

Identification of Agents with Potential Leishmania Malate Dehydrogenase Inhibitor Activity: A Proteomic and Molecular Docking Approach

Nasrin Amiri-Dashatan¹,
Mehdi Koushki²,
Marzieh Ashrafmansouri³,
Nayebali Ahmadi⁴,

¹ PhD in Applied Proteomics, Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁴ Professor, Proteomics Research Center, Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 21, 2021 ; Accepted November 21, 2021)

Abstract

Background and purpose: Leishmaniasis is one of the most important infectious diseases caused by different species of the *Leishmania*, which is a public health problem worldwide. So far, no effective vaccine is introduced for this disease and drug therapy is associated with many side effects. Therefore, this study was designed to identify novel FDA-approved compounds with anti-leishmanial activity.

Materials and methods: In this experimental study, proteomics, protein network analysis, and molecular docking were used. Protein profile was identified by LC-MS/MS and protein network analysis was performed using Cytoscape. Processing of the compound structure and molecular docking was performed by HyperChem and AutoDock Vina, respectively. Finally, docking results were interpreted by LigPlot⁺.

Results: Based on proteomics and protein network analysis, glycosomal malate dehydrogenase was suggested as a potential drug target. Among the compounds, the best docking results were associated with Conivaptan and Avodart with a binding energy level of -10.5 and -10.2, respectively. Also, molecular docking studies showed that the most important bonds involved in drug-receptor binding were hydrogen and hydrophobic bonds.

Conclusion: The current study demonstrated the importance of integrated proteomics, protein network and docking to identify novel compounds with anti-*Leishmania* properties. According to this study, Conivaptan and Avodart, also approved by the Food and Drug Administration, are effective inhibitors of glycosomal malate dehydrogenase in *Leishmania major* and *Leishmania tropica* which meanwhile require further in-vitro and in-vivo experiments.

Keywords: *Leishmania*, Cutaneous Leishmaniasis, glycosomal malate dehydrogenase, drug target, molecular docking

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (204): 49-61 (Persian).

* **Corresponding Author:** Nayebali Ahmadi - Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: nayebalia@yahoo.com)

شناسایی ترکیبات دارای فعالیت بالقوه مهارکنندگی مالات دهیدروژناز در *لیشمانیا*: مطالعه پروتئومیک و داکینگ مولکولی

نسرین امیری-دانش آتان^۱

مهدی کوشکی^۲

مرضیه اشرف منصوری^۳

نایبعلی احمدی^۴

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی ایجاد شده توسط انگل لیشمانیا است که به‌عنوان یک مشکل جدی بهداشت عمومی در سراسر جهان مطرح می‌باشد. علی‌رغم تحقیقات بسیار، تاکنون هیچ واکنش موثری برای این بیماری معرفی نشده است و دارو درمانی نیز با عوارض جانبی و سمیت بالا همراه است. لذا این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات دارویی جدید بالقوه از میان داروهای دارای مجوز FDA با فعالیت ضد لیشمانیایی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از روش‌های پروتئومیک، آنالیز شبکه برهمکنش پروتئینی و داکینگ مولکولی استفاده شد. شناسایی الگو و مشخصات (پرو فایل) پروتئینی لیشمانیا مازور و لیشمانیا تروپیکا با روش LC-MS/MS و آنالیز شبکه برهمکنش پروتئینی با نرم‌افزار Cytoscape صورت گرفت. اصلاح ساختار ترکیبات دارویی و داکینگ مولکولی به ترتیب با HyperChem و AutoDock Vina انجام شد. در نهایت بررسی و تفسیر نتایج داکینگ با برنامه LigPlot⁺ انجام گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج پروتئومیک و آنالیز شبکه پروتئینی، گلیکوزومال مالات دهیدروژناز به عنوان هدف دارویی بالقوه مطرح شد. بهترین نتایج داکینگ مربوط به ترکیبات Conivaptan و Avodart به ترتیب با سطح انرژی اتصال ۱۰/۵- و ۱۰/۲- بود. همچنین داکینگ مولکولی نشان داد که مهم‌ترین پیوندهای درگیر در اتصال دارو با گیرنده، پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی می‌باشند.

استنتاج: مطالعه حاضر اهمیت تلفیق روش‌های پروتئومیک، آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین و داکینگ مولکولی را نشان داد. ترکیبات Conivaptan و Avodart که دارای تاییدیه سازمان غذا و دارو آمریکا نیز می‌باشند به عنوان مهارکننده‌های موثر بالقوه‌ی آنزیم گلیکوزومال مالات دهیدروژناز لیشمانیا مازور و تروپیکا معرفی شدند که نیازمند آزمایشات بیش‌تر *in-vitro* و *in-vivo* می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا، لیشمانیوز جلدی، گلیکوزومال مالات دهیدروژناز، تارگت (هدف) دارویی، داکینگ مولکولی

مقدمه

لیشمانیا (*L*) یک انگل تک یاخته از خانواده تریپانوزوماتیده است که ایجاد بیماری لیشمانیوز می‌کند. لیشمانیوز از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی است که توسط گونه‌های مختلف لیشمانیا ایجاد می‌شود (۱). این طیف از

E-mail: nayebalia@yahoo.com

مؤلف مسئول: نایبعلی احمدی - تهران: میدان قدس، دانشکده پیراپزشکی

۱. دکترای پروتئومیکس کاربردی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۳. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۳۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۰/۴/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۸/۳۰

بیماری‌ها به عنوان مشکل جدی بهداشت عمومی در سراسر جهان مطرح می‌باشند. لیشمانیوز در انسان به اشکال لیشمانیوز جلدی (سالک)، جلدی-مخاطی و احشایی بروز می‌کند که براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی تقریباً ۱۲ میلیون نفر در سطح جهان به اشکال مختلف لیشمانیوز آلوده می‌باشند (۲). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، در سال ۲۰۲۰، تعداد ۹۸ کشور در سراسر جهان برای لیشمانیوز اندمیک بوده‌اند. همچنین سالانه تقریباً از ۵۰۰۰۰۰ تا یک میلیون مورد لیشمانیوز جدید در سال در سراسر جهان گزارش می‌شود (۴،۳). علاوه بر این، حدود ۲/۴ میلیون مورد با ناتوانی تعدیل شده در سراسر جهان ایجاد می‌کند که با توجه به این دلایل به عنوان یکی از ۱۰ بیماری عفونی مهم مطرح است. کشورهای منطقه خاورمیانه تقریباً ۵۷ درصد از لیشمانیوز جلدی را شامل می‌شوند، منطقه‌ای که *ل. تروپیکا* و *ل. مائور* در ۱۸ کشور منطقه (از جمله ایران) بومی هستند. علاوه بر این، سالانه بیش از ۱۰۰۰۰۰ مورد جدید لیشمانیوز جلدی توسط کشورهای منطقه خاورمیانه به سازمان بهداشت جهانی گزارش می‌شود. با این حال، میزان بروز واقعی ۵-۳ برابر بیش تر تخمین زده می‌شود (۵،۳). در سال ۲۰۱۹، بیش از ۸۷ درصد موارد جدید لیشمانیوز جلدی در ۱۰ کشور رخ داده است که کشور ایران را نیز شامل می‌شود (۶). این بیماری با گزش پشه فلیتوموس آلوده به فرم متاسیکلیک در انسان و جوندگان ایجاد می‌شود. در این میان، لیشمانیوز جلدی شایع‌ترین فرم بیماری می‌باشد که *ل. مائور* و *ل. تروپیکا* به ترتیب عوامل اصلی ایجادکننده نوع زئونوتیک (Zoonotic) و آنتروپونوتیک (Anthroponotic) می‌باشند (۷). لیشمانیوز جلدی در ایران به دو شکل لیشمانیوز جلدی مرطوب و خشک مشاهده می‌شود که به ترتیب *ل. مائور* و *ل. تروپیکا* عوامل بیماری می‌باشند (۹،۸). بر اساس گزارش مرکز مدیریت بیماری‌ها، مبتلایان به انواع لیشمانیوز در کشور سالانه ۲۰ هزار نفر می‌باشد که لیشمانیوز جلدی بیش‌ترین موارد ابتلا را شامل می‌شود. با وجود شناخت

عامل بیماری، ناقل بیماری و راه‌های انتقال آن و انجام تحقیقات بسیار در این زمینه، متأسفانه لیشمانیوز جلدی همچنان در بسیاری از کشورهای جهان در حال گسترش است و این روند با توجه به این که ناقلین بیماری و مخازن آن تقریباً در همه جای کشورمان وجود دارد، نیز مشاهده می‌شود (۸).

علی‌رغم تلاش‌های بسیار در زمینه درمان این بیماری، هنوز واکسنی برای آن معرفی نشده و درمان دارویی، روش اصلی مقابله با این بیماری است (۱۰). روش‌های درمانی قدیمی و جدید بسیاری برای درمان لیشمانیوز جلدی با سه خط مشی درمانی استفاده شده‌اند که شامل درمان موضعی، درمان فیزیکی و درمان سیستمیک می‌باشند (۱۱). درمان موضعی شامل استفاده از عصاره گیاهان و مواد معدنی، تزریق داخل ضایعه با استفاده از میاکرین، سولفات اسیدبرین، گلوکانتیم و نیز به کارگیری پاراموایسین و ایمیدازول می‌باشد. درمان سیستمیک شامل استفاده از ترکیبات دارویی همانند گلوکانتیم، آموتریسین، دی آمیدین‌های آروماتیک، آلپورینول، پاراموایسین، و مشتقات ایمیدازول می‌باشد. درمان فیزیکی شامل کورتاژ زخم، اشعه درمانی، گرما درمانی و سرما درمانی می‌باشد. هر یک از پروتکل‌های فوق، اثرات درمانی و عوارض جانبی خاصی را دارند (۱۱). در دارو درمانی، می‌توان به سمیت داروها، عوارض جانبی، گرانی و کارایی پایین آن‌ها اشاره نمود (۱۱). همچنین مقاومت دارویی و گزارش ظهور گونه‌های مقاوم لیشمانیا به داروهای موجود در سطح جهان از محدودیت‌های اصلی در این زمینه می‌باشد (۱۲). لذا می‌توان گفت که مهم‌ترین چالش در زمینه درمان لیشمانیوز، شناسایی و ارائه داروهای جدید با کارایی بالا و سمیت کم‌تر می‌باشد (۱۳). مراحل کلیدی در فرایند کشف دارو، شناسایی اهداف دارویی و طراحی داروهای مهارکننده این اهداف می‌باشد که نیازمند صرف وقت و هزینه زیاد است (۱۴). پروتئین هدف بایستی برای بقای انگل ضروری بوده و در میزبان وجود نداشته باشد و یا حتی الامکان از لحاظ

ساختاری متفاوت از همولوگ آن در میزبان باشد. آنزیم‌ها تنظیم کننده‌های کلیدی فرایندهای سلولی می‌باشند و به عنوان اهداف دارویی برای درمان بیماری لیشمانیوز مورد توجه می‌باشند. در این میان، آنزیم‌های فرایندهای گلیکولیز و چرخه کربس اهمیت ویژه‌ای دارند. متابولیسم انرژی تریپانوزوماتیدها صرفاً وابسته به منابع کربنی در دسترس می‌باشد و به دلیل عدم وجود چرخه کربس عملکردی در آن‌ها، از گلیکولیز به عنوان تنها منبع تولید انرژی (ATP) استفاده می‌کنند. آنزیم‌های گلیکولیتیک در اندامک منحصراً به فرد شبیه پراکسی زوم تحت عنوان گلیکوزوم تجمع یافته‌اند. لذا با توجه به ویژگی منحصراً به فرد گلیکوزوم در لیشمانیا و همچنین فاصله فیلوژنتیکی زیاد آن‌ها با میزبان پستاندار، می‌توان از این ویژگی‌ها در جهت معرفی مهارکننده‌های اختصاصی براساس ساختار آنزیم‌ها، بهره جست (۱۰). مالات دهیدروژناز به عنوان یک آنزیم مهم در تولید انرژی، در فرایندهای گلیکولیز و چرخه کربس با احیا اگزالوآستات به مالات، مشارکت دارد. بر اساس مطالعه Leroux و همکاران، سه ایزو آنزیم مالات دهیدروژناز سیتوزولیک، گلیکوزومی و میتوکندریایی در لیشمانیا موجود است. همچنین این سه ایزو آنزیم تفاوت اندکی در خصوصیات بیوشیمیایی در گونه‌های لیشمانیا دارند که بیانگر سازگاری متابولیکی انگل با محیط‌های مختلف است که در طول مراحل رشد خود در معرض آن قرار می‌گیرند (۱۵). در بسیاری از تریپانوزوماتیدها، سوکسینات یک محصول مهم و نهایی ایجاد شده از متابولیسم گلوکز است و مسیر منتهی به تولید آن سال‌ها مورد بحث بود. با توجه به این که سوکسینات از یک مسیر منشعب از فسفوانول پیرووات تولید می‌شود، مالات دهیدروژناز گلیکوزومی در روند تبدیل فسفوانول پیرووات به مالات مشارکت دارد که در نهایت توسط فوماراز به سوکسینات تبدیل می‌شود و یا این که مالات مجدداً وارد چرخه کربس می‌گردد و توسط مالات دهیدروژناز میتوکندریایی به مسیر خود ادامه می‌دهد (۱۶). براساس نتایج مطالعه

مقاومت دارویی در لیشمانیا با روش پروتئومیکس در توسط Brotherton و همکاران، مسیرهای متابولیکی گلیکولیز و چرخه کربس به عنوان مسیرهای تنظیم شده در گونه مقاوم به آمفوتریسین، شناسایی شدند. در مطالعه مذکور مالات دهیدروژناز گلیکوزومی و میتوکندریایی نیز در گونه مقاوم تغییر کرده بودند که بیانگر نقش مهم آن در ایجاد مقاومت دارویی می‌باشد (۱۶). با توجه به این یافته‌ها، مالات دهیدروژناز می‌تواند به عنوان هدف دارویی مهم ذکر گردد. البته ترکیب دارویی Licochalcone A نیز بر روی لیشمانیا بررسی شده که موجب تغییر ساختار میتوکندری شده و مکانیسم اثر آن نیز بر روی مالات دهیدروژناز میتوکندریایی معرفی شده است (۱۷). با این حال، در مطالعه حاضر، بر روی مالات دهیدروژناز متمرکز گردید که تا کنون چنین مطالعه پروتئومیکس و محاسباتی انجام نشده است. لذا معرفی داروهای بالقوه جدید برای مهار مالات دهیدروژناز گلیکوزومی در گونه‌های *L. ماژورول*، *تروپیکا*، هدف اصلی مطالعه می‌باشد.

تکنولوژی نو ظهور پروتئومیکس در زمینه لیشمانیا می‌تواند با استفاده از آنالیز همزمان پروتئین‌ها، مشخصات بیان پروتئین در انگل لیشمانیا، الگوی پروتئینی در تعامل انگل - میزبان و الگوی پروتئینی در نمونه‌های بیمار، به شناسایی اهداف درمانی جدید و مطالعه تاثیرات دارویی بر مسیرهای متابولیک انگل، منجر گردد (۱۸، ۱۹). امروزه رویکردهای بیوانفورماتیک در شناسایی اهداف بالقوه بسیار حائز اهمیت می‌باشند (۲۰، ۲۱). داکینگ به عنوان یک الگوریتم کامپیوتری، نحوه اتصال ترکیب شیمیایی به جایگاه اتصال و یا جایگاه فعال پروتئین هدف را نمایش می‌دهد و در نهایت ترکیبات مورد بررسی را بر مبنای اندازه انرژی اتصال رتبه‌بندی می‌کند (۲۲). این روش به عنوان یکی از پرکاربردترین ابزار در طراحی دارویی است و می‌تواند به طور صحیح، مناسب بودن یک ترکیب به عنوان مهارکننده یک پروتئین ویژه را پیشگویی کند (۲۳). در نهایت ترکیبات با

انجام آنالیز پروتئومیک در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند (۱۸). این مطالعه در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شناسه اخلاق IR.SBMU.RETECH.REC.1399.1017 به تصویب رسیده است. رضایت آگاهانه از تمام بیماران شرکت کننده در مطالعه دریافت شد.

آنالیز پروتئومیکی

در این مرحله، ابتدا پروتئین‌های انگل استخراج شدند. بدین ترتیب که سلول‌ها در بافر لیز حاوی گلیسرول، اوره ۸ مولار، مهارکننده پروتئاز، DTT، Tween-20 و Tris-HCL به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس در دور ۱۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی حاوی پروتئین‌های محلول جمع‌آوری شدند (۲۶). سپس پروتئین‌های مربوط به هر یک از گونه‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی (LC-MS/MS) برای تعیین محتوی پروتئومیکی آن‌ها بررسی شدند. هر گروه مطالعه به صورت سه بار تکرار با روش کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی آنالیز شدند (۲۷).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های پروتئومیکی با استفاده از آزمون Student t-test در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. میزان تغییر پروتئین (FC: Fold Change) با تقسیم مقادیر میانگین سه تکرار در هر گروه برای هر پروتئین شناسایی شده، محاسبه شد. پروتئین‌ها با تفاوت‌های بیشتر از ۲ ($FC > 2$) و $P < 0.05$ به عنوان پروتئین‌های تغییر یافته بین گونه‌ها مشخص شدند. پروتئین‌های دارای بیان در هر دو گونه، برای ادامه کار انتخاب شدند.

پیشگویی و آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین

شبکه برهمکنش پروتئین مربوط به پروتئین‌های مشترک دو گونه با استفاده از پایگاه داده STRING

نتایج مناسب داکینگ سنتز شده و در آزمایشگاه و یا در سیستم‌های زنده مورد بررسی قرار گیرند. در خصوص معرفی هدف دارویی برای انگل *لیشمانیا* بایستی به این نکته توجه نمود که پروتئین هدف برای بقا انگل ضروری باشد و در صورت مهار آن، چرخه رشد انگل کند و یا متوقف گردد (۲۴). لذا این مطالعه با ادغام فناوری پروتئومیک و داکینگ مولکولی با هدف شناسایی داروهای جدید دارای پتانسیل ضد لیشمانیایی و فعالیت مهارکنندگی اهداف دارویی منتخب از میان داروهای مورد پذیرش سازمان غذا و دارو امریکا انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری، کشت و شناسایی نمونه‌ها

این مطالعه تجربی، بر روی موارد مشکوک بالینی لیشمانیوز جلدی مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی تهران و شیراز، جهت تشخیص انگلی انجام شد. اسمیر از طریق نمونه برداری از مرز ضایعات پوستی مربوط به هر مورد تهیه شد. اسمیرها با استفاده از میکروسکوپ نوری به طور دقیق مشاهده و وجود اجساد لیشتن جستجو گردید. ضایعات پوستی حاوی اجساد لیشتن در محیط NNN (Novy-Nicolle-Mc Neal) کشت شد تا فاز پروماستیگوت به دست آید (۱۸). گونه‌ها با استفاده از تکنیک پلی مورفیسم طول زنجیره‌ای واکنش محدود زنجیره‌ای پلیمرز (PCR-RFLP) شناسایی شدند (۲۵) از هر گونه *L. مائورول*، *تروپیکا*، پنج ایزوله ایرانی جمع‌آوری شد. به منظور کشت انبوه جهت آنالیز پروتئومیکی، پروماستیگوت‌ها به محیط کشت مایع RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله غیرفعال شده با حرارت، ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین و ۱۰۰ U/ml پنی سیلین منتقل شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از گذشت ۸ روز، تعداد 10^7 انگل در فرم متاسیکلیک در هر میلی لیتر از طریق شمارش با استفاده از لام ثوبار برداشت و جمع‌آوری شد و جهت

پیشگویی گردید (۲۸). سپس شبکه پروتئینی با معیارهای مرکزیت از جمله درجه هر پروتئین (node degree) برای شناسایی پروتئین‌های کلیدی (hub) به عنوان اهداف دارویی بالقوه با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape تحلیل شد (۲۹). درجه هر پروتئین بیانگر تعداد پروتئین‌هایی است که با پروتئین مورد نظر مرتبط می‌باشند و هر چه این میزان بالاتر باشد بیانگر اهمیت بالای آن پروتئین می‌باشد (۳۰).

شناسایی، مدل‌سازی و پیشگویی ساختار سه بعدی اهداف دارویی

در این مرحله، اهداف دارویی شناسایی شده از طریق آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین، در سایت NCBI Blast علیه پروتئوم انسانی جهت شناسایی پروتئین‌های که با انسان دارای همولوژی نباشند، بلاست شدند. همچنین جهت اطمینان بیشتر، پروتئین‌های دارای ارتولوگ با پروتئوم انسان از طریق پایگاه داده TDR (<http://tdrtargets.org/targets/search>) فیلتر شدند (۳۱). پروتئین‌های اهداف دارویی بالقوه، در پایگاه داده Protein Data Bank: PDB (<http://www.rcsb.org>) برای ساختار سه بعدی مناسب شان جستجو شدند. ساختار سه بعدی پروتئین‌ها با عدم وجود ساختار سه بعدی در این پایگاه داده، با استفاده از روش همولوژی مدلینگ در پایگاه داده I-TASSER پیشگویی شد (۳۲).

بازیابی ترکیبات دارویی (انتخاب لیگاندها)

ابتدا ترکیبات دارویی دارای تاییدیه FDA از پایگاه داده (www.drugbank.ca) (DrugBank)، بازیابی گردید. سپس پردازش و اصلاحات ساختار سه بعدی ترکیبات استخراج شده با انجام به حداقل رساندن انرژی توسط نرم‌افزار HyperChem و با استفاده از روش مکانیک مولکولی انجام شد. در مرحله پردازش، ترکیبات شامل، ترکیبات معدنی (که حاوی اتم کربن نمی‌باشند)، ترکیبات مخلوط شده با نمک حذف گردید، ترکیبات حاوی

اتم‌های نادر (شامل سلنیوم، سیلیکون، طلا و پلاتین) حذف شدند، ترکیبات فلزات سنگین حذف شدند و همچنین ترکیباتی که به طور دائم باردار بودند نیز حذف گردیدند (۳۳). سپس ساختارهای سه بعدی لیگاندها از لحاظ انرژی بهینه‌سازی شدند و در نهایت، تعداد ۱۳۸۸ ترکیب برای انجام داکینگ انتخاب شدند.

داکینگ مولکولی (غربالگری مجازی)

جهت انجام داکینگ از برنامه اتوداک وینا (AutoDock Vina) استفاده شد. جعبه (گرید یا Box) به صورتی تعریف شد تا تمامی پروتئین را پوشش دهد. فضای سه بعدی برای داکینگ (منظور جایگاه فعال و آمینواسیدهای واکنش دهنده) در ساختار سه بعدی مشخص شد که اصطلاحاً به آن گرید می‌گویند. در برنامه اتوداک می‌توان آمینواسیدهای واکنشگر پاکت اتصال را با ابزارهای نمایشگر برنامه مشخص کرد و سپس طوری گرید را تعبیه کرد که آمینواسیدها در آن چارچوب قرار گیرند. در صورت عدم آگاهی، بایستی بزرگترین جعبه ممکن ایجاد گردد.

آنالیز نتایج داکینگ

پس از انجام داکینگ، نتایج به دست آمده ارزیابی و با هم مقایسه شدند. مهم‌ترین فاکتور در این زمینه ارزیابی انرژی اتصال (Binding energy) می‌باشد. هر چه انرژی اتصال منفی‌تر باشد، انجام واکنش از نظر شیمیایی محتمل‌تر است. لذا پس از اتمام داکینگ، برنامه LIGPLOT⁺ جهت ارزیابی پیوندهای هیدروژنی و آبگریز بین لیگاند و رسپتور و همچنین تعداد و طول آن‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج روش پروتئومیک

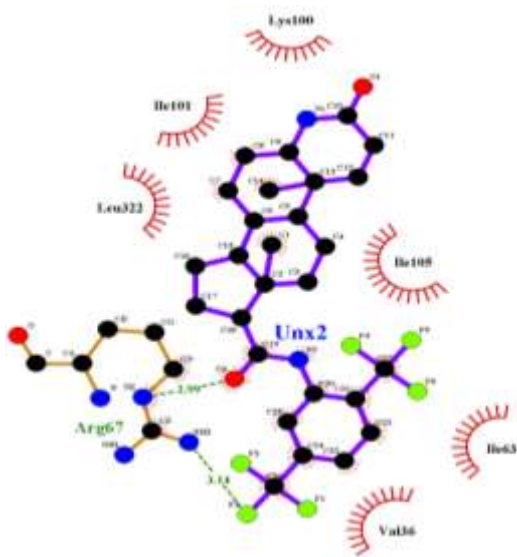
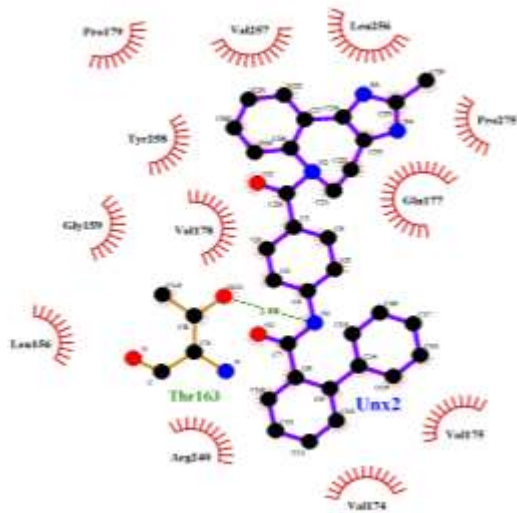
با به کارگیری روش کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی (LC-MS/MS)، الگوی پروتئومیکی

مشخصات باکس به شرح زیر می باشد:

center_x = ۵۷ ، center_y = ۶۲

center_z = ۶۱ ، size_x = ۳۴

size_y = ۴۴ ، size_z = ۴۰



تصویر شماره ۳: آمینو اسیدهای درگیر در تشکیل پیوند دهیدروژنی (خط چین سبز رنگ) و هیدروفوبی (خط چین قرمز رنگ) ترکیب الف: conivaptan و ب: Avodart با گلیکوزومال ملات دهیدروژناز توسط نرم افزار LigPlot. با شناسایی اسید آمینه ها در تشکیل پیوند بین دارو و پروتئین هدف می توان از آن ها در طراحی دارو و تعیین قدرت مهارکنندگی آن ها بهره برداری کرد.

○ C-score= 1.19
○ Estimated TM-score= 0.88±0.07
○ Estimated RMSD= 3.9±2.6 Å



تصویر شماره ۲: مشخصات پروتئین گلیکوزومال ملات دهیدروژناز مدل سازی شده بر اساس روش تشابه (Homology modeling) با استفاده از برنامه برخط I-TASSER (On-line).

نتایج داکینگ مولکولی

تعداد ۱۳۸۸ ترکیب دارویی با ساختار مدل شده برای آنزیم گلیکوزومال ملات دهیدروژناز، با استفاده از نرم افزار اتو داک وینا تحت داکینگ قرار گرفت و جعبه (Box) به صورتی تعریف شد تا کل پروتئین را پوشش دهد. نتایج مربوط به ۱۰ داروی دارای بیشترین انرژی اتصال به پروتئین، در جدول شماره ۱ مشخص شده اند. داروهای conivaptan و Avodart به ترتیب دارای کمترین انرژی اتصال و در نتیجه دارای محکم ترین و مناسب ترین اتصال بوده و به عنوان داروهای مناسب جهت آنالیزها و انجام آزمایشات بعدی در آزمایشگاه و سلول زنده مورد توجه می باشند. نتایج داکینگ مولکولی دو داروی conivaptan و Avodart با جزئیات مربوطه در تصویر شماره ۳ نشان داده شده اند که نتایج بیانگر این است که این ترکیبات به ترتیب با آمینو اسیدهای Thr163 و Arg67 در برهمکنش دهیدروژنی شرکت می کنند (تصویر شماره ۳).

جدول شماره ۱: لیست دارو های بیشترین تمایل اتصال برای گلیکوزومال ملات دهیدروژناز. نتایج داکینگ به صورت انرژی اتصال بین داروها با پروتئین هدف گزارش می شود که هر چقدر انرژی اتصال منفی تر باشد، اتصال قوی تر است. دو داروی Avodart و conivaptan در میان ده داروی برتر از نظر اتصال از اولویت برخوردارند.

نام دارو	انرژی آزاد اتصال (kcal/mol)	شناسه لیگاند (دارو) در DrugBank	شناسه لیگاند (دارو) در پایگاه داده ZINC	اسیدهای آمینه مشارکت کننده در پیوند هیدروژنی	طول پیوند هیدروژنی (آنگستروم)	اسیدهای آمینه مشارکت کننده در پیوند هیدروژنی
conivaptan	-۱۰/۵	DB08911	ZINC000012503187	Thr163	۲/۸۸	Val174/Val175/Arg240/Leu156/ Gly159/Val178/Gln177/Pro275/ Leu256/Val257/Pro179/Tyr258/ Val178/Gly159
Avodart	-۱۰/۲	DB00762	ZINC000003932831	Arg67	۲/۹۹	Val36/Ile63/Ile105/Leu322/ Ile101/Lys100
Dihydroergotamine	-۹/۸	DB04868	ZINC000003978005	-	-	Thr94/Asp186/Arg95/Ser185/ Asn310/Pro128/His184/Asn130/ Asn127/Met234/Arg89
Lifitegrast	-۹/۸	DB09048	ZINC000084668739	Gly86/ Asp35	3/23,3/11	Gly11/Ile13/Gly12/Pro88/Ile63/ Ala85/Ile105/Arg67/Gly104/ Asp108/His65/Gly64/Gly8
Enasidenib	-۹/۷	DB11691	ZINC000222731806	Thr218	۳/۰۹	Gly217/Asn127/His184/Ser185/ Asn130/Ser131/Asn310/Pro128/ Arg95/Asp186/Arg89
Nilotinib	-۹/۶	DB06210	ZINC000006716957	Arg67	۳/۱۲	His65/Asp108/Gly64/Ile105/Gly104/ Phe34/Val36/Gly86/Ile63/Val87
Ergotamine	-6/9	DB00444	ZINC000052955754	-	-	Leu256/Pro275/Gln177/Arg240/ Leu156/Lys244/Gly159/Thr163/ Val174/Val178/Tyr258
Differin	-4/9	DB00872	ZINC000003784182	Gly86/ Gly11/ Asp35	2/81,3/33,3/26	Asp108/Gly104/Ile63/Arg67/His65/ Gly64/Ile105/Val84/Ala85/Gly8
Ponatinib	-۹/۴	DB00385	ZINC000036701290	Arg67, Asp108	3/01,3/20	Gly86/Asp35/Val36/Phe34/Leu111/ Leu107/Leu322/Gly64/Ile63/Ile105
Paliperidone	-۹/۳	DB08827	ZINC000001481956	Gln177	2/80	Gln195/Pro275/Tyr258/Leu256/ Val178/Val257/Leu160/Gly159/ Arg240/Leu156/Pro179

بحث

پاسخگویی به درمان با این داروها نیز گزارشات می موجود است. آقای پور محمدی و همکاران در مطالعه ای پاسخ بالینی به درمان لیشمانیوز جلدی با گلوکانتیم، داروی انتخابی برای تمام انواع لیشمانیوز در ایران، را بررسی کرده اند. در مطالعه مذکور، پاسخ به درمان ۶ هفته پس از شروع درمان مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه پورمحمدی، سطح قابل توجهی از عدم پاسخگویی به گلوکانتیم را در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ناشی از *L. مازور* در ایران را نشان داده که این نتایج نیاز به ترکیبات درمانی جدید را برجسته می کند (۳۵). با توجه به مطالب فوق، شناسایی اهداف دارویی کارآمدتر، یکی از مهم ترین اهداف در زمینه تحقیقاتی بیماری لیشمانیوز می باشد. لذا در این مقاله با مطالعه پروتئین های متاسیکلیک *L. مازور* و تروپیکا، اهداف دارویی بالقوه جدید و مشترک بین دو گونه و ترکیبات دارویی نوین با استفاده از داکینگ مولکولی معرفی شدند. بدین ترتیب که شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین مربوط به

آنتیموان ها به عنوان خط اول درمان بیماری لیشمانیوز به مدت ۶۰ سال گذشته مطرح هستند. با این حال مکانیسم های دقیق سلولی - مولکولی عملکردشان به خوبی توصیف نشده اند. نتایج گروهی از مطالعات در این مورد نشان داد که این داروها به وسیله مهار گلیکولیز و بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب عمل می کنند. علاوه بر این، اهداف ویژه در این مسیرهای متابولیکی برای داروها شناسایی نشده اند. شواهد اخیر نشان می دهند که این داروها، انگل را به واسطه مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز)، قطعه قطعه کردن ژنوم و غیره از بین می برند و دارای عوارض جانبی زیاد، کارایی پایین، طول دوره درمان طولانی و هزینه بالایی هستند (۱۰). همچنین گلوکانتیم دارای تاثیرات جانبی بر روی شاخص های خونی نیز می باشد (۳۴). با این حال، ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی (SbV) هنوز خط اول درمان برای لیشمانیوز در نظر گرفته می شود، و از مقاومت دارویی و عدم

پروتئین‌های دارای بیان مشترک بین گونه‌های مورد مطالعه، ترسیم و تحلیل شد. اهداف دارویی با در نظر گرفتن شاخص درجه پروتئین انتخاب شدند. در واقع پروتئین‌های دارای مقادیر بالاتر این شاخص‌ها از لحاظ اهمیت و احتمال هدف دارویی بودن ارزشمندتر می‌باشند (۳۶). ولی آنچه که برای معرفی اهداف دارویی در این مطالعه مد نظر بود این که این اهداف در میزان انسان وجود نداشته و با متفاوت از همولوگ خود باشند. با در نظر گرفتن تمام این شاخص‌ها و حذف پروتئین‌هایی که دارای همولوژی با انسان بودند، نهایتاً متیل ترانسفراز و گلیکوزومال مالات دهیدروژناز به عنوان اهداف مورد نظر معرفی شدند. یکی از دلایل مهم انتخاب این آنزیم‌ها، نداشتن همولوژی با پروتئوم انسانی می‌باشد که در فرایند تولید دارو از اهمیت بالایی برخوردار است. از آنجایی که برای پروتئین گلیکوزومال مالات دهیدروژناز و متیل ترانسفراز پایگاه داده PDB ساختاری یافت نشد، با استفاده از روش همولوژی مدلینگ با استفاده از برنامه I-TASSER، ساختار سه بعدی آن‌ها پیشگویی شد (۳۷). پروتئین متیل ترانسفراز نیز با توجه به این که دارای همولوژی کم‌تر از ۳۰ درصد با ساختارهای PDB بود، از انجام داکینگ کنار گذاشته شد. مالات دهیدروژناز گلیکوزومی از جهت این که در فرایند تولید انرژی و همچنین تولید سوکسینات در انگل لیشمانیا مشارکت دارد، هدف بودن این آنزیم می‌تواند در فرایندهای سلولی انگل ایجاد اختلال کرده و باعث متوقف شدن مراحل رشد انگل شود. در مطالعه‌ای دیگر، آنزیم پیرووات کیناز فرایند گلیکولیز، از طریق زیست سامانه‌ای (System Biology) و داکینگ مولکولی، بررسی شده و داروهای بالقوه جدید برای مهارش مطرح شده است (۳۸). اگرچه در سال‌های گذشته مطالعه داروی A Licochalcone بر روی مالات دهیدروژناز میتوکندریایی توسط محققین صورت پذیرفته است، ولی مطالعه حاضر از جوانب بسیاری با مطالعات گذشته تفاوت داشته و نوع گلیکوزومی این آنزیم بررسی و بحث می‌گردد (۱۷).

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی در روش‌های طراحی دارو صورت گرفته است. در حقیقت می‌توان طراحی مستقیم و معنی‌دار داروها را برای یک پروتئین هدف داشت که به میزان قابل توجهی می‌تواند مسیر کشف و تکامل داروهای جدید را کوتاه نماید (۳۹). در واقع روش‌های *In-silico* قادرند در شناسایی اهداف دارویی یاری‌کننده باشند، همچنین از آن‌ها می‌توان جهت آنالیز ساختارهای هدف برای نواحی اتصالی فعال ممکن، ساخت مولکول‌های برگزیده شده، بررسی شباهت‌های دارویی، داکینگ این مولکول‌ها با هدف امتیازدهی به آن‌ها بر مبنای اتصال آن‌ها و بهینه‌سازی بیش‌تر مولکول جهت بهبود خصوصیات اتصالی استفاده کرد. ادغام روش‌های تجربی و انفورماتیکی، شانس موفقیت در بسیاری از مراحل فرایند کشف، از شناسایی هدف‌های جدید و توضیح عملکردشان گرفته تا کشف و توسعه ترکیبات هدف یا خواص مورد نظر را افزایش می‌دهد. ابزارهای محاسباتی سبب می‌شوند که طراحی برای هدف‌های جدید سریع‌تر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر گردد. از این روش‌ها می‌توان به داکینگ اشاره نمود که به معنی تعیین محاسباتی وابستگی اتصال بین پروتئین و لیگاند است. نتیجه‌ای که از مطالعات داکینگ به‌دست می‌آید، این امکان را می‌دهد که سنتز و ارزیابی آزمایشگاهی ترکیبات کم‌تری را انجام داده و همچنین در میان ترکیباتی که مورد بررسی قرار می‌گیرد، درصد بیش‌تری از آن‌ها مهارکننده فعال باشند. از نکات حائز اهمیت در این مطالعه استفاده از داروهای مورد تایید سازمان غذا و دارو (FDA) است. در مطالعه حاضر، در میان کتابخانه دارویی، با توجه به نتایج داکینگ مولکولی، ترکیب conivaptan (DB00872, Dock Score:-10.5) به عنوان مهارکننده بالقوه با اهمیت برای گلیکوزومال مالات دهیدروژناز شناسایی و پیشنهاد شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این دارو می‌تواند کاندید خوب برای انجام آزمایشات بیولوژیکی در شرایط مختلف *in-vivo* و *in-vitro* و امید بخش برای ایجاد داروی

محاسباتی از جمله روش‌های پیش‌بینی دارو برای اهداف پروتئینی، در زمینه کشف دارو از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. مطالعه حاضر می‌تواند مسیر را برای استفاده وسیع از غربالگری مجازی و داکینگ مولکولی جهت کشف داروهای درمان‌کننده لیشمانیوز هموار سازد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت و پرسنل مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و سایر کسانی که ما را در انجام مطلوب این مطالعه یاری دادند، سپاسگزاری می‌نمایم.

جدید در درمان لیشمانیوز باشند، چرا که این دارو توسط FDA تایید شده است. تمامی داروهای تشخیصی با تمایل اتصال بالا برای پروتئین‌های هدف از لحاظ سمیت در پایگاه داده DrugBank جستجو شدند که برای داروهای Nilotinib، Conivaptan، Lifitegrast و Differin در این پایگاه داده هیچ گونه سمیتی برای آنها گزارش نشده است. از میان این داروها همچنین Differin هم اکنون به عنوان داروی برای درمان آکنه و مشکلات پوستی به صورت موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد که از این نظر بسیار جالب توجه است (۴۰). نتایج ارائه شده در این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از مطالعات

References

1. Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis recognition and treatment. *Am Fam Physician* 2004; 69(6): 1455-1460.
2. deMonte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Légaré D, Corbeil J, Melo MN, et al. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(5): e1167.
3. World Health Organization(WHO). Framework for action on cutaneous leishmaniasis in the Eastern Mediterranean Region 2014-2018. Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2014.
4. Araujo AR, Portela Junior NC, Feitosa APS, Silva OAd, Ximenes RAA, Alves LC, et al. Risk factors associated with American cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016; 58-86.
5. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. World Health Organization, WHO Leishmaniasis Control Team Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7(5): e35671.
6. Lehlewa AM, Khaleel HA, Lami F, Hasan SAF, Malick HA, Mohammed RH, et al. Impact of modifiable risk factors on the occurrence of cutaneous leishmaniasis in Diyala, Iraq: case-control study. *JMIRx Med* 2021; 2(3): e28255.
7. Shieh WJ, Hoang MP. Cutaneous infections. *Immunohistochemistry in Diagnostic Dermatopathology*. Cambridge: Cambridge University Press; 2017.
8. Ahmadi NA, Modiri M, Mamdohi S. First survey of cutaneous leishmaniasis in Borujerd county, western Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2013; 19(10): 847-853.
9. Razmjou S, Hejazy H, Motazedian MH, Baghaei M, Emamy M, Kalantary M. A new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(7): 727-730.
10. Chawla B, Madhubala R. Drug targets in *Leishmania*. *J Parasitic Dis* 2010; 34(1): 1-13.
11. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T,

- Dias Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* 2011; 15(8): e525-e532.
12. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 111-126.
 13. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 152(1): 35-46.
 14. Amiri-Dashatan N, Koushki M, Abbaszadeh H-A, Rostami-Nejad M, Rezaei-Tavirani M. Proteomics applications in health: biomarker and drug discovery and food industry. *Iran J pharm Res* 2018; 17(4): 1523-1536.
 15. Leroux A, Fleming-Canepa X, Aranda A, Maugeri D, Cazzulo JJ, Sánchez MA, et al. Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania* spp. *Mol Biochem parasitol* 2006; 149(1): 74-85.
 16. Brotherton M-C, Bourassa S, Légaré D, Poirier GG, Droit A, Ouellette M. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist* 2014; 4(2): 126-132.
 17. Zhai L, Blom J, Chen M, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(12): 2742-2748.
 18. Ashrafmansouri M, Amiri-Dashatan N, Ahmadi N, Rezaei-Tavirani M, SeyyedTabaei S, Haghighi A. Quantitative proteomic analysis to determine differentially expressed proteins in axenic amastigotes of *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *IUBMB life* 2020; 72(8): 1715-1724.
 19. Amiri-Dashatan N, Koushki M, Rezaei Tavirani M, Ahmadi N. Proteomic-based studies on *Leishmania*. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2018; 28(163): 173-190 (Persian).
 20. Chandra N. Computational systems approach for drug target discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2009; 4(12): 1221-1236.
 21. Wadood A, Ahmed N, Shah L, Ahmad A, Hassan H, Shams S. In-silico drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process. *OA Drug Des Deliv* 2013; 1(1): 3.
 22. Gschwend DA, Good AC, Kuntz ID. Molecular docking towards drug discovery. *J Mol Recognit* 1996; 9(2): 175-186.
 23. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided drug Des* 2011; 7(2): 146-157.
 24. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac Trop Med* 2012; 5(6): 485-497.
 25. Tabrizi F, Seyyed Tabaei SJ, Ahmadi NA, Arefi Oskouie A. A Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Study to Identify Metabolite Differences between Iranian Isolates of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*. *Iran J Med Sci* 2021; 46(1): 43-51.
 26. Amiri-Dashatan N, Rezaei-Tavirani M, Zali H, Koushki M, Ahmadi N. Quantitative proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in *Leishmania major* metacyclogenesis. *Microb Pathogen* 2020; 149: 104557.
 27. Amiri-Dashatan N, Rezaei-Tavirani M, Ahmadi N. A quantitative proteomic and bioinformatics analysis of proteins in metacyclogenesis of *Leishmania tropica*. *Acta trop* 2020; 202: 105227.

28. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* 2012; 41(D1): D808-D15.
29. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 2011; 27(3): 431-432.
30. Amiri Dashatan N, Rezaie Tavirani M, Zali H, Koushki M, Ahmadi N. Prediction of *Leishmania major* key proteins via topological analysis of protein-protein interaction network. *Galen Med J* 2018; 7: e1129.
31. Magariños MP, Carmona SJ, Crowther GJ, Ralph SA, Roos DS, Shanmugam D, et al. TDR Targets: a chemogenomics resource for neglected diseases. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(D1): D1118-D1127.
32. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(W1): W174-W181.
33. Zali H, Golchin A, Farahani M, Yazdani M, Ranjbar MM, Dabbagh A. FDA approved drugs repurposing of Toll-like receptor4 (TLR4) candidate for neuropathy. *Iran J Pharm Res* 2019; 18(3):1639-1647.
34. Maleki M, Javidi Z, Taheri AR, Ebrahimi Rad M, Rasti M. A Study of Hematologic, Hepatic and Renal Side Effects of Intramuscular Injection of Meglumine Antimoniate (Glucantime) on Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Med J Mashhad Univ Med Sci* 2007; 50(3): 371-378 (Persaian).
35. Pourmohammadi B, Motazedian M, Handjani F, Hatam G, Habibi S, Sarkari B. Glucantime efficacy in the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011; 42(3): 502-508.
36. Ekman D, Light S, Björklund ÅK, Elofsson A. What properties characterize the hub proteins of the protein-protein interaction network of *Saccharomyces cerevisiae*? *Genome Biol* 2006; 7(6): R45.
37. Wang Y, Virtanen J, Xue Z, Zhang Y. I-TASSER-MR: automated molecular replacement for distant-homology proteins using iterative fragment assembly and progressive sequence truncation. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(W1): W429-W34.
38. Amiri-Dashatan N, Rezaei-Tavirani M, Ranjbar MM, Koushki M, Nasab SDM, Ahmadi N. Discovery of novel pyruvate kinase inhibitors in *Leishmania major* among FDA approved drugs through a system biology and molecular docking approach. *Turkish J Pharm Sci* 2021; 53367.
39. Rao VS, Srinivas K. Modern drug discovery process: an in silico approach. *J Bioinform Sequence Analys* 2011; 2(5): 89-94.
40. Rusu A, Tanase C, Pascu G-A, Todoran N. Recent Advances Regarding the Therapeutic Potential of Adapalene. *Pharmaceuticals* 2020; 13(9): 217.