	1.0387	300.01	-75165.1	-95045.8
دارو ۲	1.0387	300.01	-75125.6	-94997.9
دارو ۳	1.0383	299.98	-75110.2	-94985.7

باتوجه به مقادیر میانگین دما برای کمپلکس‌ها مشخص می‌گردد که دما با تقریب بسیار خوبی مقادیر ثابت و یکسانی دارد. همچنین مقادیر میانگین چگالی برای چهار ترکیب، عددی در حدود ۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب را نشان می‌دهد که چگالی آب می‌باشد. این نتایج تایید کننده به تعادل رسیدن سیستم مورد نظر ما در طول زمان شبیه‌سازی است. پس از اطمینان از به تعادل رسیدن سیستم می‌توان از فایل خروجی برای ادامه تحقیق استفاده نمود.

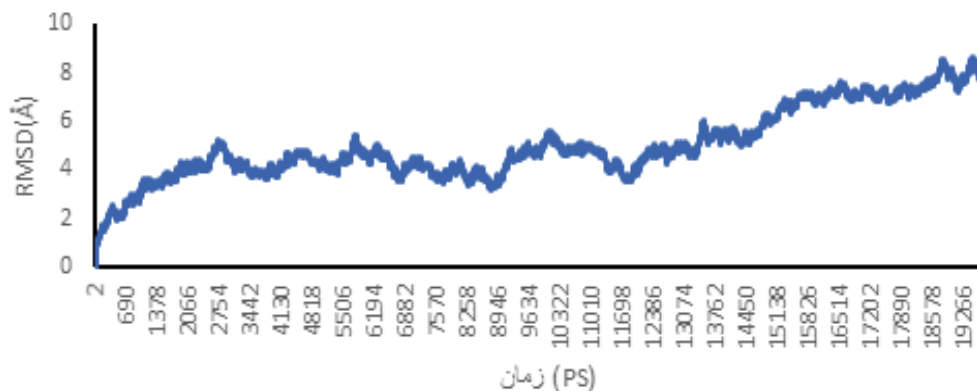
باتوجه به مقادیر انرژی کل در جدول، مشاهده می‌شود که انرژی کل کمپلکس پروتئین- لیگاند ۱ دارای مقدار منفی‌تری نسبت به انرژی کمپلکس داروی مرجع می‌باشد و به ترتیب این مقدار برای کمپلکس لیگاند ۲ و بعد کمپلکس لیگاند ۳ منفی‌تر است. این مقادیر بیانگر این مطلب می‌باشند که کمپلکس پروتئین- لیگاند ۱ از پایداری بیشتری نسبت به سایر کمپلکس‌ها برخوردار می‌باشد. این پایداری برای کمپلکس لیگاند ۲ بیشتر از کمپلکس لیگاند ۳ و برای کمپلکس لیگاند ۳ بیشتر از کمپلکس دارو مرجع می‌باشد. همچنین بررسی مقادیر به دست آمده برای انرژی پتانسیل کل نیز همین روند را نشان می‌دهند به این ترتیب که بهترین انرژی پتانسیل کل مربوط به داروی ۱ و در رتبه های بعدی داروی ۲ و سپس داروی ۳ قرار دارند. این نتایج نشان می‌دهد که، پروتئین زمانی که با لیگاندهای پیشنهادی، کمپلکس تشکیل می‌دهد به پایداری بیشتری می‌رسد و تاییدکننده صحیح بودن انتخاب این لیگاندها می‌باشد.

۳-۴ بررسی نتایج حاصل از شبیه‌سازی اتصال لیگاندها با پروتئین توسط نمودارهای RMSD

RMSD یا جذر میانگین مربع انحرافات پارامتری است که از آن برای مشخص کردن انعطاف‌پذیری پروتئین استفاده می‌شود و در نهایت به تعادل رسیدن سیستم مورد نظر را تعیین می‌کند. مقدار RMSD با استفاده از نرم‌افزار امبر و مدول CPPTRAG محاسبه شد. در ادامه نمودار RMSD کمپلکس داروها به صورت تابعی از زمان رسم شده‌اند. با تجزیه و تحلیل این نمودارها و مشاهده میزان افت و خیز آنها به صحت انجام روش شبیه‌سازی و انتخاب لیگاندها پی می‌بریم. شکل‌های ۱۹ تا ۲۲ نمودارهای RMSD کمپلکس‌ها را نشان می‌دهند.



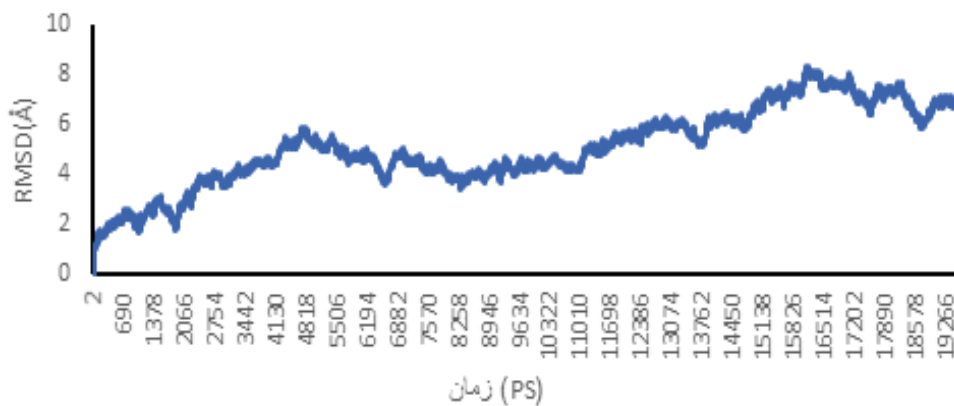
شکل ۳-۱۹ نمودار RMSD دارو مرجع در مدت زمان انجام فرآیند شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۰ نمودار RMSD دارو ۱ در مدت زمان انجام فرایند شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۱ نمودار RMSD دارو ۲ در مدت زمان انجام فرایند شبیه‌سازی



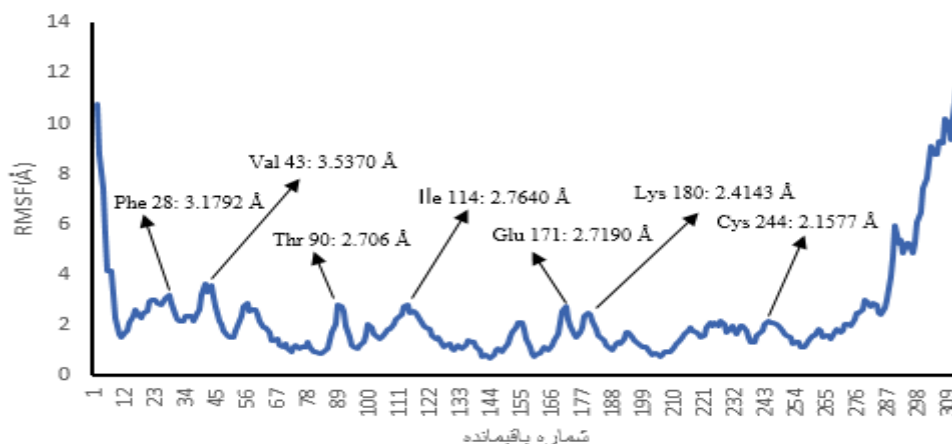
شکل ۳-۲۲ نمودار RMSD دارو ۳ در مدت زمان انجام فرایند شبیه‌سازی

در نمودارهای نشان داده شده می‌بینیم که در ابتدای شبیه‌سازی میزان RMSD در حال افزایش می‌باشد و افت و خیزهایی نیز در مقدار آن مشاهده می‌شود. اما به تدریج و با گذر زمان نمودار حول یک مقدار میانگین نوسان می‌کند و افت و خیز چشم‌گیری در آن دیده نمی‌شود. این زمان‌ها، زمان-

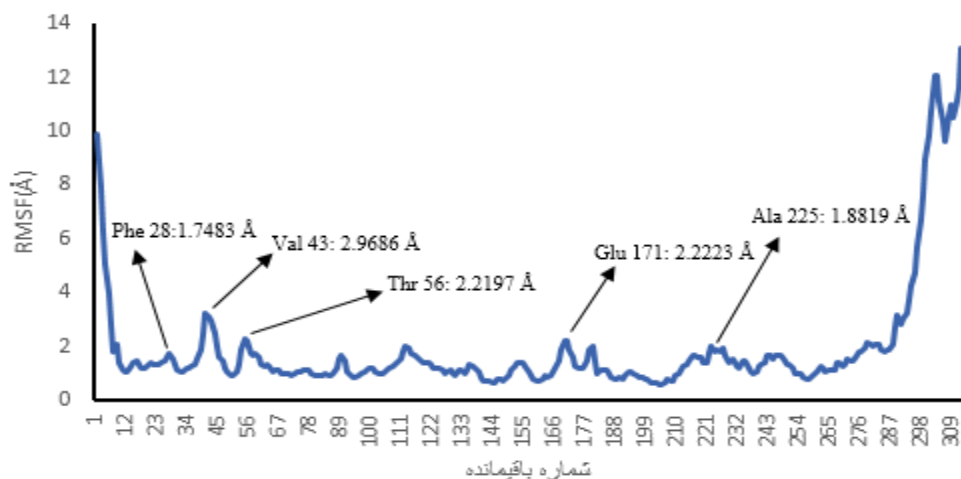
هایی هستند که سیستم به حالت تعادل رسیده و تاییدکننده صحت انجام شبیه‌سازی است. شیب این نمودارها مشخص کننده پایداری سیستم‌ها هستند. هر چه میزان شیب نمودار کمتر باشد سیستم پایدارتر است و هر چه میزان این شیب بیشتر باشد پایداری سیستم کمتر است. با توجه به نمودارهای رسم شده مشاهده می‌شود که، کمپلکس دارو مرجع بعد از گذشت ۱۶۰۰۰ پیکوثانیه از شروع فرایند شبیه‌سازی به تعادل رسیده است. همچنین زمان رسیدن به تعادل برای کمپلکس دارو ۱، ۱۵۰۰۰ پیکوثانیه و کمپلکس دارو ۲، ۱۶۵۰۰ پیکوثانیه و کمپلکس دارو ۳، ۱۶۰۰۰ پیکوثانیه می‌باشد. برای پایداری کمپلکس داروها با پروتئین، میزان RMSD از نقطه‌ای مورد بررسی قرار می‌گیرد که ساختار کمپلکس داروها - پروتئین به تعادل رسیده باشد و از زمان تعادل به بعد برای آنالیزهای MMGBSA از آن استفاده می‌شود.

۳-۵ بررسی اتصال لیگاندها و پروتئین با استفاده از نمودار RMSF

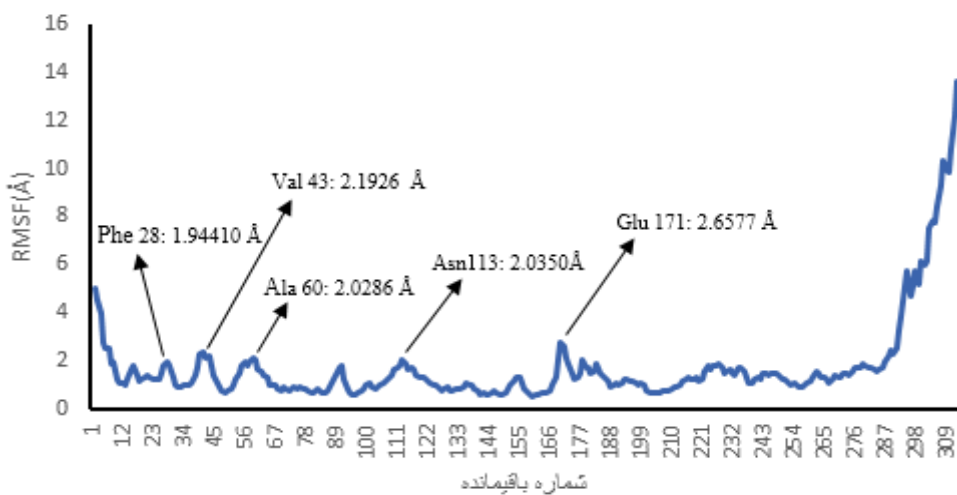
RMSF برای بررسی تحرک اسیدآمینوهای درگیر در جایگاه اتصال پروتئین اندازه‌گیری می‌شود. نمودارهای رسم شده در شکل‌های ۳ تا ۲۶ مربوط به RMSF کمپلکس داروها می‌باشد، که با استفاده از نتایج حاصل از شبیه‌سازی رسم شده‌اند.



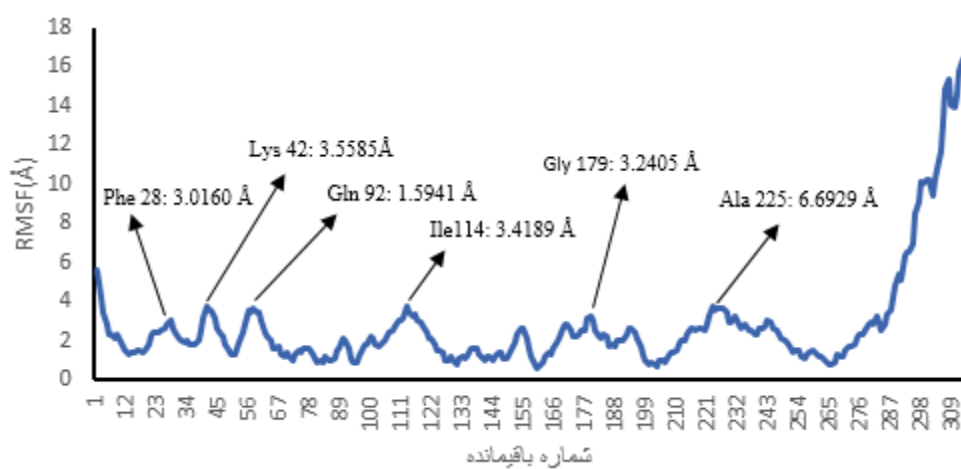
شکل ۳-۲۶ نمودار RMSF کمپلکس دارو مرجع در زمان انجام شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۴ نمودار RMSF کمپلکس دارو ۱ در زمان انجام شبیه سازی



شکل ۳-۲۵ نمودار RMSF کمپلکس دارو ۲ در زمان انجام شبیه سازی



شکل ۳-۲۶ نمودار RMSF کمپلکس دارو ۳ در زمان انجام شبیه سازی

با توجه به نمودارهای RMSF مشخص می‌شود که کمپلکس داروی مرجع نسبت به کمپلکس‌های پروتئین و داروهای ۱ تا ۳ دارای نوسانات بیشتری می‌باشد. هر چه این نوسانات کمتر باشد، اسیدهای آمینه از انعطاف‌پذیری و تحرک کمتری برخوردار هستند، در نتیجه کمپلکس پایدارتر است. با بررسی نتایج حاصل از شبیه‌سازی مشخص شد آمینواسیدهای Phe28، Val43، Lys44، Phe161، Lys50، Val150، Leu149، Ala27، Gly26، Thr95، Leu93، Gln92، Glu51، Lys180، Thr30، Tyr69، Ala68، Gln96، آمینواسیدهایی هستند که در نزدیکی جایگاه اتصال پروتئین قرار دارند. مقادیر RMSF مربوط به این آمینواسیدها، کاهش این پارامتر را برای کمپلکس داروهای ۱ تا ۳ نسبت به کمپلکس داروی مرجع نشان می‌دهند. مقادیر RMSF برای تعدادی از این آمینواسیدها در جدول ۳ آورده شده است.

در هر نمودار تعدادی از آمینواسیدهایی که، از بیشترین مقدار RMSF برخوردار بوده و قله‌های نمودار را نشان می‌دهند مشخص شده‌اند. این آمینواسیدها برای کمپلکس دارو مرجع، Phe28، Val43، Thr90، Ile114، Glu171، Lys180، Cys244، کمپلکس دارو ۱، Phe28، Val43، Thr56، Glu171، Ala225، کمپلکس دارو ۲، Phe28، Val43، Ala60، Asn113، Glu171 و برای کمپلکس دارو ۳، Phe28، Lys42، Ser57، Glu179، Ala225، Ile114 می‌باشند. بین این آمینواسیدها، Phe28 جزء آمینواسیدهایی است که در نزدیکی جایگاه اتصال پروتئین قرار دارد. مقادیر بدست آمده برای این آمینواسید نیز کاهش مقدار RMSF را برای کمپلکس داروهای ۱ تا ۳ نسبت به کمپلکس داروی مرجع نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول ۳ مشاهده می‌شود مقادیر RMSF کمپلکس داروهای پیشنهادی در حدود یک و کمتر از یک می‌باشد و بیانگر این مطلب است که باقیمانده‌های جایگاه فعال در کمپلکس این داروها از انعطاف‌پذیری کمتری برخوردار هستند و در زمان انجام فرایند شبیه‌سازی تغییرات چشمگیری نداشته‌اند. این روند کاهش نشان‌دهنده ایجاد محدودیت حرکتی بیشتر برای آمینواسیدها در برهمکنش با داروهای ۱ تا ۳ می‌باشد. در نتیجه جایگاه اتصال در این کمپلکس‌ها ثابت بوده و می‌توان برای آنالیزهای بعدی از آنها استفاده نمود.

جدول ۳-۴ مقادیر RMSF آمینو اسیدهای موجود در اطراف جایگاه اتصال پروتئین برای چهار کمپلکس بر حسب Å

داروی ۳	داروی ۲	داروی ۱	داروی مرجع	آمینو اسید
3.0160	1.9441	1.7483	3.1792	Phe28
1.3209	0.8352	0.9164	1.5206	Glu51
1.5941	1.2673	1.0655	1.9227	Gln92
1.1013	0.8738	0.9082	1.5323	Leu93
0.8818	0.6026	0.8644	1.0920	Thr95
2.6566	1.4830	1.4665	2.9013	Gly26
0.9184	0.7366	0.8789	0.9363	Arg81
1.3199	0.7616	0.9394	1.5206	Lys50
0.7307	0.6007	0.6892	0.8306	Phe161

۳-۶ نتایج محاسبات انرژی آزاد پیوندی با استفاده از روش MMGBSA

جهت بررسی‌های بیشتر انرژی آزاد اتصال، می‌توان از روش مکانیک مولکولی تعمیم یافته سطح (MMGBSA) استفاده نمود. در این روش، با استفاده از انرژی‌های حلالیت مولکول‌های برهمکنش-کننده و مکانیک مولکولی، می‌توان انرژی اتصال دارو به پروتئین را محاسبه کرد. سایر روش‌های موجود دارای محدودیت‌هایی از قبیل نحوه رسیدن به اثرات حلال هستند. با استفاده از روش MMGBSA انرژی‌های مربوط به هر دارو محاسبه و نتایج حاصل مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ترکیبی که از انرژی اتصال منفی‌تری برخوردار بود، به عنوان ترکیب پایدارتر انتخاب شد.

در جدول ۳ ۵ مقادیر انرژی گازی و انرژی حلال داروها که با استفاده از روش MMGBSA بدست آمده، نشان داده شده است.

جدول ۳-۵ مقایسه مقادیر انرژی گازی و انرژی حلال داروها (kcal/mol)

دارو	انرژی گازی	انرژی حلال
داروی ۱	-110.75	-16.94
داروی ۲	-40.30	-23.06
داروی ۳	-91.21	-18.55

باتوجه به مقادیر به دست آمده در جدول ۳ ۵ مشاهده می‌شود که مقدار انرژی فاز گازی برای داروها بیشتر از مقدار انرژی حلال مربوط به آنها می‌باشد. در نتیجه می‌توان گفت در انرژی اتصال به دست آمده انرژی فاز گازی نسبت به انرژی حلال از سهم بیشتری برخوردار است. همچنین با توجه به مقادیر انرژی فاز گازی داروها مشخص می‌شود که این انرژی برای داروی ۱ مطلوب‌تر است، در نتیجه داروی ۱ برهمکنش مناسب‌تری با پروتئین برقرار می‌کند.

در جدول ۳ ۶ مقادیر انرژی‌های به دست‌آمده از شبیه‌سازی به روش MMGBSA برای کمپلس داروها گزارش شده است.

جدول ۳-۶ انرژی‌های بدست آمده از روش MMGBSA برای کمپلکس داروها (kcal/mol)

مولفه انرژی	داروی مرجع	داروی ۱	داروی ۲	داروی ۳
ΔE_{vdw}	-34.4071	-49.80	-51.97	-40.61
ΔE_{ele}	-16.0117	-10.80	-17.67	-19.49
ΔE_{GB}	30.82	29.22	38.93	32.16
ΔE_{surf}	-4.33	-6.48	-6.44	-5.29
ΔG_{gas}	-50.41	-60.60	-69.64	-60.10
ΔG_{sol}	26.49	22.74	32.49	26.87
ΔG_{bind}	-23.92	-37.86	-37.15	-33.23

نتایج حاصل از روش MMGBSA برای انرژی کمپلکس داروها نشان می‌دهد که بهترین انرژی اتصال با مقدار -37.15 کیلوکالری بر مول مربوط به داروی ۱ می‌باشد و در رتبه‌های بعدی دارو ۲ و سپس داروی ۳ به ترتیب با مقادیر انرژی اتصال -37.15 و -33.23 کیلوکالری بر مول قرار دارند. این نتایج مطابق با نتایج بدست آمده از روش داکینگ مولکولی است و تاییدکننده صحت انجام داکینگ و داروهای انتخابی می‌باشد.

انرژی اتصال محاسبه شده مجموع مقادیر دو انرژی فاز گازی و انرژی انحلال کمپلکس‌ها می‌باشد. مقادیر به دست آمده برای این انرژی‌ها نشان می‌دهند که بیشترین سهم در انرژی اتصال کمپلکس داروها مربوط به انرژی فاز گازی می‌باشد. همچنین مقادیر مربوط به انرژی فاز گازی از مجموع مقادیر انرژی‌های واندروالسی و انرژی‌های الکترواستاتیک به دست می‌آید که با توجه به مقادیر این دو انرژی برای کمپلکس‌ها به این نتیجه می‌رسیم که بیشترین سهم مربوط به برهمکنش‌های واندروالسی می‌باشد. مقادیر مثبت برای انرژی حلالیت قطبی و مقادیر منفی برای

انرژی حلالیت غیر قطبی (آبگریز) در انرژی اتصال به دست آمده بیانگر این مطلب است که سهم انرژی حلالیت قطبی از سهم انرژی حلالیت غیر قطبی بسیار کمتر می‌باشد. در نتیجه می‌توان گفت در برهمکنش‌های پیوندی بین دارو و پروتئین نقش اصلی را نیروهای آبگریز برعهده دارند. در نهایت داروی ۱ در مقایسه با داروهای دیگر از انرژی اتصال مطلوب‌تری برخوردار است و به خوبی برهمکنش هیدروفوبی توسط آن صورت می‌گیرد.

۳-۷ نتیجه گیری

در ابتدا با توجه به مطالعات و تحقیقات انجام شده بر روی تعدادی از مشتقات کینازولین که قوی‌ترین مهارکننده‌های آنزیم 1M17 شناخته شده‌اند ترکیب (۶-فلوئورو-۲-(۴-فلوئوروفنیل)-۳-۲) اکسواپندول-۳-ایلیدین(آمینو)کینازولین-۴(H^۳)-یک با بهترین میزان ثابت مهارکنندگی جهت مهار آنزیم 1M17 انتخاب شد. این دارو به عنوان داروی مرجع برای شناسایی ترکیبات دارویی جدید مورد استفاده قرار گرفت. در بخش بعدی این پایان نامه ۲۶۴ ترکیب از مشتقات کینازولین به عنوان مهارکننده‌های آنزیم 1M17 با استفاده از نرم‌افزار مولگرو غربالگری شده و از میان آن‌ها سه ترکیب که از انرژی اتصال مطلوب‌تری برخوردار بودند انتخاب شدند. با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نیز انرژی‌های آزاد اتصال محاسبه و مولفه‌های انرژی به همراه تغییرات RMSD مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نمودارهای رسم شده مشخص شد که پارمترهای چگالی، انرژی پتانسیل کل، انرژی کل و دما همگرایی بسیار خوبی دارند و کمپلکس داروها در طول شبیه‌سازی به تعادل رسیده‌اند. همچنین نمودارهای RMSD رسم شده نیز به تعادل رسیدن و پایداری کمپلکس داروها را در طول انجام فرایند شبیه‌سازی تایید می‌کنند. در مراحل انجام شده بیشترین تطابق مربوط به داروی شماره ۱ می‌باشد. نمودارهای RMSF رسم شده برای کمپلکس‌ها نشان می‌دهند که باقیمانده‌های سایت فعال در کمپلکس داروهای پیشنهادی از انعطاف‌پذیری کمتری برخوردار بوده و در حین شبیه-

سازی تغییرات چشمگیری در موقعیت آن‌ها ایجاد نشده است در نتیجه داروهای پیشنهادی برهمکنش مناسبی با جایگاه اتصال پروتئین برقرار می‌کنند. تمایل داروها جهت اتصال به جایگاه فعال پروتئین با استفاده از انرژی آزاد اتصال مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج حاصل از روش MMGBSA مشخص گردید که داروی ۱ با مقدار انرژی ۳۷۰۸۶ کیلوکالری بر مول از انرژی آزاد اتصال مطلوب‌تری نسبت به سایر داروها برخوردار است. انرژی‌های فاز گازی و انحلال به دست آمده نشان می‌دهند که بیشترین سهم در برهمکنش‌های دارو با پروتئین مربوط به انرژی‌های فاز گازی است. از مقایسه مقادیر به دست آمده برای انرژی‌های واندروالسی و الکترواستاتیک کمپلکس‌ها به این نتیجه می‌رسیم که سهم قابل توجهی از برهمکنش‌ها، واندروالسی است. همچنین از بررسی انرژی انحلال این کمپلکس‌ها بدست می‌آید که عامل اصلی در ویژگی‌های اتصال، برهمکنش‌های غیرقطبی دارو با پروتئین است. در نهایت می‌توان گفت داروی ۱ از قدرت مهارکننده‌گی بالاتری نسبت به سایر مشتقات مورد مطالعه برخوردار بوده و می‌تواند با اتصالات قوی‌تری به جایگاه فعال پروتئین متصل و باعث مهار آن شود. همچنین این دارو گزینه‌ی مناسبی جهت بررسی‌های بیشتر آزمایشگاهی است.

۳-۸ آینده‌نگری

✓ ایجاد استخلاف‌های جدید روی بهترین ترکیب به دست آمده و بررسی مجدد آن از طریق

روش‌های محاسباتی

✓ افزایش زمان شبیه‌سازی با پیشرفت کامپیوترها

✓ بررسی میدان نیروهای جدید

✓ تست روش‌های داکینگ جدید

پوست

جدول (پ-۱): نامگذاری یک حرفی و سه حرفی اسیدهای آمینه

Name	Three-letter abbreviation	One-letter abbreviation
Alanine	Ala	A
Cysteine	Cys	C
Aspartic acid	Asp	D
Glutamic acid	Glu	E
Phenylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Methionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y

مراجع

- [۱] مهدوی، ر. (۱۳۸۳) " اصول بیوشیمی لنینجر " چاپ سوم، انتشارات آینده، تهران، ص ۲۷۴.
- [2] kim, K. N., Fisher, D. K., Gao, M., & Gultinan, M. J. (1998) "Molecular cloning and characterization of the Amylose-Extender gene encoding starch branching enzyme IIB in maize". *Plant molecular biology*, 38(6), 945-956.
- [3] Radzicka, A., & Wolfenden, R. (1995). "A proficient enzyme". *Science*, 267(5194), 90-93.
- [4] Callahan, B. P., & Miller, B. G. (2007). "OMP decarboxylase—an enigma persists". *Bioorganic chemistry*, 35(6), 465-469.
- [5] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*". Macmillan.
- [۶] محیطی م، (۱۳۸۵)، پایان نامه ارشد: "بررسی پایداری ترمودینامیکی آنزیم لیپاز پانکراس خوک در شرایط مختلف (میدان مغناطیسی)"، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی شاهرود.
- [7] Menendez, R. G. (1999). "Three molecular mechanisms to explain some biological effects of electromagnetic fields and hypogravity". *Medical hypotheses*, 52(3), 239-245.
- [8] Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., ... & Scheer, M. (2012). BRENDA in 2013: "integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA". *Nucleic acids research*, 41(D1), D764-D772.
- [9] Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). "The determination of enzyme dissociation Constants". *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- [10] Daszkiewicz, P. I. O. T. R. (2016). "René-Antoine Ferchault de Réaumur (1683-1757)-dendrologiczne aspekty jego prac". *Rocznik Polskiego Towarzystwa Dendrologicznego*, 64.
- [11] Kuhn, P. L., Petroulakis, E., Zazanis, G. A., & McKinnon, R. D. (1995). "Motor function analysis of myelin mutant mice using a rotarod". *International journal of developmental neuroscience*, 13(7), 715-722.

[12] Radzicka, A., & Wolfenden, R. (1996). "Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases". *Journal of the American Chemical Society*, 118(26), 6105-6109.

[13] Pozharskii, A. F., Garnovskii, A. D., & Simonov, A. M. (1966). "Advances in the chemistry of imidazole". *Russian Chemical Reviews*, 35(2), 122.

[۱۴] وخشوری ل، (۱۳۸۸)، پایان نامه ارشد: "تهیه و بررسی بسترهایی برای تثبیت آنزیم"، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان.

[۱۵] لاهیجی س، ۱۳۹۵، پایان نامه ارشد: "تثبیت آنزیم فیتاز نو ترکیب از *Yersinia intermedi* بر روی نانولوله های کربنی چندلایه"، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهر کرد.

[۱۶] عزیزی ل، ۱۳۹۰، پایان نامه ارشد: "بررسی کینتیکی مهارشدن آنزیم آلکالین فسفاتاز"، مرکز پیام نور تهران، پژوهشکده علوم زیستی.

[17] Furnham, N., Holliday, G. L., de Beer, T. A., Jacobsen, J. O., Pearson, W. R., & Thornton, J. M. (2014). "The Catalytic Site Atlas 2.0: cataloging catalytic sites and residues identified in enzymes". *Nucleic acids research*, 42(D1), D485-D489.

[18] Matthews, J. A. (2006). Investigation of the effects of increased levels of O-GlcNAc protein modification on protein kinase C and Akt.

[19] Longu, S., Mura, A., Padiglia, A., Medda, R., & Floris, G. (2005). "Mechanism-based inactivators of plant copper/quinone containing amine oxidases". *Phytochemistry*, 66(15), 1751-1758.

[20] Grimminger, F., Schermuly, R. T., & Ghofrani, H. A. (2010). "Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors". *Nature reviews Drug discovery*, 9(12), 956.

[21] Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). "The protein kinase complement of the human genome". *Science*, 298(5600), 1912-1934.

[22] Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases". *Cell*, 141(7), 1117-1134.

[۲۳] جلالی پور ف، ۱۳۹۱، پایان نامه ارشد: "آنتی بادی مونوکلونال ضد EGFR در باکتری *E.Coli*

به منظور تولید آنتی بادی تک زنجیره ای"، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.

[24] Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., & Salomon, D. S. (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer". *Gene*, 366(1), 2-16.

[25] Dahabreh, I. J., Linardou, H., Kosmidis, P., Bafaloukos, D., & Murray, S. (2010). "EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer". *Annals of oncology*, 22(3), 545-552.

[26] Ihmaid, S., Ahmed, H., & Zayed, M. (2018). "The design and development of potent small molecules as anticancer agents targeting EGFR TK and tubulin polymerization". *International journal of molecular sciences*, 19(2), 408.

[27] Al-Obaid, A. M., Abdel-Hamide, S. G., El-Kashef, H. A., Alaa, A. M., El-Azab, A. S., Al-Khamees, H. A., & El-Subbagh, H. I. (2009). "Substituted quinazolines, part 3. Synthesis, in vitro antitumor activity and molecular modeling study of certain 2-thieno-4 (3H)-quinazolinone analogs". *European journal of medicinal chemistry*, 44(6), 2379-2391.

[28] Zayed, M. F., Ahmed, H. E., Ihmaid, S., Omar, A. S. M., & Abdelrahim, A. S. (2015). "Synthesis and screening of some new fluorinated quinazolinone-sulphonamide hybrids as anticancer agents". *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 10(3), 333-339.

[۲۹] نخعی سیستانی، ر. تفرحی، م. شیرزاد، ه. (۱۳۸۹). اصول ژنتیک سرطان (ترجمه). چاپ اول، تهران: برای فردا. ص ۳۵۹.

[30] Kopp, R., Rothbauer, E., Mueller, E., Schildberg, F. W., Jauch, K. W., & Pfeiffer, A. (2003). "Reduced survival of rectal cancer patients with increased tumor epidermal growth factor receptor levels". *Diseases of the colon & rectum*, 46(10), 1391-1399.

[۳۱] هاریسون. ۱۳۸۰. اصول طب داخلی بیماریهای انکولوژی. ترجمه: فاطمه اصفهانی. انتشارات فرهنگی تیمورزاده: نشر طبیب.

[32] Zayed, M. F., Ahmed, H. E., Omar, A. S. M., Abdelrahim, A. S., & El-Adl, K. (2013). "Design, synthesis, and biological evaluation studies of novel quinazolinone derivatives as anticonvulsant agents". *Medicinal Chemistry Research*, 22(12), 5823-5831.

[33] Connolly, D. J., Cusack, D., O'Sullivan, T. P., & Guiry, P. J. (2005). "Synthesis of

- quinazolinones and quinazolines". *Tetrahedron*, 61(43), 10153-10202.
- [34] Ajani, O. O. (2016). "Quinazoline pharmacophore in therapeutic medicine". *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3), 716-733.
- [35] Zayed, M. F., & Hassan, M. H. (2014). "Synthesis and biological evaluation studies of novel quinazolinone derivatives as antibacterial and anti-inflammatory agents". *Saudi pharmaceutical journal*, 22(2), 157-162.
- [36] Kumar, K. S., Ganguly, S., Veerasamy, R., & De Clercq, E. (2010). "Synthesis, antiviral activity and cytotoxicity evaluation of Schiff bases of some 2-phenyl quinazoline-4 (3) H-ones". *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 5474-5479.
- [37] Abbas, S. E., Awadallah, F. M., Ibrahim, N. A., Said, E. G., & Kamel, G. M. (2012). "New quinazolinone-pyrimidine hybrids: Synthesis, anti-inflammatory, and ulcerogenicity studies". *European journal of medicinal chemistry*, 53, 141-149.
- [38] Ali, M. M., Mohamed, A. Y., El-Bayouki, M. A., Basyouni, W. M., & Abbas, S. Y. (2010). "Synthesis of some new 4 (3H)-quinazolinone-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their metal complexes and a study on their anticonvulsant, analgesic, cytotoxic and antimicrobial activities". *Eur. J. Med. Chem*, 45, 3365-3373.
- [39] Al-Rashood, S. T., Aboldahab, I. A., Nagi, M. N., Abouzeid, L. A., Abdel-Aziz, A. A., Abdel-hamide, S. G., ... & El-Subbagh, H. I. (2006). "Synthesis, dihydrofolate reductase inhibition, antitumor testing, and molecular modeling study of some new 4 (3H)-quinazolinone analogs". *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(24), 8608-8621.
- [40] Zayed, M. F., & Hassan, M. H. (2013). "Design, synthesis and biological evaluation studies of novel quinazoline derivatives as cytotoxic agents". *Drug research*, 63(04), 210-215.
- [41] Al-Obaid, A. M., Abdel-Hamide, S. G., El-Kashef, H. A., Alaa, A. M., El-Azab, A. S., Al-Khamees, H. A., & El-Subbagh, H. I. (2009). "Substituted quinazolines, part 3. Synthesis, in vitro antitumor activity and molecular modeling study of certain 2-thieno-4 (3H)-quinazolinone analogs". *European journal of medicinal chemistry*, 44(6), 2379-2391.
- [42] Isanbor, C., & O'Hagan, D. (2006). "Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents". *Journal of Fluorine Chemistry*, 127(3), 303-319.
- [43] Layeva, A. A., Nosova, E. V., Lipunova, G. N., Trashakhova, T. V., & Charushin, V. N. (2007). "A new approach to fluorinated 4 (3H)-quinazolinones". *Journal of*

fluorine chemistry, 128(7), 748-754.

[44] Ibrahim, S. R., Mohamed, G. A., Al Haidari, R. A., Zayed, M. F., El-Kholy, A. A., Elkhayat, E. S., & Ross, S. A. (2018). "Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities". *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(3), 786-790.

[45] Ihmaid, S., Ahmed, H., & Zayed, M. (2018). "The design and development of potent small molecules as anticancer agents targeting EGFR TK and tubulin polymerization". *International journal of molecular sciences*, 19(2), 408.

[46] Xue, L. C., Dobbs, D., Bonvin, A. M., & Honavar, V. (2015). "Computational prediction of protein interfaces: A review of data driven methods". *FEBS letters*, 589(23), 3516-3526.

[47] Sharma, A. (2016). "Short notes on comparison of Molecular docking, Molecular Dynamics and QM/MM methods". *Journal of Science*, 1(3), 34-44.

[48] Yuriev, E., Holien, J., & Ramsland, P. A. (2015). "Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012–2013 in review". *Journal of Molecular Recognition*, 28(10), 581-604.

[49] Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., & Ferrin, T. E. (1982). "A geometric approach to macromolecule-ligand interactions". *Journal of molecular biology*, 161(2), 269-288.

[50] Irwin, J. J., Lorber, D. M., McGovern, S. L., Wei, B., & Shoichet, B. K. (2002, January). "Molecular docking and drug design". In *2002 International Conference on Computational Nanoscience and Nanotechnology-ICCN 2002* (pp. 50-51).

[51] Irwin, J. J., Shoichet, B. K., Mysinger, M. M., Huang, N., Colizzi, F., Wassam, P., & Cao, Y. (2009). "Automated docking screens: a feasibility study". *Journal of medicinal chemistry*, 52(18), 5712-5720.

[52] Zhang, S., Kumar, K., Jiang, X., Wallqvist, A., & Reifman, J. (2008). "DOVIS: an implementation for high-throughput virtual screening using AutoDock". *BMC bioinformatics*, 9(1), 126.

[53] Cosconati, S., Forli, S., Perryman, A. L., Harris, R., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2010). "Virtual screening with AutoDock: theory and practice". *Expert opinion on drug discovery*, 5(6), 597-607.

[54] Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). "A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm". *Journal of molecular*

biology, 261(3), 470-489.

[55] Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., ... & Mainz, D. T. (2006). "Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes". *Journal of medicinal chemistry*, 49(21), 6177-6196.

[56] Kinnings, S. L., & Jackson, R. M. (2009). "LigMatch: a multiple structure-based ligand matching method for 3D virtual screening". *Journal of chemical information and modeling*, 49(9), 2056-2066.

[57] Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function". *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639-1662.

[58] Wang, R., Fang, X., Lu, Y., & Wang, S. (2004). "The PDBbind database: Collection of binding affinities for protein– ligand complexes with known three-dimensional structures". *Journal of medicinal chemistry*, 47(12), 2977-2980.

[59] Wang, R., Fang, X., Lu, Y., Yang, C. Y., & Wang, S. (2005). "The PDBbind database: methodologies and updates". *Journal of medicinal chemistry*, 48(12), 4111-4119.

[60] Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). "ZINC– a free database of commercially available compounds for virtual screening". *Journal of chemical information and modeling*, 45(1), 177-182.

[61] Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). "Phase transition for a hard sphere system". *The Journal of chemical physics*, 27(5), 1208-1209.

[62] Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1959). "Studies in molecular dynamics. I. General method". *The Journal of Chemical Physics*, 31(2), 459-466.

[63] Nosé, S., & Klein, M. L. (1983). "Constant pressure molecular dynamics for molecular systems". *Molecular Physics*, 50(5), 1055-1076.

[64] Barker, J. A., & Watts, R. O. (1969). "Structure of water; A Monte Carlo calculation". *Chemical Physics Letters*, 3(3), 144-145.

[65] Greengard, L., & Rokhlin, V. (1987). "A fast algorithm for particle simulations". *Journal of computational physics*, 73(2), 325-348.

[66] Morriss, G. P., Davis, P. J., & Evans, D. J. (1991). "The rheology of n alkanes: Decane and eicosane". *The Journal of chemical physics*, 94(11), 7420-7433.

[۶۷] منصوری س. و حبیبی فیضی ل. و مینوچهر ز. (۱۳۹۵) "مدل سازی به روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مونومر ($A\beta$ ۱-۴۲) و ($A\beta$ ۱-۴۰)، به منظور مقایسه نقش آن‌ها در ایجاد بیماری آلزایمر" مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، شماره ۲۴، دوره ۶، ص ۴۵.

[68] Zhmurov, A., Dima, R. I., Kholodov, Y., & Barsegov, V. (2010). "Sop-GPU: Accelerating biomolecular simulations in the centisecond timescale using graphics processors". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(14), 2984-2999.

[۶۹] بآبادی م، (۱۳۹۸)، پایان نامه ارشد: "بررسی اتصال مشتقات جدید سنتز شده برای مهار آنزیم Pim-1"، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

[70] Childers, M. C., & Daggett, V. (2017). "Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design". *Molecular systems design & engineering*, 2(1), 9-33.

[71] Maithri, G., Manasa, B., Vani, S. S., Narendra, A., & Harshita, T. (2016). "Computational drug design and molecular dynamic studies-A review". *Int J Biomed Data Min*, 6(01), 1-7.

[72] Nogrady, T., & Weaver, D. F. (2005). "*Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach*". Oxford University Press.

[73] Ranjbar, M. M., Ataei, S., Nikbakht, G. B., & Golabdar, S. (2017). "Analysis of variations, structures, and phylogenic characteristics of bovine leukocyte antigen DRB3 exon2". *Archives of Razi Institute*, 72(3), 147-157.

[74] De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). "Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery". *Journal of medicinal chemistry*, 59(9), 4035-4061.

[75] Frembgen-Kesner, T., & Elcock, A. H. (2006). "Computational sampling of a cryptic drug binding site in a protein receptor: explicit solvent molecular dynamics and inhibitor docking to p38 MAP kinase". *Journal of molecular biology*, 359(1), 202-214.

[76] Gane, P. J., & Dean, P. M. (2000). "Recent advances in structure-based rational drug design". *Current opinion in structural biology*, 10(4), 401-404.

[77] Minor, L. K. (Ed.). (2006). *Handbook of assay development in drug discovery*. CRC Press.

[78] Hajduk, P. J. (2006). "Fragment-based drug design: how big is too big?". *Journal*

of medicinal chemistry, 49(24), 6972-6976.

[79] Lipinski, C. A. (2004). "Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five Revolution". *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337-341.

[80] Kelder, J., Grootenhuis, P. D., Bayada, D. M., Delbressine, L. P., & Ploemen, J. P. (1999). "Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs". *Pharmaceutical research*, 16(10), 1514-1519.

[81] Zayed, M., Ahmed, S., Ihmaid, S., Ahmed, H., Rateb, H., & Ibrahim, S. (2018). "Design, synthesis, cytotoxic evaluation and molecular docking of new fluoroquinazolinones as potent anticancer agents with dual EGFR kinase and tubulin polymerization inhibitory effects". *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1731.

Abstract

Cancer is a disease caused by unbalanced control and abnormal growth of cells. One of the significant causes of cancer is the overproduction of Protein kinase that leads to over-Phosphorylation of proteins and it can alter the function and activity of cells. Epidermal growth factor receptor is one of the essential parts of Protein kinase that plays a vital role in procedures such as cell proliferation, cell mobility, angiogenesis and resistance against apoptosis. According to the conducted studies, it appeared that in most tumors overexpression of epidermal growth factor receptor plays a fundamental role. That's why identification and understanding the interaction of these inhibitors of receptors are considered as very important targets for the function of anticancer agents. Today, computer simulations are one of the best ways to study these interactions. In the first section of this thesis, according to the conducted studies, among the derivatives of quinazoline, which are known to be the most potent protein 1M17 inhibitors, a compound with optimal inhibitory constant and high inhibitory potency was selected and used as reference drug. This compound is (6-Fluoro-2-(4-fluorophenyl)-3-(Oxindole-3-indolone) Amino kinazoline-4(H3) one. In the second section of thesis, 264 compounds of derivatives of quinazoline have been examined by the use of virtual screening, and from among them three compounds with more negative connection energy have been selected as recommended drugs for the inhibition of protein 1M17 and have been researched by the use of dynamic molecular simulation method. The obtained results from the dynamic molecular method, approved the procedure of molecular docking and drug one that is called N- (2,4-Dimethoxyphenyl)-2-(6- Fluoro-2-(4-fluorophenyl)- quinazoline-4-il(tio) Acetamide. It has been selected as The best drug and the strongest inhibitor. According to obtained energy values by the use of MMGBSA method for complex drugs it has been determined that the largest share of the released energy of the connection is related to Van der Waals energy. Also hydrophobic forces play a vital role in the connection energy.

Keywords: Epidermal growth factor, Quinazolines, Molecular docking, Molecular dynamics, Linkage energy.



Shahrood University of
Technology

Faculty of Chemistry

M.Sc. Thesis in Physical Chemistry

**Docking, virtual screening and
molecular dynamics simulation for
determination of new derivatives of
anti-cancer drugs from Quinazoline
compounds**

By

Elahe Sadat Mosavi

Supervisor:

Dr. Mohssen. Sargolzaei

Dr. Hossein. Nikoofard

January 2020