

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر

ميدان : علوم الطبيعة والحياة.

مجال : علوم بيولوجية.

تخصص : بيوكيمياء تطبيقية.

قسم : البيولوجيا.

تحت عنوان:

دراسة تثبيط إنزيم *Shikimate Kinase* عند جرثومة المعدة
Helicobacter Pylori بواسطة مجموعة مجموعة من
الفلافونويدات باستعمال وسائل بيومعلوماتية (*in silico*)

من إعداد الطالبتين:

◀ شعبان صوفيا

◀ ميلي إيمان

لجنة المناقشة:

جامعة قالمة	MCA	رئيساً	عليوي نورة
جامعة قالمة	MAA	مشرفاً	بعلي سليم
جامعة قالمة	MCB	ممتحناً	حمديكان مليكة

السنة الدراسية: 2022 - 2023

التشكرات

قال تعالى: « فاذكروني أذكركم و اشكروا لي ولا تكفرون »

الآية 152 من سورة البقرة.

الحمد لله والشكر لله الذي وفقنا في إتمام هذا العمل، وعلّمنا ما لم نكن نعلم وكان فضله علينا عظيماً.

على عتبة مرحلة جديدة من الحياة لابد أن نقدم الشكر الجزيل لأعضاء اللجنة المؤقّرة التي قبلت مناقشة مُذكرتنا هذه والتي بالتأكيد ستُثيرها بالنقد البناء والتوجيه السليم بدايةً:

برئيسة اللجنة الأستاذة القديرة **عليوي نورة** والأستاذة الفاضلة **حمديكان مليكة** على قبولها المشاركة كمتحنّة، كما تتوجه بخالص تشكّراتنا إلى **الأستاذ بعلي سليم** على تحمّله أعباء الإشراف على هذا العمل ولم يبخل علينا بتوجيهاته ونصائحه والمعاملة الطيبة التي حضيّنا بها من قبله.

لكل هؤلاء نقول جزاكم الله عنا خيراً.





إهداء

الحمد لله الذي أنار لي طريقي وكان لي خير عون، هذه ثمرة الجهد والنجاح بفضلته تعالى مهداة

إلى التي بجانها ارتويت، وبدفئها احتيت، وبنورها اهتديت، ولحقها ما وفيت.....

{أمي أطال الله عمرها}

إلي درعي الذي به احتيت، وفي الحياة به اقتديت، من علمني محاسن الأخلاق.....

{أبي أطال الله عمره}

إلى سندي وموطن اتماي، وصدر أمانني وكبريائي إخوتي.....

{بشرى، سلمى، أكرم حفظهم الله ورعاهم}

وإلى القريبين من القلب والداعمين والمساندين في السراء والضراء.....

{عماتي وجدتي}

إلى من ساعدتني وأعانتي في انجاز هذه المذكرة وإخراجها في أحسن صورة.....

{ميلي إيمان}

إلى رفيقات المشوار اللاتي تحلو بهم مصاعب الطريق....

{شيماء، ورانيا وناريمان وصال ومريم}

في الختام، شكرا لكل من سهل الطريق، بدعوة صادقة أو كلمة طيبة.

صوفيا



إهداء

إلى من أفضلها على نفسي ولما لا فلقد ضحت من أجلي ولم تدخر جهدا في سبيل إسعادي على الدوام

{أمي الحبيبة}

نسير في دروب الحياة و يبقى من يسيطر على أذهاننا في كل مسلك نسلكه صاحب الوجه الطيب

والأفعال الحسنة فلم يبخل عليا طيلة حياته {والدي العزيز}

إلى من كان وما زال سندي وسام عزتي وكبريائي زوجي العزيز {بورقي شعيب}

إلى من قضيت معهم أجمل أيام حياتي وعشت معهم أحلى الذكريات فكانوا أسعد الناس بنجاحي

إخواني {مروة، ملاك، سندس} والى براعم قلبي {جاد وجوري}

إلى عائلة زوجي الطيبة وبالأخص "والدي زوجي" الكريمين وإخوته الأحباء انعم الله عليكم بالصحة

والعافية جميعا

إلى صديقتي ورفيقة دربي من ساعدتني وأعانتني في نجاح وإنجاز هذه المذكرة وإخراجها في أحسن

صورة {شعبان صوفيا}

إلى أحسن من عرفني بهم القدر الذين تحلو بالإخاء وتميزوا بالوفاء {مريم وصال ناريمان رانيا}

إلى كل من كان لهم أثر على حياتي أحبهم قلبي ونسيهم قلمي.

إيمان

مُلخَص:

باستعمال وسائل بيومعلوماتية Outils bioinformatiques ارتأينا في هذا البحث إجراء دراسة حول إمكانية تثبيط إنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا *Helicobacter Pylori* من طرف إثنان وأربعون فلافونيدًا تمّ اختيارها وتحميل بينيتها من بنك Pubchem أين قُمنّا بإرساء Docking هذه الفلافونيدات في الموقع الفعال للإنزيم المُستهدف (موقع ارتباط ADP) بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD حيث كشفت النتائج المتحصل عليها عن اقتراح مركبين هما: Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate يمكن أن يلعبا دور مُثبِّط لإنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا *Helicobacter Pylori*. لما يملكانه من ألفة عالية affinité نحو الموقع الفعّال للإنزيم، ما يُنبئ بإمكانية استعمالهما كمتببّط إنزيمي من أجل التصدي لبكتيريا *Helicobacter Pylori*.

الكلمات المفتاحية: Shikimate Kinase، الإرساء الجزيئي، GOLD، *Helicobacter Pylori*، الفلافونيدات.

Résumé

L'objectif principal de cette étude était de découvrir, grâce au criblage virtuel, de nouveaux inhibiteurs de la Shikimate kinase chez *Helicobacter Pylori*, à partir d'un groupe de flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation étudiés (42 flavonoïdes). L'amarrage moléculaire a été réalisé en utilisant GOLD, pour étudier les interactions de liaison de quarante deux composés avec les cibles, seulement deux molécules ont donné de bons résultats l'Axillarin7-sulfate et la Quercetin3-sulfate: à 84.07 Kcal/mol et 77.15 Kcal/mol respectivement par rapport à le ligand original (ADP) 85.64 Kcal / mol. Le programme d'approche de l'amarrage moléculaire avec GOLD est considéré parmi les meilleures techniques utilisées aujourd'hui pour développer des inhibiteurs plus efficaces.

Les mots clés: L'amarrage moléculaire, Shikimate kinase, GOLD, flavonoïdes, *Helicobacter Pylori*,

Abstract

The main objective of this study was to discover, through virtual screening, new inhibitors of Shikimate kinase in *Helicobacter Pylori*, from a group of the most abundant flavonoids in the diet studied. Molecular docking was performed using GOLD, to study the binding interactions of forty two compounds with the targets, only two molecules gave good results Axillarin7-sulfate and Quercetin3-sulfate: at 84.07 Kcal/mol and 77.15 Kcal/mol respectively compared to the original ligand (ADP) 85.64 Kcal/mol. The molecular docking approach program with GOLD is considered among the best techniques used today to develop more effective inhibitors.

Keywords: Molecular docking, Shikimate kinase, GOLD, flavonoids, *Helicobacter Pylori*,

قائمة الاختصارات

2D : Deux Dimension.

3D : Trois Dimension.

Å : Angström.

ADMET: Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity.

ATP: Adenosines tri-phosphate.

ADP: Adenosines Diphosphate.

FDA: Food Drug Administration.

GOLD: Genetic Optimization for Ligand Docking.

GA : Algorithme Génétique.

HP : *Helicobacter Pylori*.

Log P: Logarithme P.

MacOS : Macintosh Operating System .

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NIH: National Institutes of Health.

NMP : Nucléosidiques mono-phosphates.

PDB : Protein Data Bank.

ES: Enzyme -Substrat.

SDF: Stands for structure-data file.

SK: Shikimate kinase.

RMSD: Root Mean Square Deviation.

RAM: Random Access Memory.

UNIX: Universal Network Information Exchange

قائمة الجداول :

الصفحة	الجدول
9	الجدول 1: بنيات الـ Shikimate kinase المختارة رفقة رمز ودقة التصميم كل بنية
9	الجدول 2: بنيات الفلافونيدات الاثنان وأربعون المحملة من بنك Pubchem
23	الجدول 3: نتائج حساب قيمة الـ RMSD للمعقد (Shikimate Kinase-ADP).
24	الجدول 4: الروابط الهيدروجينية الناشئة بين الركيزة ADP و الموقع الفعال للأنزيم Shikimate Kinase
25	الجدول 5: نتائج الإرساء الجزيئي للفلافونويدات المختارة باستعمال برنامج GOLD
26	الجدول 6: الروابط الهيدروجينية الناشئة بين Axillarin 7-sulfate و الأنزيم Shikimate Kinase
28	الجدول 7: الروابط الهيدروجينية الناشئة بين Quercetin 3-sulfate و الأنزيم Shikimate Kinase
31	الجدول 8: الخصائص الدوائية للمركبين Axillarin 7-sulfate و Quercetin3-sulfate

قائمة الأشكال:

الصفحة	الشكل
5	الشكل 1: نافذة العرض لبرنامج Pymol.
6	الشكل 2: النافذة الرئيسية لبرنامج الإرساء GOLD.
7	الشكل 3: نافذة العرض لموقع بنك معطيات البروتينات PDB على شبكة الانترنت.
8	الشكل 4: نافذة العرض لموقع بنك معطيات الجزيئات Pubchem على شبكة الانترنت.
21	الشكل 5: نموذج ثلاثي الأبعاد لإنزيم Shikimate kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i> . (رمز PDB: 3MUF). يظهر المجال CORE باللون الأحمر، و يظهر المجال LID باللون الأخضر و يظهر مجال ربط الركيزة (SB) باللون الأصفر، بينما تظهر كل من ADP و Shikimate وفق أنموذج العود bâtonnet (بذرات كربون ملونة بالأزرق). صورة مُنحزة بواسطة برنامج Pymol.
22	الشكل 6: الأحماض الأمينية المشكلة لموقع ارتباط ADP ضمن الموقع الفعال لإنزيم SK عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i> (رمز ملف PDB: 3MUF). تظهر الأحماض الأمينية وفق أنموذج العود (ذرات الكربون ملونة بالأخضر) ترتبط جندورها (R) بروابط هيدروجينية (تظهر بخط متقطع بلون أصفر) مع الـ ADP الظاهرة وفق أنموذج العود (ذرات الكربون ملونة بالبرتقالي). صورة مأخوذة بواسطة برنامج Pymol.
23	الشكل 7: مطابقة superposition منجزة بواسطة برنامج الـ GOLD للركيزة ADP قبل الإرساء (يظهر الكربون باللون الأخضر) وبعد الإرساء (يظهر الكربون باللون الأزرق السماوي) في الموقع الفعال لإنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i> (الركيزة ADP مُمثلة وفق أنموذج العود bâtonnet، رمز PDB: 3MUF، قيمة RMSD = 1.60 Å).
24	الشكل 8: آلية ارتباط الـ ADP في الموقع الفعال لإنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i> . صورة مأخوذة بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD.
27	الشكل 9: صورة مأخوذة بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD توضح طريقة ارتباط الفلافونيد Axillarin7-sulfate بالموقع الفعال لإنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i> . (رمز ملف PDB: 3MUF)، تظهر الروابط الهيدروجينية بخط متقطع.
27	الشكل 10: صورة مأخوذة بواسطة برنامج Pymol لتموضع Quercetin 3-sulfate بعد إرساءه في الموقع الفعال لأنزيم Shikimate Kinase (رمز PDB: 3MUF).
28	الشكل 11: صورة مأخوذة بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD توضح طريقة ارتباط الفلافونيد Quercetin-3-sulfate بالموقع الفعال لإنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i> . (رمز PDB: 3MUF)، تظهر الروابط الهيدروجينية بخط متقطع.
29	الشكل 12: صورة مأخوذة بواسطة برنامج Pymol لتموضع Quercetin 3-sulfate بعد إرساءه في الموقع الفعال لأنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i> . (رمز PDB: 3MUF)

29	<p>الشكل 13: مطابقة superposition باستعمال برنامج الإسءاء الجزيئي GOLD لكل من الركيزة ADP (ذرات الكربون باللون البنفسجي) و الفلافونيد Axillarin7-sulfate (ذرات الكربون باللون الأزرق السماوي) و الفلافونيد Quercetin3-sulfate (ذرات الكربون باللون الأصفر) التي تم إرساءها في الموقع الفعّال لإنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i>.</p>
30	<p>الشكل 14: مطابقة superposition باستعمال برنامج <i>Pymol</i> لكل من الركيزة ADP (ذرات الكربون باللون البنفسجي) و الفلافونيد Axillarin7-sulfate (ذرات الكربون باللون الأزرق السماوي) و الفلافونيد Quercetin3-sulfate (ذرات الكربون باللون الأصفر) التي تم إرساءها في الموقع الفعّال لإنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا <i>Helicobacter pylori</i>.</p>

الفهرس

التشكرات

الإهداء

الملخص

Résumé

Abstract

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

قائمة الاختصارات

1.....مقدمة عامة.

الفصل الأول: الأساس العملي

I- الوسائل.....5

1. جهاز الحاسوب.....5

2. البرامج المُستعملة.....5

1.2. برنامج Pymol.....5

2.2. برنامج الـ GOLD.....6

1.2.2. تعريف.....6

3. بنك مُعطيات البروتينات Protein Data Bank.....7

4. بنك معطيات الجزيئات الكيميائية Pubchem.....8

5. بُنية Shikimate Kinase المُختارة في الدراسة.....8

6. الفلافينويدات المُستعملة في عملية الإرساء.....9

II. الطرائق.....19

1. تحضير البروتين لعملية الإرساء (Docking).....19

2. تحديد موقع الارتباط.....19

3. عملية الإرساء.....19

4. القاعدة 5 للعالم Lipinski.....19

الفصل الثاني: النتائج و المناقشة

1. إنزيم Shikimate Kinase.....20

1.1. تعريف.....20

2.1. وصف البنية الفراغية.....20

2. اختبار موثوقية برنامج الإرساء المستخدم.....22

1.2. الجذر التربيعي لمتوسط المربعات (RMSD).....22

3. إرساء الفلافونيدات في الموقع الفعال للإنزيم S kinase بواسطة برنامج GOLD.....24

1.3. دراسة ارتباط Axillarin- 7 -sulfate بالموقع الفعال لإنزيم Shikimat kinase.....26

2.3. دراسة ارتباط Quercetin 3-sulfate مع الموقع الفعال لإنزيم Shikimate kinase.....28

4. اختبار القاعدة خمسة للعالم Lipinski.....31

5. المناقشة.....32

الخلاصة وآفاق مستقبلية.....34

المراجع

مُقَدِّمَةٌ

عَامَّةٌ

تعتبر الإصابة بجرثومة المعدة أو ما يُسمى بالملوّية البوابيّة (الإسم العلمي: *Helicobacter pylori*) من أكثر أنواع العدوى البكتيرية المزمنة شيوعاً بين البشر إذ أشارت التقديرات إلى أن أكثر من 50% من سكان العالم مُصابون بهذه الجرثومة المعدة خصوصاً في البلدان النامية حيث تُعتبر فئة الأطفال الأكثر عُرضة لها. (Park et al., 2021)

في عام 2005 تم منح جائزة نوبل في علم وظائف الأعضاء للباحثين Barry Marshall و Robin Warren لاكتشافهما الارتباط بين الإصابة بالجرثومة المعدة *Helicobacter pylori* ومرض القرحة الهضمية (ulcère peptique). (Marshall et al., 2008)

تنتقل جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* إلى الإنسان بطرق عدة منها تناول الخضار والفواكه التي لم يتم غسلها جيداً، أو نتيجة استقرار جرثومة المعدة في إمدادات المياه، أو الاتصال مع شخص آخر مُصاب بها من خلال بعض السلوكيات السلبية كالعطس مثلاً، حيث تدخل جرثومة المعدة إلى الجسم عبر الفم لتستقر في المعدة و الأمعاء.

تفرز جرثومة المعدة إنزيم اليورياز (uréase) المُحفّز لتفاعل تحويل اليوريا إلى CO₂ و أمونيا هذه الأخيرة تعمل على تحييد حموضة المعدة (رفع درجة حموضتها)، الأمر الذي يسمح لجرثومة المعدة بالاستيطان حيث يسمح شكلها الحلزوني وسوطها أحادي القطب بالتحرك بحريّة عبر الطبقة المخاطية في المعدة تمهيداً لاختراقها ما يتسبّب في حدوث جملة من الأمراض نذكر منها التهاب المعدة المزمن والقرحة الهضمية وقرحة الاثني عشر (ulcères gastro-intestinaux) حيث تُصاحب هذه الأمراض أعراض عديدة نذكر منها ألم حارق بالمعدة في الجزء العلوي من البطن و التجشؤ و النقيؤ والإسهال والإمساك و انتفاخ في المعدة و الشعور بالغثيان و فقدان الوزن غير المُبرر و ضعف الشهية (Kavitt et al., 2019)، وفي بعض الحالات يتطوّر الأمر إلى الإصابة بسرطان المعدة إذ تعتبر الجرثومة المعدة الحلزونية السبب الرئيسي الثاني للوفيات المرتبطة بالسرطان في العالم (Wroblewski et al., 2010; Shichijo et al., 2022)

يرتكز تشخيص الإصابة بجرثومة المعدة *Helicobacter pylori* على إجراء مجموعة من الاختبارات تتمثل في فحص الدم عبر البحث عن الأجسام المضادة المُوجّهة ضدّ جرثومة المعدة، فحص البراز للبحث عن أدلة مباشرة على العدوى تتمثل في الكشف عن المُستضد (Antigène)،

اختبار التنفس عن طريق الزفير ويعرف باسم اختبار النفس Test respiratoire à l'urée، حيث يتم إعطاء الخاضع للاختبار مشروب اليوريا للتحقق من وجود الغاز الذي تنتجه، كما يُمكن اللجوء إلى عمل منظار المعدة بغية التحقق من وجود جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* بأخذ عينة من جدار المعدة وعمل اختبار سريع للكشف عن اليورياز Test rapide d'uréase ما يعرف باختبار CLO كما يمكن التحقق من تواجد الجرثومة المعدة عبر الفحص بالمجهر (De Brito et al., 2019)

يعتمدُ تطبيب المُصاب بجرثومة المعدة *Helicobacter pylori* على استخدام علاج ثلاثي لفترة تتراوح بين أسبوع إلى أسبوعين، أين يُعطى المريض مُثبطات مضخة البروتونات (H^+) مثل Lansoprazole و Pantoprazole Oméprazole و Rofeprazole رُفقة نوعين مُختلفين من المُضادّات الحيوية مثل Amoxicilline و Clarithromycine و Tétracycline و Métronidazole. حيث تعمل المُضادّات الحيوية على قتل الجرثومة المعدة عبر تثبيط العمليات الحيوية وبالتالي منعها من التكاثر وإفرازها للسموم، وعادة ما تُخلط المُضادّات الحيوية مع بعضها للحصول على فعل تآزري action synergique لغرض زيادة القابلية للتثبيطية للمضاد و بالتالي زيادة الفعالية العلاجية.

من جهة أخرى يُمكن أن يُسبب تناول المُضادّات الحيوية كغيرها من الأدوية ظهور بعض الآثار الجانبية مثل تغيرات في لون الجلد و صداع الرأس و إسهال و غثيان وشعور بوجود طعم معدني في الفم، وصولاً إلى معاناة المريض من غازات البطن. (Mohsen et al., 2020)

على صعيد آخر لا تزال ظاهرة مقاومة جرثومة المعدة للمُضادّات الحيوية تشكّل إحدى أبرز المشاكل والتحدّيات التي يصطدم بها الأطباء و الباحثين، فحسب تقرير حديث قدّر خبراء الصّحة أنّ 3.57 مليون وفاة تم تسجيلها عام 2019 ترتبط بمقاومة جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* للمُضادّات الحيوية (Ahmed et al., 2022) فبالرغم أن بروتوكولات علاج الإصابة بجرثومة المعدة *Helicobacter pylori* باستخدام المُضادّات الحيوية أظهر نجاعة كبيرة إلا أنّ بعض سلالاتها بدأت تُظهر مقاومة لأنواع معينة من المُضادّات الحيوية (Roszczenko- Jasińska et al., 2020). ما دفع الباحثين إلى التحري عن مُضادّات جديدة والبحث عن أساليب

علاج بديلة عبر استهداف إنزيمات و بروتينات جديدة بواسطة مُنتجات طبيعية produits naturels للتغلب على السلالات البكتيرية المقاومة والتي تزيد من نسبة الوفيات والوبائية.

منذ العصور القديمة، شكّلت المنتجات الطبيعية produits naturels، مصدرًا مهمًا للأساليب العلاجية. في الوقت الحاضر، رغم التقدّم الكبير في مجال الصناعة الصيدلانية، فإنّ نحو 25% من الأدوية المُصنّعة مُستخرجة بصورة مباشرة أو غير مباشرة من النباتات كونها تُعتبر مصدر آمن إلى حد كبير يخلو استعمالها من الآثار الجانبية الضارة المُصاحبة عادة للأدوية المُصنّعة (Newman *et al.*, 2000 ; Calixto, 2019)

تحتوي النباتات على عناصر غذائية و مواد فعّالة طبيعية Constituents actifs يُعزى لمُعظمها الأثر الطّبي و المُفيد لصّحة الإنسان. قُسمت المواد الفعّالة الطبيعية على أساس خصائصها الكيميائية إلى ثمانية أقسام هي على التوالي: الفلافونويدات Flavonoïdes و القلويدات Alcaloïdes و الجلايكوسيدات Glycosides و الصابونيات Saponines و الدباغيات Tannines و الزيوت الأساسية Huiles essentielles و الراتنجيات Résines و الأحماض العضوية Acides organiques (Das & Gezici, 2018)

تنتشر الفلافونويدات بشكل واسع في المملكة النباتية، فهي جزء لا يتجزأ من نظامنا الغذائي لتواجدها في الخضروات و الفواكه و المُكسّرات و الزهور و الشاي...الخ، وعادة ما تنقسم إلى ست فئات هي مركبات flavonols (على سبيل المثال، Quercétine) و مركبات flavones (على سبيل المثال، Apigénine) و مركبات flavonones (على سبيل المثال، Naringénine) و مركبات Anthocyanidines (على سبيل المثال، Cyandine) و مركبات Isoflavonones (على سبيل المثال، Génistéine) و مركبات Flavanols (على سبيل المثال، Catéchine) (Parekh *et al.*, 2023)

تحتلّ الفلافونويدات المكانة الأهمّ في الدراسات العلمية لما تتميز به من خصائص بيولوجية هامة منها التأثير المُضاد للأكسدة antioxydant و التأثير المُضاد للالتهابات anti-inflammatoire و التأثير المُضاد للسرطنة anticancérigène و التأثير المُضاد للجراثومة المعدة antibactérienne (Wang *et al.*, 2018 ; ; Shamsudin *et al.*, 2022)

ومع التطور الكبير الذي شهدته العلوم التجريبية خلال العقدين الماضيين، وظهور علم البيومعلوماتية Bioinformatique، بوصفه علمًا يلتقي فيه النمو الهائل للتقنية الحيوية مع التطور المُطرد لتقانة المعلومات. حيث يدمج علم المعلوماتية الحيوية الحاسوب مع الرياضيات والجينوم والأحياء، ويتعامل مع الخلية وما تحتويه من أحماض ريبية نووية (ADN و ARN) وبروتينات كما لو أنها حاسوب.

يعتمد علم المعلوماتية الحيوية أساسًا على تطبيق أحدث التقنيات والبرامج الحاسوبية لدراسة، فهم، تحليل و تنظيم المعلومات و المُعطيات والبيانات المتعلقة بالجزئيات البيولوجية حيث يوجد مجالين في علم المعلوماتية الحيوية هما مجال Génomique ومجال Protéomique، من أجل ذلك اتجهت الأبحاث بقوة نحو هذا المجال خاصة في تطوير عقاقير وأدوية جديدة تستهدف بروتينات معينة بإيجاد الدواء المناسب للمُسبب الرئيسي للمرض.

يُعدّ الإرساء الجزيئي Docking moléculaire إحدى العمليات المستعملة في علم المعلوماتية الحيوية يتمثل في عملية محاكاة بين بروتين و جزيء باستعمال برامج مختلفة مثل برنامج GOLD و Glide و FlexX... الخ، تهدف هذه العملية إلى التنبؤ بمعقد جزيئي انطلاقًا من جزئيات مُنفصلة، حيث تُعتبر هذه الطريقة أقل تكلفة وأكثر سرعة من الطرائق التجريبية فهي

تساعد كثيرًا الباحثين في بحوثهم قبل ولوجهم إلى المخبر (Grosdidier, 2015)

من أجل ذلك تُعتبر البرامج الخاصة بعملية الإرساء الجزيئي Docking الأكثر استعمالًا في البيولوجيا، الصيدلة و الطب، لأنّ أغلب العناصر النشطة ingrédients actifs هي جزئيات صغيرة (مواد ارتباط) Ligands يُمكنها التفاعل مع جزئيات بيولوجية مُستهدفة مثل الإنزيمات (جزئيات مستقبلة).

ارتأينا في هذا العمل إجراء دراسة بيومعلوماتية (in silico) تتمحور حول تثبيط إنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة Helicobacter Pylori من طرف مجموعة من الفلافونيدات (إثنان وأربعون فلافونيدًا)، باستعمال وسائل بيومعلوماتية Outils bioinformatiques تتمثل أساسًا في برنامج Pymol الخاص بدراسة وعرض البنى الفراغية للبروتينات وبرنامج GOLD الخاص بعملية الإرساء الجزيئي.

يُحفز إنزيم Shikimate Kinase المُنتمي إلى عائلة الكيناز أحادي الفوسفات (MNP) حدوث التفاعل الخامس من مسار الـ Shikimate عبر فسفرة الركيزة Shikimate إلى Shikimate 3-phosphate باستعمال ATP، حيث يلعب مسار دورا في تركيب الأحماض الأمينية العطرية (فينيل ألانين Phe ، تريبتوفان Trp وتيروسين Tyr) (Masoko et al., 2016).

يتواجد Shikimate Kinase عند العديد من أنواع الكائنات الحيّة مثل الفطريات و جرثومة المعدة و النباتات الراقية، بينما لا يوجد له أي نظير في الخلايا البشرية (Gu et al., 2002) الأمر الذي يجعله هدفاً جذاباً من قبل الباحثين لتطوير مُضادّات حيويّة جديدة تستهدف الكائنات المُمرضة بالنسبة للإنسان مثل جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* المُسببة لعدة أمراض كالقرحة المعدية و سرطان المعدة.

تم تبويب هذه الدراسة في فصلين:

للـ فصل أول: يعرض الوسائل و الطرائق المُستعملة.

للـ فصل ثاني: يعرض أهمّ النتائج المُحصّل عليها مع مناقشتها ينتهي بخلاصة و أفاق مُستقبلية.

الفصل الأول:

الأساس العملي

- الوسائل:

1. جهاز الحاسوب:

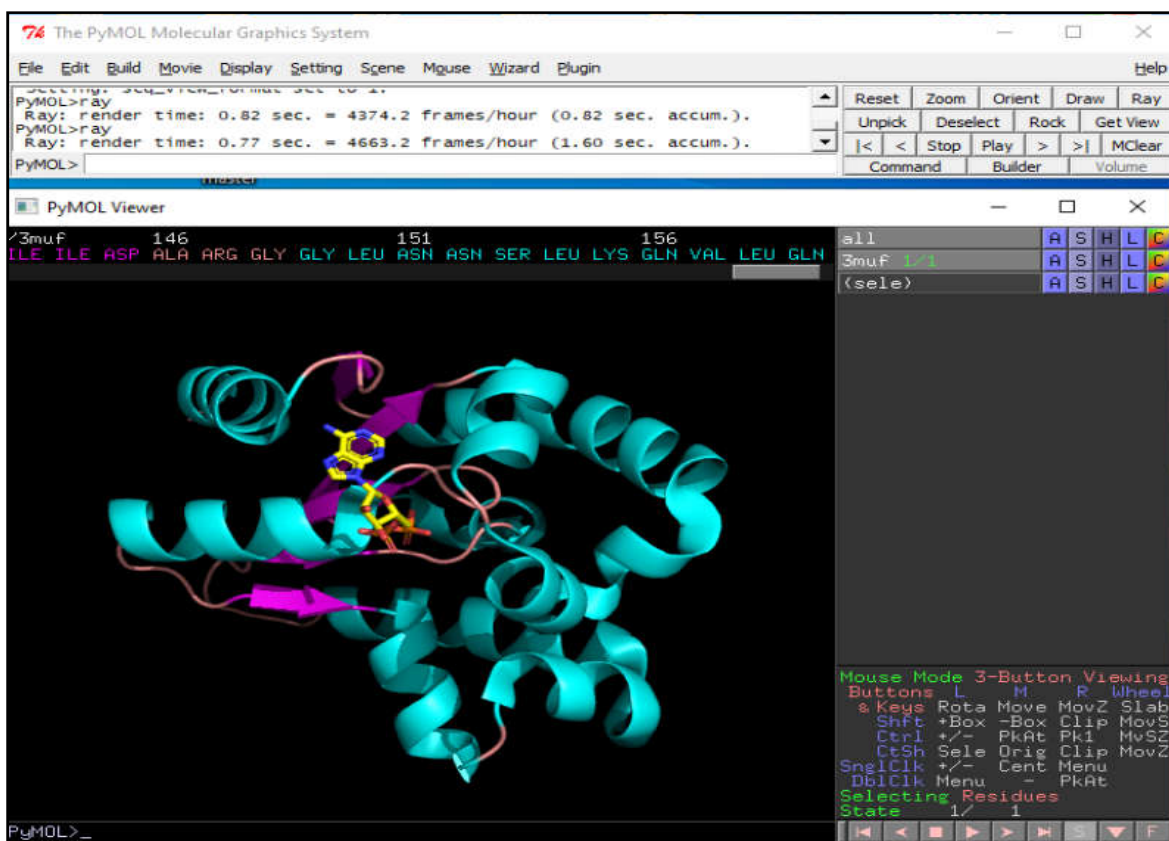
استعملنا خلال هذه الدراسة جهاز حاسوب ذو مواصفات عالية تتمثل في مُعالج Intel Core I7 بسرعة 2.8 ميغاهرتز و ذاكرة RAM بحجم 16 جيجابايت ونظام تشغيل Win 10 64 بت.

2. البرامج المُستعملة:

1.2 برنامج PyMOL:

برنامج لعرض و تصميم صور ثلاثية الأبعاد عالية الدقة للجزيئات الصغيرة والكبيرة خاصة البيولوجية منها مثل البروتينات (Ordog, 2008) حيث يُتوفر بعدة نُسخ منها الشكل المجاني على الموقع www.pymol.com، أين يُمكن تحميله ونقله من جهاز حاسوب إلى آخر، وتشغيله على أنظمة حاسوبية عديدة مثل: MacOS و Windows و Unix.

يتميز برنامج الـ *Pymol* بعدة خصائص تجذب إليه الباحثين في مجال المعلوماتية الحيوية نذكر منها مُعالجة البنيات ثلاثية الأبعاد بشكل جيد ومُتعدد كتوضيح توضُّعها الفراغي، وتحليل بعض خصائصها الكيميائية.

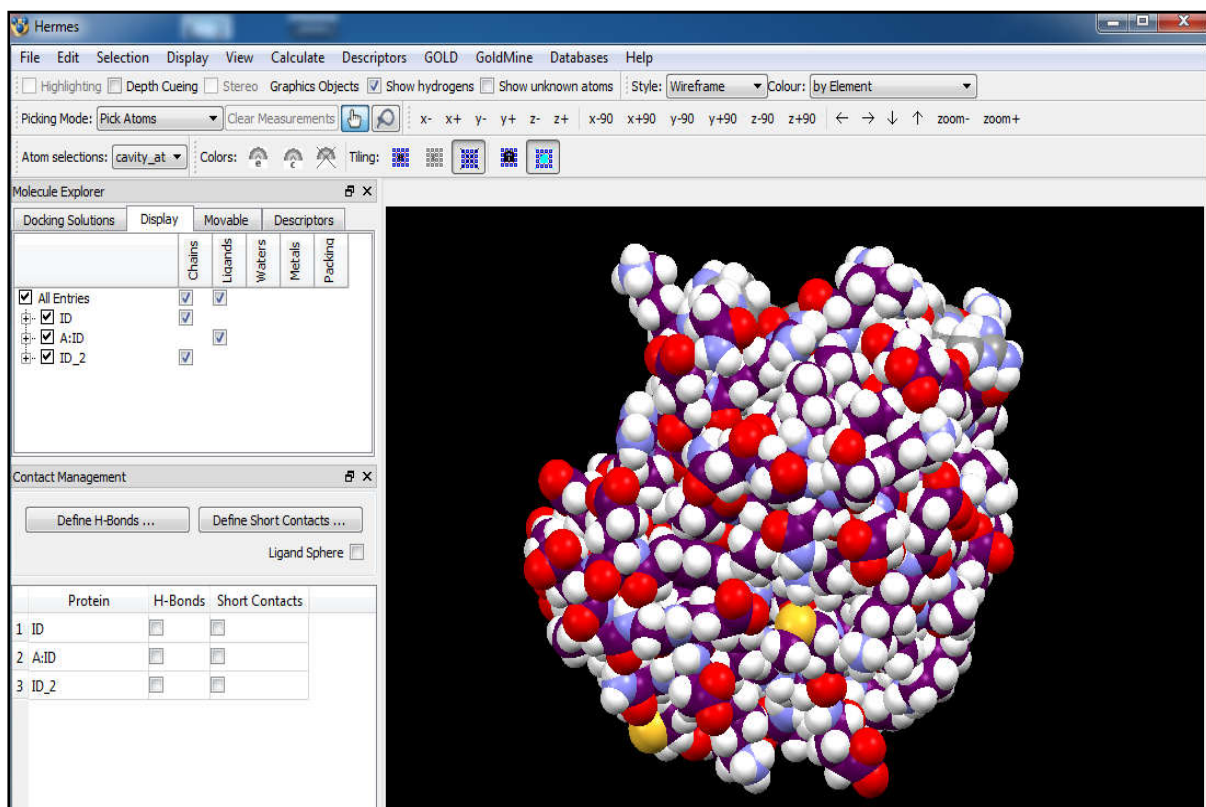


الشكل 01. نافذة العرض لبرنامج *Pymol*.

2.2. برنامج الـ GOLD : (Genetic Optimisation for Ligand Docking)

1.2.2. تعريف:

برنامج يُستعمل لإرساء Docking مادة ارتباط أو ركيذة Ligand صغيرة الوزن الجزيئي في موقع ارتباط على مُستوى بروتين (موقع فعال لأنزيم، مستقبل بروتيني...الخ).



الشكل 2. النافذة الرئيسية لبرنامج الإرساء GOLD.

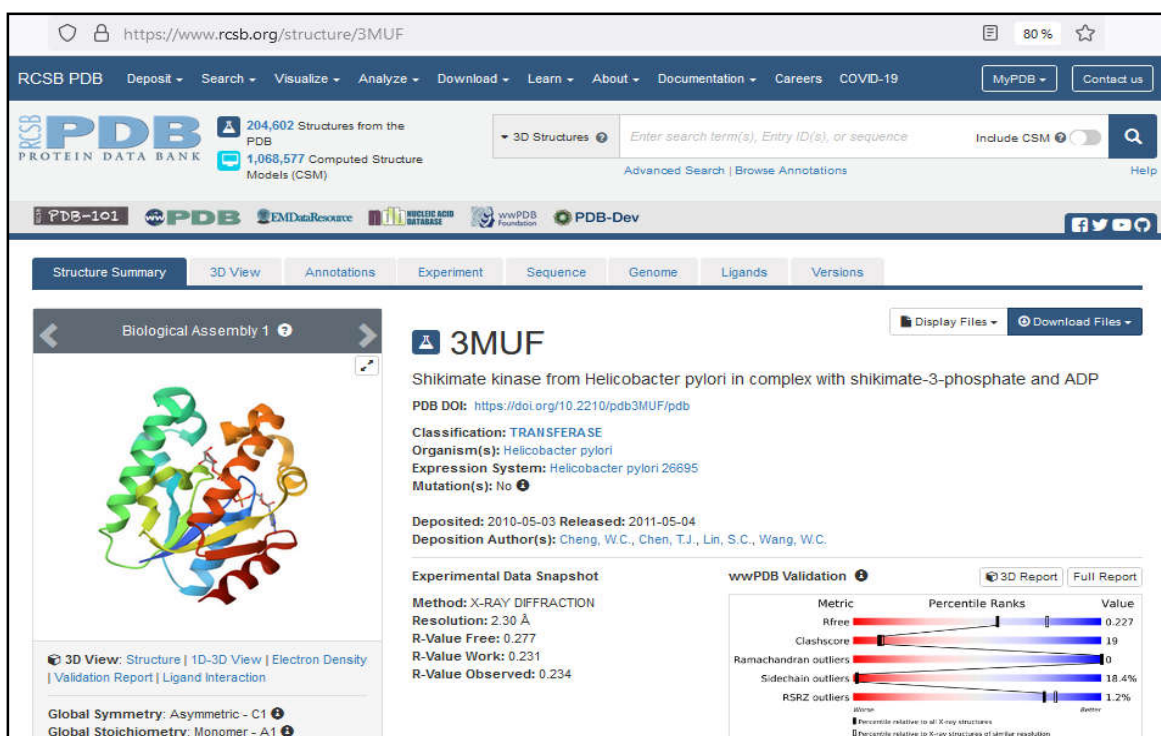
يتنبأ برنامج GOLD بالألفة *affinité* أو درجة انجذاب مواد الارتباط ligands نحو موقع مستهدف في البروتين، اعتماداً على أنواع الروابط الكيميائية الناشئة بين مادة الارتباط و جذور الأحماض الأمينية المشكلة للموقع المُستهدف (Started *et al.*, 2020) حيث يُعبّر عن الألفة بواسطة GOLD Fitness Score المُعتمد على الميكانيك الجزيئي. يعتمد برنامج GOLD مبدأ تحديد المجاميع المانحة والمُستقبلة بغية تشكيل الروابط الهيدروجينية على مستوى البروتين ومادة الارتباط، حيث تتقابل المجاميع المانحة في البروتين مع المجاميع المُستقبلة في مادة الارتباط والعكس صحيح. تسمح قيم Docking score بترتيب مواد الارتباط ligand من حيث ألفتها (درجة الانجذاب) لتشكيل روابط مع موقع مُستهدف في بروتين مُعيّن (Verdonk *et al.*, 2003)

تؤخذ قيمة التوافق Fitness Score كقيمة سالبة، لذلك كلما كانت هذه القيمة كبيرة كلما كان التنبؤ بالارتباط جيداً (Started *et al.*, 2020).

يستعمل برنامج الإرساء GOLD نوع من الخوارزميات يسمى الخوارزمية الوراثة Algorithmme génétique (GA)، التي تعتمد على عرض عدد كبير من الاحتمالات لارتباط مادة التفاعل في موقع الارتباط على مستوى بروتين مُستهدف (Jones *et al.*, 1997)

3. بنك مُعطيات البروتينات (PDB) Protein Data Bank

بنك يحتوي خصوصا على الملفات الأصلية للبروتينات، يملك كل بروتين رمز واحد خاص به، يُسهل الحصول على ملفات البروتينات. يُقدّم البنك معلومات وتحاليل خاصة بكل بنية سواء بما تعلق بالروابط الكيميائية، أو معلومات خاصة بنمط التجربة المُستعملة في تحديد البنية ثلاثية الأبعاد (الرنين النووي المغناطيسي RMN أو الأشعة السينية X) مع تحديد دقة التصميم (Résolution)، هذه الأخيرة كلما كانت جيدة Haute résolution كان تحديد موقع الارتباط site d'interaction في البروتين دقيقا ما سينعكس بالإيجاب على نتائج الإرساء Docking (Jone *et al* ; 1997). يتم تزويد البنك بصورة دورية بملفات بروتينات جديدة مرفوقة بالمقال العلمي، للإشارة كشف تفحص بنك PDB بتاريخ 07 جوان 2023 عن احتواءه على 205701 ملفاً.

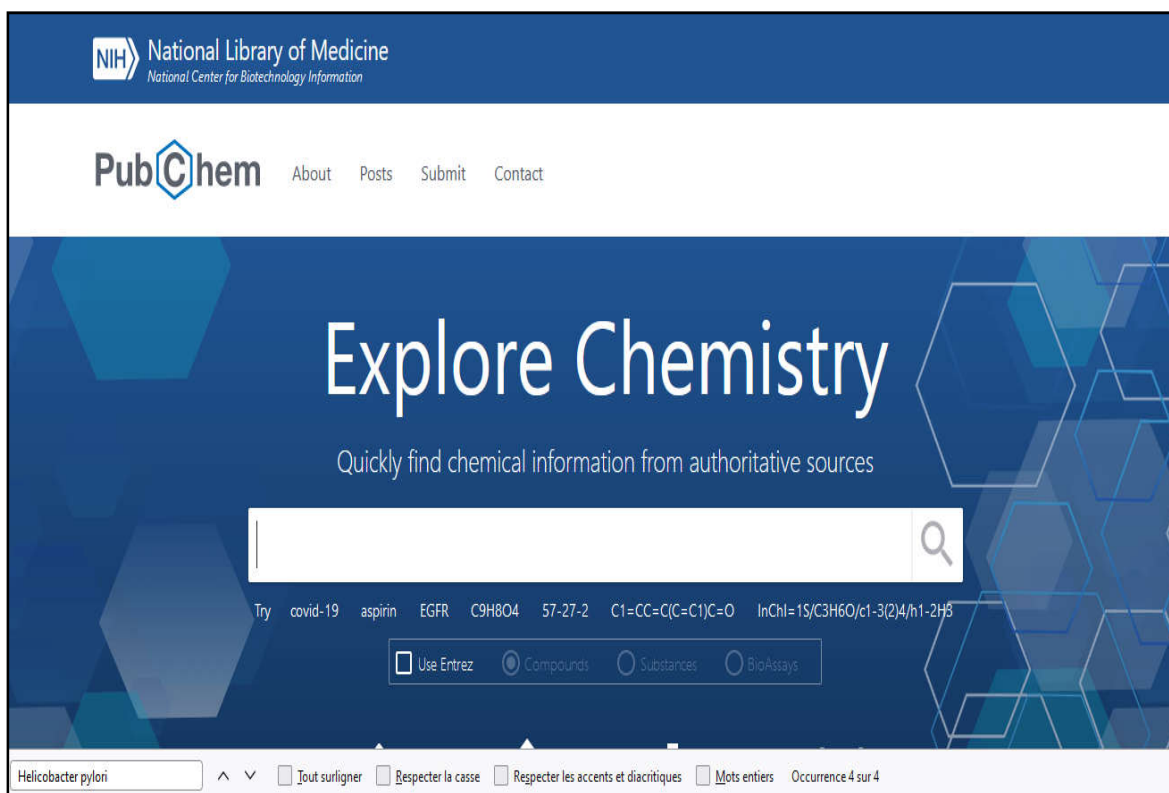


The screenshot shows the RCSB PDB website interface for entry 3MUF. The main content area includes a 3D ribbon diagram of the protein structure, a classification as TRANSFERASE, and organism information as Helicobacter pylori. The experimental data section indicates the method is X-RAY DIFFRACTION with a resolution of 2.30 Å. A validation report is also present, showing metrics such as R-free (0.227), Clashscore (19), Ramachandran outliers (0), Sidechain outliers (18.4%), and RSRZ outliers (1.2%).

الشكل 3. نافذة العرض لموقع بنك معطيات البروتينات PDB على شبكة الانترنت.

4. بنك مُعطيات الجزيئات الكيميائية Pubchem :

هُو بنك مُعطيات أمريكي خاص بالجزيئات الكيميائية و البيوكيميائية مُسيّر من طرف المركز الوطني للمعلوماتية و التكنولوجيا الحيوية (NCBI) الذي يُمثل بدوره فرع من المكتبة الوطنية للطب في الولايات المتحدة الأمريكية. يُمثّل بنك Pubchem مُستودع لملايين الجزيئات الكيميائية مُتوفرة بصورة مجانية لكل مُتفحّص للموقع، حيث يُوفّر البنك معلومات تُخصّ الخصائص الفارماكولوجية و الكيميائية و السُمومية لكل جزيئة كيميائية.



الشكل 4. نافذة العرض لموقع بنك معطيات الجزيئات Pubchem على شبكة الانترنت.

5. بنية الـ Shikimate kinase المُختارة في الدراسة:

يتوفّر بنك الـ PDB على ستة بنيات Shikimate kinase تُخصّ بكتيريا *Helicobacter pylori* تمّ الحصول عليها جميعًا باستعمال تقنية الدراسة البلورية بواسطة الأشعة السينية Cristallographie aux rayons X (الجدول 1).

الجدول 1. بُنيات الـ **Shikimate kinase** المُختارة مع مصدر ورمز ودقة تصميم كل منها.

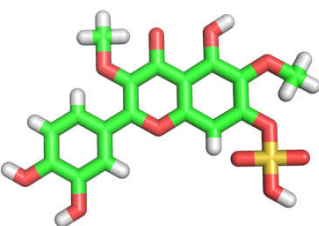
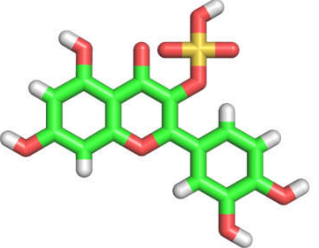
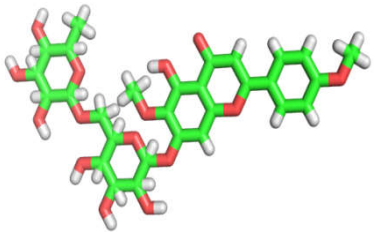
المرجع	مادة الارتباط	دقة التصميم	الرمز في بنك الـ PDB
(Cheng <i>et al.</i> , 2005)	لا توجد	1.80Å	1ZUH
(Cheng <i>et al.</i> , 2005)	Shikimate-3-phosphate	2.30Å	1ZUI
(Cheng <i>et al.</i> , 2012)	لا توجد	1.80Å	3HR7
(Cheng <i>et al.</i> , 2012)	Shikimate-3-phosphate و ADP	2.30Å	3MUF
(Cheng <i>et al.</i> , 2012)	لا توجد	2.40Å	3MRS
(Cheng <i>et al.</i> , 2012)	NSC162535	2.53Å	3N2E

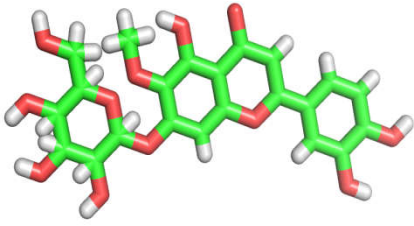
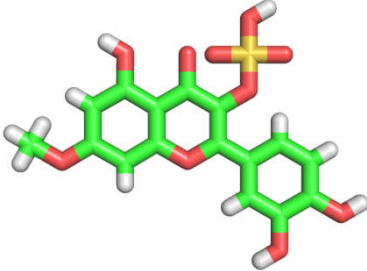
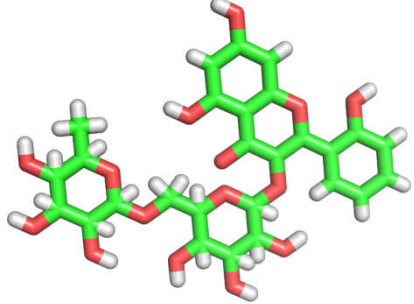
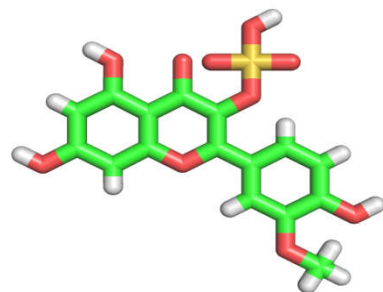
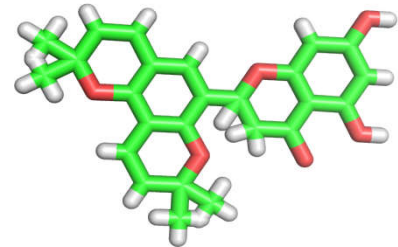
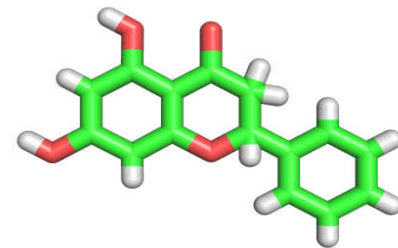
6. الفلافونيدات المُستعملة في عملية الإرساء:

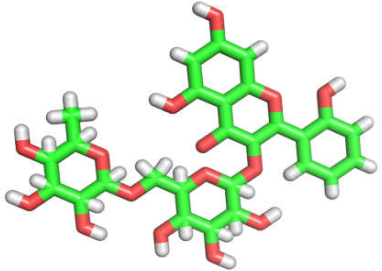
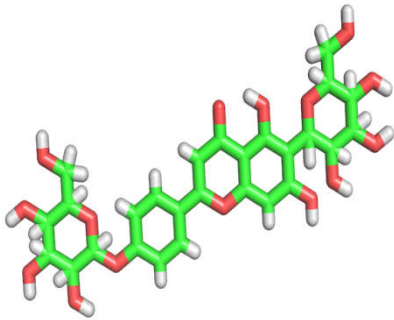
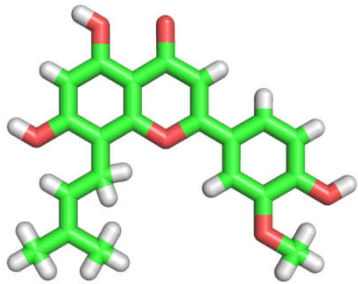
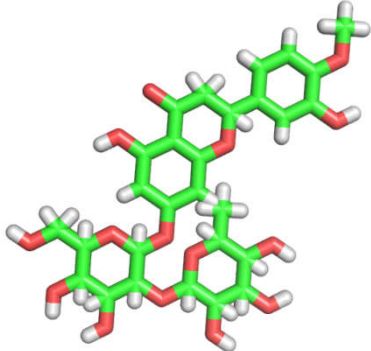
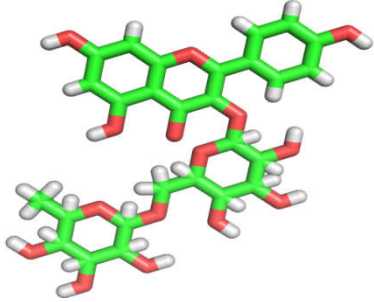
وقع اختيارنا على إثنان وأربعون فلافونيداً تنتشر في الأغذية المتناولة من طرف الإنسان، فُمنّا بتحميل البنية ثنائية الأبعاد (2D) للفلافونيدات المُختارة (الجدول 2) من بنك Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) في شكل ملف SDF.

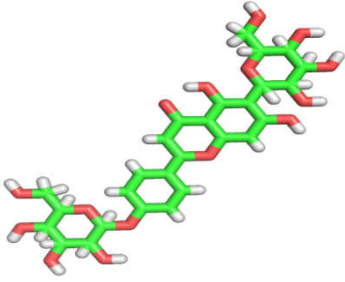
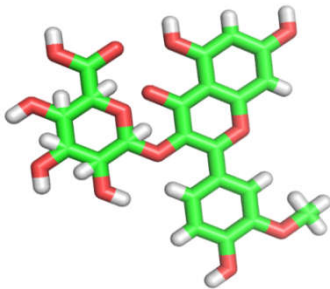
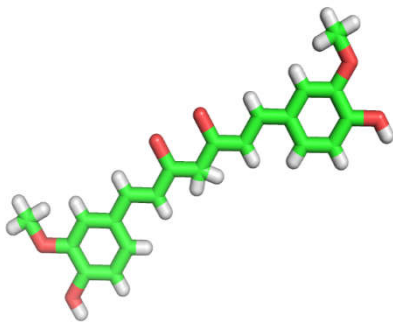
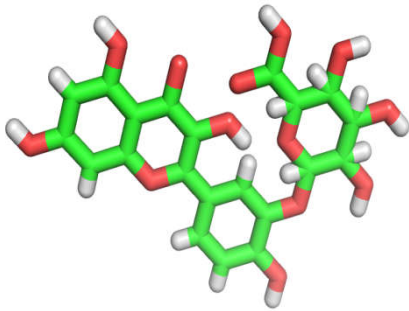
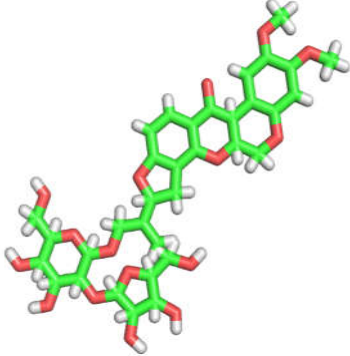
بواسطة برنامج Lig-Prep تمّ تحويلها إلى بنية ثلاثية الأبعاد (3D) كخطوة أولى ثم إلى ملف MOL2 كخطوة ثانية لغرض استعماله في عملية الإرساء بواسطة برنامج GOLD لاحقاً.

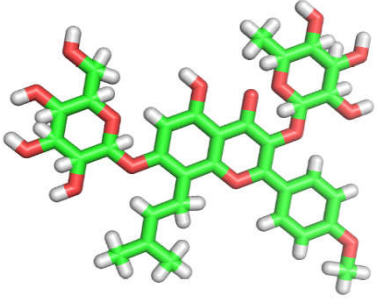
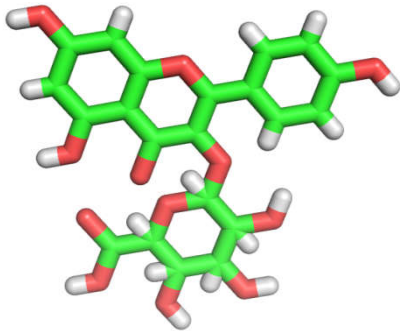
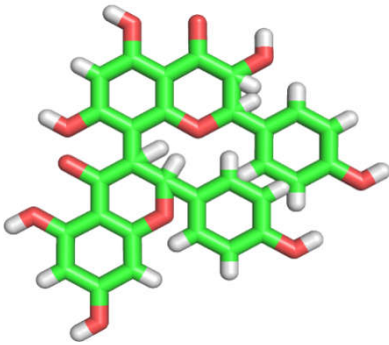
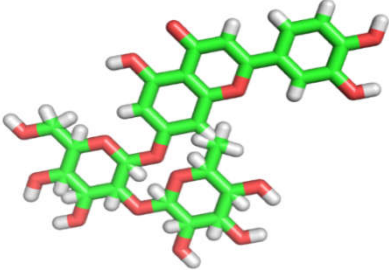
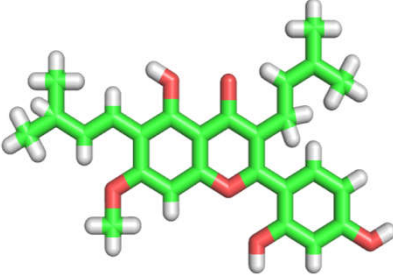
الجدول 2. بنية الفلافونيدات المُختارة المُحملة من بنك Pubchem.

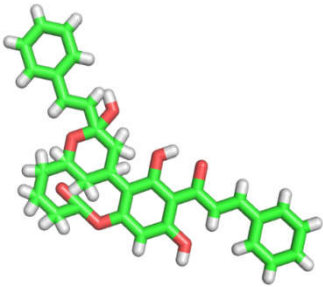
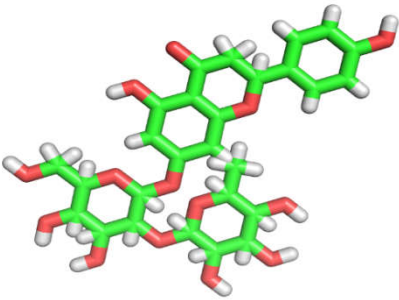
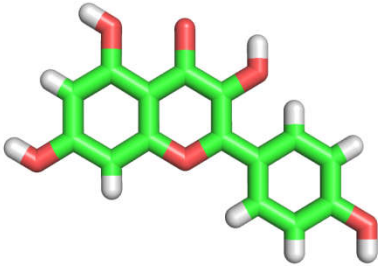
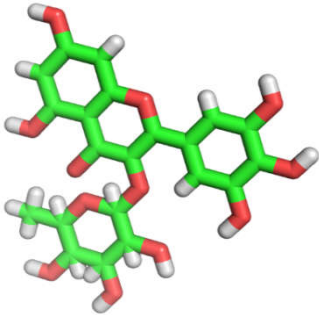
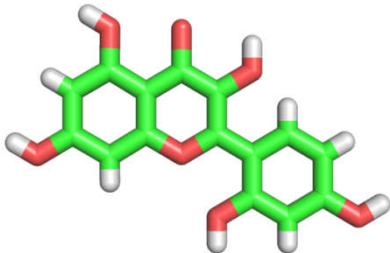
اسم المركب	الصيغة الكيميائية الإجمالية	البنية ثنائية الأبعاد
Axillarin 7-sulfate	$C_{17}H_{14}O_{11}S$	
Quercetin 3-sulfate	$C_{15}H_{10}O_{10}S$	
Pectolarine	$C_{29}H_{34}O_{15}$	

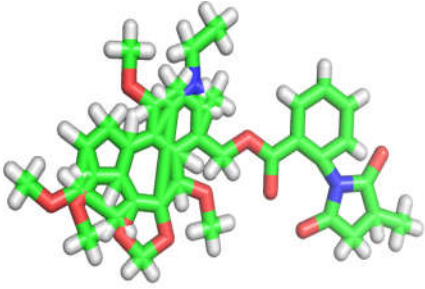
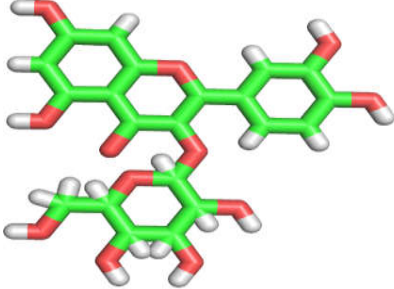
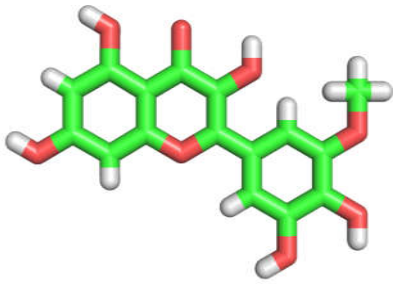
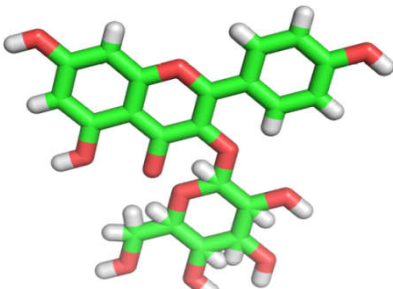
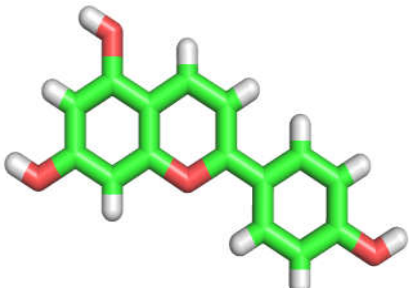
	$C_{22}H_{22}O_{12}$	<p>Nepitrin</p>
	$C_{16}H_{12}O_{10}S$	<p>Rhamnetin3-O-sulfate</p>
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	<p>Datiscin</p>
	$C_{16}H_{12}O_{10}S$	<p>Persicarin</p>
	$C_{25}H_{24}O_6$	<p>Sanggenol O</p>
	$C_{15}H_{12}O_4$	<p>Pinocembrin</p>

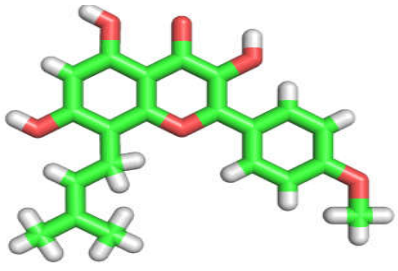
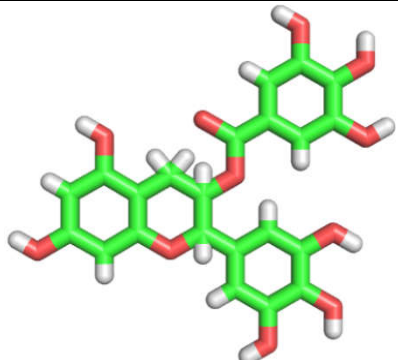
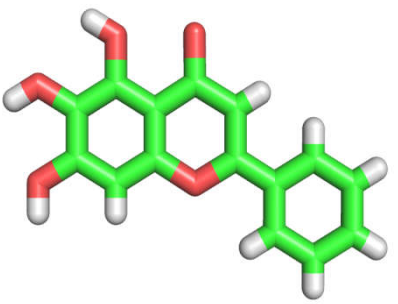
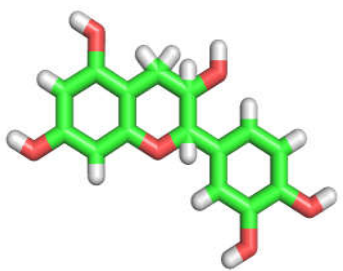
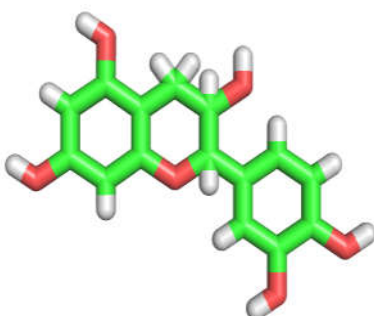
	$C_{27}H_{30}O$	Rutin
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Isosaponarin
	$C_{21}H_{20}O_6$	Caflanone
	$C_{28}H_{34}O_{15}$	Neohesperidin
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Nicotiflorin

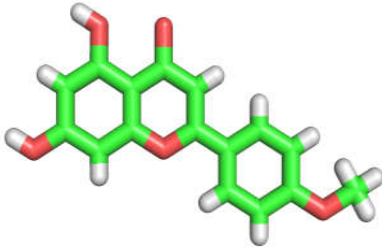
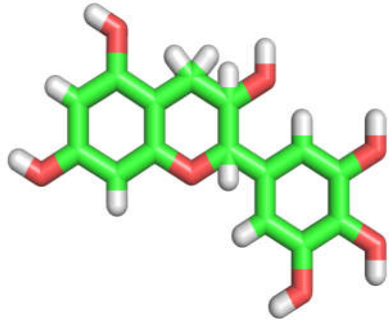
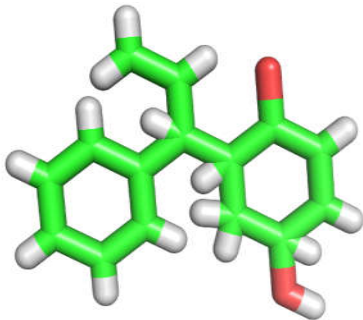
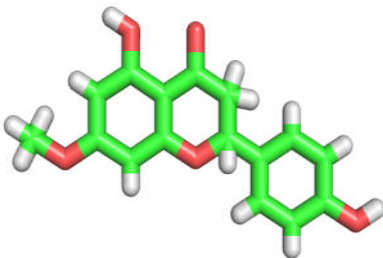
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Flavonoid LP
	$C_{22}H_{20}O_{13}$	Isorhamnetin 3- _glucuronide
	$C_{21}H_{20}O_6$	Curcumin
	$C_{21}H_{18}O_{13}$	Quercetin_3-glucuronide
	$C_{34}H_{40}O_{16}$	Amorphin Flavonoid

	$C_{33}H_{40}O_{15}$	Icariin
	$C_{21}H_{18}O_{12}$	Kaempferol 3-glucuronide
	$C_{30}H_{22}O_{12}$	Garcinia biflavonoid
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Lonicerin
	$C_{26}H_{28}O_6$	Artocarpin

	$C_{32}H_{30}O_7$	kurzichalcolactone
	$C_{27}H_{32}O_{14}$	Naringin
	$C_{15}H_{10}O_6$	Kaempferol
	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Myricitrin
	$C_{15}H_{10}O_7$	Morin

	$C_{38}H_{50}NO_{10}$	Elatin
	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Isoquercitrin
	$C_{16}H_{12}O_8$	Laricitrin
	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Astragalin
	$C_{21}H_{20}O_{4+}$	Apigenidin

	$C_{15}H_{11}O_6$	Icaritin
	$C_{22}H_{18}O_{11}$	Epigallocatechin Gallate
	$C_{15}H_{10}O_5$	Baicalein
	$C_{15}H_{14}O_6$	Catechin
	$C_{15}H_{14}O_6$	Epicatechin

	$C_{16}H_{12}O_5$	Acacetin
	$C_{15}H_{14}O_7$	Epigallocatechin
	$C_{15}H_{16}O_2$	Propolis neoflavonoid
	$C_{16}H_{14}O_5$	Sakuranetin

II- الطرائق:**1. تحضير البروتين لعملية الإرساء (Docking):**

تم تحميل بنية الإنزيم المُختار من بنك PDB باستخدام رمز الـ PDB، لاستعماله من طرف برنامج الـ GOLD، أين تمت إضافة ذرات الهيدروجين إلى البنية البروتينية بعد حذف جزيئات الماء المُعيقة لعملية الإرساء.

2. تحديد موقع الارتباط:

باستخدام برنامج *Pymol* قمنا بتحديد الأحماض الأمينية الداخلة في الموقع الفعّال (موقع ارتباط ADP) لإنزيم Shikimate Kinase المُختار (رمز PDB: 3MUF).

3. عملية الإرساء:

باستخدام برنامج GOLD وبعد تحقيق جميع الشروط السابقة يتم إجراء عملية إرساء الفلافونيدات المُختارة في الموقع المُستهدف (موقع ارتباط ATP) في الإنزيم، حيث نتحصّل مع كل إنزيم على ثلاثة احتمالات للارتباط يُعبّر عنها بـ GOLD score، يتم اختيار أحسنها Meilleur score.

4. القاعدة خمسة للعالم Lipinski:

نشر العالم Christopher Lipinski عام 1997 قاعدته المعروفة باسم القاعدة خمسة (la règle de 5) حدّد فيها خمسة مواصفات للأدوية التي تؤخذ عن طريق الفم (biodisponibilité la par voie orale تُشير إلى بعض المواصفات الجزيئية للمركبات التي تُؤهلها إلى أن تكون أدوية ويمكنها الحصول على المُصادقة Approbation من قبل الجهات المختصة مثل إدارة الغذاء والدواء (FDA). (Ntie-Kang, 2013) تستند هذه القاعدة إلى تميّز المركب بخاصية الامتصاصية أو النفاذية إذا ما حقّق على الأقل ثلاثة من المعايير الفيزيوكيميائية التالية:

◀ الوزن الجزيئي ≥ 500 دالتون.

◀ لوغاريتم معامل التوزع في الدهون (Log P) ≥ 5 .

◀ عدد الذرّات المعطية للروابط الهيدروجينية (OH.NH) ≥ 5

◀ عدد الذرّات المستقبلة للروابط الهيدروجينية (H) ≥ 10 .

◀ عدد الروابط الدوّارة (rotables) ≥ 15 .

يتم حساب المعايير السابقة باستعمال الموقع التالي: <https://www.molinspiration.com>

الفصل الثاني:

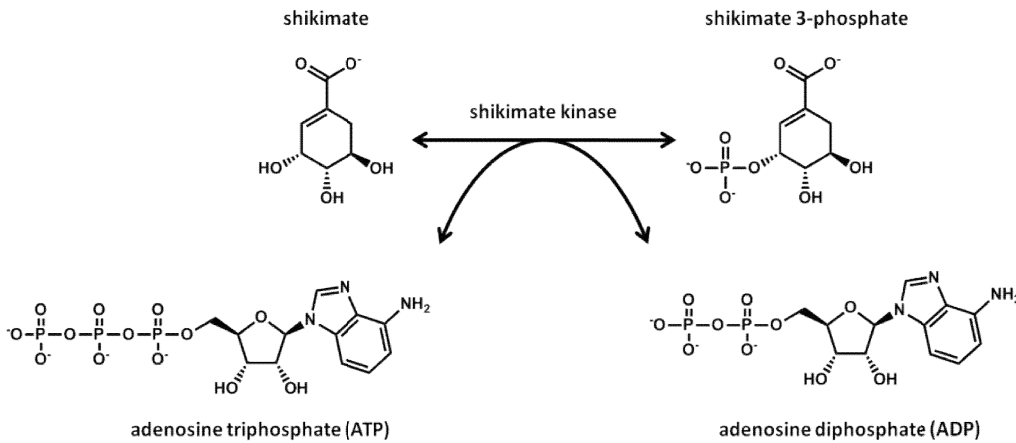
النتائج والمناقشة

النتائج والمناقشة:

1. إنزيم Shikimate Kinase:

1.1. تعريف:

يحفز إنزيم Shikimate Kinase المنتمي إلى عائلة الكيناز أحادي الفوسفات (MNP) حدوث التفاعل الخامس من مسار الـ Shikimate عبر فسفرة الركيزة Shikimate إلى Shikimate 3-phosphate باستعمال ATP (Masoko *et al.*, 2016) حسبما يوضحه التفاعل التالي:

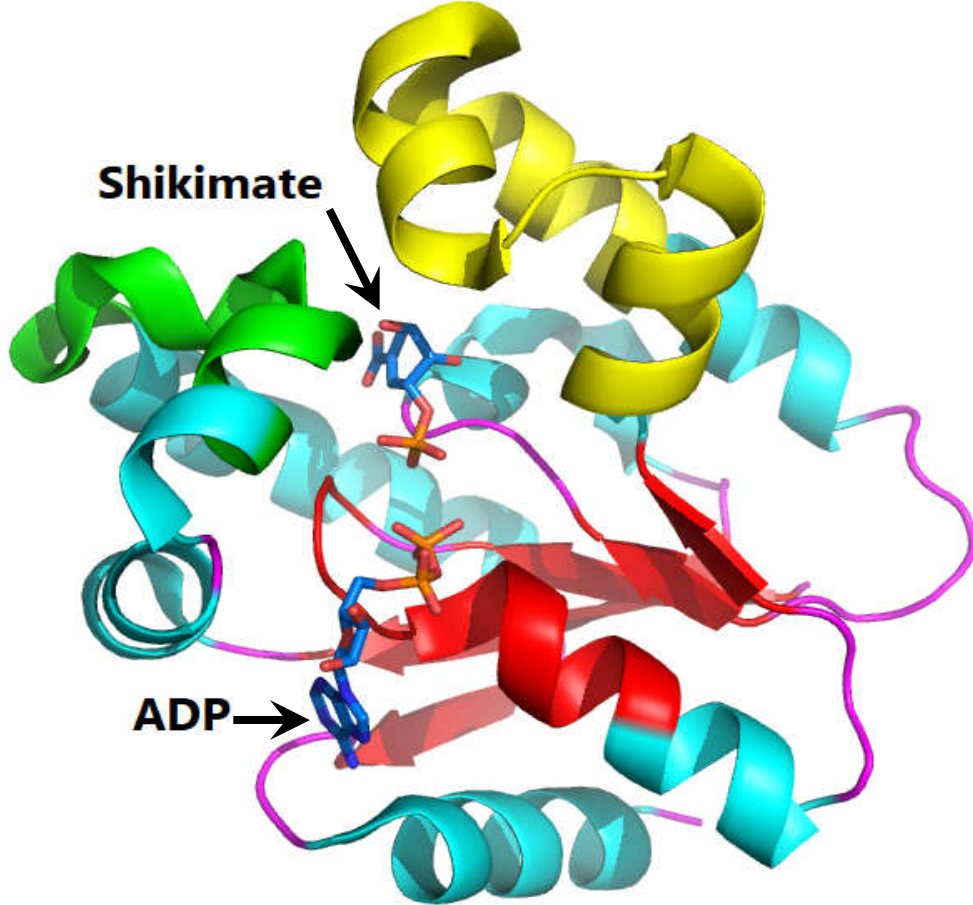


2.1. وصف البنية الفراغية:

يمتلك Shikimate Kinase مستوى بنائي ثالثي Structure tertiaire، حيث يتكون من سلسلة ببتيدية واحدة تتضمن خمسة بنيات ثانوية متوازية من النمط β (التفاف بشكل وريقات مطوية)، تُحيط بها ثمانية بنيات ثانوية من النمط α (التفاف حلزوني) تفصل بينها تسعة مناطق انعطاف. (Vianna & De Azevedo, 2012)

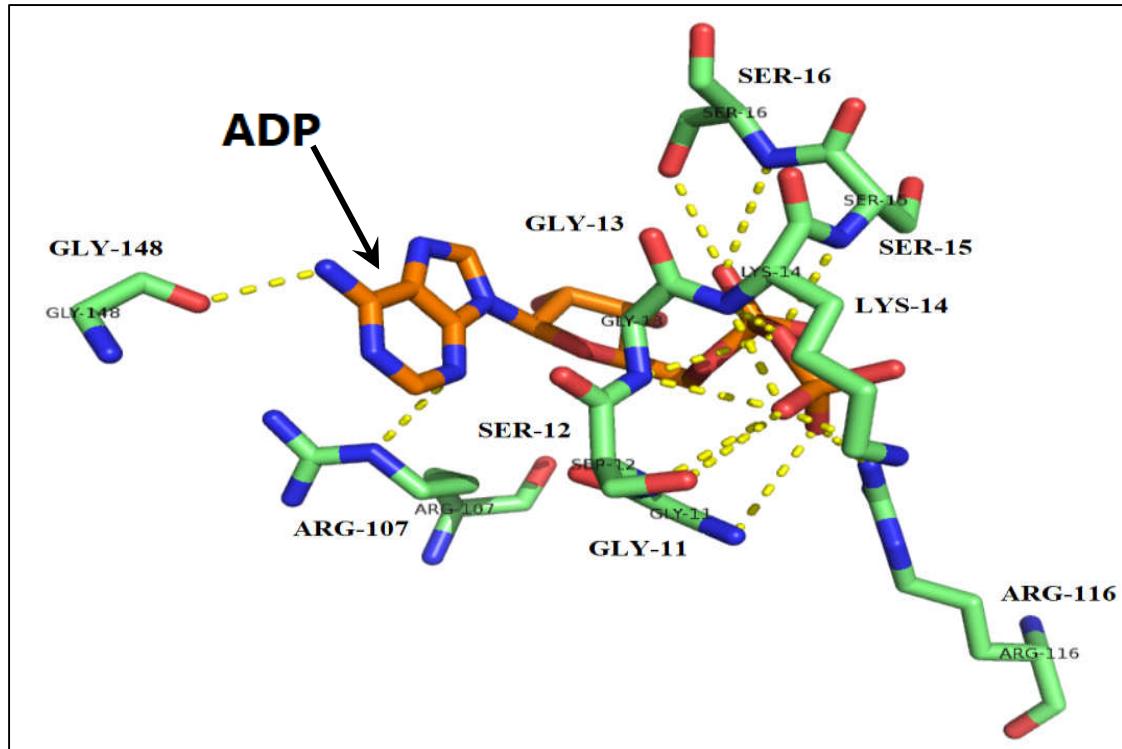
يحتوي الإنزيم Shikimate Kinase على موقع فعال يتشكل من منطقتين إحدهما تُخصّ ارتباط ATP (الركيزة الأولى) و الأخرى تخص ارتباط Shikimate (الركيزة الثانية). (الشكل 5).
 يتمركز الموقع الفعال للإنزيم Shikimate Kinase ضمن ثلاثة مجالات هي: CORE و LID و SB حيث: تتموقع ATP بين المجالين CORE و LID، بينما يتموقع Shikimate ضمن المجال SB (Vianna & De Azevedo, 2012)، تتلخص مميزات كل مجال فيما يلي:
 المجال CORE يتكون من الخمس بنيات ثانوية β رفقة الحلقة المكونة من تتابع الأحماض الأمينية المحصور بين الحمض الأميني PHE 9 إلى LEU 17.

المجال LID يتكون من تتابع الأحماض الأمينية المحصور بين GLY112 و ASP124، أين يتضمن هذا المجال حمض أميني أساسي هو ARG116 الضروري لارتباط ATP. المجال SB يتكون من تتابع الأحماض الأمينية المحصور بين THR33 و GLU61.



الشكل 5. نموذج ثلاثي الأبعاد لإنزيم Shikimate kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*. (رمز ملف PDB: 3MUF). يظهر المجال CORE باللون الأحمر، و يظهر المجال LID باللون الأخضر و يظهر مجال ربط الركيزة (SB) باللون الأصفر، بينما تظهر كل من ADP و Shikimate وفق أنموذج العود bâtonnet (بذرات كربون ملونة بالأزرق). صورة مُنجزَة بواسطة برنامج *Pymol*.

بواسطة برنامج الـ *Pymol* قمنا بتحديد الأحماض الأمينية المُشكّلة للموقع المُستهدف في عملية الإرساء والمتمثل في منطقة ارتباط ADP في مستوى الموقع الفعال للإنزيم Kinase Shikimate وهذا ضمن حيز قدره 6Å حول ADP (رمز ملف PDB: 3MUF). أين حدّدنا الأحماض الأمينية التالية: GLY11 و SER12 و GLY13 و LYS14 و SER15 و SER16 و ARG107 و ARG116 و GLY148. (الشكل 6).



الشكل 6. الأحماض الأمينية المشكلة لموقع ارتباط ADP ضمن الموقع الفعّال لإنزيم SK عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* (رمز ملف PDB: 3MUF). تظهر الأحماض الأمينية وفق أنموذج العود (ذرات الكربون ملونة بالأخضر) ترتبط جذورها (R) بروابط هيدروجينية (تظهر بخط متقطع بلون أصفر) مع الـ ADP الظاهرة وفق أنموذج العود (ذرات الكربون ملونة بالبرتقالي). صورة مأخوذة بواسطة برنامج *Pymol*.

2. اختبار موثوقية برنامج الإرساء المستخدم : *Fiabilité de programme utilisé*

كخطوة أولى يلجأ الباحثون دائماً خلال الدراسة البيومعلوماتية *in silico* إلى اختبار موثوقية برنامج الإرساء الجزيئي المُستعمل بواسطة حساب قيمة الجذر التربيعي لمتوسط المربعات (RMSD) مرفوقاً بإجراء التحليل البصري *L'analyse visuelle*.

1.2 الجذر التربيعي لمتوسط المربعات (RMSD) *L'écart quadratique moyen*

تُعبّر قيمة RMSD المحسوبة على قدرة أي برنامج إرساء جزيئي على محاكاة ربط الركيزة Ligand في موقعها الصحيح، إذ تُعبّر عن درجة الانحياز *Déviations* بين الركيزة الحقيقية المرتبطة بالموقع الفعّال للإنزيم *ligand cocrystallisé* و ذات الركيزة المُعاد إرسائها عن طريق البرنامج حيث لا يجب أن تتعدى قيمة RMSD عتبة 2Å (*Cross et al., 2009*)

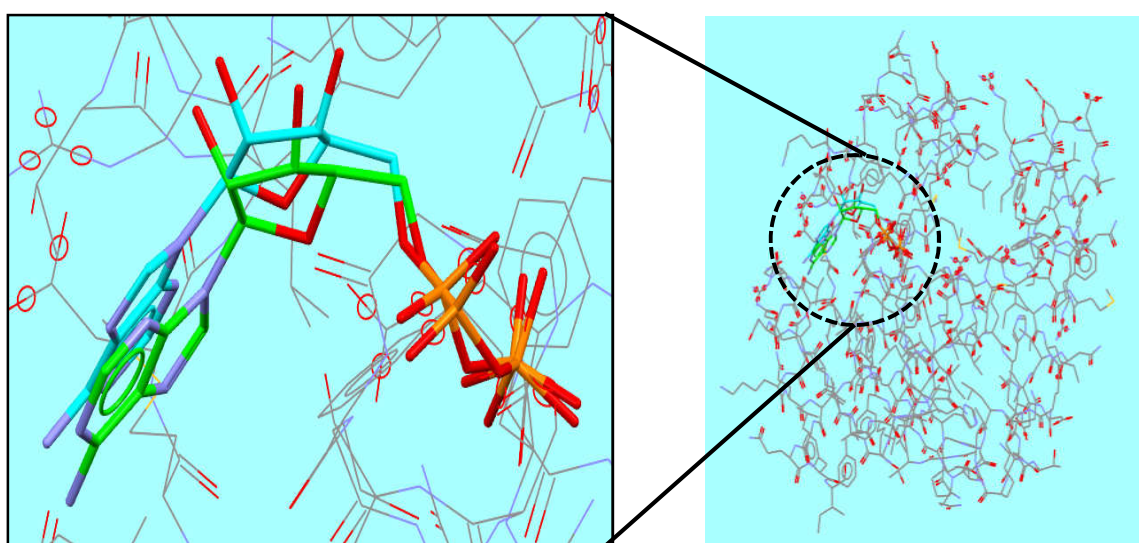
من أجل ذلك أجرينا اختبار موثوقية لبرنامج GOLD باستعمال ملف PDB (3MUF) أين جاءت قيمة الـ RMSD للركيزة المرتبطة ADP ضمن الموقع الفعّال للإنزيم *Shikimate*

kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*، دون عتبة 2Å بقيمة تبلغ 1.6Å ما يدل على موثوقية برنامج الإرساء المُستعمل (الجدول 3).

الجدول 3. نتائج حساب قيمة الـ RMSD للمعدد (Shikimate Kinase - ADP).

قيمة RMSD	دقة التصميم Résolution	الركيزة المرتبطة	رمز ملف الـ PDB	الجرثومة المعدة
1.6Å	2.3Å	ADP	3MUF	<i>Helicobacter pylori</i>

من جهة أخرى جاءت نتيجة GOLD score مع الركيزة ADP تساوي 85.64 (Kcal/mol)، حيث أظهرت نتيجة التحليل البصري بواسطة برنامج GOLD ارتباط الركيزة ADP بواسطة تسعة روابط هيدروجينية نشأت بين جذور الأحماض الأمينية: GLY13 و LYS14 و SER15 و SER16 و ARG116 و ALA146 و LEU150 المشكلة للموقع الفعال للإنزيم والركيزة ADP ما سمح بتمركز جيد لهذه الأخيرة في الموقع الفعال (الجدول 4 والشكل 8).



الشكل 7. مطابقة superposition منجزة بواسطة برنامج الـ GOLD للركيزة ADP قبل الإرساء (يظهر الكربون باللون الأخضر) وبعده الإرساء (يظهر الكربون باللون الأزرق السماوي) في الموقع الفعال لإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* (الركيزة ADP مُمثلة وفق أنموذج العود bâtonnet، رمز ملف الـ PDB: 3MUF، قيمة RMSD = 1.60Å).



الشكل 8. آلية ارتباط الـ ADP في الموقع الفعّال لإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*. صورة مأخوذة بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD .

الجدول 4. الروابط الهيدروجينية الناشئة بين الركيزة ADP و الموقع الفعّال للإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
(N)11GLY	O	2.545
GLY13 (N)	N	2.984
LYS14 (N)	O	2.490
	O	2.538
	O	2.928
GLY80 (N)	O	2.810
GLU112 (O)	O	2.379
	O	2.981
ARG116 (N)	O	2.952
	O	2.693
	O	2.787

3. إرساء الفلافونيدات المختارة في الموقع الفعّال للإنزيم Shikimate kinase بواسطة برنامج GOLD:

بهدف الوصول إلى اختيار مثبّط للإنزيم Shikimate kinase، تمّ إرساء الفلافونيدات المختارة في موقع ارتباط الـ ADP في إنزيم Shikimate Kinase بعدها انتخبنا أفضل النتائج من حيث قيمة GOLD score مقارنة مع نتيجة الـ ADP، نتائج الإرساء المحصّل عليها ممثلة في الجدول 5.

الجدول 5. نتائج الإرساء الجزيئي للفلافونيدات المختارة باستعمال برنامج GOLD

	مواد الارتباط المختبرة	GOLD score (Kcal/mol)
1	ADP (ligand cocrystallisé)	85.64
2	Axillarin7-sulfate	85.57
3	Quercetin3-sulfate	77.15
4	Pectolarine	74.01
5	Nepitrin	74.78
6	Rhamnetin 3-O-sulfate	74.40
7	Datiscin	74.31
8	Persicarin	73.02
9	Sanggenol O	74.14
10	Pinocembrin	73.06
11	Rutin	72.38
12	Isosaponarin	70.27
13	Caflanone	69.50
14	Neohesperidin	69.31
15	Nicotiflorin	69.02
16	Flavonoid LP	68.68
17	Isorhamnetin 3-glucuronide	68.17
18	Curcumin	67.79
19	Quercetin 3-glucuronide	65.77
20	Amorphin Flavonoid	65.31
21	Icariin	64.88
22	Kaempferol 3-glucuronide	64.40
23	Garcinia biflavonoid	63.05
24	Lonicerin	62.92
25	Artocarpin	61.95
26	kurzichalcolactone	61.56
27	Naringin	61.48
28	Kaempferol	61.47
29	Myricitrin	59.31
30	Morin	58.93
31	Elatin	56.71
32	Isoquercitrin	56.31
33	Laricitrin	55.31
34	Astragalin	55.16
35	Apigenidin	54.99
36	Icaritin	54.65
37	Epigallocatechin Gallate	53.10
38	Baicalein	49.47
49	Catechin	49.46
40	Epicatechin	48.21
41	Acacetin	47.91
42	Sakuranetin	44.59
43	Propolisneoflavonoid	40.64

من خلال النتائج الموضحة في الجدول جاءت أعلى قيمة GOLD score مع الركيبة ADP بقيمة قدرها 85.64Kcal/mol، تلاها الفلافونويد Axillarin7-sulfate بقيمة قدرها 85.07Kcal/mol، متبوعاً بالفلافونيد Quercetin3-sulfate بقيمة GOLD score قدرها 77.15 Kcal/mol، لتلحق باقي الفلافونيدات مرتبة تنازلياً تبعاً.

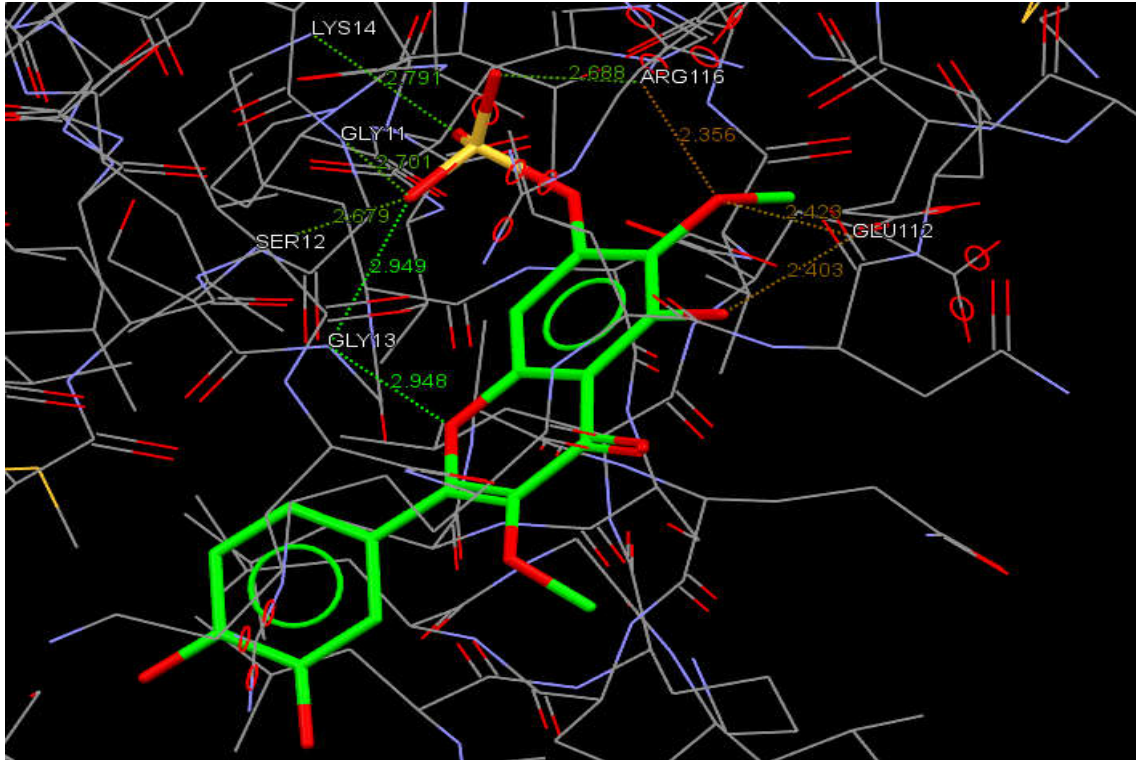
1.3. دراسة ارتباط Axillarin 7-sulfate بالموقع الفعال لإنزيم Shikimate kinase

أظهرت نتيجة التحليل البصري بواسطة برنامج الإرساء GOLD ارتباط الفلافونويد Axillarin 7-sulfate بواسطة تسعة روابط هيدروجينية نشأت بين جذور الأحماض الأمينية: GLY11 و SER12 و GLY13 و LYS14 و GLU112 و ARG116 المشكلة للموقع الفعال للإنزيم و Axillarin 7-sulfate ما سمح بتمركز جيد لهذا الأخير في الموقع الفعال للإنزيم.

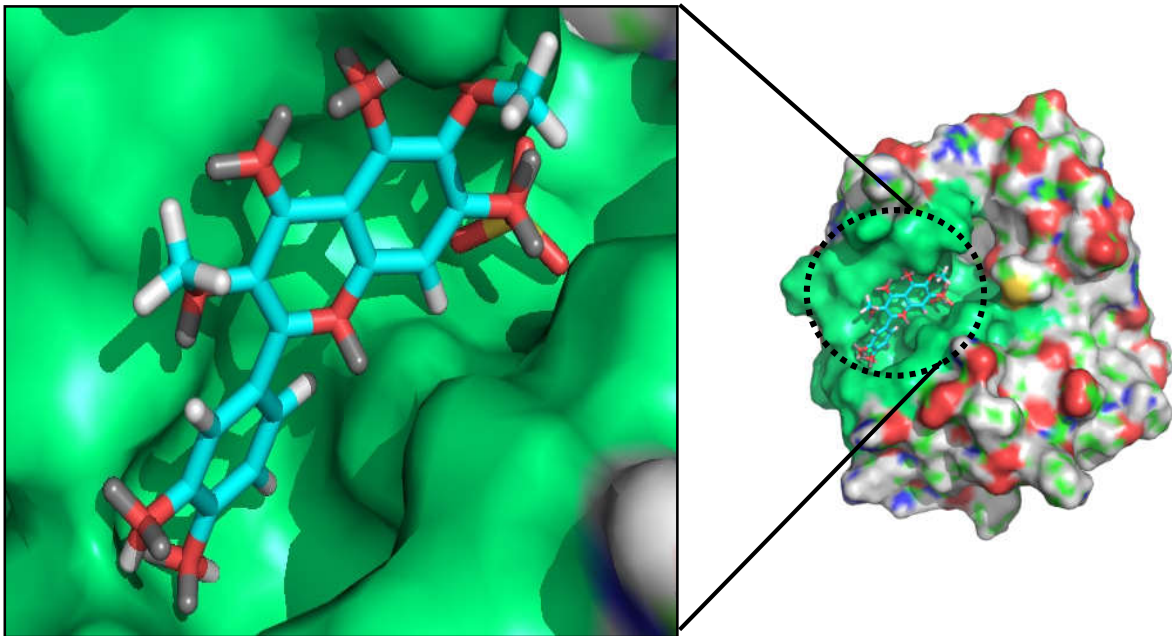
الجدول 6. الروابط الهيدروجينية الناشئة بين Axillarin 7-sulfate و الأنزيم Shikimate Kinase

عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
GLY11 (N)	O11	2.701
SER 12 (N)	O11	2.679
GLY 13 (N)	O11	2.949
	O2	2.948
LYS 14 (N)	O10	2.791
GLU 112 (O)	5O	232.4
	6O	2.403
ARG 116 (N)	5O	562.3
	12O	6882.



الشكل 9. صورة مأخوذة بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD توضح طريقة ارتباط الفلافونويد Axillarin7-sulfate بالموقع الفعال لإنزيم Kinase عند جراثومة المعدة (*Helicobacter pylori*) رمز ملف (3MUF :PDB)، تظهر الروابط الهيدروجينية بخط منقطع.

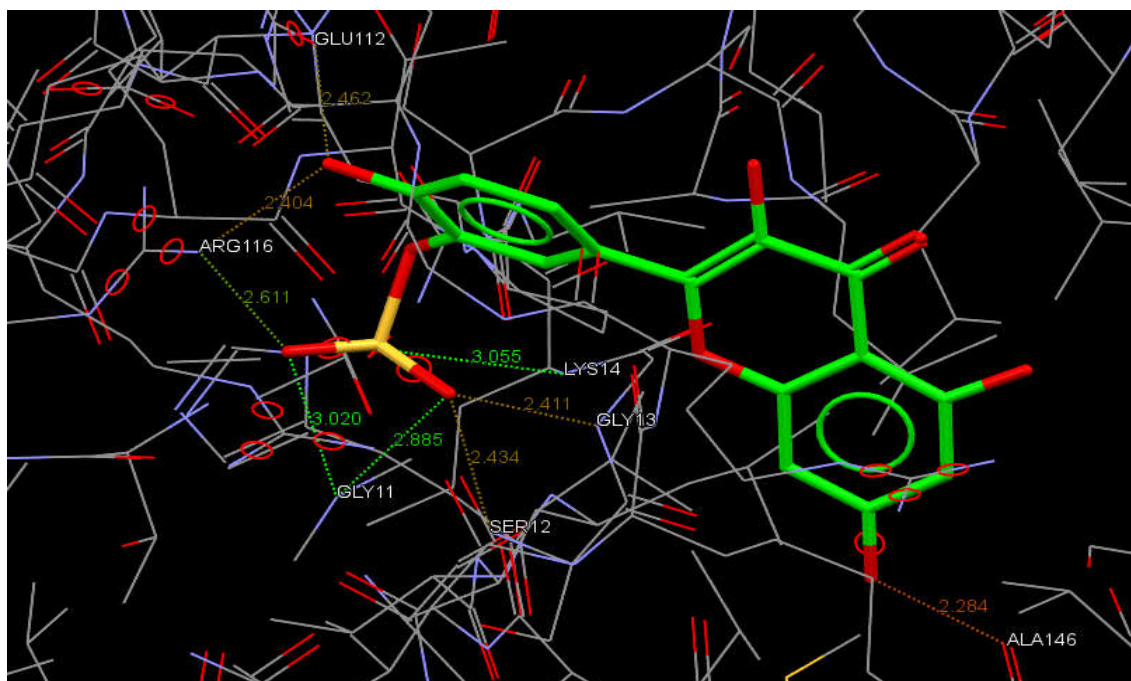


الشكل 10. صورة مأخوذة بواسطة برنامج Pymol لتموضع Axillarin7-sulfate بعد إرساءه في الموقع الفعال لأنزيم Kinase عند جراثومة المعدة (*Helicobacter pylori*) (رمز ملف (3MUF :PDB

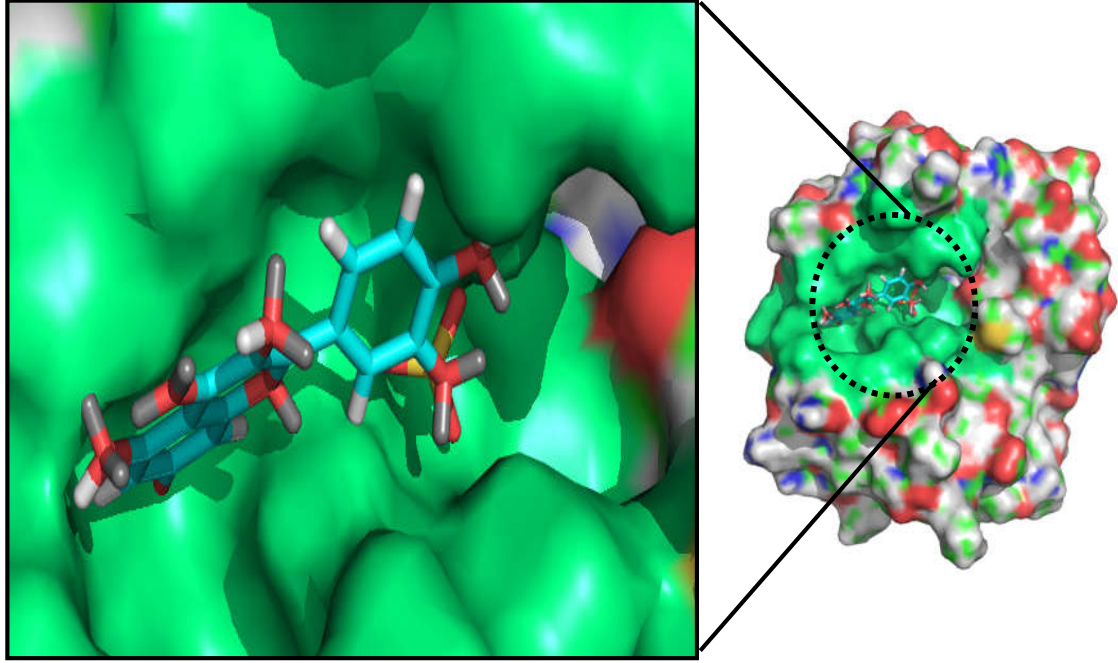
2.3 دراسة ارتباط Quercetin 3-sulfate مع الموقع الفعّال لإنزيم Shikimate kinase كشفت نتيجة التحليل البصري بواسطة برنامج GOLD ارتباط Quercetin3-sulfate بواسطة تسعة روابط هيدروجينية نشأت بين جذور: GLY11 و SER12 و GLY13 و LYS14،GLU112، و ARG116 و ALA146 المشكلة للموقع الفعّال للإنزيم و Quercetin 3-sulfate ما سمح بتمركز جيد لهذا الأخير في الموقع الفعّال للإنزيم.(الجدول 07 و الشكلان 11 و 12).

الجدول 7. الروابط الهيدروجينية الناشئة بين Quercetin 3-sulfate و الأنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*

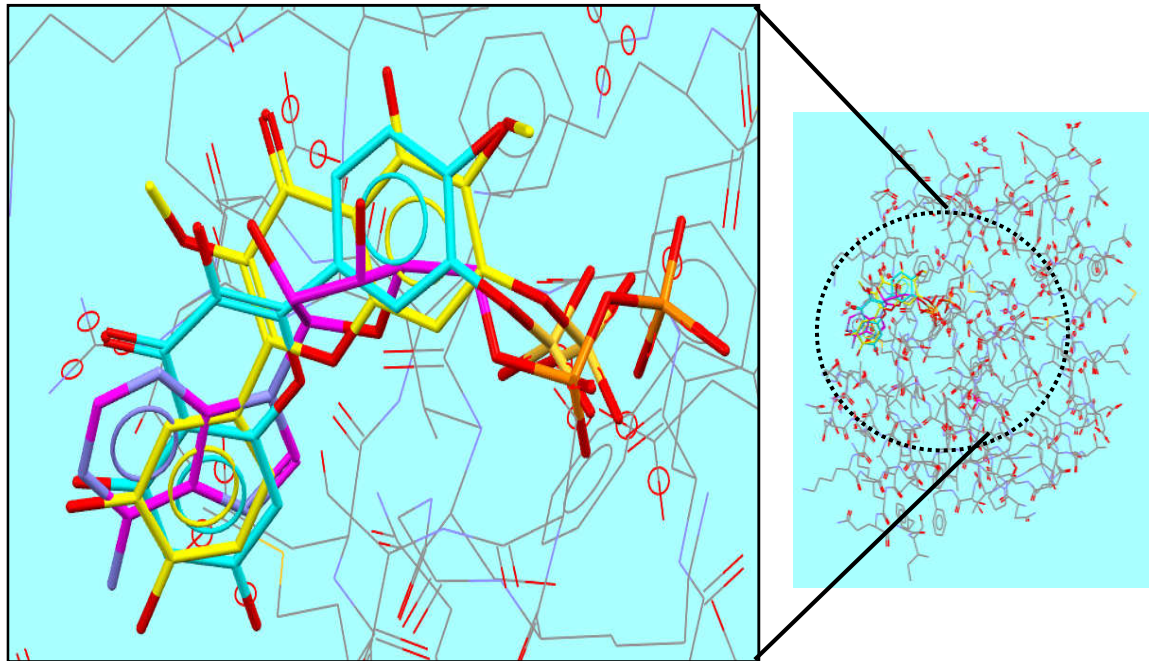
Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
GLY11 (N)	O	2.885
	O	3.020
SER 12 (N)	O	2.434
GLY 13 (N)	O	2.411
LYS 14 (N)	O	3.055
GLU 112 (O)	O	2.462
ARG 116 (N)	O	2.404
	O	2.611
ALA 146 (O)	O	2.284



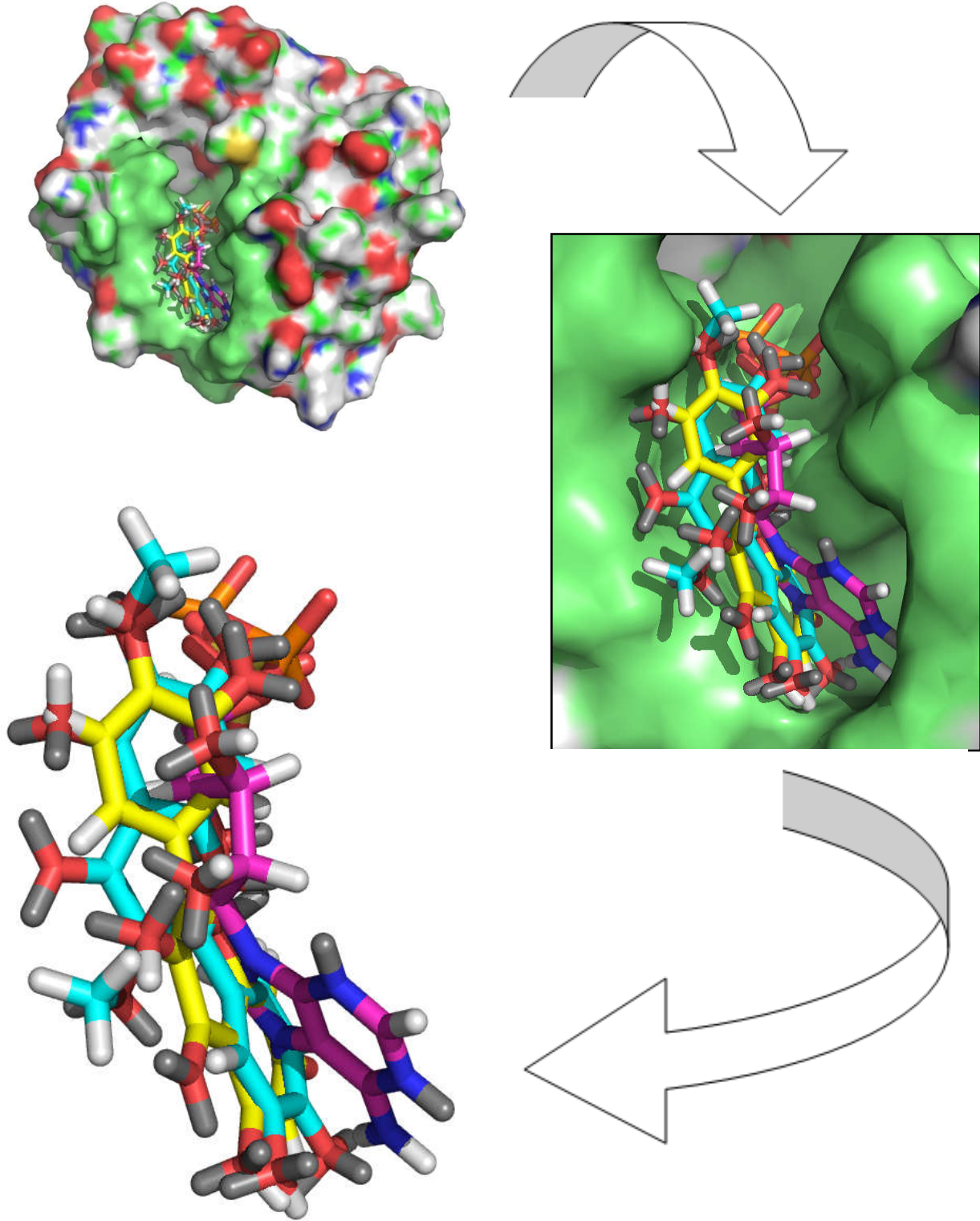
الشكل 11. صورة مأخوذة بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD توضح طريقة ارتباط الفلافونيد Quercetin-3-sulfate بالموقع الفعّال لإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة (*Helicobacter pylori* رمز ملف PDB: 3MUF)، تظهر الروابط الهيدروجينية بخط متقطع.



الشكل 12. صورة مأخوذة بواسطة برنامج *Pymol* لتموضع *Quercetin3-sulfate* بعد إرساء هفي الموقع الفعال لأنزيم *Shikimate Kinase* عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* (رمز ملف (3MUF :PDB



الشكل 13. مطابقة *superposition* باستعمال برنامج الإرساء الجزيئي *GOLD* لكل من الركيزة *ADP* (ذرات الكربون باللون الأزرق) و *Axillarin7-sulfate* (ذرات الكربون باللون الأزرق السماوي) و *Quercetin3-sulfate* (ذرات الكربون باللون الأصفر) التي تم إرساءها في الموقع الفعال لإنزيم *Shikimate Kinase* عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*.



الشكل 14. مطابقة superposition باستخدام برنامج *Pymol* لكل من الركيزة *ADP* (ذرات الكربون باللون البنفسجي) و الفلافونيد *Axillarin7-sulfate* (ذرات الكربون باللون الأزرق السماوي) و الفلافونيد *Quercetin3-sulfate* (ذرات الكربون باللون الأصفر) التي تم إرساءها في الموقع الفعال لإنزيم *Shikimate Kinase* عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*.

4. اختبار القاعدة خمسة للعالم Lipinski:

من أجل استخراج الخصائص الدوائية الحركية (propriété pharmacocinétique) المعروفة اختصاراً بـ ADMET، قمنا بتمرير الفلافونيدات (Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate) المقترحة لتثبيط إنزيم لإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* على اختبار قاعدة العالم Lipinski (القاعدة 5)، عبر الاستعانة بالموقع: <https://molinspiration.com/index.htmls> أين تحصلنا على النتائج الموضحة في الجدول 8.

الجدول 08. الخصائص الدوائية للمركبين Quercetin3-sulfate و Axillarin 7-sulfate

	الوزن الجزيئي	عدد الذرات المعطية للهيدروجين	عدد الذرات المستقبلة للهيدروجين	عدد الروابط القابلة للتدوير	Log P
Axillarin7-sulfate	426.36	4	11	5	0.19
Quercetin3-sulfate	382.30	5	10	3	0.46

من خلال النتائج المُحصَل عليها من هذا الاختبار فإن كل من Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate تتوفّر فيهما ثلاثة شروط على الأقلّ من أصل خمسة ما يعني أن امتصاص الجسم لهذين المركبين سيكون فعّالاً عند تناوُلهما عبر الفم من أجل استهداف Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*.

5. المناقشة:

خلال هذا العمل وبواسطة وسائل بيومعلوماتية تتمثل في برنامج الإرساء الجزيئي GOLD و برنامج *Pymol* الخاص بعرض ودراسة البنى الفراغية للبروتينات اختبرنا مجموعة من إثنان وأربعون فلافونيدًا الأكثر انتشارًا في الأغذية المستهلكة من طرف الإنسان على تثبيط إنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*.

من أجل ذلك قمنا بإرساء الفلافونيدات المختارة في الموقع الفعال لإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* بهدف قياس دراسة درجة انجذاب *affinité* (يُعبّر عنها بطاقة تشكل الروابط بين E و S) كل فلافونيد اتجاه الإنزيم ومقارنة نتائج إرسائها مع نتيجة إرساء الركيزة المرتبطة (ADP) بهدف الوصول إلى مُثَبِّط مُقْتَرَح للإنزيم المُستهدف.

كشفت نتائج الإرساء عن اقتراح مركبين هما: Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate حيث جاء المُركَّب Axillarin 7-sulfate في المُرتبة الثانية من حيث بقيمة GOLD score (84.07 Kcal/mol) قريبًا جدًا من قيمة GOLD score للركيزة المرتبطة ADP (85.64 Kcal/mol) بينما جاء المركب Quercetin3-sulfate في المُرتبة الثانية بقيمة GOLD score (77.15 Kcal/mol).

من جهة أخرى كشفت المُطابِقة Superposition بين الركيزة ADP و المركبان Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate اشتراكهم في تشكيل روابط هيدروجينية مع خمسة أحماض أمينية مُشكِّلة للموقع الفعال للإنزيم هي على الترتيب: GLY11، GLY13، LYS14، ARG116، GLU112 كما أظهرت المُركبات الثلاثة نفس الوضعية تقريبًا داخل الموقع الفعال للإنزيم Shikimate Kinase، دليل على أن كل من المركبين Axillarin 7-sulfate و Quercetin 3-sulfate يُحاكي إلى حدّ كبير ارتباط الركيزة ADP بالموقع الفعال للإنزيم Shikimate Kinase.

إنّ النتائج المُتحصّل عليها بخصوص دور الفلافونيدات كمُثَبِّطات مُقْتَرَحَة لإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* تتوافق مع دور الفلافونيدات المُضاد للميكروبات بشتى أنواعها من جرثومة المعدة و فطريات و فيروسات (Shamsudin et al., 2022) حيث كشفت العديد من الأبحاث حول مركبات الفلافونيد

عن امتلاكها لخصائص مثبتات قويّة اتجاه جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* ، (González et al., 2019 ; Ivyna de Araújo Rêgo et al., 2022) ،

علاوة على ذلك تُشير الكثير من الدراسات إلى أن التحدي القائم في استعمال الفلافونيدات كأدوية أو مضادات حيوية يكمن في بعض خصائصها الكيميائية فهي ضعيفة الذوبان و النفاذية وقليلة الامتصاص في مستوى الأمعاء (González-Mas et al., 2021)، باستثناء الفلافونيدات الكبريتية مثل Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate التي بفضل مجموعة الكبريت سالبة الشحنة (SO_4^{2-}) تعطي لها قابلية أكبر للذوبان في الماء و بالتالي مُعدّل امتصاصية أفضل ما يُتيح للجسم الاستفادة منها بصورة أمثل. (Teles et al., 2018) وهذا ما يتوفر من خصائص في الفلافونيدات المتوصّل إليها.

في الأخير أثبت اختبار القاعدة خمسة للعالم Lipinski أنه يمكن للجسم أن يمتص المركبين Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate في حالة تناولهما عبر الفم.

الخلاصة و الأفاق المستقبلية: Conclusion et perspectives

تم في هذه الدراسة كمرحلة أولى و باستعمال وسائل بيومعلوماتية *insilico* دراسة بنية وآلية عمل إنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*.

فمنا في المرحلة الثانية وبهدف التصدي لجرثومة المعدة المسؤولة عن عديد الأمراض بتحميل بنية إنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori* من بنك PDB من أجل دراسة تثبيطه بواسطة اثنان وأربعون فلافونيدا تم اختيارها وتحميل بنيتها من بنك PubChem عن طريق إرسائها في الموقع الفعّال للأنزيم (موقع ارتباط ADP) باستعمال برنامج الإرساء الجزيئي GOLD .

كشفت نتائج الإرساء عن اقتراح مركبين هما: Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate يمكن أن يلعبا دور مُثبِّط لإنزيم Shikimate Kinase عند جرثومة المعدة *Helicobacter pylori*.

من جهة أخرى أكد اختبار القاعدة 5 للعالم Lipinski عدم وجود أي إشكالية تخصّ فاعليّة امتصاص المركبين في جسم الإنسان.

أخيراً فإنّ النتائج المُتحصّل عليها في هذا العمل باستخدام برنامج الإرساء الجزيئي GOLD تحتاج إلى أن تُدعم بتجارب مخبرية *invitro* لتأكيد دور الفلافونيدات المُستعملة في هذه الدراسة في تثبيط أنزيم Shikimate Kinase، ما يُنبئ عن إمكانية الاستفادة من ذلك في التصدي لجرثومة المعدة (*Helicobacter pylori*)

قائمة

المراجع

قائمة المراجع

- Ahmed, I., Li, Z., Shahzad, S., Naveed, S., Khan, A. K., Ahmed, A., Kamran, Z., Yousaf, M., Ahmad, S., Afzal, G., Ahmad, H. I., Yasin, N. A., Jia, J., Hussain, M., & Munir, S. (2022). Potential Probiotics Role in Excluding Antibiotic Resistance. *Journal of Food Quality*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5590004>
- Calixto, J. B. (2019). The role of natural products in modern drug discovery. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91, 1–7. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91, 1–7. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>.Abstract
- Cheng, W. C., Chang, Y. N., & Wang, W. C. (2005). Structural basis for shikimate-binding specificity of Helicobacter pylori shikimate kinase. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 8156–8163. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8156-8163.2005>
- Cheng, W. C., Chen, Y. F., Wang, H. J., Hsu, K. C., Lin, S. C., Chen, T. J., Yang, J. M., & Wang, W. C. (2012). Structures of Helicobacter pylori shikimate kinase reveal a selective inhibitor-induced-fit mechanism. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033481>
- Cross, J. B., Thompson, D. C., Rai, B. K., Baber, J. C., Fan, K. Y., Hu, Y., & Humblet, C. (2009). Comparison of several molecular docking programs: Pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(6), 1455–1474. <https://doi.org/10.1021/ci900056c>
- Das, K., & Gezici, S. (2018). Review article Plant secondary metabolites, their separation, identification and role in human disease prevention. *Annals of Phytomedicine: An International Journal*, 7(2), 13–24. <https://doi.org/10.21276/ap.2018.7.2.3>
- De Brito, B. B., Da Silva, F. A. F., Soares, A. S., Pereira, V. A., Cordeiro Santos, M. L., Sampaio, M. M., Moreira Neves, P. H., & De Melo, F. F. (2019). Pathogenesis and clinical management of Helicobacter pylori gastric infection. *World Journal of Gastroenterology*, 25(37), 5578–5589. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i37.5578>
- González-Mas, M. C., Blázquez, M. A., López-Gresa, M. P., Mena, P., & García-Viguera, C. (2021). Editorial: Flavonoids: From Biosynthesis and Metabolism to Health Benefits. *Frontiers in Plant Science*, 12(September), 10–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.727043>

- González, A., Salillas, S., Velázquez-Campoy, A., Espinosa Angarica, V., Fillat, M. F., Sancho, J., & Lanás, Á. (2019). Identifying potential novel drugs against *Helicobacter pylori* by targeting the essential response regulator HsrA. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47746-9>
- Grosdidier, A. (2015). *Conception d ' un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives Aurélien Grosdidier To cite this version : HAL Id : dumas-01115990.*
- Gu, Y., Reshetnikova, L., Li, Y., Wu, Y., Yan, H., Singh, S., & Ji, X. (2002). Crystal structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 319(3), 779–789. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00339-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00339-X)
- Ivyna de Araújo Rêgo, R., Guedes Silvestre, G. F., Ferreira de Melo, D., Albino, S. L., Pimentel, M. M., Silva Costa Cruz, S. B., Silva Wurzba, S. D., Rodrigues, W. F., Goulart de Lima Damasceno, B. P., & Cançado Castellano, L. R. (2022). Flavonoids-Rich Plant Extracts Against *Helicobacter pylori* Infection as Prevention to Gastric Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 13(August), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.951125>
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>
- Kavitt, R. T., Lipowska, A. M., Anyane-Yeboah, A., & Gralnek, I. M. (2019). Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. *American Journal of Medicine*, 132(4), 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.12.009>
- Marshall, B., Adams, P. C., & Marshall, B. (2008). *Cjg22895*. 22(11), 895–896.
- Masoko, P., Mabusa, I. H., & Howard, R. L. (2016). Isolation of alpha-linolenic acid from *Sutherlandia frutescens* and its inhibition of *Mycobacterium tuberculosis*' shikimate kinase enzyme. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1344-1>
- Mohsen, S., Dickinson, J. A., & Somayaji, R. (2020). Update on the adverse effects of antimicrobial therapies in community practice. *Canadian Family Physician*, 66(9), 651–659.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17(3), 215–234. <https://doi.org/10.1039/a902202c>
- Ntie-Kang, F. (2013). (No Title). <http://www.springerplus.com/content/2/1/353>
- Ordog, R. (2008). PyDeT, a PyMOL plug-in for visualizing geometric concepts

- around proteins. *Bioinformatics*, 2(8), 346–347.
<https://doi.org/10.6026/97320630002346>
- Parekh, N., Garg, A., Choudhary, R., Gupta, M., Kaur, G., Ramniwas, S., Shahwan, M., Tuli, H. S., & Sethi, G. (2023). The Role of Natural Flavonoids as Telomerase Inhibitors in Suppressing Cancer Growth. *Pharmaceuticals*, 16(4).
<https://doi.org/10.3390/ph16040605>
- Park, J. S., Jun, J. S., Seo, J. H., Youn, H. S., & Rhee, K. H. (2021). Changing prevalence of Helicobacter pylori infection in children and adolescents. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 64(1), 21–25.
<https://doi.org/10.3345/cep.2019.01543>
- Roszczenko-Jasińska, P., Wojtyś, M. I., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2020). Helicobacter pylori treatment in the post-antibiotics era—searching for new drug targets. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(23), 9891–9905. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10945-w>
- Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Shah, S. A. A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M. A., Parveen, H., & Zakaria, Z. A. (2022). Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. *Molecules*, 27(4).
<https://doi.org/10.3390/molecules27041149>
- Shichijo, S., Uedo, N., & Michida, T. (2022). Detection of Early Gastric Cancer after Helicobacter pylori Eradication. *Digestion*, 103(1), 54–61.
<https://doi.org/10.1159/000519838>
- Started, G., Steps, E., States, T., Rules, A. P., Asn, F., Residues, G., Tautomers, S. H., Ligands, D., Ions, M., Molecules, W., For, M., Waters, H., Waters, S., Detection, C., Accessibility, S., O-h, R., & Ions, M. (n.d.). *GOLD User Guide GOLD User Guide Conditions of Use Introduction and Overview*.
- Teles, Y. C. F., Souza, M. S. R., & De Souza, M. de F. V. (2018). Sulphated flavonoids: Biosynthesis, structures, and biological activities. *Molecules*, 23(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules23020480>
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003). Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD Marcel. *Proteins*, 52(November 2002), 609–623.
- Vianna, C. P., & De Azevedo, W. F. (2012). Identification of new potential Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase inhibitors through molecular docking simulations. *Journal of Molecular Modeling*, 18(2), 755–764.
<https://doi.org/10.1007/s00894-011-1113-5>