مقاله پژوهشی

طراحی، مطالعه داکینگ مولکولی و پیش‌بینی سمیت تعدادی از مشتقات جدید ۱، ۲، ۳ تری آزول شامل بخش پی پیرازین به‌عنوان عوامل ضد قارچ و مهارکننده آنزیم سیتوکروم ۵۱

ابوذر روئین تن[1*]، فاطمه فدایی نوبندگانی[2]

۱- دانشگاه افسری و تربیت پاسداری امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا، فسا، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: در این مطالعه، بر روی تعدادی از مشتقات جدید تری آزول، شامل حلقه ۱، ۲، ۳ تری آزول متصل شده به بخش پی پیرازین به‌عنوان عوامل ضد قارچ و مهارکننده آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP51) مطالعات داکینگ انجام شد. در ادامه خطرات سمیت ترکیبات طراحی‌شده با استفاده از نرم‌افزارهای موجود پیش‌بینی گردید.

مواد و روش‌ها: در ابتدا ساختار شیمیایی همه آزول‌های طراحی‌شده با استفاده از نرم‌افزار ۰/۱۴ Chem BioDraw Ultra ترسیم شد، سپس به‌منظور بهینه‌سازی انرژی، به نرم‌افزار Hyperchem انتقال یافت. پس از آماده‌سازی آن‌ها، تمام این ترکیبات شیمیایی با آنزیم موردنظر به‌منظور انتخاب بهترین مهارکننده دارویی توسط نرم‌افزار Auto Dock- Vina-1-1-2-win32.msi داک شدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار مولگرو مورد آنالیز قرار گرفت. در مرحله نهایی پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات به‌وسیله برنامه OSIRIS انجام گردید.

نتایج: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات داکینگ مولکولی مهم‌ترین پیوندهای درگیر در اتصال دارو با گیرنده، کوئوردیناسیون حلقه آزول با پروتئین هم، پیوند هیدروژنی و اتصالات هیدروفوبیک می‌باشند. در میان تمام ترکیبات موردمطالعه، بهترین نتایج داکینگ مربوط به ترکیب شماره ۵ (ترکیب حاوی گروه ۴- برمو) است.

نتیجه‌گیری: در پایان با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات داکینگ، ارزیابی بیولوژیکی و پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات طراحی‌شده می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب شماره ۵ (ترکیب حاوی گروه ۴- برمو) می‌تواند به‌عنوان عامل مؤثر ضد قارچ و مهارکننده آنزیم CYP51 مطرح شود.

کلمات کلیدی: داکینگ مولکولی، پیش‌بینی خطر سمیت، مهارکننده CYP51، ۱، ۲، ۳ تری آزول، ضد قارچ

مقدمه

میزان بروز عفونت‌های قارچی با افزایش تعداد بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، مانند بیماران تحت شیمی‌درمانی، دریافت‌کنندگان پیوند عضو و بیماران با نقص اکتسابی سیستم ایدز در حال افزایش است (۱). در این میان میزبانان با سیستم ایمنی معیوب، پاتوژن‌های قارچی به‌آسانی می‌توانند به بافت‌ها حمله کرده و عفونت‌های جدی با میزان بالای بیماری و مرگ‌ومیر را ایجاد کنند (۲). در سال‌های اخیر استفاده وسیع از عوامل ضد قارچ به‌خصوص بعد از شیوع بیماری ایدز باعث ایجاد مقاومت به این داروها توسط میکروارگانیسم‌های پاتوژن شده است. امروزه تلاش‌های فراوان برای توسعه داروهای ضد قارچ با سمیت کمتر، اثربخشی بیشتر و مکانیسم عمل جدید صورت گرفته است (۶-۳).

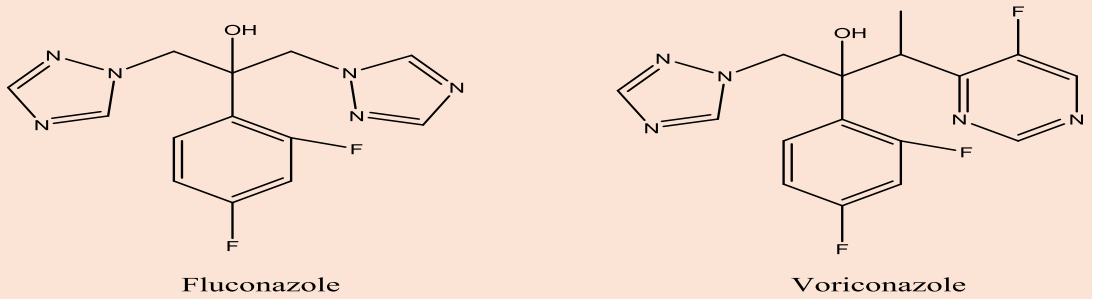
۱، ۲، ۳ تری آزول‌ها دسته مهمی از ترکیبات ناجور حلقه بوده که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی و کشاورزی می‌باشند (۷). واکنش‌های حلقه‌زایی ۱، ۳- دوقطبی یکی از

*نویسنده مسئول: **ابوذر روئین تن**، دانشگاه افسری و تربیت پاسداری امام حسین (ع)، تهران، ایران.
Email: abroeintan@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0001-9471-591X

مهم‌ترین روش‌ها جهت تولید ترکیب‌های ناجور حلقه پنج عضوی می‌باشند. مشتقات ۱، ۲، ۳ تری آزول با استفاده از واکنش کلیک تهیه می‌شوند. شیمی کلیک به گروهی از واکنش‌ها اشاره می‌کند که سریع، ساده، با خالص‌سازی آسان، فضاویژه و باراندمان بالا هستند (۸). در سال ۱۸۸۵ اولین مشتقات تری آزول را از واکنش سیانوژن و فنیل هیدرازین و متعاقب آن حلقوی کردن ترکیب حاصل در محیط اسید استیک به دست آورد. ترکیب ناجور حلقه تری آزول دارای سه‌اتم نیتروژن در حلقه خود است. این ناجور حلقه به علت داشتن سه‌اتم الکترونگاتیو دچار کمبود الکترون است. واکنش‌های جانشینی الکترون‌دوستی روی کربن در سیستم‌های حلقوی تقریباً غیرمعمول است، زیرا تعداد اتم‌های کربن کمتر است و الکترون‌دوست‌ها ترجیحاً به نیتروژن حمله می‌کنند. تعداد ناجور حلقه‌های حاوی چند اتم در طبیعت کم است، اما اهمیت آن‌ها ازنظر شیمی دارویی محرز است (۸). اثرات ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد اشتها، ضد تشنج و ضدافسردگی این دسته از ترکیبات، اهمیت سیستم‌های ناجور حلقه را نشان می‌دهد. آزول‌های فلوکونازول و وریکونازول (شکل ۱) مهم‌ترین داروهای ضد قارچ برای درمان عفونت‌های قارچی هستند (۹).

با گسترش روزافزون مطالعات شبیه‌سازی و دینامیک مولکولی در تمامی شاخه‌های علوم و استفاده از کامپیوترها در مطالعات، بهره‌گیری از علم بیوانفورماتیک نسبت به دهه‌های گذشته بیش‌ازپیش شده است. بیوانفورماتیک، علمی است که با ایجاد توسعه و الگوریتم‌ها، تکنیک‌های محاسباتی و آماری، عمل محاسبه پیشرفته و پیچیده را در علوم پایه مخصوصاً شاخه زیست‌شناسی به‌راحتی امکان‌پذیر می‌سازد (۱۵). در این راستا، غربالگری مجازی، روشی محاسباتی و تائید شده برای تشخیص بهترین و پایدارترین ترکیب از کتابخانه‌های شیمیایی عظیم است. غربالگری مجازی ازلحاظ اقتصادی، روشی کاملاً مقرون‌به‌صرفه جهت تحقق و دست‌یابی به بهترین و پایدارترین ترکیب مهارکننده است (۱۶). با بهره‌گیری از علم بیوانفورماتیک و درک عمق رفتار مولکول‌ها، مهارکننده‌ها و نیز کمپلکس گیرنده – لیگاند، می‌توان داروهایی طراحی کرد که علاوه برداشتن امتیازات و خواص داروهای فعلی، بسیار اختصاصی‌تر عمل کنند و از داشتن عوارض جانبی آن‌ها عاری باشند.

در این مطالعه، از روش‌های کامپیوتری مانند داکینگ به‌منظور کشف ترکیباتی جدید با فعالیت ضد قارچی بالقوه و پیش‌بینی



شکل ۱- عوامل ضد قارچی تری آزول مورداستفاده در درمان بالینی

سیتوکروم‌ها مجموعه بزرگی از هموپروتئین‌ها (ترکیب آهن و پروتئین) هستند که در آن‌ها آهن موجود با دریافت یا از دست دادن الکترون تحت واکنش‌های اکسایش-کاهش قرار می‌گیرد. سایت فعال در سیتوکروم P۴۵۰ شامل یک هم (کوفاکتور دارای اتم آهن) است. لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP۵۱) یک آنزیم حیاتی در چرخه زندگی قارچ‌ها است و این آنزیم اولین هدف برای عوامل ضد قارچ آزول‌ها محسوب می‌شود (۱۳-۱۰). مهار آنزیم سیتوکروم ۵۱ باعث از هم گسستگی غشاء پلاسمایی سلول قارچ‌ها شده که این امر درنهایت منجر به آسیب‌پذیر شدن سلول قارچ در برابر عوامل محیطی می‌شود (۱۴).

خطر سمیت ترکیبات طراحی‌شده استفاده شد. باهدف بررسی و شناسایی دقیق مکانیسم اتصال ۱۰ ترکیب با اسکلت ساختاری به سایت فعال آنزیم سیتوکروم ۵۱، روش مولکولار داکینگ اجرا و نتایج به‌دست‌آمده از آن مورد تجزیه‌وتحلیل و درنهایت پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات طراحی‌شده توسط مرورگر OSIRIS انجام گرفت (۱۷). برای انجام روش داکینگ از نرم‌افزار Auto Dock Vina استفاده شده است (۱۸). اتوداک وینا ازجمله نرم‌افزارهای معتبر در دسترس برای اکتشاف دارو، داکینگ مولکولی و آزمایش‌های مجازی است که توسط دکتر اولگ تروت ایجاد شد (۱۹-۱۸). از ویژگی‌های یک نرم‌افزار خوب، داشتن

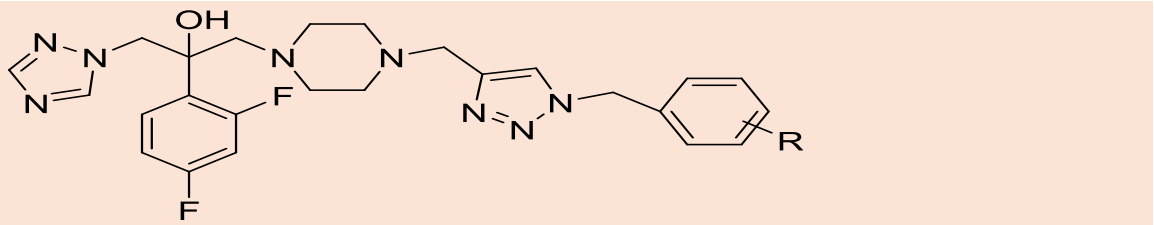
دقت بالا برای گرفتن نتیجه قابل‌اعتماد و همچنین سرعت‌بالا است. این برنامه در مقایسه با نرم‌افزار داکینگ مولکولی اتوداک ۴، تقریباً دومرتبه سرعت را افزایش می‌دهد، همچنین صحت پیش‌گویی‌های مود جفت شدن را بهبود می‌دهد.

مواد و روش‌ها

مطالعات کامپیوتری بر اساس فعالیت ضد قارچی یک سری از مشتقات تری آزول محاسبه گردیده است. مقادیر کمترین غلظت مهاری ترکیب که می‌تواند ۸۰ درصد از رشد قارچ را در محیط آزمایشگاهی مهار کند (MIC۸۰)، محاسبه‌شده از میزان فعالیت یک سری از مشتقات آزول علیه قارچ‌های مختلف به‌عنوان داده‌های بیولوژیکال مورداستفاده قرار گرفتند (۲۰). این پژوهش به شیوه توصیفی – تحلیلی انجام شد. برای انجام عملیات داکینگ، شبیه‌سازی اتصال مولکول به‌وسیله نرم‌افزار اتوداک وینا (Auto Dock- Vina-1-1-2-win32.msi) با دقت ۷۳ درصد انجام گرفت (۱۸). بدین منظور این نرم‌افزار در کامپیوتر ۵ هسته‌ای با حافظه ۶ گیگابایت تحت سیستم‌عامل لینوکس نصب گردید. در این تحقیق ۱۰ ترکیب از مشتقات ۱، ۲، ۳ تری آزول حاوی بخش پی پیرازین موردبررسی قرار گرفت. ساختار کلی، جزئیات ساختاری و نام ترکیبات موردمطالعه در جدول ۱ و شکل ۲ آورده شده است. ساختار کریستالی آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP۵۱) از پایگاه بانک PDB انتخاب و دانلود گردید. کد شناسایی این آنزیم در PDB بانام ۱ EA۱ ثبت گردیده است.

جدول ۱- جزئیات ساختاری و نام ترکیبات موردمطالعه

شماره ترکیب	R	نام ترکیب
۱	2- F	2-(2,4-difluorophenyl)-1-(4-((1-(2-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۲	2- Cl	1-(4-((1-(2-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۳	4-Cl	1-(4-((1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۴	2-Br	1-(4-((1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۵	4- Br	1-(4-((1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۶	3- Me	2-(2,4-difluorophenyl)-1-(4-((1-(3-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۷	4-Me	2-(2,4-difluorophenyl)-1-(4-((1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۸	4- CN	4-((4-((4-(2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl)piperazin-1-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzonitrile
۹	3- NO2	2-(2,4-difluorophenyl)-1-(4-((1-(3-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
۱۰	4- NO2	2-(2,4-difluorophenyl)-1-(4-((1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol



شکل ۲- ساختار کلی ترکیبات موردمطالعه

آماده‌سازی لیگاندها و پروتئین برای انجام داکینگ

ساختار دوبعدی لیگاندهای موردنظر توسط برنامه ChemBioDraw Ultra۱۴/۰ ترسیم و سپس به‌منظور به حداقل رساندن انرژی مولکول‌ها از نرم‌افزار Hyperchem و روش‌های MM+Field و semi-empirical(PM) استفاده گردید. الگوریتم Polak-Ribiere برای بهینه کردن ساختارهای مولکولی مورداستفاده قرار گرفت. سپس کنفورمری که دارای کمترین انرژی بود انتخاب و جهت مطالعات داکینگ به برنامه Vina Auto Dockمنتقل شد. در ادامه با استفاده از Gasteiger-Marsili بار جزئی برای مولکول‌های مهارکننده محاسبه شد.

با استفاده از نرم‌افزار مولگرو Docker (MVD 2007.2.2.5– Molegro Virtual Aug 27)، لیگاند و کوفاکتورهای اضافی و مولکول‌های آب موجود در ساختار کریستالی پروتئین حذف شدند (۲۱). بعد از حذف قسمت‌های غیرضروری در عملیات داکینگ، پروتئین به‌عنوان ورودی نرم‌افزار Auto Dock Vina استفاده شد. تا بعد از اضافه شدن اتم‌های هیدروژن به پروتئین، بار کلی آن با استفاده از Kollman Charge تعیین گردد سپس هیدروژن‌های غیر یونیزه در اتم کربن مجاور ادغام شوند.

انجام داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار اتوداک وینا

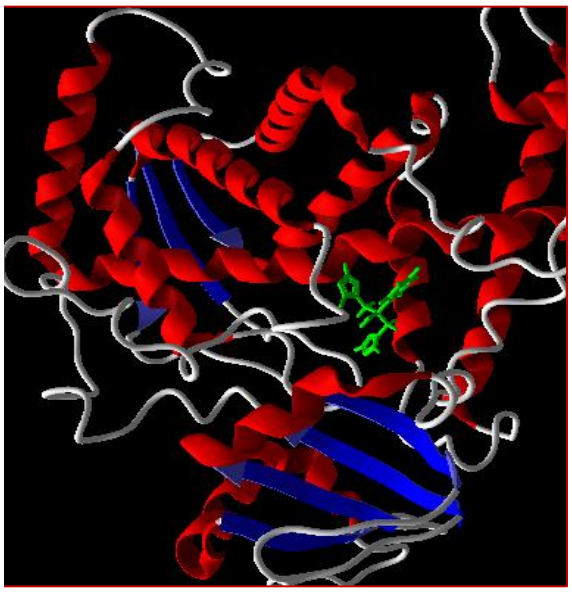
شبیه‌سازی اتصال مولکول به‌وسیله نرم‌افزار اتوداک وینا (Autodock- vina-1-1-2-win32.msi) با دقت ۷۳ درصد انجام گرفت. با توجه به این‌که ساختار گیرنده در دمای ۳۱۰ کلوین به تعادل رسیده و در پایدارترین حالت خود بود و شبیه‌سازی اتصال با اعمال انعطاف‌پذیری گیرنده هدف، ازنظر زمانی و محاسباتی بسیار هزینه‌بر است، در این مطالعه ساختار مولکول گیرنده صلب فرض می‌شود. ازآنجاکه ابعاد جعبه گرید می‌تواند از ۱ تا ۴۰ آنگستروم باشد، به‌منظور تنظیم فضای جستجو جعبه گرید، مکعب حاوی نقاط جستجو (spacing) با ابعاد ۰/۳۷۵ آنگستروم استفاده شد به‌نحوی‌که گرید، تمامی ساختار گیرنده را در برگرفته بود. پس از تنظیم گرید، اعداد مربوط به مراکز و اندازه کارتزینی جعبه گرید (۱۰۰×۱۰۰×۱۰۰) انتخاب شد. درنهایت آمینواسیدهای درگیر در تشکیل پیوند هیدروفوبی و هیدروژنی توسط نرم‌افزار مولگرو (MVD) مشخص شدند.

پیش‌بینی خطر سمیت

با استفاده از مرورگر OSIRIS (یک ابزار اینترنتی مبتنی بر جاوا) سمیت، حلالیت، وزن مولکولی و همانندی دارویی لیگاندهای طراحی‌شده پیش‌بینی گردید. کمیت cLogP معیاری از آب‌دوستی ترکیبات است. آب‌دوستی پایین (cLogP بالا) موجب جذب ضعیف دارو می‌شود. با توجه به توزیع مقدار cLogP محاسباتی بیش از ۳۰۰۰ داروی موجود در بازار، cLogP نباید بیشتر از ۵ باشد. میزان حلالیت نیز جذب و توزیع دارو را تحت تأثیر قرار می‌دهد. میزان حلالیت (LogS) تخمینی ۸۰ درصد داروهای موجود در بازار بزرگ‌تر از ۴- است. این سرور کمیتی به نام همانندی دارویی را تعیین می‌کند. مثبت بودن این کمیت نشان می‌دهد مولکول دارای قطعات برجسته‌ای است که اغلب در داروهای تجاری وجود دارند، اما لزوماً به این معنا نیست که قطعات رفتاری ایده‌آل دارد. به عبارتی ممکن است یک مولکول همانندی دارویی بالایی داشته باشد اما واجد شرایط دارو نباشد. درنهایت به هر ترکیب امتیازی تعلق گرفت. امتیاز دارو ترکیبی از همانندی دارویی، cLogP، LogS، وزن مولکولی و خطرات سمیت است. بیشتر بودن امتیاز ترکیبات، بیانگر فعالیت بیشتر آن‌ها است (۲۲)؛ بنابراین به‌منظور مقایسه، امتیاز ترکیب مرجع نیز موردمحاسبه قرار گرفت.

نتایج

در ابتدا به‌منظور اعتبار سنجی عملیات داکینگ، لیگاند فلوکونازول از جایگاه فعال آنزیم برداشته شد و پس از انجام داکینگ مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۳). بعد از اعتبار سنجی داکینگ ساختار سه‌بعدی ترکیبات مهارکننده در جایگاه فعال



شکل ۳- داکینگ مولکول فلوکونازول (سبزرنگ) در جایگاه فعال آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP۵۱)

آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP51) داک شدند. نتایج نشان می‌دهند که لیگاندها در فضای مشابه با فلوکونازول قرار می‌گیرند.

مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که مقادیر MIC۸۰ ترکیبات شماره ۲ و ۵ علیه قارچ کاندیدا آلبیکنز رده ۱۴۰۵۳، ۴ برابر کمتر از ترکیب مرجع فلوکونازول است؛ بنابراین این ترکیبات فعالیت ضد قارچی مطلوب‌تری دارند. همچنین کمترین غلظت مهاری ترکیبات شماره ۶، ۷ و ۱۰ علیه قارچ Microsporum gypseum ۱۲۸ برابر کمتر از فلوکونازول و وریکونازول است (۲۰). داده‌های مربوط به تغییرات انرژی اتصال، برهم‌کنش‌های لیگاندها شامل پیوندهای هیدروژنی، برهم‌کنش‌های هیدروفوبی، در جدول ۲ ذکر شده است.

نتایج این بررسی‌ها نشان داد که مشتقات موردمطالعه می‌توانند بااتصال به جایگاه فعال آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP51) موجب مهار آن گردند. نتایج داکینگ نشان داد که تمامی ترکیبات موردمطالعه عملکرد خوبی داشته و انرژی پیوندی قابل قبولی دارند. با توجه به نتایج حاصل از داکینگ مولکولی مشخص شد که ترکیب شماره ۵ باانرژی پیوندی ۱۰/۸۵- کیلوکالری بر مول نسبت به داروی رفرنس فلوکونازول فعالیت ضد قارچی بیشتر و مؤثرتری علیه آنزیم از خود نشان می‌دهد که این فرضیه به‌طور کامل با نتایج آزمایشگاهی مطابقت دارد. همچنین بر اساس انرژی پیوندی محاسبه‌شده (جدول ۲) برخی ترکیبات طراحی‌شده باید از داروی مرجع فلوکونازول قوی‌تر باشند، درحالی‌که داده‌های آزمایشگاهی این امر را تائید

جدول ۲- انرژی اتصال و برهم‌کنش‌های موجود بین ترکیبات موردمطالعه و اسیدآمینه‌های جایگاه فعال آنزیم (CYP51)

شماره ترکیب	انرژی اتصال (کیلوکالری برمول)	برهم‌کنش‌های هیدروژنی	برهم‌کنش‌های هیدروفوبی
۱	-۹/۱۷	Thr۲۶۰ ،Gln ۷۲ ،Gly۳۹۶ Cys۳۹۴	Tyr۷۶ ،Leu۳۲۱ ،Phe۳۸۷ Met۲۵۳ ،His۱۰۱ ،Cys۳۹۴
۲	-۸/۲۷	Thr۲۶۰ ،Cys ۳۹۴ ، Gln۷۲	Leu۳۲۱ ،Leu۳۲۱ ،Ala۲۵۶ Ala۴۰۰ ،Ala۱۰۴ ،Cys۳۹۴ Tyr۷۶ ،Phe۳۸۷ ،Leu۱۰۰ ،His۱۰۱
۳	-۱۰/۳۸	Thr۲۶۰ ،Arg۹۶ ، Gln۷۲	Phe۲۵۵ ،Tyr۷۶ ،Phe۸۳ ،Ala۷۳ Cys۳۹۴ ، Gly۳۸۸
۴	-۷/۸۴	Arg۹۶ ،Thr۲۶۰	Ala۴۰۰ ،Leu۳۲۴ ،Leu۳۲۱ Cys۳۹۴ ،Tyr۷۶
۵	-۱۰/۸۵	Thr۲۶۰ ، Gln ۷۲ ،Gly ، Arg۳۲۶ Ala۳۸۹	Leu۳۲۱ ،Leu۳۲۴ ،Ala۴۰۰ ، ۳۹۶ ،Cys۳۹۴ ، Gly۳۸۸ ، Arg۳۲۶ Tyr۷۶ ،Gly
۶	-۹/۲۷	Thr۲۶۰ ، Ala۳۸۹ Gln۷۲	Ala۷۳ ،Phe۸۳ ،Tyr۷۶ ،Phe۲۵۵ Leu۳۲۱ ،His۱۰۱ ،Cys۳۹۴
۷	-۱۰/۵۴	Leu۳۲۱ ،Thr۲۶۰ Gln۷۲	Gly۳۸۸ ، Cys۳۹۴ ،Tyr۷۶ Leu۳۲۱
۸	-۹/۴۵	Gln۷۲ ، Gly۳۹۶ ،Cys۳۹۴ ، ، Thr۲۶۰ ، Gln۷۲ Leu۳۲۴ ،Leu۳۲۱
۹	-۷/۶۲	Ala۳۸۹ ، Arg۳۲۶ ، Thr۲۶۰ ، Gln۷۲	Leu۳۲۱ ،Leu۳۲۴ ،Ala۴۰۰ ، Cys۳۹۴ ،Tyr۷۶ ۳۳۲
۱۰	-۱۰/۲۳	Met۷۹ ،Arg۹۶ Thr۲۶۰ ، Gln۷۲	Tyr۷۶ ،Met۷۹ ،Phe۲۵۵ Leu۳۲۱ ،Cys۳۹۴ ،Gly۳۹۶
فلوکونازول	-۶/۸۲	Thr۲۶۰ ، Gln۷۲ ،Arg۹۶	Tyr۷۶ ،Met۷۹ ،Phe۲۵۵ Leu۳۲۱ ،Cys۳۹۴

نمی‌کند که علت آن می‌تواند پایین بودن cLogP، سمیت این ترکیبات و مشکلات موجود در جذب آ ن ها باشد. نتایج مربوط به پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات طراحی‌شده نشان داد که ترکیبات شماره ۳ و ۴ و ۷ و ۹ و ۱۰ دارای خطرات سمیت جهش‌زا و تومورزا می‌باشند. نتایج مربوط به ارزیابی خطر سمیت در جدول ۳ ذکر شده است.

ساخته‌شدن الگوریتم‌ها با پیچیدگی‌ها و سرعت محاسباتی مختلف، داک کرد هزاران لیگاند میسر شده است که این امر در صنعت داروسازی برای حل مسائل و مشکلات طرح‌های دارویی مبتنی بر ساختار از اهمیت به سزایی برخوردار است. با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی سنتز دارو، در کنار دانش بیوانفورماتیک می‌توان ترکیبات ارائه‌شده را سنتز و پس از کشت در رده‌های

جدول ۳- نتایج ارزیابی خطر سمیت لیگاندهای طراحی‌شده با ترکیب مرجع توسط مرورگر OSIRIS

شماره ترکیب	خطرات سمیت	cLogP	حلالیت	وزن مولکولی	همانندی دارویی	امتیاز دارو
۱	-	۱/۰۲	-۲/۲۹	۵۱۲/۵۳۸	۲/۹۳	۰/۶۸
۲	-	۱/۵۲	-۲/۷۵	۵۲۸/۹۹۳	۲/۹۲	۰/۶۸
۳	Mutagenic	۱/۵۲	-۲/۷۵	۵۲۸/۹۹۳	۲/۹۲	۰/۶۸
۴	Mutagenic	۲/۸۵	-۳/۲۴	۵۷۳/۴۴۴	۳/۶۵	۰/۸۶
۵	-	۲/۸۵	-۳/۲۴	۵۷۳/۴۴۴	۳/۶۵	۰/۸۶
۶	-	۱/۲۶	-۲/۳۲	۵۰۸/۵۷۵	۲/۸۳	۰/۶۸
۷	Mutagenic	۱/۲۶	-۲/۳۲	۵۰۸/۵۷۵	۲/۸۳	۰/۶۸
۸	-	۰/۷۵	-۲/۷۵	۵۱۹/۵۵۸	۱/۳۴	۰/۴۱
۹	Mutagenic	۰/۲۴	-۲/۰۵	۵۳۵/۲۵	۲/۸۵	۰/۶۷
۱۰	Tumorigenic	۰/۲۴	-۲/۰۵	۵۳۵/۲۵	۲/۸۵	۰/۶۷
فلوکونازول	-	-۰/۱	-۲/۱۷	۳۰۶/۲	۳/۰۳	۰/۷۲

cLogP: لگاریتم ضریب تقسیم اکتانول/ آب
همانندی دارویی: پتانسیل یک مولکول شیمیایی برای تبدیل‌شدن به مولکولی با خاصیت دارویی است.
امتیاز دارو: ترکیبی از همانندی دارویی، cLogP، LogS، وزن مولکولی و خطرات سمیت است.

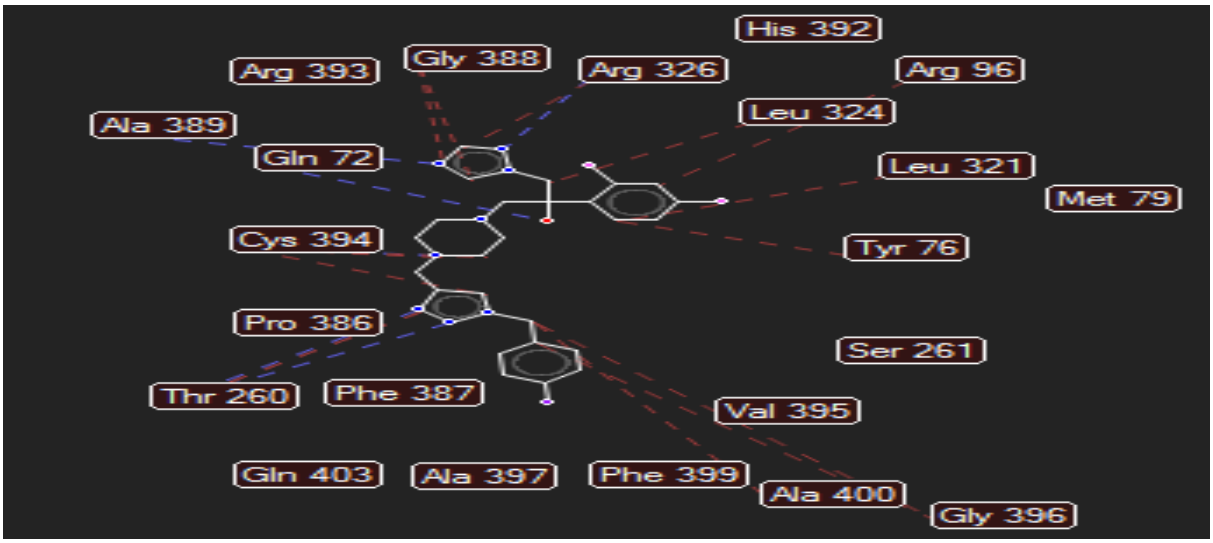
بحث و نتیجه‌گیری

امروزه انجام آزمایش با روش‌های کامپیوتری بسیار آسان‌تر، کم‌هزینه‌تر از انجام آزمایش بر روی یک سیستم حقیقی است. البته بایستی به این نکته توجه داشت که آزمایش‌های تجربی نقش بسیار مهمی در اعتبار روش‌های شبیه‌سازی خواهند داشت. موضوع دیگر اینکه تمام فاکتورهای استفاده‌شده در شبیه‌سازی تقریبی هستند، اما تحت کنترل کاربرند و به‌راحتی می‌توان با تغییر یک پارامتر، اهمیت آن پارامتر را در ویژگی‌های موردبررسی مطالعه نمود. در حال حاضر به خاطر پیشرفت‌های کامپیوتری و

سلولی و بررسی سمیت آن‌ها به تولید گسترده چنین داروهایی با هزینه کمتر و کاربرد بهینه‌تر در بازار دارویی فعلی و آینده بسیار امیدوار بود (۲۳). داکینگ مولکولی، یکی از روش‌های کلیدی شیمی محاسباتی است که به‌طورمعمول در فرایند اکتشاف دارو از آن استفاده می‌شود (۲۴). مینیمم کردن انرژی یا بهینه کردن، تکنیک مهمی در محاسبات اتصال مولکولی است. بهینه کردن کمپلکس، به لیگاند این اجازه را می‌دهد تا حالتی با کمترین انرژی در جایگاه فعال پروتئین به دست آورد.

همان‌طور که در طرح کلی مولکول نشان داده شده است فارماکوفورهای مختلفی در این مولکول وجود دارد که می‌تواند به‌طور بالقوه با گیرنده‌ها و مولکول‌های هدف گوناگون برهم‌کنش داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهد که قرار گرفتن برخی استخلاف‌ها بر روی قسمت‌های خاصی از این ترکیبات موجب ایجاد پیوندهای هیدروفوبیک و هیدروژنی بین ترکیب و گیرنده می‌شود. بر اساس همین مطالعات قرار گرفتن یک استخلاف روی موقعیت ۲ و ۴ حلقه فنیل انتهایی این ترکیبات به علت ایجاد یک اتصال هیدروفوبیک اضافی با آنزیم CYP۵۱، تمایل دارو و گیرنده را افزایش می‌دهد.

شامل یک زنجیره بلند هیدروکربنی متصل به حلقه پیپرازین است به‌طور کامل در یک پاکت هیدروفوبیک که از باقی‌مانده‌های آمینواسیدهای سیستئین ۳۹۴ تشکیل شده است قرار می‌گیرد. گروه هیدروکسیل موجود در ترکیبات طراحی‌شده با آمینواسید گلوتامین ۷۲ در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می‌کند (شکل ۴). مطالعه اتصالات دارو – گیرنده نشان داد که هیچ تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای میان گروه‌های الکترون کشنده و الکترون دهنده که روی حلقه فنیل به‌جای R قرار می‌گیرند وجود ندارد. بااین‌حال، به نظر می‌رسد استخلاف‌های الکترون دهنده بر روی حلقه فنیل ترکیبات می‌تواند قدرت پیوند میان دارو و گیرنده را



شکل ۴- بررسی رزیدوهای (آمینواسیدهای) درگیر در تشکیل پیوند مهارکننده با ترکیب شماره ۵ توسط نرم افزارمولگرو (MVD): همان‌طور که در شکل مشخص است این ترکیب با آمینواسید Thr۲۶۰ ، Gln۷۲، Arg۳۲۶ ، Ala۳۸۹ پیوند هیدروژنی (خط‌چین آبی‌رنگ) و با آمینواسیدهای Leu۳۲۱، Leu۳۲۴، Ala۴۰۰، Arg۳۲۶ ، Gly۳۸۸ ، Gly۳۹۶، Cys۳۹۴، Tyr۷۶ برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک در تشکیل پیوند هیدروفوبی (خط‌چین قرمزرنگ) شرکت می‌کند.

مطالعات داکینگ نشان می‌دهد در تمامی ترکیبات طراحی‌شده، یکی از اتم‌های نیتروژن در حلقه آزولی، با اتم آهن هم در جایگاه فعال آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP۵۱) اتصال برقرار می‌کند که این اتصال، مهم‌ترین برهم‌کنش برای مهار آنزیم محسوب می‌شود.

در بسیاری از مشتقات طراحی‌شده، بخشی از مولکول که شامل حلقه فنیل و دواتم فلوئور قرارگرفته بر روی آن است با آمینواسیدهای تیروزین ۷۶، لوسین ۳۲۱ و ۳۲۴ برهمکنش هیدروفوبی تشکیل می‌دهند. نیتروژن‌های حلقه ۱، ۲، ۳ تری آزول متصل به حلقه پیپرازین با آمینواسید ترئونین ۲۶۰، پیوند هیدروژنی می‌دهد. در تمامی ترکیبات، بخشی از مولکول که

افزایش دهد. با توجه به نتایج داکینگ مولکولی ترکیب شماره ۵ با آنزیم CYP۵۱ مشخص شد که قسمت‌های غیر قطبی آن (حلقه‌های آروماتیک) عمدتاً با قسمت‌های غیر قطبی آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP۵۱)، مشتمل بر آمینواسیدهای Leu۳۲۱، Leu۳۲۴، Ala۴۰۰، Arg۳۲۶ ، Gly۳۸۸ ، ۳۹۶ Gly، Cys۳۹۴، Tyr۷۶ برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک و با آمینواسید Thr۲۶۰، Gln۷۲، Arg۳۲۶، Ala۳۸۹ برهم‌کنش‌های هیدروژنی را نشان می‌دهند (شکل ۴).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضرمی‌توان نتیجه گرفت که ترکیب شماره ۵ (ترکیب حاوی گروه ۴- برمو) می‌تواند ضمن میان کنش با آمینواسیدهای مهم واقع در جایگاه فعال

آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP۵۱) باعث مهار آن شود که این نتیجه دقیقه با نتایج آزمایشگاهی تطابق دارد. نتایج پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات طراحی‌شده نشان داد که ترکیبات شماره ۵ و ۴ و ۱ و ۲ و ۳ و ۶ و ۷ به ترتیب دارای بیشترین امتیاز دارویی می‌باشند، اما ملاک ما در این تحقیق یافتن ترکیبات انتخابی با اثرات جانبی کمتر است؛ بنابراین ترکیبات شماره ۱ و ۲ و ۶ به دلیل cLogP پایین و ترکیبات شماره ۳ و ۴ به دلیل سمیت کنار گذاشته شدند. همچنین علی‌رغم اینکه ترکیب شماره ۷ دارای مینیم میزان انرژی اتصال مطلوبی در بین ترکیبات طراحی‌شده بود، اما به دلیل سمیت و cLogP کنار گذاشته شد. مقایسه نتایج داکینگ مولکولی، مطالعات آزمایشگاهی و پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات طراحی‌شده نشان داد که ترکیب شماره ۵ (ترکیب حاوی گروه ۴- برمو) در مقایسه با ترکیب مرجع فلوکونازول به دلیل امتیاز دارویی و cLogP بالاتر در کنار انرژی اتصال کمتر، بهترین عامل ضد قارچ و کاندید مناسب برای مهار آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (CYP۵۱) است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد ۹۶۰۶۱۲ در دانشگاه امام حسین (ع) انجام گردید. نویسندگان مقاله از تمامی همکاران در آزمایشگاه محاسباتی و انفورماتیک تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Wang W, Sheng C, Che X, Ji H, Cao Y, Miao Z, etal. Discovery of highly potent novel antifungal azoles by structure-based rational design. Bioorg Med ChemLett. 2009;19(20):5965-9.
2. Xu Y, Sheng C, Wang W, Che X, Cao Y, Dong G,et al. Structure-based rational design, synthesis and antifungal activity of oxime-containing azole derivatives. Bioorg Med Chem Lett. 2010;20(9): 2942-5
.3. Che X, Sheng C, Wang W, Cao Y, Xu Y, Ji H, etal. New azoles with potent antifungal activity: design, synthesis and molecular docking. Eur J Med Chem. 2009;44(10):4218-26.
4. Davood A, Iman M, Nematollahi A, Shafiee A.Docking and QSAR studies of new 1,4-dihydropyridines containing 4(5)-chloro-2-methyl-5(4)-imidazolyl substituent. Med Chem Res. 2011;21(3):325-32.
5. Guillon R, Giraud F, Loge C, Le Borgne M, PicotC, Pagniez F, et al. Design of new antifungal agents: synthesis and evaluation of 1-[(1H-indol-5-ylmethyl)amino]-2-phenyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ols. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19(20):5833-6.
6. Chai X, Zhang J, Cao Y, Zou Y, Wu Q, Zhang D,et al. New azoles with antifungal activity: Design, synthesis, and molecular docking. Bioorg Med Chem Lett. 2011;21(2):686-9.
7. Gadhave P.P, Dighe N.S, Pattan S.R, Deotarse P, Musmade D.S, Shete R. Current biologicaland synthetic profile of triazoles. A review Annals Biol Res. 2010; 1(2): 82–89.
8. Sun QY, Xu JM, Cao YB, Zhang WN, Wu QY, Zhang DZ, et al. Synthesis of novel triazole derivatives as inhibitors of cytochrome P450 14alpha-demethylase (CYP51). Eur J Med Chem. 2007;42(9):1226-33.
9. Groll, A.H, Lumb. New developments in invasive fungal disease. Future Microbiol. 2012; *7*(2): 179–84.
10. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJ. Azole resistance profile of amino acid changes in Aspergillus fumigatus CYP51A based on protein homology modeling.Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(6):2425-30.
11. Sheng C, Miao Z, Ji H, Yao J, Wang W, Che X, et al. Three-dimensional model of lanosterol 14 alphademethylase from Cryptococcus neoformans: activesite characterization and insights into azole binding. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(8):3487-95.
12. Ji H, Zhang W, Zhang M, Kudo M, Aoyama Y, Yoshida Y, et al. Structure-based de novo design, synthesis, and biological evaluation of non-azole inhibitors specific for lanosterol 14alphademethylase of fungi. J Med Chem. 2003;46(4):474-85.
13. Davood A, Iman M. Molecular docking and QSAR study on imidazole derivatives as 14ademethylase inhibitors. Turk J Chem.2013;37(1):119-33.

14. Lamb DC, Kelly DE, Venkateswarlu K, Manning NJ, Bligh HF, Schunck WH, et al. Generation of complete, soluble, and catalytically active sterol 14alpha-demethylase-reductase complex. Biochemistry.1999;38(27):8733-8.
15. Reddy NM, Kleeberger SR, Kensler TW,Yamamoto M, Hassoun PM, Reddy SP. Disruption of NRF2 impairs the resolution of hyperoxia-induced acute lung injury and inflammation in mice. J Immunol. 2009; 182(11):7264-71.
16. Reddy NM, Suryanarayana V, Kalvakolanu DV, Yamamoto M, Kensler TW, Hassoun PM. Innate immunity against bacterial infection following hyperoxia exposure is impaired in NRF2-deficient mice. J Immunol. 2009;183(27): 4601-8.
17.Molecular Property Predictions Osiris PropertyExplorer, From: http://www.cheminformatics.ch/propertyExplorer/, Accessed 6 July 2013.
18. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem. 2010; 31(2): 455.
19. Sandeep G, Nagasree K. P, Hanisha M, Kumar MM. K. AUDocker LE: A GUI for virtual screening with AUTODOCK Vina. BMC research notes**.** 2011; 4(1): 445.
20. Yanwei Wang, Kehan Xu, Guojing Bai, Lei Huang, Qiuye Wu, Weihua Pan, etal. Synthesis and Antifungal Activity of Novel Triazole Compounds Containing Piperazine Moiety**.** Molecules. 2014; *19*(8):11333-40.20.
21. Thomsen R. a new technique for high-accuracy molecular docking. J Med Chem. 2006; 49(11):3315. 24.
22. Bhakat S. SAR and Pharmacophore Based Designing of Some Antimalarial and Antiretroviral Agents: An INTERNET Based Drug Design Approach. Der Pharma Chemica. 2012;4(3):1247-63.
23.Tollenaere JP. The role of structure-based ligand design and molecular modelling in drugdiscovery. 1996;18(2):56-62.
24. Novikov FN, Chilov GG. Molecular docking: theoretical background, practical applications and perspectives. Mendeleev Commun. 2009; 19(5): 237-242.

Oiginal Article

Design, Molecular Docking Studies and Toxicity Prediction of Some Novel 1, 2, 3-Triazole Derivatives Containing Piperazine Moiety as Antifungal Agents and CYP-51 Inhibitors

Roeintan A[1*], Fadaei F[2]

1. University of Imam Hossein, Tehran, Iran
2. Department of Food Science and Technology Faculty of Agriculture, University of Fasa, Fasa, Iran

Received: 22 Dec 2017 Accepted: 13 May 2018

Abstract

Background & Objective: In this study, a number of new triazole derivatives, containing a 1, 2, 3-triazole ring attached to the piperazine moiety as antifungal agents and lanosterol 14 alpha-demethylase, (CYP51) inhibitors were docking studies conducted. In the following, the toxicity risks of the designed compounds, were predicted by existing software.

Materials & methods: Initially, the chemical structures of all azole were designed using ChemBioDraw Ultra14.0 program, then transferred into Hyperchem software for energy minimization. After preparing, all of these chemical compounds were docked with the target enzyme in order to select the best inhibitor of the drug using the Auto Dock-Vina-1-1-2-win32.msi software. The results were analyzed using the Molegro Virtual Docking software. At the final stage, the toxicity risk prediction of compounds was performed by the OSIRIS program.

Results: After checking the computation, 10 compounds of ligands that were the results of Docking, were selected according to the Gibbs free energy (least ΔG). Docking results revealed the azole-heme coordination, hydrogen bond, hydrophobic interactions were involved in the drug-receptor interactions. Among the all studied compounds, the best docking results were related to No. 5 displayed. In fact, this compound had the most negative ΔG_{bind} (-10.85 Kcal/mol) that indicated favorable interactions with the key amino acid residues at active site of CYP51.

Conclusion: In conclusion, according to the results of docking studies, biological evaluation and Toxicity Risk Prediction of designed Compounds, it can be concluded that Compound No. 5 can be considered as an effective antifungal agent and an inhibitor of the CYP51 enzyme.

Keywords: Molecular Docking, Toxicity Risk Prediction, CYP51 Inhibitor, 1, 2, 3-triazole, Antifungal

***Corresponding Author: : Abozar Roeintan,** University of Imam Hossein, Tehran, Iran.
Email: abroeintan@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0001-9471-591X