

بررسی برهم‌کنش مواد موثر عصاره زعفران با پروتئین نورآمینیداز ویروس آنفولانزا با رویکرد شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

مریم بندخت^۱، سپیده امجد ايراق^{۲*}

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

^۲ استادیار، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

*Amjad_i_s@aut.ac.ir

چکیده

بیماری‌های حاد تنفسی از جمله آنفولانزا، به دلیل افزایش مقاومت به داروهای ضد ویروس، همچنان یکی از چالش‌های مهم سلامت جهانی به‌شمار می‌روند. در این پژوهش، به منظور بررسی رفتار ترکیبات گیاهی، برهم‌کنش دو ترکیب زیست‌فعال زعفران شامل پیکروکروسین و سافرانال با پروتئین نورآمینیداز ویروس آنفولانزا با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مطالعه شد. شبیه‌سازی‌ها در شرایط فیزیولوژیکی انجام شد. آنالیزهای SASA، RDF، RMSD، شعاع ژیراسیون و پتانسیل الکترواستاتیک انجام گردید. نتایج آنالیز RMSD نشان داد که پیکروکروسین تغییرات ساختاری در پروتئین ایجاد می‌کند. آنالیز RDF نشان داد که سافرانال در فواصل نزدیک‌تری نسبت به پیکروکروسین در اطراف پروتئین دیده می‌شود (در شعاع ۰/۸ نانومتری). همچنین آنالیز SASA افزایش آب‌دوستی سطح پروتئین را در حضور سافرانال تایید کرد. این یافته‌ها، بینشی در مقیاس مولکولی از برهم‌کنش ترکیبات زیست‌فعال زعفران با پروتئین‌های ویروسی فراهم می‌کنند. نتایج نشان داد که این عصاره‌ها می‌توانند در مواجهه با ویروس آنفولانزا موثر باشند و می‌توان از آن‌ها به عنوان مهارکننده پروتئین نورآمینیداز ویروس آنفولانزا نام برد.

کلمات کلیدی: شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، عصاره‌های گیاهی، برهم‌کنش پروتئین-لیگاند، پروتئین نورآمینیداز، ویروس آنفولانزا

Investigation of the Interaction Between Saffron-Derived Bioactives and Influenza Virus Neuraminidase Using Molecular Dynamics Simulation

Keywords: Molecular Dynamics Simulation, Herbal Compounds, Protein-Ligand Interaction, Influenza Neuraminidase, Influenza Virus

Abstract

Acute respiratory diseases, including influenza, remain major global health challenges due to the increasing resistance to antiviral drugs. In this study, to investigate the interaction behavior of herbal compounds, the interactions of two saffron-derived bioactive compounds, Picrocrocin and Safranal, with influenza neuraminidase were examined using molecular dynamics simulations. All simulations were performed under physiological conditions. SASA, RDF, RMSD, gyration radius and electrostatic potential were done. The results of RMSD analysis indicated that picrocrocin induced pronounced structural changes in the protein. RDF analysis demonstrated that safranal remained closer to the neuraminidase surface (approximately 0.8 nm), in comparison to picrocrocin. In addition, SASA analysis showed an increased surface hydrophilicity of the protein in the presence of safranal. These findings provide molecular-level insight into the interactions of saffron-derived

bioactive compounds with viral proteins. The results showed that these bioactive compounds can be effective in interacting with influenza virus and they can be used as influenza virus neuraminidase inhibitor.

۱- مقدمه

ویروس آنفولانزای A (IAV)^۱ همچنان یکی از چالش‌های عمده سلامت جهانی محسوب می‌شود و سالانه حدود ۵ تا ۱۵ درصد از جمعیت جهان را آلوده کرده و موجب صدها هزار مرگ‌ومیر در سراسر دنیا می‌گردد [۱، ۲]. واکسیناسیون نقش کلیدی در پیشگیری از آنفولانزا ایفا می‌کند؛ با این حال، تغییرات مداوم در سویه‌های ویروسی، اثربخشی بلندمدت آن را کاهش داده و نیازمند به‌روزرسانی‌های منظم است [۳]. داروهای مورد استفاده برای درمان آنفولانزا شامل داروهایی هستند که با مهار بخش‌هایی از ویروس، از تکثیر آن جلوگیری می‌کنند. این داروها شامل مهارکننده‌های کانال یونی M2 مانند آمانتادین^۲ و ریمانتادین^۳ و همچنین مهارکننده‌های نورآمینیداز^۴ مانند اوسلتامیویر^۵، زانامیویر^۶ و پیرامیویر^۷ هستند. با این حال، مقاومت دارویی، فراهمی زیستی پایین و دفع سریع این داروها باعث کاهش کارایی آن‌ها شده است [۴]. به همین دلیل، نیاز به روش‌های درمانی جدید که پروتئین‌های مهم ویروس مانند نورآمینیداز را هدف قرار دهند، بیش از پیش احساس می‌شود [۵، ۶]. ساختار کلی ویروس آنفولانزای A شامل پروتئین‌های هم‌اگلوتینین (HA)^۸، نورآمینیداز (NA) و کانال یونی M2 در شکل (۱) نشان داده شده است.

ویروس آنفولانزا به چهار نوع اصلی A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شود [۷]. ویروس‌های آنفولانزای A قادر به آلوده‌سازی طیف وسیع‌تری از میزبان‌های جانوری نسبت به ویروس‌های آنفولانزای B هستند که تنها انسان‌ها، فک‌ها و راسوها را مبتلا می‌کنند؛ ویروس‌های آنفولانزای C که انسان‌ها، سگ‌ها و خوک‌ها را درگیر می‌کنند و ویروس‌های آنفولانزای D که عمدتاً دام‌ها را آلوده می‌سازند [۸]. علاوه بر این، در ویروس‌های آنفولانزای A، ۱۸ زیرگونه مختلف هم‌اگلوتینین (H1-H18) و ۱۱ زیرگونه نورآمینیداز (N1-N11) شناسایی شده است که ترکیب آن‌ها، زیرگونه ویروس آنفولانزای A را تعیین می‌کند [۹].

تکثیر ویروس آنفولانزا با عملکرد پروتئین‌های سطحی آن آغاز می‌شود که نقش اصلی را در ایجاد عفونت ایفا می‌کنند. از میان این پروتئین‌ها، هم‌اگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) اهمیت ویژه‌ای دارند. پروتئین HA با اتصال به اسید سیالیک موجود روی سطح سلول‌های میزبان، موجب چسبیدن ویروس به سلول و ورود آن به داخل سلول می‌شود و بدین ترتیب فرآیند عفونت آغاز می‌گردد. پس از تکثیر ویروس درون سلول، پروتئین NA با جدا کردن اسید سیالیک، باعث می‌شود ویروس‌های جدید از سطح سلول رها شوند و بتوانند

¹ Influenza A Virus

² Amantadine

³ Rimantadine

⁴ Neuraminidase

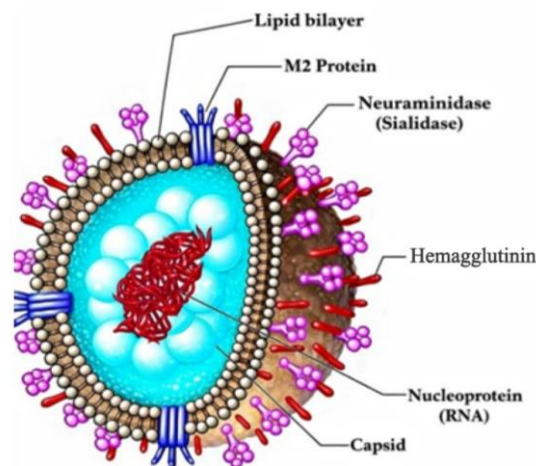
⁵ Oseltamivir

⁶ Zanamivir

⁷ Peramivir

⁸ hemagglutinin

به سلول‌های دیگر حمله کنند. به‌طور کلی، HA مسئول آغاز عفونت از طریق اتصال ویروس به سلول میزبان است، در حالی که NA نقش کلیدی در انتشار ویروس و گسترش عفونت در بدن را ایفا می‌کند [۱۰].

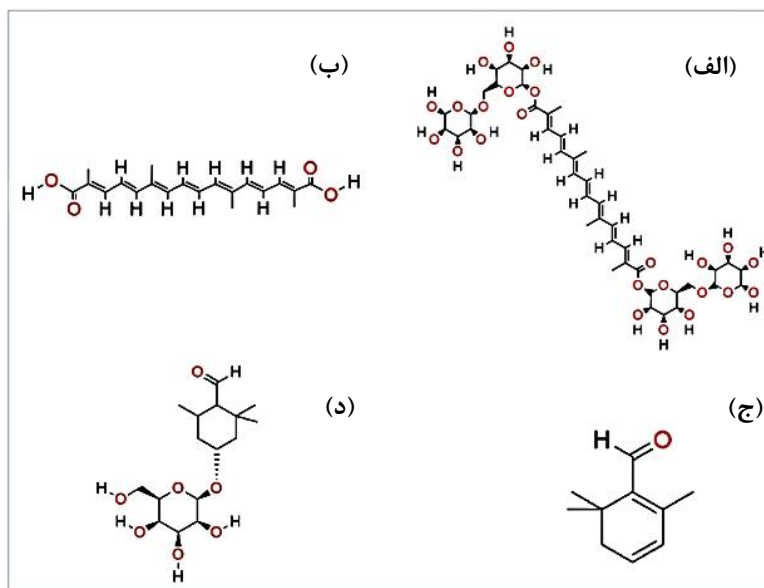


شکل ۱. نمای کلی ساختار ویروس آنفولانزای A و پروتئین‌های اصلی تشکیل‌دهنده آن، از جمله هم‌آگلوتینین (HA)، نورآمینیداز (NA) و سایر پروتئین‌های درگیر در تکثیر و پایداری ویروس [۱۱].

در سال‌های اخیر، ترکیبات طبیعی به‌عنوان گزینه‌هایی ایمن‌تر و دارای اثرگذاری چندجانبه نسبت به داروهای ضدویروسی شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۲، ۱۳]. مطالعات نشان داده‌اند که در بسیاری از موارد، ترکیبات پیچیده موجود در داروهای گیاهی می‌توانند اثرات قوی‌تری نسبت به ترکیبات خالص و جداشده داشته باشند. یکی از مزایای مهم داروهای گیاهی، وجود مجموعه‌ای از همین ترکیبات پیچیده و مختلف است که هرکدام فعالیت خاص خود را دارند و در کنار هم می‌توانند اثر کلی بیشتری ایجاد کنند [۱۴].

زعفران (*Crocus sativus* L.) که به‌طور گسترده در نقاط مختلف جهان کشت می‌شود، از دیرباز علاوه بر کاربردهای خوراکی، در حوزه درمان نیز مورد استفاده قرار گرفته‌است [۱۵، ۱۶]. این گیاه حاوی چهار ترکیب زیست‌فعال اصلی شامل کروسین، کروسستین، پیکروکروسین و سافرانال است [۱۷]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و ضدویروسی هستند [۱۸، ۱۹]. همچنین، شواهد بالینی بیانگر آن است که عصاره‌های زعفران می‌توانند با تعدیل پاسخ‌های ایمنی، به بهبود عملکرد دستگاه تنفسی کمک کنند [۲۰]. با وجود این مزایا، محدودیت‌هایی مانند حلالیت پایین، پایداری محدود و فراهمی زیستی نامطلوب این ترکیبات، استفاده مستقیم از آن‌ها را با چالش مواجه کرده است. در چنین شرایطی، روش‌های محاسباتی می‌توانند نقش مؤثری در تحلیل برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی و تفسیر

رفتار این ترکیبات در سطح مولکولی ایفا کنند. ساختار شیمیایی ترکیبات زیست فعال زعفران در شکل (۲) ارائه شده است و فعالیت های درمانی گزارش شده و نقش های حسی آن ها در جدول (۱) خلاصه شده است.



شکل ۲. ساختار شیمیایی (الف) کروسین، (ب) کروسیتین، (ج) سافرانال و (د) پیکروکروسین.

جدول ۱. ترکیبات زیست فعال اصلی زعفران و فعالیت های درمانی گزارش شده آن ها

ترکیب	نقش حسی در زعفران	اثرات زیستی اصلی	مراجع
کروسین	ایجاد رنگ قرمز تیره زعفران	آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد ویروسی (HIV-1، SARS-CoV-2، HSV-1، محافظت کننده قلب)	[۲۰-۲۶، ۱۵]
کروسیتین	مشارکت در خاصیت رنگ دهی زعفران	ضد دیابت، ضد سرطان، ضد ویروسی (اتصال به پروتئاز SARS-CoV-2)	[۲۷، ۲۶، ۱۷]
پیکروکروسین	عامل ایجاد طعم تلخ زعفران	طعم تلخ، فعالیت ضد سرطانی، تعدیل پاسخ ایمنی	[۲۹، ۲۸، ۲۵، ۱۷]
سافرانال	ایجاد عطر زعفران	ضد افسردگی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، پایداری محدود در شرایط درون تنی	[۲۷، ۲۳، ۱۷]

رویکردهای محاسباتی می توانند روش های کارآمدی در زمینه کشف دارو باشند که زمان و بودجه لازم برای بررسی و تفسیر دینامیک اتم ها و مولکول ها را کاهش می دهند [۲۶]. شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD)^۱

¹ Molecular Dynamics Simulation

یکی از ابزارهای محاسباتی قدرتمند برای بررسی برهم‌کنش‌های زیست‌مولکولی در مقیاس اتمی است که به‌طور گسترده در پژوهش‌های زیست‌پزشکی به‌منظور مطالعه برهم‌کنش بین پروتئین و لیگاند و تحلیل عملکردهای مولکولی مورد استفاده قرار گرفته است [۳۰، ۳۱]. در این روش، با استفاده از میدان‌های نیرو، می‌توان پایداری ساختاری مولکول‌ها، تغییرات شکل آن‌ها در طول زمان و میزان تمایل لیگاندها برای اتصال به پروتئین‌ها را بررسی کرد [۳۲، ۳۳]. شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی در حوزه علوم دارویی برای پیش‌بینی نفوذپذیری مواد، بررسی پایداری سامانه‌های دارویی و درک بهتر مکانیسم‌های دارورسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۴].

فراتر از کاربردهای دارویی، این روش، امکان بررسی دقیق برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی و فرایندهای دینامیکی را فراهم می‌کند که دسترسی به آن‌ها از طریق روش‌های تجربی اغلب دشوار یا غیرممکن است. از این‌رو، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در مقیاس اتمی به‌طور گسترده در سامانه‌های شیمیایی و مواد مختلف برای تحلیل روابط بین ساختار و خواص مورد استفاده قرار گرفته است [۳۵-۳۷]. پیشرفت‌های اخیر گزارش‌شده در حوزه شیمی مولکولی و مهندسی مواد نیز کارآمدی این روش را در تفسیر ساز و کارها، تحلیل انرژی برهم‌کنش و ارزیابی دینامیکی ساختار سامانه‌های مولکولی پیچیده نشان می‌دهد [۳۸، ۳۹].

مطالعات اخیر بر نقش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به‌عنوان یک ابزار محاسباتی مؤثر در طراحی منطقی سامانه‌های دارویی و تحلیل مکانیسم‌های انتقال و برهم‌کنش در سامانه‌های دارورسانی تأکید دارند [۴۰-۴۷]. این رویکردهای محاسباتی به‌ویژه در بررسی ترکیبات طبیعی اهمیت دارند، زیرا امکان ارزیابی پایداری ساختاری، حلالیت و سازگاری این ترکیبات را در سامانه‌های رهش کنترل‌شده فراهم می‌کنند [۵۳].

هر ذره بر اساس قانون دوم نیوتن یا معادله حرکت $F = ma$ (که در آن F نیروی وارد شده به ذره، m جرم آن و a شتاب آن در یک میدان پتانسیل است) حرکت می‌کند. به‌طور کلی الگوریتم دینامیک مولکولی شامل محاسبه نیروهای وارد بر ذرات و اتم‌ها در لحظه t و محاسبه سرعت و مکان جدید آن‌ها در لحظه $t + \Delta t$ با استفاده از قانون دوم نیوتن طبق رابطه (۱) است [۴۸].

$$\sum F = m \frac{d^2x}{dt^2} \quad (1)$$

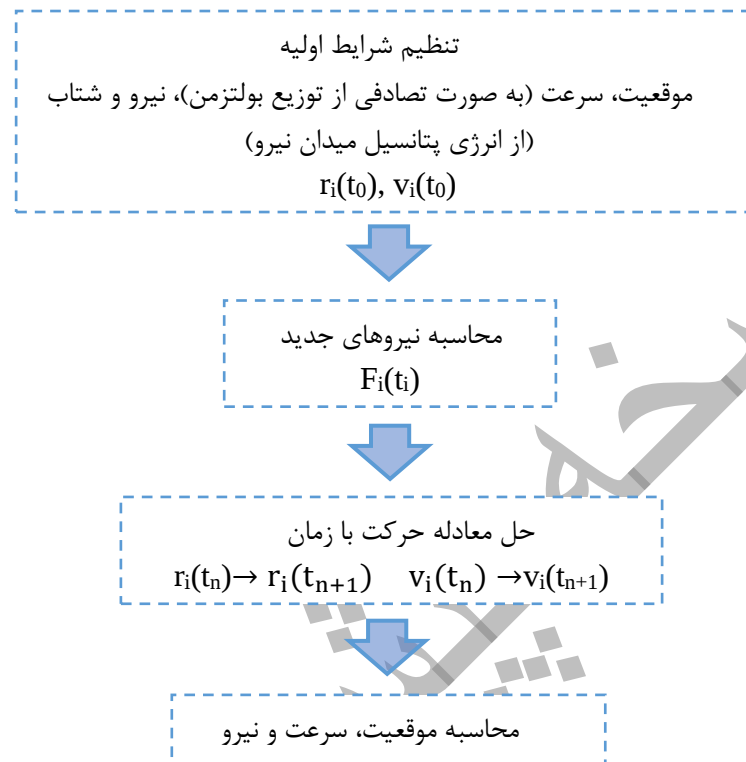
الگوهای مختلفی برای انتگرال‌گیری از معادله (۱) ارائه شده‌است که می‌توان به لیپ‌فراگ^۱، ورله^۲ و ولاسیتی‌ورله^۳ اشاره کرد که در این پژوهش از الگوریتم ورله برای انتگرال‌گیری استفاده شده‌است. تفاوت این الگوها در نحوه محاسبات مکان و سرعت اتم‌ها در گام بعدی، با توجه به گام قبلی است [۴۹]. نمای کلی مراحل

¹ Verlet

² Leap-frog

³ Velocity verlet

انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در طرحواره (۱) ارائه شده است که در آن Γ نشان‌دهنده موقعیت، v سرعت و t زمان می‌باشد.



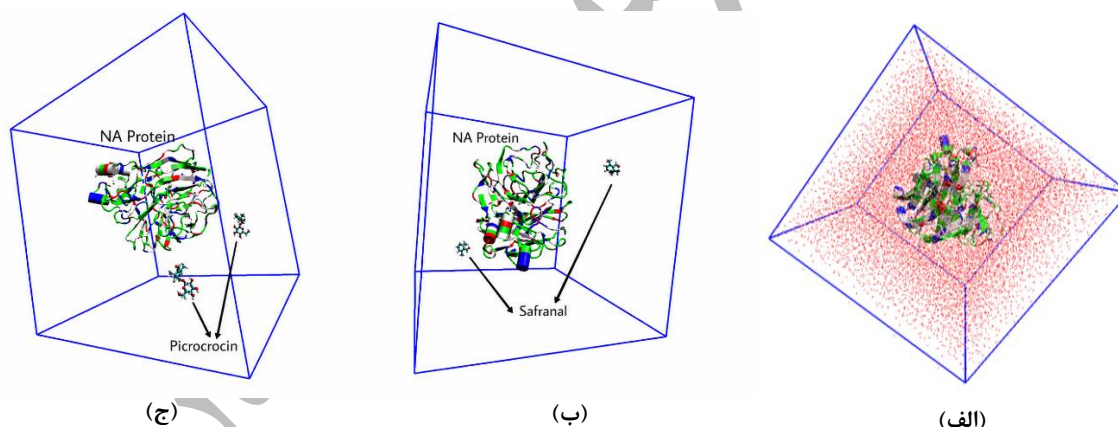
طرحواره ۱. روند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شامل تنظیم شرایط اولیه، محاسبه نیروها و به‌روزرسانی موقعیت و سرعت ذرات در طول زمان [۴۸].

در این پژوهش، پتانسیل دو ترکیب زیست‌فعال استخراج‌شده از زعفران شامل پیکروکرو سین و سافرانال به‌عنوان لیگاند‌های طبیعی هدف‌گیرنده پروتئین نورآمینیداز ویروس آنفلانزا با رویکردی مهندسی مورد بررسی قرار گرفته‌است. به‌منظور تحلیل رفتار برهم‌کنشی و پایداری ساختاری این ترکیبات، از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شده و پارامترهایی نظیر RMSD، RDF، سطح قابل‌دسترس حلال (SASA)، شعاع ژیراسیون و انرژی‌های برهم‌کنش مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. هدف اصلی این مطالعه، توسعه یک چارچوب محاسباتی برای تفسیر و شناسایی برهم‌کنش‌های مولکولی در مقیاس اتمی است، به‌گونه‌ای که نتایج حاصل بتوانند مبنایی برای تحلیل رفتار ترکیبات طبیعی و طراحی منطقی سامانه‌های دارویی و رهایش کنترل‌شده مبتنی بر این ترکیبات فراهم کنند.

۲- روش پژوهش

هدف این پژوهش، بررسی و تفسیر برهمکنش‌های پروتئین نورآمینیداز ویروس آنفلانزا در مواجهه با دو عصاره زعفران (پیکروکروسین و سافرانال)، در بستر نرم افزار گرومکس^۱ است که این عصاره‌ها می‌توانند به عنوان یک مهارکننده فعالیت این پروتئین استفاده شوند. پروتئین نورآمینیداز که هدف این پروژه است در میان پروتئین‌های دیگر این ویروس، نقش اساسی‌تری در بیماری و عفونت‌زایی دارد.

برای دستیابی به هدف پژوهش، سه سیستم در نظر گرفته‌شد و شبیه‌سازی به طور جداگانه برای آن‌ها انجام شد. سیستم اول شامل پروتئین نورآمینیداز در آب، و سیستم‌های دوم و سوم به ترتیب شامل پروتئین با دو مولکول از عصاره‌های پیکروکروسین و سافرانال هستند که تصاویر این سیستم‌ها در شکل (۳) نشان داده شده‌اند. میدان نیرو gromos96 54a7 اعمال شد، سپس درون جعبه مکعبی به ابعاد ۸٫۳۲۳۰۶ نانومتر مکعب قرار گرفت و مولکول‌های آب مدل spc برای آن‌ها انتخاب شد. دما با توجه به دمای بدن که ۳۷ درجه سلسیوس است، به مقدار ۳۱۰ کلوین ثبت شد. در ادامه برای خنثی‌سازی سیستم، دو یون سدیم به ساختار اضافه شد و برای برای انتگرال‌گیری از الگوریتم ورله و برای کمینه‌سازی انرژی از الگوریتم "steepest descent" استفاده شد.



شکل ۳. الف) ساختار پروتئین NA آب‌پوشی شده در جعبه شبیه‌سازی در زمان $t = 0$ پیکوثانیه، تصویر پروتئین NA با دو مولکول از عصاره‌های ب) سافرانال و ج) پیکروکروسین در جعبه شبیه‌سازی که به کمک نرم افزار VMD ثبت شده‌اند.

¹ Gromacs

جهت رسیدن سیستم‌ها به تعادل در دما و فشار، هنگرد NVT، با انتخاب ترموستات برندنسن^۱ و گام زمانی ۲ فمتوثانیه انجام شد. بعد از اجرای هنگرد NVT به میزان ۵۰۰ هزار گام، تغییرات دمایی بررسی شد و میانگین دمایی حین شبیه‌سازی، ۳۱۰/۰۲۳ کلوین بود. بعد از اجرای هنگرد NVT، هنگرد NPT به میزان ۲ میلیون و ۵۰۰ گام انجام شد. زمان شبیه‌سازی این مرحله ۵ نانوثانیه و باروستات آن پارینلو-رحمان^۲ انتخاب شد.

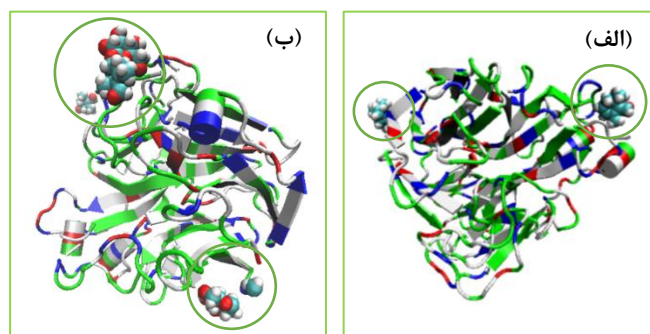
در نهایت بعد از اتمام مراحل بالا، مرحله MD روی سیستم‌ها اعمال شد؛ مرحله‌ای که اتم‌ها حرکت می‌کنند تا بتوان دینامیک مولکولی را بررسی کرد. در این مرحله، از هنگرد NPT و باروستات پارینلو-رحمان استفاده شده‌است. اجرای این مرحله بعد از ۲۵ میلیون گام به اتمام رسید. پارامترهای شبیه‌سازی سیستم‌ها به طور یکسان و متناسب با شرایط بدن تنظیم شدند تا در آخر بتوان آن‌ها را باهم مقایسه کرد و میزان برهم‌کنش‌ها را بررسی کرد.

۳- نتایج و بحث

پس از پایان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، لازم است که مکان جذب عصاره‌ها روی پروتئین NA مشخص شود تا تعیین شود که از کدام قسمت‌های پروتئین برهم‌کنش صورت گرفته‌است. ساختار پروتئین و عصاره‌ها بعد از پایان مراحل شبیه‌سازی در شکل (۴) نشان داده شده‌اند. در این شکل، بخش‌های قرمز پروتئین بیانگر قسمت اسیدی، بخش‌های سفید پروتئین بیانگر قسمت غیرقطبی، بخش‌های آبی پروتئین بیانگر قسمت بازی و بخش‌های سبز پروتئین بیانگر قسمت قطبی هستند. همانطور که در شکل (۴) مشاهده می‌شود، عصاره‌ها با پروتئین اتصال داشته‌اند و این محل‌های اتصال در جدول (۲) مشخص شده‌اند.

¹ Brendsen

² Parrinello-Rahman Barostat



شکل ۴. تصویر محل اتصال عصاره‌های الف) سافرانال و ب) پیکروکروستین به پروتئین NA.

در جدول (۲) نامگذاری محل‌های اتصال به این صورت است که از چپ به راست، سه حرف اول نوع آمینواسید و بعد شماره باقیمانده^۱ ذکر شده‌است.

جدول ۲. مکان‌های جذب عصاره‌ها روی پروتئین NA

نام عصاره	محل اتصال به پروتئین
پیکروکروستین	GLY343
	PRO342
	ASN344
سافرانال	LYS143
	SER409
	THR117

برای بررسی میزان اثر بخشی عصاره‌ها، آنالیزهای شعاع ژیراسیون (R_g)، سطح قابل دسترس حلال (SASA)، انحراف مربع میانگین ریشه (RMSD)، تابع توزیع شعاعی (RDF)، پتانسیل و برهمکنش‌های الکتروستاتیک انجام شد.

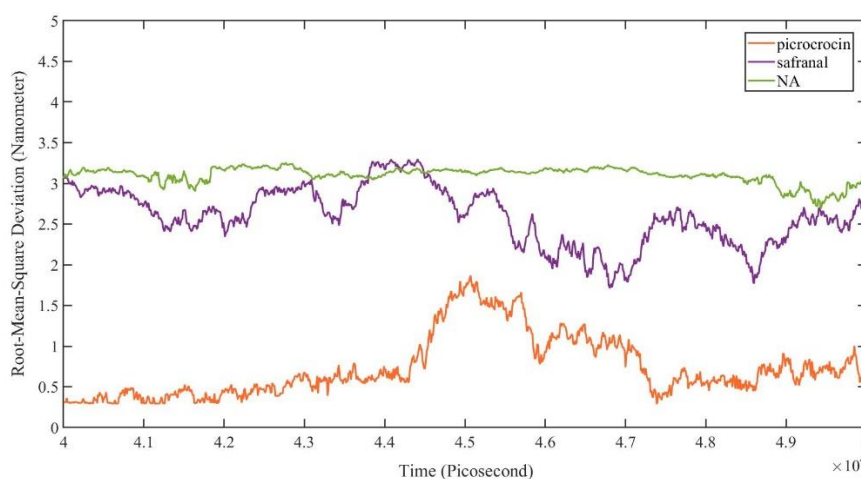
۳-۱- RMSD

انحراف مربع میانگین ریشه (RMSD)^۲ یک معیار تشابه است که به طور گسترده در تجزیه و تحلیل درشت‌مولکول‌ها استفاده می‌شود. آنالیز RMSD، نوسانات و جابه‌جایی ذرات را در بازه زمانی Δt متوسط می‌گیرد و نوسانات ساختاری نسبت به حالت مرجع سنجیده می‌شوند. معمولاً در تجزیه و تحلیل مسیرهای دینامیک مولکولی برای تعیین دوره تعادل و کیفیت شبیه‌سازی‌های زیست مولکولی استفاده می‌شود [۵۰]. این آنالیز در بازه ۴۰ تا ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی گرفته شده‌است؛ چرا که زمان‌های اولیه، برای به تعادل رساندن اجزای سیستم به کار رفته‌است. این آنالیز یک مقایسه بین حالت مرجع که در اینجا سیستم اول یعنی

¹ Residue

² Root-Mean-Square Deviation

پروتئین تنها در آب است (NA) با بقیه سیستم‌ها که جفت پروتئین-عصاره هستند انجام می‌دهد. با توجه به شکل (۵)، تجزیه و تحلیل RMSD برای پروتئین نورامینداز به عنوان تابعی از زمان نشان می‌دهد که سیستم‌ها پس از تقریباً ۴۹ نانوثانیه به حالت تعادل رسیده‌اند زیرا نوسانات اتم‌ها پس از یک زمان مشخص ثابت می‌شود. در مورد مقایسه بین عصاره‌ها، هرچه نوسان ساختاری پروتئین را بیشتر تغییر دهند موثرتر هستند؛ زیرا در بحث بیماری‌ها لازم است که شکل پروتئین عوض شود تا تاثیر دارو نمایان شود. هر دو عصاره سافرانال و پیکروکروسین تغییرات در ساختار و نوسانات پروتئین ایجاد کرده‌اند که این تغییرات برای عصاره پیکروکروسین نسبت به سافرانال بیشتر است.

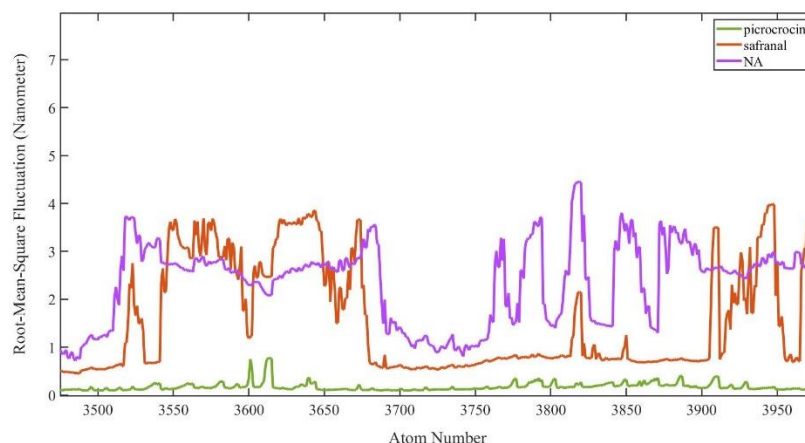


شکل ۵. نمودار RMSD دو عصاره پیکروکروسین و سافرانال.

۲-۳- RMSF

آنالیز نوسان مربع میانگین ریشه (RMSF)^۱ همانند آنالیز RMSD است، با این تفاوت که نوسانات اتم‌های مختلف پروتئین نسبت به حالت مرجع که همان پروتئین در آب است را به صورت جداگانه می‌توان ارزیابی کرد و در نهایت متوجه شد که تغییرات از چه قسمت‌هایی بیشتر اتفاق افتاده است. این آنالیز از اتم شماره ۳۵۰۰ تا اتم شماره ۴۰۰۰ گرفته شده است که نشان می‌دهد هر اتم، چه میزان جابه‌جایی بر حسب نانومتر داشته است. همانطور که در شکل (۶) مشاهده می‌شود، نوسانات اتم‌های مربوط به عصاره سافرانال تقریباً شبیه حالت مرجع (NA) است. در حالی که نوسانات مربوط به اتم‌های عصاره پیکروکروسین متفاوت از حالت مرجع است. این آنالیز، نشان‌دهنده تغییر ساختار پروتئین در مواجهه با عصاره پیکروکروسین است که در آنالیز RMSD نیز این نتیجه حاصل شد.

¹ Root-Mean-Square Fluctuation

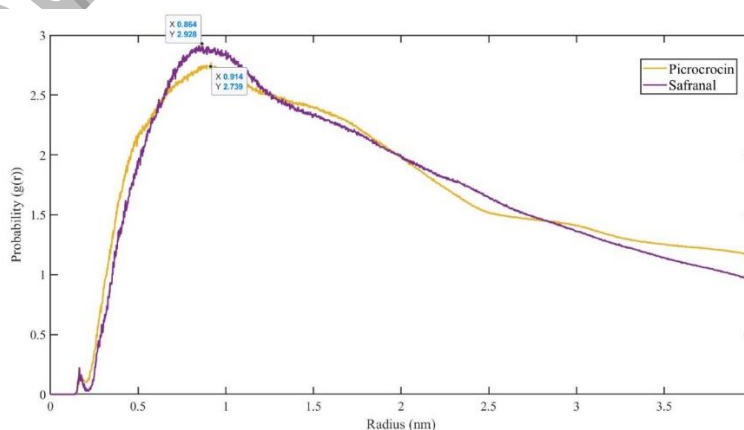


شکل ۶. نمودار RMSF دو عصاره پیکروکروسین و سافرانال.

۳-۳- RDF

آنالیز RDF یا تابع توزیع شعاعی، احتمال پیدا کردن دو مولکول یا اتم را نسبت به هم و یا فاصله آن‌ها نسبت به هم را ارزیابی می‌کند. عملکرد آن به این صورت است که اطراف مولکول مورد نظر که آنالیز روی آن انجام می‌شود، کره‌هایی به شعاع‌های مختلف (از کم تا زیاد) ایجاد می‌کند و احتمال را محاسبه می‌کند. در مورد این پژوهش، مولکول مورد نظر پروتئین است که احتمال حضور عصاره‌ها اطراف آن سنجیده می‌شود.

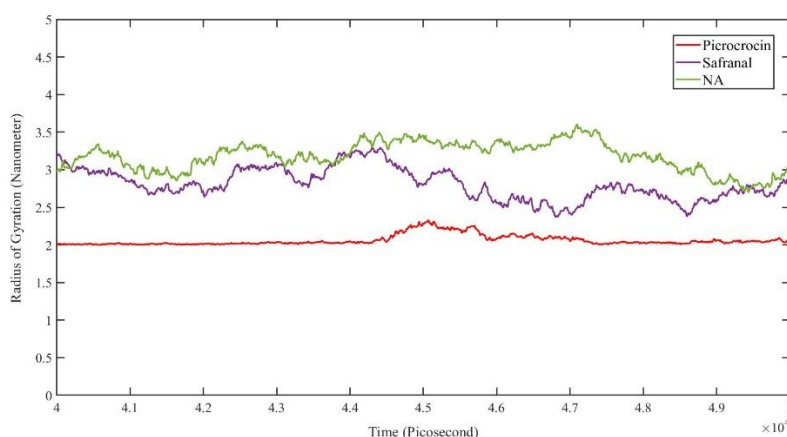
همانطور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود عصاره سافرانال در فواصل نزدیک‌تری نسبت به پیکروکروسین در اطراف پروتئین دیده می‌شود (تقریباً در شعاع ۰٫۸ نانومتری). عصاره پیکروکروسین نیز در شعاع تقریباً ۰٫۹ نانومتری بیشترین توزیع را در اطراف پروتئین دارد. با بزرگ‌تر شدن شعاع‌های رسم شده توسط آنالیز، به وضوح، احتمال وجود عصاره‌ها کاهش می‌یابد و همانطور که از نمودار مشخص است این نمودارها اول به یک مقدار بیشینه و در ادامه با افزایش شعاع، کاهش می‌یابند.



شکل ۷. نمودار RDF دو عصاره پیکروکروسین و سافرانال.

۳-۴- شعاع ژیراسیون

شعاع ژیراسیون^۱ به عنوان نحوه توزیع اتم‌های یک پروتئین حول محور آن تعریف می‌شود که هر چه عصاره بتواند تغییرات بیشتری در نحوه این توزیع ایجاد کند، موثرتر است [۵۱]. با توجه به منحنی پروتئین NA در شکل (۸) و مقایسه میزان تغییرات آن با دو منحنی سافرانال و پیکروکروسین، برای جفت پروتئین با عصاره پیکروکروسین، تغییرات پایداری در شعاع ژیراسیون دیده می‌شود که می‌توان ادعا کرد که پروتئین به تعادل رسیده‌است و شاهد تاخوردگی پایداری از این عصاره هستیم. در نتیجه، بیشترین تغییر در ساختار پروتئین توسط این عصاره حاصل شده‌است که شعاع پروتئین را نسبت به حالت مرجع آن تغییر داده‌است. به عبارتی، پروتئین کوچک شده‌است که نشان‌دهنده برهم‌کنش این عصاره با پروتئین است. نوسانات عصاره سافرانال به حالت مرجع نزدیک‌تر است و تغییرات کمتری روی شعاع پروتئین ایجاد کرده‌است.



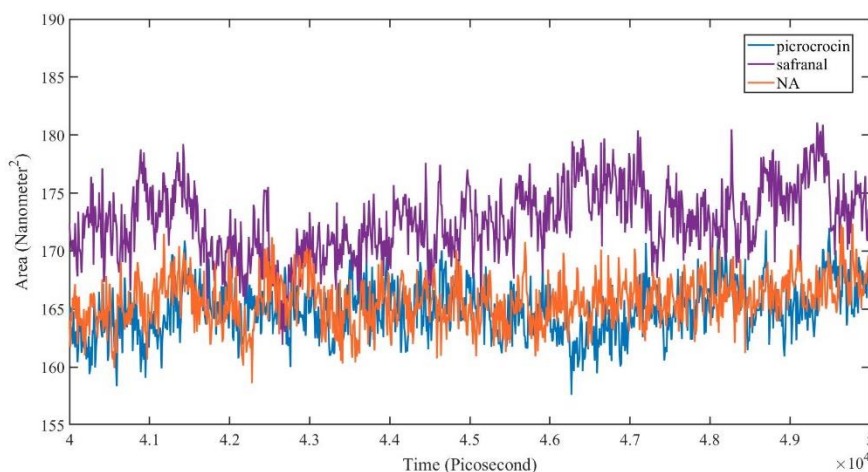
شکل ۸. نمودار شعاع ژیراسیون دو عصاره پیکروکروسین و سافرانال.

۳-۵- SASA

آنالیز SASA^۲ توصیفی از مساحت سطح یک مولکول زیستی است که در دسترس حلال است [۵۲]. این آنالیز همچنین اطلاعاتی در مورد آب‌دوستی ترکیب مورد مطالعه می‌دهد که در اینجا نیز حالت مرجع، پروتئین در آب (NA) است و در بازه زمانی ۴۰ تا ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی انجام شده‌است. با توجه به شکل (۹) و مقایسه با نمودار NA، عصاره سافرانال آب‌دوستی پروتئین را افزایش داده‌است که این نتیجه را می‌توان با افزایش سطح در دسترس حلال آبی متوجه شد. پیکروکروسین تغییر محسوسی در میزان آب‌دوستی پروتئین ایجاد نکرده‌است و نوساناتی همچون حالت مرجع دارد.

¹ Radius of Gyration

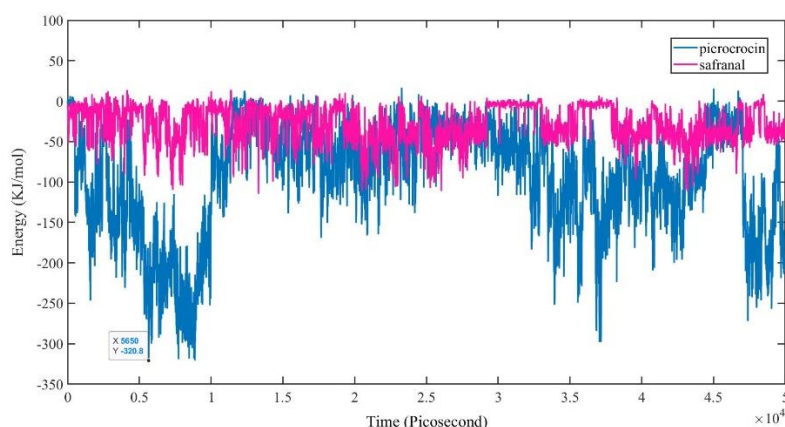
² Solvent Accessible Surface Area



شکل ۹. نمودار SASA دو عصاره پیکروکروسین و سافرانال.

۳-۶- پتانسیل الکتروستاتیک

این آنالیز برای بررسی میزان شدت برهم‌کنش پروتئین با عصاره‌های مورد مطالعه انجام شده‌است [۵۳]. با توجه به شکل (۱۰) که پتانسیل الکتروستاتیک را در طول شبیه‌سازی نشان می‌دهد، برهم‌کنش عصاره پیکروکروسین با پروتئین نسبت به سافرانال قوی‌تر است؛ زیرا چاه پتانسیل با مقدار -320.8 کیلو ژول بر مول ثبت شده‌است که این به معنی نزدیکی مولکول‌های عصاره به پروتئین است.



شکل ۱۰. نمودار برهم‌کنش الکتروستاتیکی دو عصاره پیکروکروسین و سافرانال با پروتئین NA.

در جدول (۳) تعداد پیوندهای هیدروژنی عصاره‌ها با پروتئین نشان داده شده‌است که میزان این پیوندها، شدت اتصال را مشخص می‌کند. همانطور که جدول (۳) نشان می‌دهد، تعداد پیوندهای هیدروژنی پیکروکروسین با پروتئین بیشتر است که مشخص می‌شود پیوند این عصاره با پروتئین قوی‌تر است که این نتیجه از پتانسیل الکتروستاتیک نیز مشخص شد. این نتیجه، از ساختار شیمیایی پیکروکروسین که در شکل

(۲) نمایش داده شده است نیز قابل پیش بینی است. زیرا تعداد گروه های دهنده و گیرنده پیوند هیدروژنی در پیکروکرو سین بیشتر از سافرانال است که می تواند دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی قوی تر و در نتیجه برهم کنش پایدارتر باشد.

جدول ۳. تعداد پیوندهای هیدروژنی عصاره ها با پروتئین NA

نام عصاره	تعداد پیوند هیدروژنی
پیکروکرو سین	۲/۰۱۸
سافرانال	۰/۵۷۶

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش میزان مهار پروتئین نورآمینیداز آنفولانزا توسط عصاره های زعفران بررسی شد. برای این امر، سه سیستم مجزا حاوی پروتئین در آب و سیستم های حاوی پروتئین و عصاره های پیکروکرو سین و سافرانال در نظر گرفته شد که مرجع همان پروتئین در آب است. آنالیز RMSD و شعاع ژیراسیون مشخص کردند که عصاره پیکروکرو سین نسبت به حالت مرجع، بیشترین تغییر را در نوسانات اتم های پروتئین داشته و همچنین این نتیجه را می توان از آنالیز شعاع ژیراسیون نیز گرفت که توزیع پروتئین حول مرکز جرم خود در برهم کنش با این عصاره، بیشترین تغییر را داشته است. از آنالیز RDF این نتیجه حاصل شد که سافرانال در فواصل نزدیک تری نسبت به پروتئین حضور دارد (۰/۸ نانومتر) و در واقع هر چه فاصله کمتر باشد، برهم کنش قوی تر است. بررسی پتانسیل الکتروستاتیک نشان داد که پروتئین در برهم کنش با عصاره پیکروکرو سین در چاه پتانسیل عمیق تری فرو رفته است که به معنای انرژی برهم کنش بیشتر است. هر چه انرژی برهم کنش بیشتر باشد، اتصال پروتئین و عصاره قوی تر خواهد بود. در نهایت مشخص شد که عصاره های زعفران به عنوان ترکیبات گیاهی می توانند در مواجهه با ویروس آنفولانزا موثر باشند و می توان از آن ها به عنوان مهارکننده پروتئین نورآمینیداز ویروس آنفولانزا نام برد.

معادل انگلیسی	واژه فارسی
Influenza A Virus	ویروس آنفولانزای A
Amantadine	آمانتادین
Rimantadine	ریمانتادین
Neuraminidase	نورآمینیداز
Oseltamivir	ازلتامیویر
Zanamivir	زانامیویر
Peramivir	پریامیویر
Hemagglutinin	هماگلوتینین
Molecular Dynamics Simulation	شبیه سازی دینامیک مولکولی
GROMACS	گرومکس
Ligand	لیگاند
Verlet Algorithm	الگوریتم ورله
Leap-Frog Algorithm	لیپفراگ
Velocity Verlet Algorithm	ولاسیتی ورله
Berendsen Thermostat	ترموستات برندسن
Parrinello-Rahman Barostat	باروستات پارینلو-رحمان
Residue	باقی مانده
Root-Mean-Square Deviation	انحراف مربع میانگین ریشه
Root-Mean-Square Fluctuation	نوسان مربع میانگین ریشه
Radius of Gyration	شعاع ژیراسیون
Solvent Accessible Surface Area	سطح قابل دسترس حلال

- [١] J. F. Mann, J. S. Tregoning, Y. Aldon, R. J. Shattock, and P. F. McKay, "CD71 targeting boosts immunogenicity of sublingually delivered influenza haemagglutinin antigen and protects against viral challenge in mice," *Journal of Controlled Release*, vol. 232, pp. 75-82, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.022>
- [٢] J. Liang, H. Guo, Y. Yang, G. Liang, Z. Chen, D. Li, H. Liang, J. Qiu, Q. Mei, S. Liu, J. Yang, and W. Wu, "Atractylenolide-III binds non-structural protein-1 to suppress influenza A by modulating macrophage polarization and alternative polyadenylation," *Phytomedicine*, vol. 141, p. 156704, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2025.156704>
- [٣] V. L. Herrmann, C. Hartmayer, O. Planz, and M. Groettrup, "Cytotoxic T cell vaccination with PLGA microspheres interferes with influenza A virus replication in the lung and suppresses the infectious disease," *Journal of Controlled Release*, vol. 216, pp. 121-131, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.019>
- [٤] X. Zhao, R. Li, Y. Zhou, M. Xiao, C. Ma, Z. Yang, S. Zeng, Q. Du, C. Yang, and H. Jiang, "Discovery of highly potent pinanamine-based inhibitors against amantadine-and oseltamivir-resistant influenza A viruses," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 61, no. 12, pp. 5187-5198, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00042>
- [٥] D. H. Goldhill, A. J. W. Te Velthuis, R. A. Fletcher, P. Langat, M. Zambon, A. Lackenby, and W. S. Barclay, "The mechanism of resistance to favipiravir in influenza," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 115, no. 45, pp. 11613-11618, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811345115>
- [٦] I. Leneva, E. Burtseva, S. Yatsyshina, I. Fedyakina, E. Kirillova, E. Selkova, E. Osipova, and V. Maleev, "Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010–2011 influenza season in Russia," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 43, pp. 77-84, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.01.001>
- [٧] H.-J. Kang, J. Li, M. A. Razzak, G.-D. Eom, K.-W. Yoon, J. Mao, K.-B. Chu, H. Jin, S. S. Choi, and F.-S. Quan, "Chitosan-alginate polymeric nanocomposites as a potential oral vaccine carrier against influenza virus infection," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 15, no. 44, pp. 50889-50897, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c11756>
- [٨] L. K. Borkenhagen, M. D. Salman, M.-J. Ma, and G. C. Gray, "Animal influenza virus infections in humans: A commentary," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 88, pp. 113-119, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.002>
- [٩] R. Duraes-Carvalho, and M. Salemi, "In-depth phylogenetics, evolutionary analysis and in silico predictions of universal epitopes of Influenza A subtypes and Influenza B viruses," *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 121, pp. 174-182, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.01.008>
- [١٠] N. C. Wu, and I. A. Wilson, "Influenza hemagglutinin structures and antibody recognition," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 10, no. 8, p. a038778, 2020. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038778>
- [١١] N. Singh, N. Anjum, and R. Chandra, "Combating influenza: natural products as neuraminidase inhibitors," *Phytochemistry Reviews*, vol. 18 ,no. 1, pp. 69-107, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9581-1>
- [١٢] W. F. Lai, and A. L. Rogach, "Hydrogel-Based Materials for Delivery of Herbal Medicines," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 13, pp. 11309-11320, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16120>
- [١٣] S. Parham, A. Z. Kharazi, H. R. Bakhsheshi-Rad, H. Nur, A. F. Ismail, S. Sharif, S. RamaKrishna, and F. Berto, "Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials," *Antioxidants*, vol. 9, no. 12, p. 1309, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9121309>
- [١٤] F. Carmona, and A. M. S. Pereira, "Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 23, no. 2, pp. 379-385, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000018>
- [١٥] G. Marrone, S. Urciuoli, M. Di Lauro, K. Cornali, G. Montalto, C. Masci, G. Vanni, M. Tesaro, P. Vignolini, and A. Noce, "Saffron (Crocus sativus L.) and Its By-Products: Healthy Effects in Internal Medicine," *Nutrients*, vol. 16, no. 14, p. 2319, 2024. <https://doi.org/10.3390/nu16142319>
- [١٦] M. Lautenschläger, J. Sendker, S. Hüwel, H. Galla, S. Brandt, M. Düfer, K. Riehemann, and A. Hensel, "Intestinal formation of trans-crocin from saffron extract (Crocus sativus L.) and in vitro permeation through intestinal and blood brain barrier," *Phytomedicine*, vol. 22, no. 1 ,pp. 36-44, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.10.009>
- [١٧] A. Rahaman, A. Kumari, M. A. Farooq, X.-A. Zeng, S. Hassan, I. Khalifa, R. M. Aadil, M. F. Jahangir Chughtai, A. Khaliq, and N. Ahmad, "Novel extraction techniques: an effective way to retrieve the bioactive compounds from saffron (Crocus Sativus)," *Food Reviews International*, vol. 39, no. 5, pp. 2655-2683, 2023. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1967377>
- [١٨] S. Abdian, S. Fakhri, S. Z. Moradi, M. R. Khirehghesh, and J. Echeverria, "Saffron and its major constituents against neurodegenerative diseases: A mechanistic review," *Phytomedicine*, vol. 135, p. 156097, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.156097>
- [١٩] A. T. Hariri, S. A. Moallem, M. Mahmoudi, and H. Hosseinzadeh, "The effect of crocin and safranal, constituents of saffron, against subacute effect of diazinon on hematological and genotoxicity indices in rats," *Phytomedicine*, vol. 18, no. 6, pp. 499-504, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.001>

- [۲۰] V. B. Rahim, M. T. Khammar, H. Rakhshandeh, A. Samzadeh-Kermani, A. Hosseini, and V. R. Askari, "Crocine protects cardiomyocytes against LPS-Induced inflammation," *Pharmacological Reports*, vol. 71, no. 6, pp. 1228-1234, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.07.007>
- [۲۱] F. Anaeigoudari, A. Anaeigoudari, and A. Kheirkhah-Vakilabad, "A review of therapeutic impacts of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents," *Physiological Reports*, vol. 11, no. 15, p. e15785, 2023. <https://doi.org/10.14814/phy2.15785>
- [۲۲] S. Kianbakht, and A. Ghazavi, "Immunomodulatory effects of saffron: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial," *Phytotherapy Research*, vol. 25, no. 12, pp. 1801-1805, 2011. <https://doi.org/10.1002/ptr.3484>
- [۲۳] H. R. Xiong, Y. Y. Shen, L. Lu, W. Hou, F. Luo, H. Xiao, and Z. Q. Yang, "The inhibitory effect of *Rheum palmatum* against coxsackievirus B3 in vitro and in vivo," *The American Journal of Chinese Medicine*, vol. 40, no. 4, pp. 801-812, 2012. <https://doi.org/10.1142/S0192415X12500607>
- [۲۴] S. A. Hosseini, M. Zilaei, M. H. Shoushtari, and M. Ghasemi Dehcheshmeh, "An evaluation of the effect of saffron supplementation on the antibody titer to heat-shock protein (HSP) 70, hsCRP and spirometry test in patients with mild and moderate persistent allergic asthma: A triple-blind, randomized placebo-controlled trial," *Respiratory Medicine*, vol. 145, pp. 28-34, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.10.016>
- [۲۵] S. Soleymani, R. Zabihollahi, S. Shahbazi, and A. Bolhassani, "Antiviral Effects of Saffron and its Major Ingredients," *Current Drug Delivery*, vol. 15, no. 5, pp. 698-704, 2018. <https://doi.org/10.2174/1567201814666171129210654>
- [۲۶] A. Kordzadeh, A. R. Saadatabadi, and A. Hadi, "Investigation on penetration of saffron components through lipid bilayer bound to spike protein of SARS-CoV-2 using steered molecular dynamics simulation," *Heliyon*, vol. 6, no. 12, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05681>
- [۲۷] S. Bastani, V. Vahedian, M. Rashidi, A. Mir, S. Mirzaei, I. Alipourfard, F. Pouremamali, H. Nejabati, J. Kadkhoda, N. F. Maroufi, and M. Akbarzadeh, "An evaluation on potential anti-oxidant and anti-inflammatory effects of Crocin," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 153, p. 113297, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113297>
- [۲۸] M. Carmona, A. Zalacain, A. M. Sanchez, J. L. Novella, and G. L. Alonso, "Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 3, pp. 973-979, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf052297w>
- [۲۹] M. Kabiri, H. Rezadoost, and A. Ghassempour, "A comparative quality study of saffron constituents through HPLC and HPTLC methods followed by isolation of crocins and picrocrocin," *LWT*, vol. 84, pp. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.033>
- [۳۰] F. Wang, and V. Vasilyev, "In silico tuning of binding selectivity for new SARS-CoV-2 main protease inhibitors," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 262, p. 108678, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2025.108678>
- [۳۱] K. Al-Khafaji, and T. T. Tok, "Molecular dynamics simulation, free energy landscape and binding free energy computations in exploration the anti-invasive activity of amygdalin against metastasis," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 195, p. 105660, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2020.105660>
- [۳۲] N. Kalam, R. Ali, and V. R. Balasubramaniam, "Exploring the potential of direct-acting antivirals against Chikungunya virus through structure-based drug repositioning and molecular dynamic simulations," *Computers in Biology and Medicine*, vol. 189, p. 109989, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2025.109989>
- [۳۳] P. C. Pal, and B. Das, "Targeting the dengue virus NS5-Methyltransferase SAM binding site with limonoids: Molecular docking, dynamics simulation, DFT and ADMET analysis," *Computers in Biology and Medicine*, vol. 196, p. 110784, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2025.110784>
- [۳۴] M. Lundborg, C. L. Wennberg, A. Narangifard, E. Lindahl, and L. Norlén, "Predicting drug permeability through skin using molecular dynamics simulation," *Journal of Controlled Release*, vol. 283, pp. 269-279, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.026>
- [۳۵] F. Wang, S. Zhang, K. Liu, H. Zhang, and Y. Gao, "Investigation of the mechanism of inter-material interactions of exothermic compounds based on experimental and molecular dynamics simulations," *Materials Today Chemistry*, vol. 46, p. 102742, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2025.102742>
- [۳۶] C. Pu, F. Liu, H. Xu, G. Chen, G. Tian, S. Qi, and D. Wu, "Molecular dynamics study on the mechanism of poly (amic acid) chemical structure on thermal imidization process and polyimide architecture," *Materials Today Chemistry*, vol. 33, p. 101679, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2023.101679>
- [۳۷] S. Xu, D. Lin, R. Li, J. Zhan, G. Tian, and D. Wu, "Effect of chemical structures and environmental factors on the thermal degradation mechanism of polyimide: Experiments and molecular dynamics simulations," *Materials Today Chemistry*, vol. 40, p. 102242, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2024.102242>
- [۳۸] N. Pouyanfar, N. Masoumi, M. Ahmadi, S. M. Ayyoubzadeh, G. Farnam, E. Asadian, F. Sefat, F. H. Shirazi, and F. Ghorbani-Bidkorpeh, "Comparison of laboratory-acquired ZIF-8 drug delivery-related parameters with literature-based data via machine learning tools," *Materials Today Chemistry*, vol. 47, p. 102801, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2025.102801>

- [٣٩] M. Wu, Y. Zhang, J. Jiang, X. Wang, C. Wang, Q. Wang, and L. Cao, "Synthesis and molecular dynamics simulation of biobased "bottle-brush" polyfarnesene via aqueous radical polymerization," *Materials Today Chemistry*, vol. 38, p. 102053, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2024.102053>
- [٤٠] A. Kordzadeh, M. Zarif, and S. Amjad-Iranagh, "Molecular dynamics insight of interaction between the functionalized-carbon nanotube and cancerous cell membrane in doxorubicin delivery," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 230, p. 107332, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2022.107332>
- [٤١] T. Arabian, S. Amjad-Iranagh, and R. Halladj, "Molecular dynamics simulation study of doxorubicin adsorption on functionalized carbon nanotubes with folic acid and tryptophan," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 24210, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03619-8>
- [٤٢] P. K. Marvi, S. Amjad-Iranagh, and R. Halladj, "Molecular Dynamics Assessment of Doxorubicin Adsorption on Surface-Modified Boron Nitride Nanotubes (BNNTs)," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 125, no. 48, pp. 13168-13180, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c07052>
- [٤٣] S. Kavyani, S. Amjad-Iranagh, and M. Zarif, "Effect of temperature, pH, and terminal groups on structural properties of carbon nanotube-dendrimer composites: A coarse-grained molecular dynamics simulation study," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 363, p. 119825, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119825>
- [٤٤] A. Kordzadeh, S. Amjad-Iranagh, M. Zarif, and H. Modarress, "Adsorption and encapsulation of the drug doxorubicin on covalent functionalized carbon nanotubes: A scrutinized study by using molecular dynamics simulation and quantum mechanics calculation," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 88, pp. 11-22, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2018.12.009>
- [٤٥] F. Z. Y. Bettadj, W. Benchouk, and A. Guendouzi, "Computational exploration of novel ketoprofen derivatives: Molecular dynamics simulations and MM-PBSA calculations for COX-2 inhibition as promising anti-inflammatory drugs," *Computers in Biology and Medicine*, vol. 183, p. 109203, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.109203>
- [٤٦] R. Maleki, H. H. Afrouzi, M. Hosseini, D. Toghraie, and S. Rostami, "Molecular dynamics simulation of Doxorubicin loading with N-isopropyl acrylamide carbon nanotube in a drug delivery system," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 184, p. 105303, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.105303>
- [٤٧] Z. Hasanzade, and H. Raissi, "Molecular mechanism for the encapsulation of the Doxorubicin in the cucurbit [n] urils cavity and the effects of diameter, protonation on loading and releasing of the anticancer drug: Mixed quantum mechanical/molecular dynamics simulations," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 196, p. 105563, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2020.105563>
- [٤٨] O. M. Salo-Ahen, I. Alanko, R. Bhadane, A. M. Bonvin, R. V. Honorato, S. Hossain, A. H. Juffer, A. Kabedev, M. Lahtela-Kakkonen, and A. S. Larsen, "Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development," *Processes*, vol. 9, no. 1, p. 71, 2020. <https://doi.org/10.3390/pr9010071>
- [٤٩] R. J. Sadus, *Molecular simulation of fluids*: Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2002. ISBN: 0-444-51082-6.
- [٥٠] K. Sargsyan, C. Grauffel, and C. Lim, "How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 13, no. 4, pp. 1518-1524, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00028>
- [٥١] P. Liu, J. Lu, H. Yu, N. Ren, F. E. Lockwood, and Q. J. Wang, "Lubricant shear thinning behavior correlated with variation of radius of gyration via molecular dynamics simulations," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 147, no. 8, p. 084501, 2017. <https://doi.org/10.1063/1.4986552>
- [٥٢] Z. Qu, and Y. Sun, "Computer-Aided Site-Specific PEGylation of PET Hydrolases for Enhanced PET Degradation," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 16, no. 41, pp. 55463-55477, 2024. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c12187>
- [٥٣] P. Politzer, and J. S. Murray, "Molecular electrostatic potentials: significance and applications," *Chemical reactivity in confined systems: theory, modelling and applications*, Hoboken, NJ, USA: Wiley, pp. 113-134, 2021. <https://doi.org/10.1002/9781119683353.ch7>