

ORIGINAL ARTICLE

Computational investigation of the inhibitory potential of the natural compound phellopterin against the OTU protease of crimean-congo hemorrhagic fever virus

Somayeh Farahmand* 

Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence

Somayeh Farahmand
Email: s.farahmand@pnu.ac.ir

How to cite

Farahmand, S. (2025). Computational investigation of the inhibitory potential of the natural compound phellopterin against the OTU protease of crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Experimental Animal Biology*, 13(52), 13-27.

ABSTRACT

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) is a zoonotic viral disease with high mortality, for which no specific and effective treatment has yet been introduced. The causative virus, classified within the Nairovirus genus and Orthonairoviridae family, encodes a polyprotein via its L segment, which includes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and an N-terminal OTU protease domain. The OTU domain, through its deubiquitinase (DUB) activity, plays a role in suppressing the host immune response and, due to its relatively conserved sequence, represents a promising target for antiviral drug design. This study aimed to evaluate the inhibitory effect of the natural compound Phellopterin (Phe), derived from *Heracleum persicum*, on the OTU domain. The crystal structure of OTU (PDB ID: 3PRP) was prepared and subjected to molecular docking using AutoDock 4.0. The top-ranked complex was then analyzed via a 150-nanosecond molecular dynamics (MD) simulation using GROMACS. Phellopterin showed a favorable binding affinity ($\Delta G = -8.1$ kcal/mol) and formed stable interactions with residues such as Ala79–Leu86 near the active-site entry. Analyses including RMSD, RMSF, Rg, hydrogen bonding, and PCA confirmed the structural stability of the complex. ADMET evaluation also indicated desirable pharmacokinetic properties, oral absorption, cellular permeability, and safety. Altogether, Phellopterin may serve as a potential inhibitor of the CCHFV OTU protease and provide a foundation for the development of effective natural antiviral agents.

KEYWORDS

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus, Furanocoumarins, Molecular docking simulation, Phellopterin, RNA-dependent RNA polymerase.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی مهارکنندگی ترکیب طبیعی Phellopterin بر پروتئاز OTU ویروس تب خونریزی‌دهنده کریمه-کنگو با رویکردهای محاسباتی

سمیه فرهمند* 

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

تب خونریزی‌دهنده کریمه-کنگو (CCHF) یک بیماری ویروسی زئونوز با مرگ‌ومیر بالاست که تاکنون درمان اختصاصی مؤثری برای آن معرفی نشده است. ویروس عامل بیماری، از جنس Nairovirus و خانواده Orthonairoviridae بوده و قطعه L ژنوم آن پلی‌پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که حاوی آنزیم RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) و دامنه پروتئازی OTU در بخش N-terminal است. دامنه OTU با فعالیت دی‌یوبی کوتینینازی (DUB)، در سرکوب ایمنی میزبان نقش دارد و به دلیل توالی نسبتاً محافظت‌شده‌اش، هدفی مناسب برای طراحی داروهای ضدویروسی به‌شمار می‌رود. این پژوهش با هدف بررسی اثر مهار ترکیب طبیعی Phellopterin (Phe) از گیاه *Heracleum persicum* بر دامنه OTU انجام شد؛ ترکیبی با ساختار فوروکومارینی مشابه مهارکننده‌های شناخته‌شده و برگزیده از میان ۵۰ لیگاند بر پایه انرژی اتصال و ویژگی‌های ADMET. ساختار بلورین (PDB ID: 3PRP) پس از آماده‌سازی، با استفاده از نرم‌افزار AutoDock 4.0 مورد داکینگ قرار گرفت و کمپلکس حاصل طی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۱۵۰ نانوثانیه‌ای با روش‌های GROMACS بررسی شد. Phellopterin با انرژی اتصال مناسب ($\Delta G = -8.1$ kcal/mol) به ناحیه ورودی جایگاه فعال متصل شده و تعاملات پایداری با باقی‌مانده‌هایی نظیر Ala79–Leu86 برقرار کرد، که این اتصال با تثبیت ساختار و انسداد نسبی مسیر فعال، می‌تواند موجب مهار غیررقابتی عملکرد آنزیم گردد. تحلیل‌های RMSF، RMSD، Rg، پیوندهای هیدروژنی و PCA، پایداری ساختاری کمپلکس را تأیید کردند. بررسی ADMET نیز پروفایل فارماکوکینتیکی، جذب خوراکی، نفوذپذیری سلولی و ایمنی مناسبی برای ترکیب نشان داد. بر این اساس، Phellopterin می‌تواند به‌عنوان مهارکننده بالقوه OTU ویروس CCHF مطرح شود و زمینه‌ساز طراحی داروهای ضدویروسی طبیعی و مؤثر باشد؛ اگرچه تأیید این نتایج مستلزم مطالعات تجربی *in vivo* و *in vitro* است.

واژه‌های کلیدی

ویروس تب خونریزی‌دهنده کریمه-کنگو، Phellopterin، RNA، پلی‌مراز وابسته به RNA، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی، فوروکومارین‌ها.

نویسنده مسئول:

سمیه فرهمند

ایمانامه: s.farahmand@pnu.ac.ir

استناد به این مقاله:

فرهمند، سمیه (۱۴۰۴). بررسی مهارکنندگی ترکیب طبیعی Phellopterin بر پروتئاز OTU ویروس تب خونریزی‌دهنده کریمه-کنگو با رویکردهای محاسباتی. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۳ (۵۲)، ۲۷-۱۳.

<https://eab.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

تب خونریزی‌دهنده کریمه-کنگو (CCHF) یکی از بیماری‌های ویروسی حاد، کشنده و زئونوز است که توسط ویروسی از جنس Nairovirus و خانواده Orthobunyviridae ایجاد می‌شود. ناقل اصلی این ویروس، کنه‌های سخت به‌ویژه *Hyalomma marginatum* هستند که نقش مهمی در انتقال و تکثیر ویروس دارند (Mirza et al., 2019). این بیماری که در دسته آربوویروس‌ها قرار می‌گیرد، با علامت‌های غیراختصاصی نظیر تب، درد عضلانی، تهوع و اسهال آغاز شده و در مراحل پیشرفته ممکن است به خونریزی‌های گسترده، نارسایی چند اندام و مرگ منجر شود (Zivcec et al., 2016). نرخ مرگ‌ومیر بیماری بین ۱۰ تا ۴۰ درصد گزارش شده و در برخی همه‌گیری‌ها تا ۸۰ درصد نیز رسیده است (Dokuzoguz et al., 2013). این ویروس در ایران نیز اندمیک است؛ براساس گزارش رسمی وزارت بهداشت، طی سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۵ تعداد موارد عفونت بین ۱۲۲ تا ۲۵۴ نفر متغیر بوده، با میانگین مرگ‌ومیر ۲۱ درصد. در استان سیستان و بلوچستان (به‌ویژه زاهدان و زابل)، بیش از ۶۴۷ مورد تأیید شده طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۲ ثبت شده است (Moradi et al., 2019).

ژنوم ویروس CCHFV از سه قطعه RNA تک‌ رشته‌ای منفی (S، M و L) تشکیل شده است که به‌ترتیب، پروتئین نوکلئوکسید (NP)، گلیکوپروتئین‌های G1 و G2 و یک پلی‌پروتئین حاوی آنزیم RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) را رمزگذاری می‌کنند (Aligholipour Farzani et al., 2019). آنزیم RdRp در کمپلکس با NP و RNA ویروسی، برای همانندسازی و رونویسی ژنوم ویروس حیاتی است و به‌عنوان هدفی اصلی در طراحی داروهای ضدویروسی ساختارمحور شناخته می‌شود (Gerlach et al., 2015).

این آنزیم شامل سه ناحیه اصلی palm، finger و thumb است که ناحیه palm، حاوی شش موتیف حفاظت‌شده (PreA/F) و A تا E، نقش کاتالیتیکی دارد. یکی از نواحی مهم در ساختار RdRp، دامنه OTU در بخش N-terminal است که با فعالیت دی‌یوبی کوئیتینازی (DUB)، در سرکوب پاسخ ایمنی ذاتی میزبان مشارکت دارد (Kaushal & Baranwal, 2023). اگرچه جهش‌هایی در بخش L گزارش شده‌اند که می‌توانند بر پایداری یا عملکرد آنزیم اثرگذار باشند (Hawman et al., 2021)، اما دامنه OTU به دلیل فعالیت دی‌یوبی کوئیتینازی، نقش کلیدی در مهار ایمنی میزبان دارد و به‌عنوان هدفی مناسب در طراحی مهارکننده‌های ضدویروسی مطرح شده است، به‌ویژه آن‌که اشغال

پایدار این دامنه می‌تواند موجب مهار عفونت ویروسی شود (Scholte et al., 2019; Li, 2024).

CCHF در مناطق وسیعی از آسیا، آفریقا، خاورمیانه و اروپای جنوب‌شرقی بومی است و عوامل مختلفی چون جهانی‌شدن، تغییرات اقلیمی و جابه‌جایی‌های انسانی موجب افزایش شیوع آن شده‌اند (Appannanavar & Mishra, 2011). با وجود تهدید جدی این بیماری برای سلامت عمومی، تاکنون هیچ دارو یا واکسن تأییدشده‌ای برای CCHF معرفی نشده است. ریبوایرین، که بیش‌ترین کاربرد درمانی را داشته، در برخی مطالعات با کاهش مرگ‌ومیر همراه بوده است (Arab-Bafrani et al., 2019). با این حال، مرورهای اخیر اثربخشی آن را به دلیل محدودیت شواهد انسانی و فقدان کارآزمایی‌های تصادفی شده قطعی نمی‌دانند (Dai et al., 2021; Hawman & Feldmann, 2023).

در سال‌های اخیر، روش‌های محاسباتی (in silico) مانند مدل‌سازی همولوژی، داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) به‌عنوان ابزارهایی سریع، کم‌هزینه و کارآمد در طراحی داروهای ضدویروسی موردتوجه قرار گرفته‌اند. این روش‌ها در مقابله با ویروس‌هایی مانند زیکا، دنگی، آنفلوآنزا و ابولا نتایج موفقی ارائه داده‌اند (Pattnaik et al., 2018). همچنین، به‌کارگیری گسترده‌تر روش‌های محاسباتی از جمله داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و یادگیری ماشین/هوش مصنوعی در طراحی داروهای ضدویروسی در سال‌های اخیر، باعث کاهش قابل توجه هزینه و زمان تحقیقات شده است. علاوه بر این، این رویکردها با بازشناسی ساختار سه‌بعدی آنزیم‌های ویروسی، راه‌های نوینی برای توسعه داروهای موثر فراهم کرده‌اند (Diakou et al., 2022).

هم‌زمان، استفاده از منابع طبیعی، به‌ویژه گیاهان دارویی غنی از متابولیت‌های ثانویه فعال، نقش مهمی در کشف داروهای نوین ایفا می‌کند. گیاه *Heracleum persicum* (چوچاق)، بومی ایران، منبعی غنی از ترکیبات فوروکومارینی است و در مطالعات قبلی ترکیبی به‌نام Phellopterin از آن استخراج شده است (Dehnoee et al., 2023).

در این پژوهش، ساختار بلورین دامنه OTU از پلی‌پروتئین ویروس CCHFV (ثبت‌شده در پایگاه داده PDB) به‌عنوان هدف انتخاب شد. سپس با استفاده از روش‌های داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، پتانسیل ترکیب طبیعی Phellopterin برای مهار این آنزیم بررسی شد. هدف این مطالعه، ارزیابی قابلیت مهار Phellopterin روی آنزیم OTU ویروس CCHFV برای کشف داروهای جدید ضدویروسی است.

روش‌شناسی پژوهش

آماده‌سازی پروتئین هدف و انتخاب لیگاند

ساختار بلورین دامنه OTU در بخش N-terminal آنزیم RNA پلیمرز وابسته به RNA (RdRp) ویروس تب خونریزی‌دهنده کریمه-کنگو از پایگاه داده PDB و با کد 3PRP استخراج گردید. جایگاه فعال پروتئین براساس منابع علمی (Capodagli *et al.*, 2011; Dzimianski *et al.*, 2019; Kocabaş & Ergin, 2016) و ابزارهای محاسباتی (PDBsum, COACH, Chimera, LIGPLOT) شناسایی گردید و شامل باقی‌مانده‌های کلیدی (Tyr73, Glu78, Tyr89, A: Gln16, Cys40, Gly100, Ser101, Thr102, Leu108, Ile131, Phe133, His151, Asp153) بود. پالایش ساختار با حذف مولکول‌های آب، افزودن هیدروژن‌ها و مینیم‌سازی انرژی از طریق سرور SwissSidechain انجام شد.

لیگاندهای درمانی بالقوه از پایگاه PubChem استخراج و با استفاده از معیارهای لیپینسکی، SwissADME و PreADMET ارزیابی شدند. تفسیر نتایج SwissADME و PreADMET براساس معیارهای استاندارد انجام شد. این معیارها شامل سازگاری با قانون پنج‌گانه لیپینسکی (LogP کمتر از ۵، TPSA کمتر از ۱۴۰، آنگستروم مربع، وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون، پذیرنده پیوند هیدروژنی کمتر از ۱۰ و دهنده پیوند هیدروژنی کمتر از ۵)، نفوذپذیری بالا از طریق سلول‌های Caco-2 (>70%)، عدم مهار آنزیم CYP3A4، حلالیت مناسب (LogS بزرگ‌تر از -۵) و عدم سمیت ژنی بر پایه آزمون Ames بود. ساختارهای سه‌بعدی لیگاندها با ابزارهای Open Babel و AutoDockTools آماده‌سازی و به فرمت PDBQT تبدیل شدند. همچنین حالت‌های پروتونه‌شده آن‌ها در pH فیزیولوژیک تنظیم و فایل‌های توپولوژی با استفاده از ACPYPE تولید گردیدند (Salaria *et al.*, 2023; Khandan, 2023). (Alamdari *et al.*, 2023)

مطالعات داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی با نرم‌افزار AutoDock 4.0 و الگوریتم ژنتیک در ۵۰ اجرا انجام شد. ناحیه اتصال توسط Grid Box با ابعاد ۶۶×۶۶×۶۶ آنگستروم و مختصات مرکزی $X=17/248$ ، $Y=9/427$ ، $Z=15/578$ آنگستروم پوشش داده شد. معیار انتخاب بهترین لیگاند براساس کم‌ترین انرژی پیوندی (ΔG) و تعاملات مولکولی شامل پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های آب‌گریز بود. بررسی و تصویرسازی تعاملات با PyMOL و Discovery

Studio انجام گرفت (Sakhawat *et al.*, 2023; Shojapour *et al.*, 2022).

از میان ۵۰ ترکیب گیاهی استخراج‌شده از PubChem که پیش‌تر براساس معیارهای دارویی (قوانین لیپینسکی، SwissADME و PreADME) پالایش شده بودند، ترکیب Phellopterin به‌عنوان لیگاند منتخب برگزیده شد. این انتخاب بر پایه انرژی اتصال پایین، تعاملات مؤثر با باقی‌مانده‌های کلیدی جایگاه فعال و همچنین ویژگی‌های مطلوب دارویی و ایمنی این ترکیب انجام شد. افزون بر این، پایداری مناسب Phellopterin در تحلیل‌های اولیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، آن را به گزینه‌ای مناسب برای بررسی‌های پیش‌بالینی تبدیل کرد.

بررسی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با GROMACS 2022.6 و نیروی میدان AMBER99SB اجرا شد. کمپلکس‌ها در جعبه‌ای حاوی آب نوع TIP3P و یون‌های خنثی‌کننده قرار گرفتند. پس از کمینه‌سازی انرژی، تعادل‌سازی در شرایط NVT و NPT به‌مدت یک نانوثانیه انجام و شبیه‌سازی اصلی به‌مدت ۱۵۰ نانوثانیه با گام زمانی ۲ فمتوثانیه اجرا شد. خروجی مسیر حرکتی (trajectory) با بازه ۱۰ پیکوثانیه ذخیره شد (Li *et al.*, 2024; Shojapour & Farahmand, 2022).

تحلیل‌های ساختاری و دینامیکی کمپلکس پروتئین-لیگاند

جهت بررسی جامع رفتار کمپلکس پروتئین-لیگاند در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، تحلیل‌های ساختاری و دینامیکی به شرح زیر انجام شد.

آنالیزهای RMSD، RMSF و Rg و ساختار ثانویه پروتئین

برای سنجش پایداری ساختاری، RMSD (جذر میانگین مربع تغییر در ساختار) اتم‌های اسکلت اصلی در طول زمان با استفاده از ابزار gmx rms در بسته نرم‌افزاری GROMACS 2020.4 محاسبه شد تا تعادل و تغییرات ساختاری ارزیابی شود. مقایسه RMSD بین پروتئین آزاد و کمپلکس‌شده، اثر اتصال لیگاند را بر ساختار پروتئین نشان داد. RMSF (جذر میانگین مربع نوسانات) نیز با استفاده از gmx rmsf جهت تعیین نواحی انعطاف‌پذیر، به‌ویژه

انرژی شامل واندروالس، الکترواستاتیک و انرژی حل‌شوندگی را در نظر گرفته و دیدگاه کمی نسبت به تمایل اتصال لیگاند فراهم می‌سازد (Davey et al., 2021).

تحلیل آماری

برای ارزیابی پایداری و تکرارپذیری نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، هر سیستم در سه تکرار مستقل بررسی شد. میانگین و انحراف معیار برای تحلیل داده‌های کمی به کار رفت. ارتباط بین انرژی اتصال و شاخص‌های ساختاری مانند RMSD و تعداد پیوندهای هیدروژنی با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون سنجیده شد. تحلیل‌ها با زبان Python و کتابخانه‌های آماری scipy.stats و statsmodels انجام گرفت و ترسیم نمودارها با کمک ابزارهای seaborn و matplotlib صورت پذیرفت (Fu et al., 2023).

یافته‌های پژوهش

انتخاب و آماده‌سازی لیگاند

بر پایه بررسی‌های کتابخانه‌ای و تحلیل‌های محاسباتی، مجموعه‌ای از ترکیبات طبیعی از پایگاه‌های داده معتبر استخراج و براساس معیارهای فارماکوکینتیکی، از جمله قانون پنج‌گانه لیبینسکی (شکل ۱) و شاخص‌های سامانه‌های SwissADME و PreADMET غربال‌گری شدند. از میان آن‌ها، ترکیب طبیعی Phellopterin با شناسه PubChem: 98608، به دلیل انرژی اتصال بالا (۸/۱- کیلوکالری بر مول) و ویژگی‌های دارویی مناسب، برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

انتخاب نهایی این ترکیب صرفاً مبتنی بر انرژی اتصال نبود؛ بلکه عواملی نظیر کیفیت تعاملات مولکولی در جایگاه فعال آنزیم، موقعیت فضایی پایدار در حفره اتصال و همچنین پروفایل ADMET مناسب به صورت هم‌زمان در تصمیم‌گیری لحاظ گردیدند.

Phellopterin به عنوان یک کاندیدای داروی خوراکی با جذب گوارشی بالا (بیش از ۹۲ درصد)، جذب روده‌ای ۹۸/۱ درصد و حلالیت مناسب در آب (Log S برابر ۴/۲۴-) ارزیابی شد. همچنین با وزن مولکولی ۳۰۰/۳ دالتون، شاخص چربی‌دوستی XLOGP3 معادل ۳/۸، فاقد پیوند هیدروژنی دهنده، دارای سه پیوند هیدروژنی پذیرنده، چهار پیوند چرخان و سطح قطبی (TPSA برابر ۶۱/۸۱ آنگستروم مربع)، با تمامی معیارهای لیبینسکی سازگار بود. این مقادیر در محدوده قابل قبول برای

در محل اتصال لیگاند، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پارامتر شعاع ژیراسیون (Rg) با ابزار gmx gyrate برای ارزیابی تراکم ساختار پروتئین و تغییرات کلی در فشردگی آن محاسبه شد (Shojapour et al., 2021). بررسی ساختار ثانویه نیز با الگوریتم DSSP از طریق ابزار do_dssp در GROMACS انجام شد تا تغییرات احتمالی در ماریچ‌های آلفا و صفحات بتا پس از اتصال لیگاند مشخص گردد (SamadiAfshar et al., 2024).

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) و انرژی آزاد تبادلی سطحی (FEL)

برای شناسایی حرکات غالب، تحلیل PCA مبتنی بر بردارها و مقادیر ویژه انجام شد. سپس، براساس دو مؤلفه اصلی اول (PC1 و PC2)، نقشه انرژی آزاد تبادلی سطحی (FEL) ترسیم گردید. انرژی آزاد نسبی با استفاده از رابطه $\Delta G = -RT \ln P(x)$ محاسبه شد که در آن $P(x)$ احتمال حضور سیستم در یک حالت خاص و T برابر ۳۱۰ کلوین در نظر گرفته شد (Shojapour & Farahmand, 2022).

بررسی عکس‌های فوری (Snapshots)

در بازه‌های ۴۰ نانوثانیه، تصاویر فوری از مسیر شبیه‌سازی استخراج و برای بررسی روند اتصال لیگاند و تحولات جایگاه فعال بررسی شدند (Azari et al., 2023).

تحلیل‌های تعاملات مولکولی

برای بررسی کیفی تعامل لیگاند با جایگاه فعال پروتئین، دو شاخص شامل حداقل فاصله^۵ و تعداد تماس‌های مؤثر^۶ (با فاصله > ۰.۴ نانومتر) در طول شبیه‌سازی بررسی شد (Mustali et al., 2023). همچنین، پیوندهای هیدروژنی میان پروتئین و لیگاند با استفاده از ابزار gmx hbond محاسبه شد تا پایداری و ماهیت این تعاملات مشخص شود (Tang et al., 2019).

محاسبه انرژی آزاد اتصال با روش PBSA/MM

انرژی آزاد اتصال با روش PBSA/MM از طریق ۱۰۰۰ قاب استخراج‌شده از مسیر شبیه‌سازی محاسبه شد. این روش اجزای

1. Principal Component Analysis
2. Free Energy Landscape
3. Snapshots Extraction and Analysis
4. Interaction Analysis
5. Minimum Distance
6. Number of Contacts
7. Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area

Tyr73, Glu78, Tyr89, Gly100, Ser101, Thr102, Leu108, Ile131, Phe133, His151 و Asp153 تعیین شد که نقش مستقیمی در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم دارند (Capodagli *et al.*, 2011). با این حال، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی که به مدت ۱۵۰ نانوثانیه با استفاده از GROMACS و نیروی میدان AMBER99SB انجام شد، نشان داد که لیگاند طبیعی Phellopterin در نهایت در ناحیه‌ای متفاوت از جایگاه فعال اولیه پایدار می‌شود.

در طول شبیه‌سازی، لیگاند به ناحیه‌ای متشکل از بقایای Ala79, Arg80, Gly83, Leu84, Ser85 و Leu86 منتقل شده و تعاملات پایداری با آن برقرار کرد (شکل ۲). این ناحیه در مجاورت ورودی جایگاه فعال قرار دارد و به واسطه برهم‌کنش‌های متنوعی از جمله پیوندهای هیدروژنی، هیدروفوب و π -کاتیونی، به‌عنوان یک جیب عملکردی جانبی در نظر گرفته می‌شود. این یافته از اهمیت خاصی در طراحی مهارکننده‌های غیررقابتی (non-competitive inhibitors) برخوردار است و نشان می‌دهد که Phellopterin می‌تواند با اتصال به یک محل آلستریک در نزدیکی ورودی جایگاه فعال، پتانسیل مهار مؤثر فعالیت پروتئاز OTU ویروس CCHFV را داشته باشد.

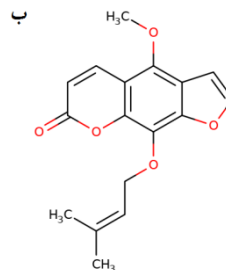
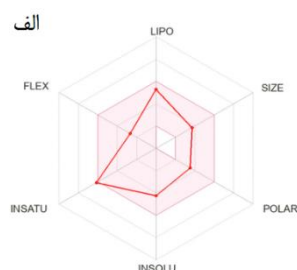
داروهای خوراکی با جذب مناسب قرار داشته و با ویژگی‌های گزارش شده برای سایر فورانوکومارین‌های زیست‌فعال تطابق دارد. از نظر ایمنی، با وجود مثبت‌بودن آزمون Ames، نتایج سرطان‌زایی در مدل‌های موش و موش صحرایی منفی گزارش شده‌اند. همچنین، عدم مهار آنزیم CYP3A4 احتمال بروز تداخلات دارویی را کاهش می‌دهد. نفوذپذیری ضعیف از سد خونی-مغزی و میزان اتصال نسبتاً پایین به پروتئین‌های پلاسما نیز از مزایای دیگر این ترکیب برای توسعه به‌عنوان یک مهارکننده ضدویروس غیرنوروتروپیک محسوب می‌شود. از میان ترکیبات بررسی‌شده، تنها Xanthohumol B با انرژی اتصال بهتر ($-8/79$ کیلوکالری بر مول) نسبت به Phellopterin قرار داشت، اما به دلیل ویژگی‌های نامطلوب‌تر مانند مهار آنزیم CYP3A4 و عدم تطابق با معیارهای سمیت انتخاب نشد. سایر ترکیبات دارای انرژی اتصال پایین‌تر و/یا ویژگی‌های فارماکوکینتیکی و سمیت نامناسب بودند (جدول ۱).

مطالعات داکینگ و دینامیک مولکولی

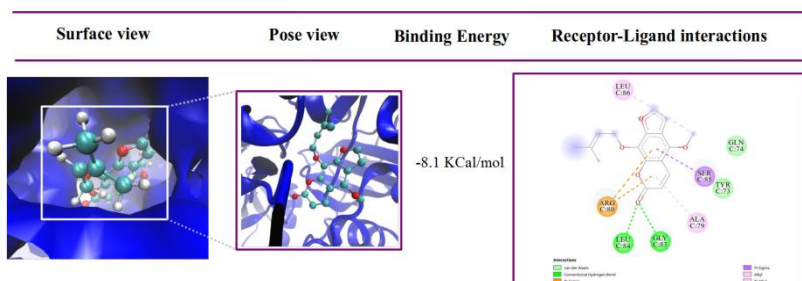
در این مطالعه، جایگاه فعال اولیه آنزیم OTU با استفاده از داده‌های ساختاری حاصل از بلورنگاری پرتوی X (PDB ID: 3PRP) و با استناد به مطالعات پیشین، شامل بقایای کلیدی Cys40, Gln16،

جدول ۱. مقایسه انرژی اتصال و پروفایل ADMET لیگاندهای منتخب

اسم لیگاند	شناسه PubChem	انرژی اتصال	عبور از سد خونی-مغزی	سیتوکروم P450 (CYP3a4)	تست ایمر	سرطان‌زایی موش	سرطان‌زایی موش صحرایی
Xanthohumol B	9799506	-8/79	-	مهار	-	-	-
Phellopterin	98608	-8/1	-	-	+	-	-
nordentatin	5320206	-7/78	+	-	+	-	-
Aurantium	98118	-7/58	-	مهار	-	+	-
Valerianol	9859337	-7/14	+	-	+	-	-
Levomenol	442343	-7/11	+	-	-	-	-
Bisabolol	1549992	-6/91	+	-	-	-	-
benzoquinone-ortho-butyl-tert-di-3,5	76915	-6/9	+	-	-	+	-
elemol	92138	-6/45	+	-	-	+	-



شکل ۱. الف) نمای راداری پارامترهای فارماکوفیزیکی مولکول Phellopterin شامل قطبیت (POLAR)، اندازه (SIZE)، چربی دوستی (LIPO)، انعطاف‌پذیری (FLEX)، حل‌الیت‌پذیری (INSOLU) و غیراشباع‌بودن (INSATU). ب) ساختار شیمیایی دوبعدی Phellopterin به‌عنوان یک ترکیب طبیعی مشتق‌شده از گیاه *Heracleum persicum*. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).



شکل ۲. بررسی برهم‌کنش لیگاند طبیعی (Phe) با جایگاه فعال پروتئین هدف. (چپ) نمای سطحی پروتئین نشان‌دهنده قرارگیری لیگاند درون حفره فعال آن است. (وسط) نمای موقعیت‌یابی لیگاند در ساختار سه‌بعدی پروتئین. (راست) نمایش جزئیات برهم‌کنش‌های گیرنده-لیگاند شامل پیوندهای هیدروژنی، برهم‌کنش‌های $\pi-\pi$ و پیوندهای الکترواستاتیک با باقی‌مانده‌های کلیدی.

A-Helix و B-Bridge کاهش یافتند، درحالی‌که ساختارهای β -Sheet و Turn 3-Helix اندکی افزایش نشان دادند. ساختار Bend تغییر محسوسی نداشت و ساختار نادر 5-Helix نیز تنها از ۰/۴۴ به ۰/۶۱ افزایش یافت که از نظر آماری کم‌اهمیت تلقی می‌شود.

این تغییرات گرچه محدود هستند، اما نشان می‌دهند که اتصال Phe می‌تواند تعادل میان ساختارهای ثانویه را مختل کرده و موجب بازآرایی‌های موضعی در ساختار کلی پروتئین شود.

جدول ۲. میانگین درصد باقی‌مانده‌های آمینواسیدی شرکت‌کننده در

ساختارهای ثانویه طی ۵۰ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی

ساختار	پروتئین آزاد	پروتئین - لیگاند Phe
Coil	۹۹/۳۱ ± ۳/۳۱	۹۷/۱۷ ± ۳/۵۳
Sheet-B	۱۱۹/۵۴ ± ۲/۷۷	۱۲۱/۳۷ ± ۲/۷۶
Bridge-B	۹/۳۰ ± ۱/۴۲	۸/۶۳ ± ۱/۰۸
Bend	۳۱/۷۱ ± ۳/۹۸	۳۱/۶۳ ± ۴/۲۴
Turn	۷۱/۱۰ ± ۶/۱۸	۷۴/۸۴ ± ۶/۳۹
Helix-A	۱۲۵/۴۴ ± ۵/۳۲	۱۲۲/۴۹ ± ۵/۷۸
Helix-5	۰/۴۴ ± ۱/۴۵	۰/۶۱ ± ۱/۷۰
Helix-3	۱۵/۱۵ ± ۵/۲۳	۱۵/۲۷ ± ۵/۲۹

نتایج آنالیز مؤلفه‌های اصلی PCA و پروفیل انرژی آزاد FEL

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای بررسی پویایی ساختاری RNA پلیمرز در حالت آزاد و در حضور لیگاند Phe نشان داد که دو مؤلفه نخست (PC1 و PC2) بیش‌ترین سهم را در واریانس حرکتی دارند. سهم غالب این مؤلفه‌ها در حالت کمپلکس‌شده بیش‌تر بود و بیانگر محدود شدن حرکات پروتئین در زیرفضای مؤلفه‌های اصلی است (شکل ۴-الف).

نقشه انرژی آزاد (FEL) نیز تفاوت قابل‌توجهی بین دو حالت

نتایج تحلیل‌های دینامیکی و ساختاری کمپلکس پروتئین-لیگاند

برای بررسی پایداری کمپلکس پروتئین-لیگاند در طول ۱۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی، سه شاخص کلیدی شامل RMSF، RMSD و شعاع ژیراسیون (Rg) ارزیابی شد.

نمودار RMSD اتم‌های اسکلت اصلی نشان داد که در ۵۰ نانوثانیه پایانی، میانگین مقدار برای پروتئین آزاد 0.19 ± 0.195 نانومتر و برای کمپلکس پروتئین-لیگاند برابر با 0.21 ± 0.247 نانومتر بود. این افزایش، بیانگر کاهش نسبی پایداری ساختار در حضور لیگاند است (شکل ۳). نوسانات اولیه در RMSD طی ۱۰ تا ۲۰ نانوثانیه ابتدایی مشاهده شد که با رسیدن به حالت تعادل دینامیکی در هر سه تکرار به ثبات رسیدند. هیچ‌یک از مسیرها به‌دلیل رفتار غیرعادی حذف نشد.

الگوی RMSF نیز در هر دو حالت کم‌تر از ۰/۴ نانومتر باقی ماند که نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری محدود باقی‌مانده‌ها بود. میانگین RMSF برای پروتئین آزاد 0.568 ± 0.109 و برای کمپلکس پروتئین-لیگاند 0.605 ± 0.1219 نانومتر به‌دست آمد. این افزایش جزئی، نشانه‌ای از افزایش تحرک موضعی برخی بقایا در حضور لیگاند است (شکل ۳).

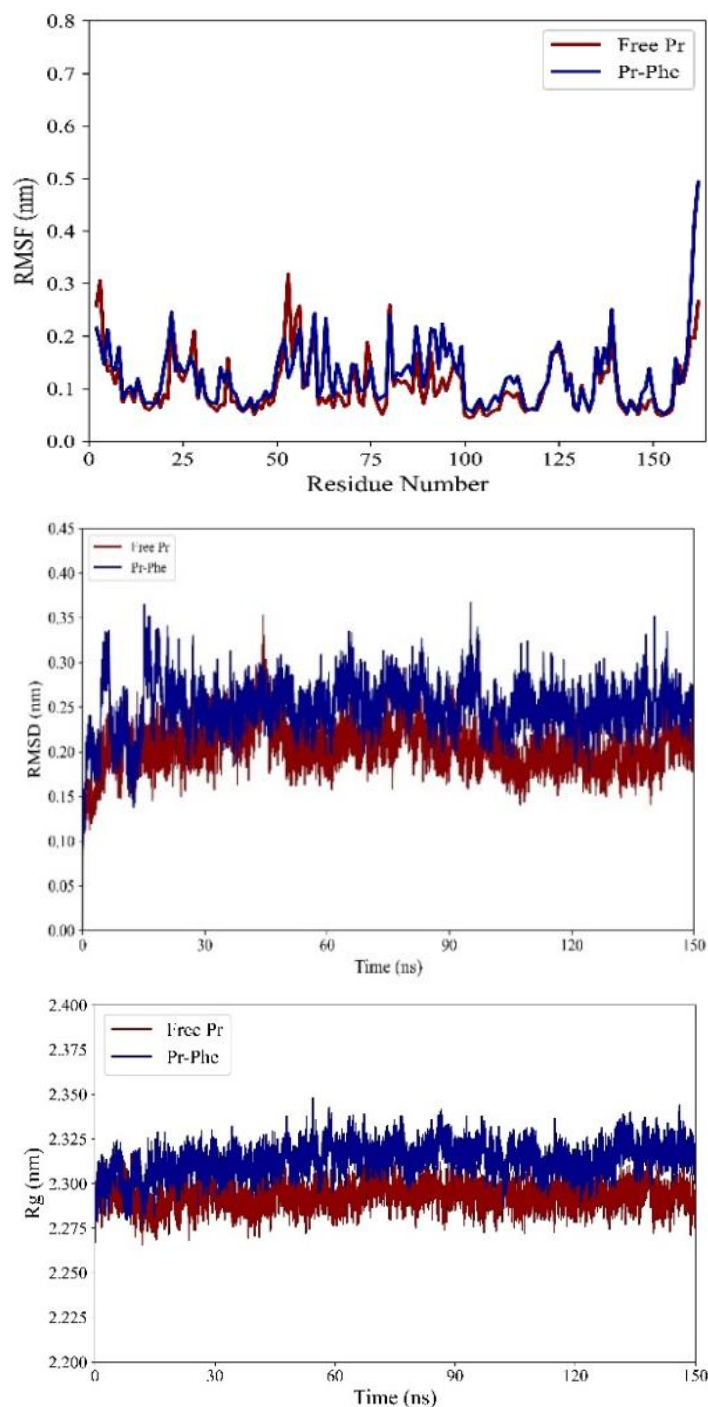
در تحلیل Rg، مقدار میانگین برای پروتئین آزاد 2.93 ± 0.07 و در حالت کمپلکس 3.15 ± 0.08 نانومتر بود که حاکی از کاهش نسبی در فشردگی ساختار پروتئین پس از اتصال لیگاند است (شکل ۳).

تحلیل ساختار ثانویه

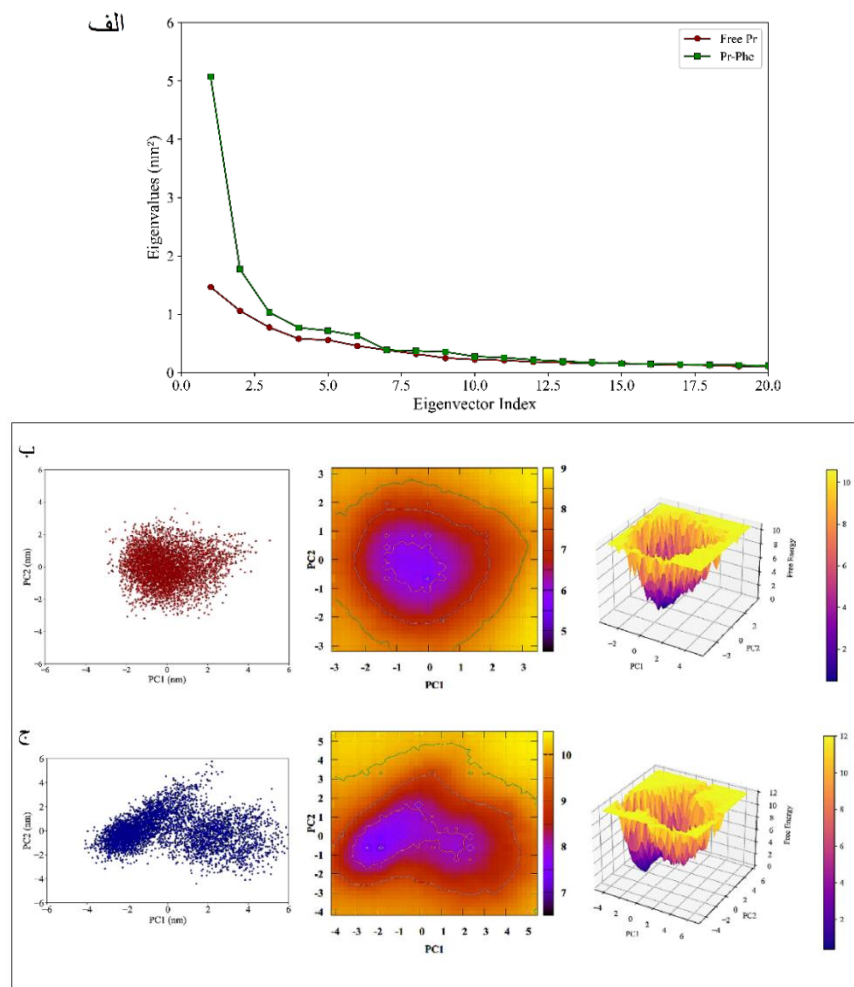
بررسی ساختار ثانویه در ۵۰ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی نشان داد که اتصال لیگاند Phe موجب تغییرات جزئی در ترکیب ساختاری پروتئین شده است. طبق نتایج جدول (۲)، مقادیر Coil،

و افزایش پایداری دینامیکی کمپلکس در حضور لیگاند هستند، که با شاخص‌های RMSD، RMSF و Rg نیز هم‌راستا می‌باشند. این الگو بیانگر آن است که اتصال لیگاند، با تثبیت ساختار در یک حالت غالب، موجب محدود شدن فضای حرکتی پروتئین و تمرکز حرکات در یک خوشه دینامیکی پایدار شده است.

نشان داد. پروتئین آزاد چندین مینیمم انرژی را تجربه کرد که نشانه انعطاف‌پذیری بالاتر آن است (شکل ۴-ب)، درحالی‌که در حالت متصل به لیگاند، تنها یک مینیمم غالب مشاهده شد که حاکی از تثبیت ساختار در حضور Phe است (شکل ۴-ج). به‌طور کلی، نتایج PCA و FEL بیانگر کاهش انعطاف‌پذیری



شکل ۳. نتایج تحلیل‌های دینامیکی مولکولی پروتئین در حالت آزاد و کمپلکس‌شده با لیگاند Phe در طول شبیه‌سازی ۱۵۰ نانوثانیه‌ای: تغییرات RMSD اتم‌های اسکلت اصلی پروتئین در طول زمان؛ مقدار RMSF برای بقایای آمینواسیدی پروتئین؛ تغییرات شعاع ژیراسیون برای بررسی فشردگی ساختار پروتئین.

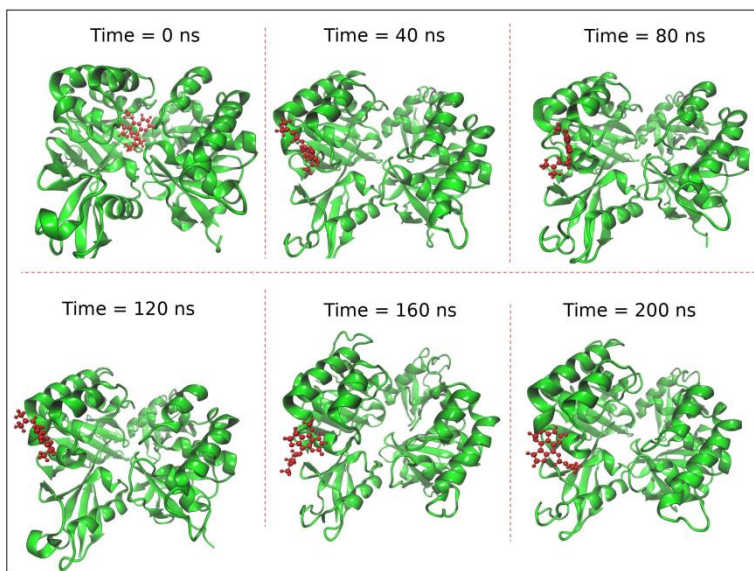


شکل ۴. تحلیل دینامیکی ساختار پروتئین RNA پلیمراز در دو حالت آزاد (Free Pr) و کمپلکس شده (Phe-Pr). الف) نمودار مقادیر ویژه برای ۲۰ مؤلفه نخست: سهم بیش‌تر مؤلفه‌های اول در سیستم کمپلکس نشان می‌دهد که بخش عمده‌ای از حرکت سیستم در چند بعد محدود متمرکز شده و آزادی حرکتی کاهش یافته است؛ ب) نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA): نمودار پراکندگی حرکات ساختاری (FEL) در فضای دو مؤلفه اصلی اول، نقشه چگالی احتمال، و نقشه انرژی آزاد؛ برای پروتئین آزاد؛ ج) در حضور لیگاند.

از بازه ۴۰ تا ۲۰۰ نانوثانیه، موقعیت نسبی لیگاند نسبت به بقایای کلیدی بدون تغییر چشم‌گیر باقی ماند و هیچ‌گونه خروج از جیب اتصال مشاهده نشد. این پایداری مکانی، همراه با انسداد نسبی مسیر ورود به سایت فعال، احتمال عملکرد مهاری غیررقابتی Phe را تقویت می‌کند؛ عملکردی که احتمالاً از طریق ممانعت فضایی یا القای تغییرات ساختاری اعمال می‌شود. این نتایج با داده‌های حاصل از داکینگ، تحلیل پیوندهای هیدروژنی و انرژی اتصال محاسبه‌شده به روش MM/PBSA هم‌راستا هستند. لازم به ذکر است که نتایج گزارش‌شده از میانگین سه اجرای مستقل شبیه‌سازی استخراج شده‌اند که در تمامی آن‌ها، لیگاند در ناحیه آلستریک تثبیت شده و موقعیت اتصال و تعاملات کلیدی آن تکرارپذیر بوده است.

تجزیه و تحلیل تصاویر لحظه‌ای (Snapshot Analysis)

تصاویر لحظه‌ای استخراج‌شده در بازه‌های ۴۰ نانوثانیه‌ای از شبیه‌سازی دینامیکی، روند تکامل پیکربندی کمپلکس پروتئین-Phe را در طول زمان به خوبی نمایش دادند. در تمام این مراحل، لیگاند در موقعیتی نزدیک به جیب ورودی جایگاه فعال باقی ماند و انسجام فضایی قابل‌توجهی نشان داد (شکل ۵). بررسی ساختاری نشان داد که محل اتصال لیگاند مستقیماً با سه‌گانه کاتالیتیکی آنزیم (Asp37، Cys40 و His151) تماس نداشت، اما در ناحیه‌ای واقع شده بود که در مسیر دسترسی به این بقایا قرار دارد. لیگاند با ایجاد پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های π -آلکیل و π -کاتیونی با بقایای اطراف، اتصال پایداری برقرار کرده بود.



شکل ۵. تصاویر لحظه‌ای استخراج‌شده از کمپلکس پروتئین - Phe در فواصل ۴۰ نانوثانیه‌ای طی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۲۰۰ نانوثانیه‌ای.

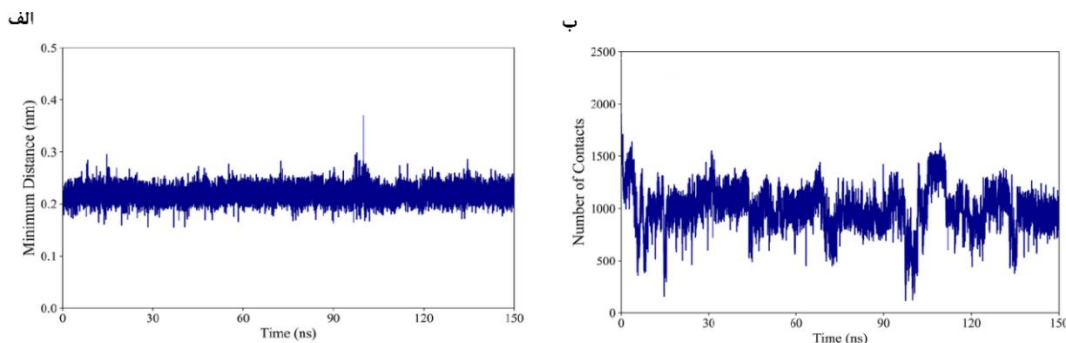
تحلیل پیوندهای هیدروژنی

بررسی پیوندهای هیدروژنی اطلاعات مهمی درباره کیفیت و پایداری برهم‌کنش‌های میان لیگاند Phe و پروتئین فراهم ساخت. در طول ۵۰ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی، میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی میان پروتئین و لیگاند برابر با $9/408 \pm 386/935$ بود که نشان‌دهنده پایداری مطلوب این تعامل در گذر زمان است.

در مقایسه با حالت آزاد، میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین و مولکول‌های حلال در وضعیت کمپلکس‌شده با لیگاند، از $18/892 \pm 106/201$ به $19/011 \pm 983/321$ کاهش یافت. این کاهش اندک احتمالاً ناشی از پوشش بخشی از سطح پروتئین توسط لیگاند است که تماس مستقیم پروتئین با محیط آبی را محدود کرده و در عین حال بدون ایجاد برهم‌ریختگی ساختاری، به تثبیت کمپلکس کمک می‌کند.

تحلیل فاصله حداقلی و تماس‌های مولکولی در کمپلکس پروتئین-لیگاند

برای ارزیابی پایداری اتصال لیگاند، دو شاخص کلیدی شامل حداقل فاصله و تعداد تماس‌های بین لیگاند و باقی‌مانده‌های فعال پروتئین طی شبیه‌سازی ۱۵۰ نانوثانیه‌ای بررسی شد. ثبات این شاخص‌ها، نشان‌دهنده حفظ موقعیت اتصال و کیفیت تعاملات فضایی لیگاند است. نتایج نشان داد که مقدار فاصله حداقلی در اغلب زمان شبیه‌سازی کمتر از $0/3$ نانومتر باقی مانده و بیانگر نزدیکی پایدار لیگاند به جیب اتصال می‌باشد (شکل ۶-الف). همچنین، نمودار تماس‌های مولکولی (شکل ۶-ب) نشان داد که تعاملات بین لیگاند و پروتئین در طول شبیه‌سازی به‌طور پیوسته در سطح بالایی حفظ شده‌اند که بیانگر پایداری بالای کمپلکس است.



شکل ۶. بررسی پایداری اتصال لیگاند Phe به پروتئین هدف در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. الف) حداقل فاصله بین اتم‌های لیگاند و نزدیک‌ترین اتم‌های پروتئین در هر فریم از شبیه‌سازی؛ ب) تعداد تماس‌های مولکولی بین لیگاند و باقی‌مانده‌های پروتئین در بازه ۱۵۰ نانوثانیه؛ ثبات هر دو شاخص در طول زمان بیانگر حفظ موقعیت اتصال و پایداری فضایی لیگاند در جیب اتصال آنزیم است.

جدول ۳. میانگین و انحراف استاندارد اجرای مختلف انرژی برای کمپلکس

پروتئین-لیگاند، محاسبه‌شده با استفاده از روش MM/PBSA

نوع انرژی	پروتئین-لیگاند Phe
انرژی واندروالس (کیلوژول/مول)	$-۹۵/۲۹۱ \pm ۱۶/۳۸۹$
انرژی الکترواستاتیک (کیلوژول/مول)	$۴/۹۳۶ \pm ۱۰/۹۱۳$
انرژی حلال پذیری قطبی (کیلوژول/مول)	$۴۸/۸۹۰ \pm ۱۱/۴۳۵$
انرژی سطح حلال پذیر (کیلوژول/مول)	$-۱۰/۰۰ \pm ۱/۲۴۷$
انرژی کل اتصال (کیلوژول/مول)	$-۵۱/۴۶۵ \pm ۱۳/۰۵۰$

تحلیل انرژی به تفکیک باقیمانده برای شناسایی

رزیجوهای کلیدی محل اتصال لیگاند

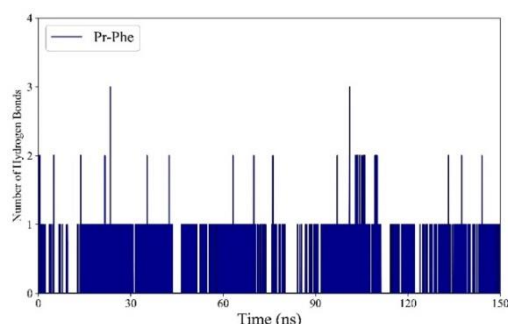
به منظور شناسایی رزیجوهای کلیدی درگیر در اتصال لیگاند، آنالیز انرژی به تفکیک باقیمانده براساس روش MM/PBSA انجام شد. نتایج نشان داد که رزیجوهای موجود در محل فعال، به‌ویژه ARG79، ARG80، Gly83 و Lue84 با انرژی‌های پیوندی منفی، در پایداری کمپلکس نقش مؤثری ایفا می‌کنند. در این میان ARG80 ($-۰/۰۸۳۵ \pm ۰/۰۰۴۴$)، Arg79 ($-۰/۱۴۱۹ \pm ۰/۰۰۵۹$)، Lue84 ($-۰/۰۰۵۱ \pm ۰/۰۰۰۳$) و GLY83 ($-۰/۰۰۱۶ \pm ۰/۰۰۰۱$) دارای بیش‌ترین سهم منفی بودند، که نشان‌دهنده مشارکت آن‌ها در برهم‌کنش‌های واندروالس و هیدروفوبیک با لیگاند است. این داده‌ها با محل اتصال لیگاند در آنالیز داکینگ نیز هم‌راستا هستند و نقش این رزیجوها را در پایداری کمپلکس تأیید می‌کنند.

بحث

تب خونریزی‌دهنده کریمه-کنگو (CCHF) یکی از مرگ‌بارترین بیماری‌های ویروسی زئونوز است که توسط ویروس CCHFV از طریق گزش کنه، تماس با خون حیوان آلوده یا ترشحات بیماران منتقل می‌شود. نرخ مرگ‌ومیر بالا (تا ۳۰ درصد)، نبود درمان اختصاصی و قابلیت اپیدمی‌زایی سریع، این ویروس را در فهرست پاتوژن‌های اولویت‌دار سازمان جهانی بهداشت (WHO) قرار داده است (Dokuzoguz et al., 2013).

ژنوم CCHFV دارای سه قطعه RNA است که قطعه L آن، پلی‌پروتئینی بزرگ شامل آنزیم RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) را رمزگذاری می‌کند. این آنزیم برای همانندسازی ویروسی ضروری بوده و دارای دامنه‌های عملکردی متعددی از جمله پروتئاز OTU در بخش N-terminal است که با فعالیت دی‌یوبی کوئیتینازی (DUB)، در فرار ویروس از پاسخ ایمنی نقش دارد (Gerlach et al., 2015; Kaushal & Baranwal, 2023).

نمودار فراوانی پیوندهای هیدروژنی (شکل ۷) نشان داد که در اغلب زمان‌های شبیه‌سازی، دو پیوند هیدروژنی پایدار میان پروتئین و Phe حفظ شده و در برخی لحظات نیز افزایش گذرای تا سه پیوند دیده می‌شود. حضور غالب این پیوندها، همراه با کاهش تماس‌های پروتئین با حلال، حاکی از جای‌گیری مناسب و پایدار لیگاند در محل اتصال و نقش آن در تقویت پایداری ساختاری کمپلکس است. این یافته با نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل شعاع ژیراسیون نیز هم‌راستا می‌باشد.



شکل ۷. نمودار تعداد پیوندهای هیدروژنی بین لیگاند Phe و پروتئین هدف در طول ۱۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

محاسبه انرژی آزاد اتصال با روش MM/PBSA

تحلیل انرژی آزاد اتصال با روش MM/PBSA بر پایه ۱۰۰۰ قاب از ۵۰ نانوثانیه انتهایی مسیر شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد. این تحلیل به تفکیک، سهم انرژی‌های مختلف در اتصال لیگاند به پروتئین را بررسی نمود (جدول ۳). براساس نتایج، انرژی واندروالس بیش‌ترین سهم مطلوب را در پایداری کمپلکس داشت ($-۹۵/۲۹۱ \pm ۱۶/۳۸۹$ کیلوژول بر مول)، در حالی که انرژی الکترواستاتیک تأثیر مثبت اندکی داشت ($۴/۹۳۶ \pm ۱۰/۹۱۳$ کیلوژول بر مول). انرژی حلال‌پذیری قطبی به‌صورت یکنواخت نقش نامطلوبی در اتصال ایفا نمود ($۴۸/۸۹۰ \pm ۱۱/۴۳۵$ کیلوژول بر مول). انرژی سطح حلال‌پذیر (SASA) نیز سهم منفی مؤثری داشت ($-۱۰/۰۰ \pm ۱/۲۴۷$ کیلوژول بر مول). در نهایت، انرژی کل اتصال بین لیگاند و پروتئین برابر با $-۵۱/۴۶۵ \pm ۱۳/۰۵۰$ کیلوژول بر مول محاسبه شد که نشان‌دهنده تمایل اتصال مطلوبی بین لیگاند و پروتئین هدف می‌باشد. لازم به ذکر است که این محاسبه براساس موقعیت تثبیت‌شده نهایی لیگاند در ناحیه آلستریک، طی ۵۰ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی انجام شده است. از آنجا که لیگاند در جایگاه فعال اولیه تنها به‌طور موقت حضور داشت و در ابتدای شبیه‌سازی جابه‌جا شد، تحلیل انرژی برای آن موقعیت ناپایدار، انجام نشد.

در حال حاضر، تنها داروی پیشنهادشده برای درمان، ریباویرین است؛ با این حال، این دارو اختصاصی نبوده و با عوارضی نظیر اُرمی، سمیت کلیوی و اثرات تراتوژن همراه است (Smee et al., 2018). در نتیجه، شناسایی ترکیبات طبیعی با کارایی ضدویروسی و عوارض کم‌تر، ضرورتی جدی است. ترکیبات گیاهی به دلیل ساختارهای زیست‌فعال، جایگاه ویژه‌ای در طراحی داروهای جدید دارند. در این مطالعه، اثر مهار Phellopterin - ترکیبی استخراج‌شده از گیاه *Heracleum persicum* - بر دامنه OTU از پروتئین RdRp ویروس CCHFV با استفاده از روش‌های محاسباتی بررسی شد. نتایج داکینگ و دینامیک مولکولی نشان داد که این لیگاند در ناحیه ورودی جایگاه فعال OTU اتصال پایداری برقرار کرده و موجب تثبیت ساختار پروتئین شده است.

تحلیل‌های RMSF، RMSD، شعاع ژیراسیون و تماس‌های مولکولی همگی از حفظ موقعیت لیگاند در طول شبیه‌سازی و پایداری کمپلکس حمایت کردند. همچنین در تحلیل PCA، تمرکز حرکات ساختاری در حضور لیگاند بیش‌تر شد که نشان‌دهنده کاهش دینامیک پروتئین و افزایش پایداری کمپلکس است؛ یافته‌ای که با مطالعه مشابه مرادی و همکاران (۲۰۲۴) همخوانی دارد (Moradi et al., 2024).

یافته‌های این پژوهش با مطالعات پیشین هم‌راستا است. برای مثال، نشان داده شد که مهار پروتئاز OTU می‌تواند تکثیر ویروس را متوقف سازد، حتی بدون دخالت مستقیم RdRp (Scholte et al., 2017). همچنین بررسی‌های ساختاری دامنه OTU حاکی از آن است که نواحی ابتدایی این آنزیم دارای عملکرد deubiquitinase هستند و هدف مناسبی برای طراحی مهارکننده‌ها محسوب می‌شوند (Dowall et al., 2016).

مدل‌سازی سه‌بعدی RNA پلیمرز و مطالعات داکینگ پیشین با ریباویرین، امکان‌پذیری طراحی مهارکننده‌های ساختاری برای این آنزیم را تأیید کرده‌اند (Verma, 2011). با این حال، ریباویرین دارای اثربخشی محدود و عوارض جدی است (Hawman et al., 2018)، درحالی‌که Phellopterin با ساختار فوروکومارینی خود، ویژگی‌های ضدویروسی مشابهی با مشتقات شناخته‌شده دارد (Pattnaik et al., 2018). گرچه تاکنون گزارشی از فعالیت ضدویروسی Phellopterin یافت نشده، اما ساختار فوروکومارینی آن مشابه ترکیبات گیاهی با فعالیت ضدویروسی شناخته‌شده است و نتایج غربال‌گری محاسباتی از پتانسیل بالای آن حمایت می‌کند.

در این مطالعه، برخلاف تمرکز رایج بر مرکز کاتالیتیکی (Asp37، Cys40، His151)، اثر اتصال لیگاند در ناحیه ورودی جایگاه فعال بررسی شد؛ ناحیه‌ای که شامل باقی‌مانده‌های Tyr89-Ser101 بوده و به‌عنوان سطح عملکردی مجاور در مطالعات قبلی نیز معرفی شده است (Kocabaş & Ergin, 2016). اگرچه ناحیه اتصال (Ala79-Leu86) Phellopterin با محل پیشنهادی کوکاباس متفاوت است، اما هر دو در یک سطح عملکردی مجاور جایگاه فعال آنزیم قرار دارند. این هم‌پوشانی فضایی نشان می‌دهد که این سطح می‌تواند به‌عنوان یک جیب آلستریک یا محل اتصال جانبی عمل کرده و از طریق انسداد دسترسی سوبسترا یا القای تغییرات ساختاری و دینامیکی، به مهار عملکرد پروتئاز OTU منجر شود. تحلیل انرژی به تفکیک رزيجو (MM/PBSA) و نقشه تعاملات مولکولی نشان دادند که Arg79 و Arg80 از طریق برهم‌کنش‌های π -آلکیل و π -کاتیونی و Gly83 و Leu84 با پیوندهای هیدروژنی، نقش کلیدی در پایداری اتصال لیگاند ایفا می‌کنند. این یافته‌ها تطابق بالایی با محل اتصال مشاهده‌شده در شبیه‌سازی دینامیک دارند و بر اهمیت جیب آلستریک اطراف جایگاه فعال در مهار عملکرد پروتئاز OTU تأکید می‌کنند. حضور رزيجوهای با بار مثبت در این ناحیه، احتمال سازوکار مهاری غیررقابتی را تقویت می‌سازد. بر پایه تحلیل‌های چندسطحی (از جمله RMSD، FEL و پیوندهای هیدروژنی)، می‌توان فرض کرد که اتصال پایدار Phellopterin به ناحیه آلستریک، از طریق محدودکردن حرکات ساختاری ضروری، موجب تثبیت شکل غیرفعال دامنه OTU و مهار غیررقابتی عملکرد آنزیم می‌شود. همچنین، تحلیل DSSP حاکی از آن بود که اتصال لیگاند موجب تغییرات جزئی در ساختار دوم نواحی مجاور جایگاه آلستریک، از جمله کاهش A-Helix و افزایش Turn در مجاورت باقی‌مانده‌های Ala79 تا Ser101 شده است. این تغییرات موضعی می‌توانند به مهار عملکرد آنزیم از طریق محدودسازی بازآرایی‌های ساختاری کمک کنند.

از نظر ADMET، Phellopterin دارای جذب گوارشی بالا، عدم سمیت ژنی (طبق آزمون Ames) و ویژگی‌های فارماکوکینتیکی مطلوب است. برتری آن نسبت به ریباویرین در عدم مهار آنزیم CYP3A4 و فقدان اثرات تراتوژن در مدل‌های پیش‌بالینی قابل توجه است (Frank et al., 2024).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات گیاهی متعددی مانند کورکومین (Curcumin)، اپیگالوکاتچین گالات (EGCG)

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب طبیعی Phellopterin مشتق‌شده از گیاه *Heracleum persicum*، با اتصال به ناحیه‌ای جانبی در نزدیکی جایگاه فعال پروتئاز OTU ویروس CCHFV و برقراری تعاملات پایدار، موجب کاهش انعطاف‌پذیری و تثبیت ساختار پروتئین در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شد. برخلاف رویکردهای متداول که بر مهار مستقیم مرکز کاتالیتیکی تمرکز دارند، در این پژوهش یک جیب عملکردی جانبی هدف قرار گرفت و امکان مهار غیررقابتی بررسی گردید.

استفاده از ساختار بلوری آنزیم مبتنی بر داده‌های X-ray و وضوح ۲/۵ آنگستروم به‌جای مدل‌های پیش‌بینی‌شده، دقت تحلیل‌ها را به‌طور قابل‌توجهی افزایش داد و انجام تکرارهای مستقل در شبیه‌سازی، موجب ارتقای اعتبار نتایج شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اتصال Phellopterin به یک جیب آلستریک در نزدیکی جایگاه فعال پروتئاز OTU، با میانجی‌گری رزجوه‌های کلیدی Arg79، Arg80، Gly83 و Leu84، می‌تواند از طریق مکانیسم غیررقابتی، موجب مهار عملکرد آنزیم شود. همچنین ارزیابی خواص فارماکوکینتیکی و سمیت، قابلیت بالقوه Phellopterin را به‌عنوان نامزد توسعه داروی ضدویروسی تأیید کرد.

یافته‌های این مطالعه می‌تواند مبنایی برای طراحی مشتقات نیمه‌سنتزی این ترکیب یا بررسی سایر فوروکومارین‌های طبیعی با ساختار مشابه، با هدف مهار مؤثرتر آنزیم‌های کلیدی ویروس CCHFV باشند. با این‌حال، انجام مطالعات تجربی در شرایط *in vitro* و *in vivo* برای ارزیابی دقیق‌تر اثربخشی، ایمنی و ویژگی‌های دارویی، ضروری و اجتناب‌ناپذیر است، تا نتایج بررسی‌های محاسباتی با شواهد تجربی تأیید شوند.

و ریسوراترول (Resveratrol) به‌عنوان ترکیبات ضدویروس فعال علیه ویروس‌های RNA دار شناخته شده‌اند که علاوه بر اثربخشی، دارای پروفایل فارماکوکینتیکی و سمیت مناسبی نیز هستند (Hatcher et al., 2008; David et al., 2016; Shaito et al., 2020). این ترکیبات مشابه Phellopterin معیارهای قانون پنج‌گانه لپینسکی را حفظ کرده و پروفایل ADMET مناسبی دارند، از جمله جذب گوارشی بالا، عدم مهار CYP3A4 و سمیت پایین.

این ترکیبات توانایی مهار اتصال و عملکرد آنزیم‌های مرتبط با ویروس‌های RNA را دارا بوده که الگوی اثر Phellopterin را تأیید می‌کند. با توجه به ویژگی‌های مشترک ساختاری و فارماکوکینتیکی، Phellopterin نیز پتانسیل مناسبی برای توسعه به‌عنوان مهارکننده غیررقابتی ضدویروس دارد، هرچند مطالعات *in vivo* و *in vitro* بیش‌تری مورد نیاز است.

به‌طور کلی، Phellopterin با ساختار زیست‌فعال، اتصال پایدار به دامنه OTU، کاهش دینامیک پروتئین و ویژگی‌های دارویی مطلوب، گزینه‌ای مناسب برای توسعه مهارکننده‌های غیررقابتی علیه CCHFV محسوب می‌شود. نتایج این مطالعه می‌تواند مبنایی برای بررسی‌های بیش‌تر در مدل‌های آزمایشگاهی و حیوانی باشند و پیشنهاد می‌شود مشتقات نیمه‌سنتزی Phellopterin و ترکیبات فوروکومارینی مشابه برای افزایش اثربخشی و بهبود ویژگی‌های دارویی بررسی شوند. الگوی مهاری مشاهده‌شده شامل اتصال آلستریک و تثبیت ساختار آنزیم، با سازوکارهای آلستریک گزارش‌شده در ویروس‌های RNA مشابه مانند Ebola و Zika قابل‌مقایسه است، اگرچه تفاوت‌هایی در نوع آنزیم و موقعیت جیب اتصال وجود دارد.

References

- Aligholipour Farzani, T., Földes, K., Ergünay, K., Gurdal, H., Bastug, A., & Ozkul, A. (2019). Immunological analysis of a CCHFV mRNA vaccine candidate in mouse models. *Vaccines*, 7(3), 115.
- Appannanavar, S. B., & Mishra, B. (2011). An update on Crimean Congo hemorrhagic fever. *Journal of global infectious diseases*, 3(3), 285-292.
- Arab-Bafrani, Z., Jabbari, A., Mostakhdem Hashemi, M., Arabzadeh, A. M., Gilanipour, A., & Mousavi, E. (2019). Identification of the crucial parameters regarding the efficacy of ribavirin therapy in Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(12), 3432-3439.
- Azari, M., Bahreini, F., Uversky, V. N., & Rezaei, N. (2023). Current therapeutic approaches and promising perspectives of using bioengineered peptides in fighting chemoresistance in triple-negative breast cancer. *Biochemical Pharmacology*, 210, 115459.
- Capodagli, G. C., McKercher, M. A., Baker, E. A., Masters, E. M., Brunzelle, J. S., & Pegan, S. D. (2011). Structural analysis of a viral ovarian tumor domain protease from the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in complex with covalently bonded ubiquitin. *Journal of virology*, 85(7), 3621-3630.

- Dai, S., Deng, F., Wang, H., & Ning, Y. (2021). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: current advances and future prospects of antiviral strategies. *Viruses*, 13(7), 1195.
- Davey, M.G., Davies, M., Lowery, A.J., Miller, N., & Kerin, M.J. (2021). The role of microRNA as clinical biomarkers for breast cancer surgery and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8290.
- David, A. V. A., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*, 10(20), 84.
- Dehnoee, A., Kalbasi, R.J., Tavakoli, S., Zangeneh, M.M., Zangeneh, A., & Delnavazi, M.-R. (2023). Anticancer potential of furanocoumarins and flavonoids of *Heracleum persicum* fruit.
- Diakou, I., Papakonstantinou, E., Papageorgiou, L., Pierouli, K., Dragoumani, K., Spandidos, D. A., ... & Vlachakis, D. (2022). Novel computational pipelines in antiviral structure-based drug design. *Biomedical Reports*, 17(6), 97.
- Dokuzoguz, B., Celikbas, A.K., Gök, Ş.E., Baykam, N., Eroglu, M.N., & Ergönül, Ö. (2013). Severity scoring index for Crimean-Congo hemorrhagic fever and the impact of ribavirin and corticosteroids on fatality. *Clinical infectious diseases*, 57(9), 1270-1274.
- Dowall, S., Buttigieg, K., Findlay-Wilson, S., Rayner, E., Pearson, G., Miloszewska, A., ... & Hewson, R. (2016). A Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) viral vaccine expressing nucleoprotein is immunogenic but fails to confer protection against lethal disease. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(2), 519-527.
- Dzimianski, J.V., Scholte, F.E., Williams, I.L., Langley, C., Freitas, B.T., Spengler, J.R., ... & Pegan, S. D. (2019). Determining the molecular drivers of species-specific interferon-stimulated gene product 15 interactions with nairovirus ovarian tumor domain proteases. *PLoS One*, 14(12), e0226415.
- Farahmand, S., SamadiAfshar, S., Khalili, M., & Hosseini, R. H. (2025). Therapeutic implications of Epirubicin-induced miRNA-22 and miRNA-331 upregulation on cell viability and metastatic potential in triple-negative breast cancer. *Human Gene*, 44, 201396.
- Frank, M.G., Weaver, G., & Raabe, V. (2024). Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus for Clinicians—Virology, Pathogenesis, and Pathology. *Emerging Infectious Diseases*, 30(5), 847.
- Fu, Y., Yang, Q., Yang, H., & Zhang, X. (2023). New progress in the role of microRNAs in the diagnosis and prognosis of triple negative breast cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1162463.
- Gerlach, P., Malet, H., Cusack, S., & Reguera, J. (2015). Structural insights into bunyavirus replication and its regulation by the vRNA promoter. *Cell*, 161(6), 1267-1279.
- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2008). Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and molecular life sciences*, 65, 1631-1652.
- Hawman, D.W., Haddock, E., Meade-White, K., Williamson, B., Hanley, P.W., Rosenke, K., ... & Feldmann, H. (2018). Favipiravir (T-705) but not ribavirin is effective against two distinct strains of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in mice. *Antiviral research*, 157, 18-26.
- Hawman, D.W., Meade-White, K., Leventhal, S., Feldmann, F., Okumura, A., Smith, B., ... & Feldmann, H. (2021). Immunocompetent mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Elife*, 10, e63906.
- Hawman, D. W., & Feldmann, H. (2023). Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Nature Reviews Microbiology*, 21(7), 463-477.
- Kaushal, N., & Baranwal, M. (2023). Mutational analysis of catalytic site domain of CCHFV L RNA segment. *Journal of Molecular Modeling*, 29(4), 88.
- Khandan Alamdari, S., Farahmand, S., Haji Hosseini, R., & Bakhshi Khaniki, G. (2023). Computational design of E6 protein inhibitors for the treatment of HPV16 disease. *Experimental animal Biology*, 12(2), 1-14.
- Kocabaş, F., & Ergin, E. K. (2016). Identification of small molecule binding pocket for inhibition of Crimean? Congo hemorrhagic fever virus OTU protease. *Turkish Journal of Biology*, 40(1), 239-249.
- Li, X., Wang, Y., Jiang, M., Yin, F., Zhang, H., Yuan, L., ... & Zhang, Z. (2024). Exploring the binding mechanism of a small molecular Hsp70-Bim PPI inhibitor through molecular dynamic simulation. *Journal of Molecular Modeling*, 30(3), 71.
- Li, M. (2024). Innate immune response against vector-borne bunyavirus infection and viral countermeasures. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1365221.
- Mirza, M.U., Vanmeert, M., Froeyen, M., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2019). In silico structural elucidation of RNA-dependent RNA polymerase towards the identification of potential Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus inhibitors. *Scientific reports*, 9(1), 6809.

- Moradi, S., Nowroozi, A., Nezhad, M. A., Jalali, P., Khosravi, R., & Shahlaei, M. (2024). A review on description dynamics and conformational changes of proteins using combination of principal component analysis and molecular dynamics simulation. *Computers in Biology and Medicine*, 183, 109245.
- Moradi, G., Piroozi, B., Alinia, C., Safari, H., Nabavi, M., Zeinali, M., ... & Gouya, M. M. (2019). Incidence, mortality, and burden of crimean congo hemorrhagic fever and its geographical distribution in Iran during 2009-2015. *Iranian Journal of Public Health*, 48(Supple 1), 44-52.
- Mustali, J., Yasuda, I., Hirano, Y., Yasuoka, K., Gautieri, A., & Arai, N. (2023). Unsupervised deep learning for molecular dynamics simulations :a novel analysis of protein-ligand interactions in SARS-CoV-2 M pro. *RSC advances*, 13(48), 34249-34261.
- Pattnaik, A., Palermo, N., Sahoo, B. R., Yuan, Z., Hu, D., Annamalai, A. S., ... & Destache, C. J. (2018). Discovery of a non-nucleoside RNA polymerase inhibitor for blocking Zika virus replication through in silico screening. *Antiviral research*, 151, 78-86.
- Sakhawat, A., Khan, M. U., Rehman, R., Khan, S., Shan, M. A., Batool, A., ... & Ali, Q. (2023). Natural compound targeting BDNF V66M variant :insights from in silico docking and molecular analysis. *Amb Express*, 13(1), 134.
- Salaria, P., Akshinthala, P., & Kapavarapu, R. (2023). Identification of novel C-15 fluoro isosteviol derivatives for GABA-AT inhibition by in silico investigations. *Journal of Molecular Modeling*, 29(3), 76.
- SamadiAfshar, S., NikAkhtar, A., SamadiAfshar, S., & Farahmand, S. (2024). Antibacterial Property of Silver Nanoparticles Green Synthesized from Stachys schtschegleevii Plant Extract on Urinary Tract Infection Bacteria. *Current Microbiology*, 81(5), 135.
- Scholte, F. E., Zivcec, M., Dzimianski, J. V., Deaton, M. K., Spengler, J. R., Welch, S. R., ... & Bergeron, É. (2017). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus suppresses innate immune responses via a ubiquitin and ISG15 specific protease. *Cell reports*, 20(10), 2396-2407.
- Scholte, F. E., Hua, B. L., Spengler, J. R., Dzimianski, J. V., Coleman-McCray, J. D., Welch, S. R., ... & Bergeron, É. (2019). Stable occupancy of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-encoded deubiquitinase blocks viral infection. *American Society for Microbiology (MBio)*, 10(4), 10-1128.
- Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., ... & Pintus, G. (2020). Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2084.
- Shojapour, M., & Farahmand, S. (2022). Point mutation consideration in CcO protein of the electron transfer chain by MD simulation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 117, 108309.
- Shojapour, M., Farahmand, S., Fatemi, F., & Shasaltaneh, M. D. (2022). Evaluation of Cyc1 protein stability in Acidithiobacillus ferrooxidans bacterium after E121D mutation by molecular dynamics simulation to improve electron transfer. *Journal of Microbiology*, 60(5), 526-532.
- Shojapour, M., Fatemi, F., Farahmand, S., & Shasaltaneh, M. D. (2021). Investigation of Cyc1 protein structure stability after H53I mutation using computational approaches to improve redox potential. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 105, 107864.
- Smee, D. F., Jung, K.-H., Westover, J., & Gowen, B. B. (2018). 2'-Fluoro-2'-deoxycytidine is a broad-spectrum inhibitor of bunyaviruses in vitro and in phleboviral disease mouse models. *Antiviral research*, 160, 48-54.
- Tang, Q., Ouyang, H., He, D., Yu, C., & Tang, G. (2019). MicroRNA-based potential diagnostic, prognostic and therapeutic applications in triple-negative breast cancer. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 2800-2809.
- Verma, S. K. (2011). Molecular docking studies towards exploring active sites for antiviral compound against RdRP protein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *BIOMIRROR*, 2(12), 1-6.
- Zivcec, M., Scholte, F. E., Spiropoulou, C. F., Spengler, J. R., & Bergeron, É. (2016). Molecular insights into Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Viruses*, 8(4), 106.