

## Molecular dynamics simulation study of the effect of hesperetin on pre-apoptotic factors of Bad, Bak, and Bim

Javad Saffari-Chaleshtori<sup>1</sup>, Navid Jamali<sup>1</sup>, Ehsan Heidari-Sureshjani<sup>2</sup>, Keihan Ghatreh-Samani<sup>3</sup>

1.Department of Biochemistry, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2.Cellular & Molecular, Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

3.Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran, Tel:038-3331471, E-mail: kgsamani@yahoo.com

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Many compounds derived from medicinal plants, such as antioxidants and polyphenols have significant roles in prevention and treatment of various cancers. Activation of apoptosis related pathways is one of the mechanisms for inhibition of cancer progression. In this study, we investigated the effect of molecular dynamics simulation of hesperetin on the pre-apoptotic factors of Bad, Bak, and Bim.

**Material and Methods:** In this study we collected data about 3 dimensional structure and Protein Data Bank (PDB) files of three apoptotic factors of Bad, Bak, and Bim from Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Using VMD v1.9.2, AutoDock v.4.2, and Gromacs v.4.5.4 softwares, we started processes such as optimization, simulation, molecular docking and molecular dynamics calculations.

**Results:** Binding of Bad molecule to hesperetin led to release of the highest amount of energy and reduced changes in the radius of gyration of Bad protein. But after binding of Bim and Bak proteins to hesperetin, changes in the radius of gyration, increased. The most frequent change in the secondary protein structure was related to increased amount of Bent structure and decreased amount of  $\beta$ -sheet structure in Bim molecule.

**Conclusion:** Hesperetin can affect the activities of pre-apoptotic factors of Bad, Bak, and Bim by influencing their molecular dynamics. It seems that hesperetin has the highest effect on the activation of Bad molecule. Also, it can activate Bim protein and induce apoptosis via inducing alternations in the secondary structure of the protein.

**Keywords:** Molecular dynamics, Apoptosis, Hesperetin

## بررسی تأثیر هسپرتین بر دینامیک مولکولی فاکتورهای پیش آپوپتوزی Bad، Bak و Bim در

### محیط شبیه سازی شده

جواد صفاری چالشتی<sup>۱</sup>، نوید جمالی<sup>۱</sup>، احسان حیدری سورشجانی<sup>۲</sup>، کیهان قطره سامانی<sup>۳</sup>

۱. گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران، تلفن ثابت: ۳۷۳-۳۳۳۱۴۷۱

E-mail: kgsamani@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** بسیاری از ترکیبات مشتق شده از گیاهان دارویی مانند آنتی اکسیدان ها و پلی فنل ها نقش بسزایی در پیشگیری و درمان انواع سرطان ها دارند. یکی از فرایندهای مهار سرطان، فعال کردن مسیر آپوپتوز است و ما قصد داریم در این مطالعه، تأثیر دینامیک مولکولی هسپرتین (Hesperetin) را بر روی فاکتورهای پیش آپوپتوزی Bad، Bak و Bim در محیط شبیه سازی شده بررسی نماییم.

**روش کار:** اطلاعات مربوط به ساختار سه بعدی و فایل های PDB (Protein Data Bank) سه فاکتور آپوپتوزی Bad، Bak و Bim را از پایگاه اطلاعاتی [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) دریافت کردیم و با استفاده از نرم افزارهای AutoDock v.4.2، VMD v.1.9.2 و Gromacs v.4.5.4 فرایندهای بهینه سازی، شبیه سازی، اتصال مولکولی و محاسبات دینامیک مولکولی را انجام دادیم.

**نتایج:** مولکول Bad در اتصال با هسپرتین بیشترین میزان انرژی را آزاد می کند در حالی که تغییرات مربوط به شعاع چرخشی (Radius of Gyration) پروتئین Bad بعد از اتصال هسپرتین کاهش ولی برای پروتئین های Bak و Bim افزایش یافت. بیشترین تغییر ساختار دوم پروتئین مربوط به افزایش میزان ساختار Bent و کاهش میزان ساختار  $\beta$ -Sheet در مولکول Bim بود.

**بحث و نتیجه گیری:** هسپرتین با تأثیر بر دینامیک مولکولی فاکتورهای پیش آپوپتوزی Bad، Bak و Bim می تواند فعالیت آن ها را تحت تأثیر قرار دهد. هر چند که به نظر می رسد بیشترین تأثیر را در فعال کردن مولکول Bad دارد و با ایجاد تغییر در ساختار دوم پروتئین Bim می تواند منجر به فعال کردن این پروتئین و القاء آپوپتوز شود.

**کلمات کلیدی:** دینامیک مولکولی، آپوپتوز، هسپرتین

وصول مقاله: ۹۷/۵/۱۷ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۸/۹ پذیرش: ۹۷/۹/۷

## مقدمه

بیماری سرطان، شیوع بسیار گسترده‌ای در جوامع امروزی دارد و این امر محققان را بر آن داشته که مطالعات گسترده‌ای را به منظور علل وقوع، پیشگیری و درمان آن انجام دهند (۱ و ۲). در این میان مطالعات مربوط به تأثیر ترکیبات گیاهی مانند آنتی‌اکسیدان ها و پلی فنل ها بسیار پراهمیت شده اند. مطالعاتی که همواره نقش گیاهان دارویی و ترکیبات مؤثره آنان را در القاء آپوپتوز به اثبات می‌رسانند (۳).

هسپرتین یک ترکیب فلاونوئیدی نامحلول در آب است که تنها به مقدار  $5\mu\text{g/ml}$  در آب حل می‌شود و در میوه‌هایی مانند مرکبات، پرتقال و گریپ فروت به وفور یافت می‌شود. (۴، ۵) این ترکیب به شدت میزان فاکتورهای نکروز دهنده تومور را کاهش می‌دهد (۶). همچنین با خواص ضد رگ زایی (Antiproliferative) خود رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار کرده و با فعال کردن مسیرهای میتوکندریایی مربوطه آپوپتوز منجر به القاء آپوپتوز و مرگ سلولی می‌شود (۷، ۸).

در فرایند آپوپتوز و مرگ سلولی، فاکتورهای بسیار متعددی نقش ایفا می‌کنند. پروتئین‌هایی مانند Bcl-1، Bcl-xl و Bcl-2 به عنوان فاکتورهای ضد آپوپتوزی از وقوع آپوپتوز در سلول جلوگیری می‌کنند (۹). زمانی که Bcl-2 توسط داروهای ضد سرطان و یا در پاسخ به محرک‌های آپوپتوزی مهار می‌شود به این معنا است که بسیاری از فاکتورهای پیش آپوپتوزی زیرمجموعه خود مانند Bad، Bak، Bim، Bax، Bid، Bik را فعال می‌کند (۱۰). پروتئین‌هایی مانند Bad، Bak، Bim فاکتورهای پیش آپوپتوزی هستند که با فعال شدنشان آپوپتوز و مرگ سلولی را در سلول‌های آسیب دیده القا می‌کنند. (۱۰) این فاکتورهای پیش آپوپتوزی بر غشای میتوکندری سلول اثر کرده و با فعال کردن cytochrome c کاسپازهای سلولی را فعال می‌کنند که این خود جریانی از پیام مرگ را برای

سلول به دنبال خواهد داشت (۱۱). مطالعات شبیه سازی و دینامیک مولکولی نشان داده است که ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند کارواکرول می‌تواند از نظر دینامیک مولکولی فاکتورهای آپوپتوزی Bak، Bax، Bim، Bid، Apaf1 و P38 را به حالت‌های مختلف فعال کند. (۱۲) همچنین تأثیر هسپرتین بر رفتار دینامیک مولکولی برخی فاکتورهای مؤثر بر آپوپتوز در محیط شبیه سازی نشان داده است که فعالیت پروتئین Bax افزایش و فعالیت NF-kB مهار می‌شود (۱۳).

با توجه به اهمیت آپوپتوز در جلوگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و اینکه فاکتورهای دخیل در مسیر آپوپتوز، نقش کلیدی در القاء و یا مهار این فرایند بر عهده دارند، در این مطالعه خواص دینامیک مولکولی سه فاکتور پیش آپوپتوزی Bad، Bak، Bim که در فرایند آپوپتوز نقش مهمی ایفا می‌کنند، در حضور هسپرتین، یک ترکیب فلاونوئیدی قدرتمند، به صورت شبیه سازی شده مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش بررسی:

آماده سازی فایل های PDB:

فایل PDB پروتئین های Bad، Bak، Bim به عنوان سه فاکتور مهم در فرایند آپوپتوز سلول ها (به ترتیب با ID:1G5J، ID:1BXL و ID:1PQ1) از پایگاه داده به نشانی [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) به دست آمدند. ساختار سه بعدی ترکیب هسپرتین نیز از پایگاه PUBCEM به دست آمد و با استفاده از نرم افزار Mercury v.3.6 به فایل PDB تبدیل شد.

شبیه سازی پروتئین ها در غیاب لیگاند:

مطالعات مربوط به شبیه سازی دینامیک مولکولی سه ساختار پروتئینی مذکور ابتدا در آب خالص انجام شد تا ساختارهای مربوطه تحت شرایط تغییرات دما، فشار قرار بگیرد و به حالت تعادل برسند. فایل های PDB سه پروتئین آپوپتوزی

اطلاعات به دست آمده در فایل متنی n.dlg مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۵، ۱۶).

شبیه سازی پروتئین ها در حضور لیگاند:

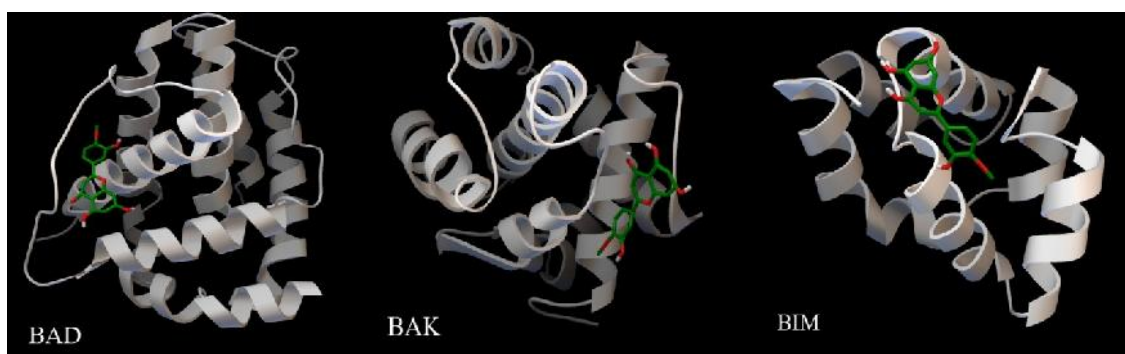
پایدارترین کمپلکس لیگاند-گیرنده برای هرکدام از پروتئین های پیش آپوتوزی Bad, Bak, Bim در اتصال با هسپرتین، با پایین ترین میزان انرژی اتصال شناسایی شد و مشابه دستورالعمل شبیه سازی پروتئین در آب شبیه سازی شدند. همانند قبل مسیرهای ذخیره شده در شبیه سازی برای تجزیه و تحلیل پارامترهای ساختاری کمپلکس ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از شبیه سازی مولکول های پیش آپوتوزی شامل مقادیر مربوط به میزان انرژی کل (Total Energy) TE، شعاع چرخشی پروتئین Rg (Radius of gyration)، جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین Root Mean Square Deviation (RMSD) و تغییرات ساختار دوم پروتئین به تنهایی و در غیاب هسپرتین، در مقایسه با نتایج حاصل از شبیه سازی اتصال هسپرتین با هرکدام از مولکول های پیش آپوتوزی، به طور جداگانه با استفاده از نرم افزار Graph pad prism v.5.0.1 مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS v.22 و آزمون آماری T وابسته (Paired Samples t-test) تجزیه و تحلیل شدند (۱۶، ۱۷).

### نتایج

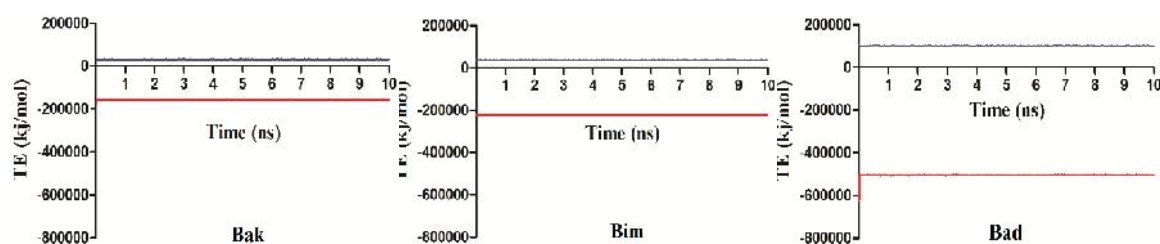
پایدارترین ترین جایگاه برای اتصال هسپرتین در سه پروتئین پیش آپوتوزی Bad, Bak, Bim در شکل ۱ نشان داده شده است. در این شکل مولکول هسپرتین (رنگ سبز) در بهترین جایگاه اتصال با پایین ترین سطح انرژی در پروتئین جای گرفته است.

مورد مطالعه (Bad, Bak و Bim) با استفاده از نرم افزار Gromacs v.4.5.4 و میدان نیروی G43A1 در حلال آب شبیه سازی شدند. با افزودن مقادیر محاسبه شده Na و Cl، غلظت ۱۴۰ میکرومولار سیستم آماده شد. در این مطالعه از مدل SPC216 استفاده شد (۱۴). در ادامه فایل PDB خروجی به عنوان ساختار ورودی داکینگ مولکولی برای شبیه سازی کمپلکس ها استفاده شد.

اتصال (Docking) لیگاند به پروتئین های پیش آپوتوزی: مطالعات داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار AutoDock v.4.2 در سیستم عامل لینوکس در مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی پژوهشکده علوم پایه سلامت دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. فرایند داکینگ مولکولی هسپرتین بر روی پروتئین های پیش آپوتوزی Bad, Bak و Bim به منظور یافتن بهترین جایگاه های اتصال لیگاند-گیرنده و نیز تعیین پایدارترین حالت انرژی آزاد اتصال لیگاند-گیرنده انجام شد. در این مطالعه پس از تولید فایل های PDBQ و PDBQT برای آنتی اکسیدان هسپرتین و تعریف آن به عنوان لیگاند و همچنین تولید فایل های PDBQ و PDBQT برای پروتئین های پیش آپوتوزی Bad, Bak و Bim و تعریف آن ها به عنوان گیرنده، از دستور Grid Box یک جعبه مجازی برای این گیرنده ها با ابعاد ۶۰\*۱۲۰\*۷۲ nm (X\*Y\*Z) تعریف کردیم. از دستور `autogrid4 -p n.gpf -l n.gle` برای تولید فایل متنی n.gle استفاده شد. پس از آن، مراحل داکینگ مولکولی برای هرکدام از پروتئین ها در ۲۰۰ مرتبه مستقل انجام شد. در این مطالعه از الگوریتم ژنتیک Lamarckian GA (Genetic Algorithm) و استفاده شد. برای تهیه فایل خروجی n.dlg از دستور `autodock4 -p n.dpf -l n.dlg` استفاده شد و

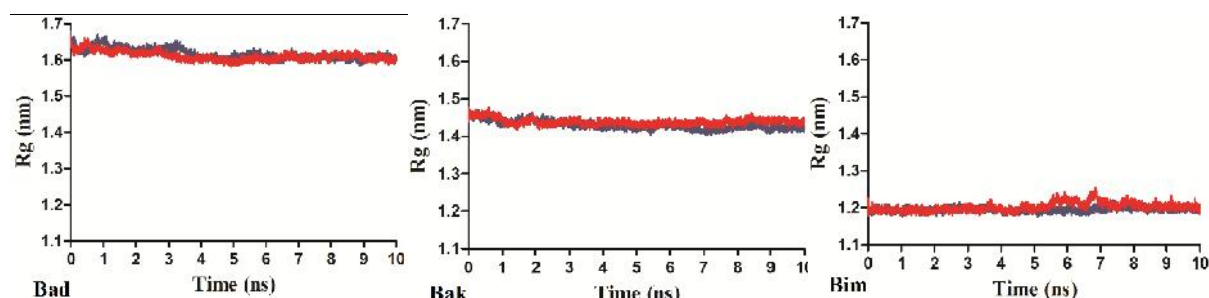


شکل ۱: نحوه اتصال هسپرترین با ساختار سه بعدی مولکول های Bad، Bak و Bim بعد از انجام داکینگ مولکولی در بهترین موقعیت در محل اتصال شکل ۲: میزان انرژی کل (TE (Total Energy) برحسب کیلو ژول بر مول برای هر سه فاکتور پیش آپتوزی Bad، Bak و Bim قبل از داکینگ مولکولی و بعد از داکینگ مولکولی را نشان می دهد. مولکول Bad بیشترین میزان



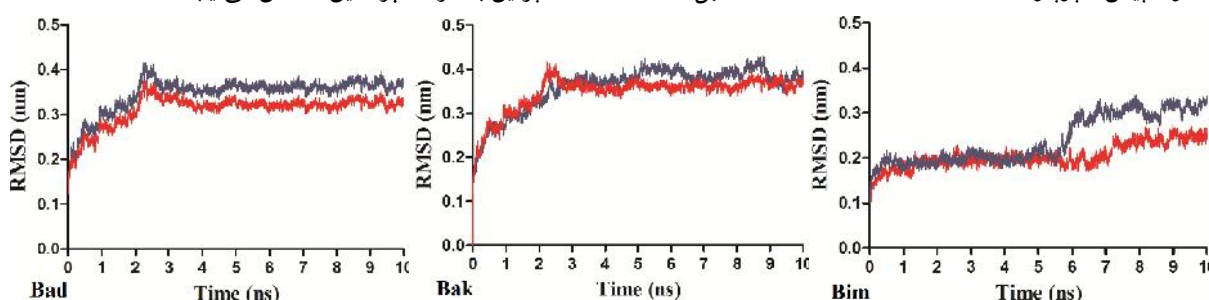
شکل ۲: مقادیر مربوط به میزان انرژی کل در شبیه سازی پروتئین های Bad، Bak و Bim قبل و بعد از اتصال هسپرترین. قبل از مرحله داکینگ (رنگ آبی) و بعد از مرحله داکینگ در حضور هسپرترین (رنگ قرمز). بیشترین میزان آزاد سازی انرژی مربوط به اتصال هسپرترین به مولکول Bad است.

میزان شعاع چرخشی (Radius of Gyration (RG) برای هر سه فاکتور پیش آپتوزی Bad، Bak و Bim در شکل ۳ در قبل از داکینگ مولکولی و بعد از داکینگ مولکولی نشان داده شده است. اتصال هسپرترین به هر دو مولکول Bak و Bim در مرحله شبیه سازی باعث افزایش میزان Rg و اتصال هسپرترین به مولکول Bad باعث کاهش در میزان Rg می شود.



شکل ۳: مقادیر مربوط به میزان Rg در شبیه سازی پروتئین های Bad، Bak و Bim قبل و بعد از اتصال هسپرتین. قبل از مرحله داکینگ (رنگ آبی) و بعد از مرحله داکینگ در حضور هسپرتین (رنگ قرمز). پس از اتصال هسپرتین به مولکول Bad میزان Rg کاهش می یابد در حالی که میزان Rg پس از اتصال هسپرتین به مولکول های Bak و Bim افزایش می یابد.

انحراف جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین Root Mean Square Deviation (RMSD) برای هر سه فاکتور پیش آپوتوزی Bad، Bak و Bim در قبل از



شکل ۴: مقادیر مربوط به میزان RMSD در شبیه سازی مولکولی پروتئین های Bad، Bak و Bim قبل و بعد از اتصال هسپرتین. قبل از مرحله داکینگ (رنگ آبی) و بعد از مرحله داکینگ در حضور لیگاند (رنگ قرمز). کاهش میزان RMSD برای هر سه مولکول پس از به پایداری رسیدن سیستم در مدت زمان ۱۰ نانو ثانیه.

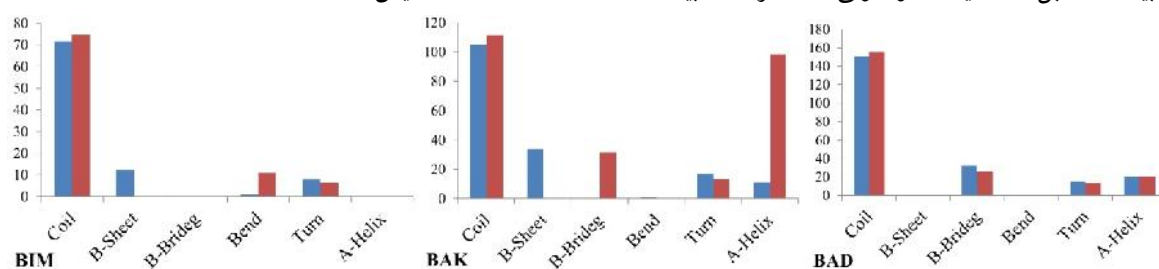
تفاوت در مقادیر فاکتورهای TE، Rg و RMSD در زمان شبیه سازی قبل و بعد از اتصال هسپرتین به پروتئین های

جدول ۱: مقادیر عددی فاکتورهای مربوط به شبیه سازی پروتئین های Bad، Bak و Bim قبل و بعد از اتصال هسپرتین.

| لیگاندها |    | TE                | RG         | RMSD       |
|----------|----|-------------------|------------|------------|
| Bad      | G1 | ۱۰۱۸۰۲/۸±۵۵۳/۱    | ۱/۶۲±۰/۰۱  | ۰/۳۶±۰/۰۱  |
|          | G2 | -۵۰۵۶۵۷/۷±۵۳۹۸/۰* | ۱/۶۱±۰/۰۱* | ۰/۳۲±۰/۰۱* |
| Bak      | G1 | ۲۹۵۰۰/۹±۵۲۱/۷     | ۱/۴۳±۰/۰۱  | ۰/۳۶±۰/۰۵  |
|          | G2 | -۱۵۷۱۷۰/۸±۱۰۳۷/۲* | ۱/۴۴±۰/۰۱* | ۰/۳۵±۰/۰۴* |
| Bim      | G1 | ۳۶۵۴۸/۹±۳۴۱/۵     | ۱/۱۹±۰/۰۱  | ۰/۲۱±۰/۰۳  |
|          | G2 | -۲۲۳۲۲۸/۸±۴۷۱/۴*  | ۱/۲±۰/۰۱*  | ۰/۲۴±۰/۰۴* |

G1 پروتئین های پیش آپوتوزی قبل از مرحله داکینگ مولکولی و بدون اتصال هسپرتین، G2 پروتئین های پیش آپوتوزی بعد از مرحله داکینگ مولکولی و در اتصال با هسپرتین. میزان انرژی کل در بعد از مرحله داکینگ به شدت کاهش می یابد. میزان Rg بعد از مرحله داکینگ برای مولکول های Bak و Bim افزایش اما برای مولکول Bad کاهش می یابد. میزان RMSD بعد از مرحله داکینگ برای هر سه مولکول Bad، Bak و Bim کاهش می یابد. \* سطح معنی داری  $p < 0.001$  در مقایسه با مرحله G1

بعد از داکینگ مولکولی و در حضور هسپرین در شکل شماره ۵ نمایش داده شده است.



شکل ۵: نمایش تغییرات ساختمان دوم پروتئین ها در مرحله شبیه سازی قبل از داکینگ مولکولی و در مرحله شبیه سازی بعد از داکینگ مولکولی و در حضور لیگاند. رنگ آبی نمایش ساختار دوم پروتئین ها در غیاب لیگاند و رنگ قرمز نمایش ساختار دوم پروتئین ها در حضور لیگاند.

نشان داد که Bim بیشترین انعطاف پذیری را در حضور کوئرتستین نسبت به حالت آزاد دارد (۲۳). مطالعاتی که بر روی هسپرین انجام شده است تأثیر این داروی گیاهی را بر انواع سلول های سرطانی به خوبی اثبات کرده است (۲۴ و ۲۵). Alshatwi و همکاران نشان دادند که هسپرین دارای یک پتانسیل قوی در مهار و توقف رشد سلول های سرطانی است و می تواند آپوپتوز را در این سلول ها القا کند (۲۶).

اما نتایج حاصل از این مطالعه که در محیط شبیه سازی و دینامیک مولکولی انجام شد نشان داد که هسپرین در پایین ترین سطح انرژی، به خوبی با ساختار پروتئین های پیش آپوپتوزی Bad، Bak و Bim اتصال برقرار می کند. پس از اتصال هسپرین به مولکول Bad بیشترین میزان انرژی آزاد می شود (شکل ۲ و جدول ۱). این میزان آزاد سازی انرژی برای مولکول Bak نسبت به سه پروتئین دیگر کمتر است. آزاد شدن انرژی بعد از اتصال هسپرین به پروتئین ها بیانگر فعال کردن آنهاست و به نظر می رسد مولکول Bad در اتصال با هسپرین بیشتر از سایر ترکیبات فعال و واکنش پذیر شده است. افزایش Rg پروتئین بعد از اتصال لیگاند، میزان در دسترس قرار دادن جایگاه های فعال پروتئین را برای واکنش پذیری افزایش می دهد (۱۶). نتایج این مطالعه (شکل ۳ و جدول ۱) نشان داد که بعد از اتصال هسپرین به

## بحث

مطالعات فراوانی که بر روی ترکیبات آنتی اکسیدانی و فلاونوئیدی گیاهان دارویی انجام شده است نشان می دهد که بسیاری از سلول های سرطانی در مواجهه با این ترکیبات تغییراتی در آنها ایجاد می شود که باعث توقف رشد، (۱۸) رگ زایی (۱۹) و نهایتاً آپوپتوز و مرگ سلولی می شوند (۲۱ و ۲۰). اما مکانیسم مولکولی و چگونگی فعالیت ترکیبات آنتی اکسیدانی و تأثیری که بر روی سلول های سرطانی می گذارند همواره توجه محققان را به خود معطوف داشته است (۲۲). مطالعه شبیه سازی و دینامیک مولکولی که بر روی تأثیر گالیک اسید بر سه فاکتور پیش آپوپتوزی Bad، Bak و Bim انجام شد نشان داد که گالیک اسید مولکول Bad را بیشتر از دو ترکیب دیگر تحت تأثیر خود قرار می دهد (۱۶). مطالعه ای که بر روی تأثیر کوئرتستین (Quercetin) بر فاکتور های پیش آپوپتوزی Bad، Bak و Bim انجام شد نشان داد که تعداد پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده بین مولکول کوئرتستین با فاکتور Bad نسبت به دو فاکتور Bak و Bim بیشتر است و کوئرتستین مولکول Bad را در پایین ترین سطح انرژی نسبت به دو فاکتور دیگر قرار داده است. میانگین RMSD در طول ۱۰ ns زمان شبیه سازی برای پروتئین Bad و Bak در حضور کوئرتستین افزایش و برای مولکول Bim کاهش یافت و مطالعات مربوط به RMSF

پروتئین را تغییر دهد و با فعال کردن آن ها موجب القاء آپوپتوز در سلول های آسیب دیده شود.

### نتیجه گیری

مجموع نتایج حاصل از شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان می دهد که هسپرتین توانسته است هر سه فاکتور پیش آپوپتوزی Bad, Bak و Bim را تحت تأثیر خود قرار دهد و به نوعی هر سه فاکتور را فعال کند؛ اما بیشترین تأثیرگذاری را بر روی پروتئین Bad با بیشترین میزان انرژی آزاد سازی دارد. در حالی که می تواند مولکول Bim را نیز با ایجاد تغییرات ساختمان دوم و افزایش تحرک پذیری فعال کند. مجموع اثرات هسپرتین بر این پروتئین ها، پیش بینی القاء مسیر آپوپتوز سلولی است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با کد مصوب ۲۶۷ در معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می باشد. بدین وسیله از آن معاونت محترم نهایت قدردانی به عمل می آوریم.

### Reference

1. Saffari-Chaleshtori J, Tabatabaiefar MA, Ghasemi-Dehkordi P, Farokhi E, Moradi MT, Hashemzadeh-Chaleshtori M. The lack of correlation between TP53 mutations and gastric cancer: a report from a province of Iran. *Genetika* 2017;49:235-46.
2. Heydarnejad MS, Hassanpour DA, Solati DK. Factors affecting quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy. *Afr Health Sci* 2011;11:266-70.
3. Eskandari E, Heidarian E, Amini S, Saffari-Chaleshtori J. Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 signaling pathways in prostate cancer PC3 cells. *J Cancer Res Ther* 2016;12:1266-71.
4. Majumdar S, Srirangam R. Solubility, stability, physicochemical characteristics and in vitro ocular tissue permeability of hesperidin: a natural bioflavonoid. *Pharm Res* 2009;26:1217-25.

مولکول های Bak و Bim و با افزایش مقادیر Rg احتمال واکنش پذیری این دو پروتئین افزایش یابد.

در طول مدت زمان ۱۰ نانو ثانیه از شبیه سازی، پروتئین های Bad و Bak (پس از گذشت ۲/۵ نانو ثانیه) زودتر از پروتئین Bim (۶ نانو ثانیه) به پایداری می رسند (شکل شماره ۴)؛ اما در پایان ۱۰ نانو ثانیه با کاهش میزان RMSD برای هر سه پروتئین مواجه می شویم (شکل ۴ و جدول ۱) و موجب می شود که پروتئین ها پس از اتصال به هسپرتین حالت پایدار خود را حفظ کنند و میزان متوسط جابه جایی را کاهش دهد. با این وجود به نظر می رسد که هسپرتین بر روی پروتئین Bad از نظر میزان RMSD بیشترین تأثیر را نسبت به دو پروتئین Bim و Bak دارد (۲۷).

در ساختمان دوم پروتئین ها ساختارهای  $\alpha$ -sheet و  $\beta$ -helix ساختارهای پایدار و غیر فعال در پروتئین هستند اما ساختارهای coil و turn مناطق فعال پروتئین محسوب می شوند. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات ساختاری coil بعد از داکینگ مولکولی در هر سه پروتئین افزایش یافته است (شکل ۵) که منجر به فعال شدن هر سه پروتئین می شود اما افزایش ساختار  $\alpha$ -helix در مولکول Bak تا حدی از فعالیت آن می کاهد و همچنین افزایش محسوس ساختار Bend در مولکول Bim منجر به فعال شدن آن شده است. این نتایج نشان می دهد که اتصال هسپرتین به این فاکتورهای پیش آپوپتوزی می تواند ساختار دوم این سه



5. Yoshida H, Takamura N, Shuto T, Ogata K, Tokunaga J, Kawai K, et al. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- $\alpha$  in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:728-32.
6. Kim HK, Jeong T-S, Lee M-K, Park YB, Choi M-S. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica Chimica Acta* 2003;327:129-37.
7. Nalini N, Aranganathan S, Kabalimurthy J. Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Toxicol Mech Methods* 2012;22:397-408.
8. Choi EJ. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *Nutr Cancer* 2007;59:115-9.
9. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferat* 2012;45:487-98.
10. Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis?. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2009;1:97-115.
11. Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2012;45:217-24.
12. Saffari Chaleshtori J, Heidari Soureshjani E, Reisi F, Tabatabaiefar MA, Asadi-Samani M, Zamanian N, et al. Damage intensity of carvacrol on prostatic cancer cells line Du145 and molecular dynamic simulation of its effect on apoptotic factors. *Int J Pharm Tech Research* 2016;9:261-73.
13. Sambantham S, Radha M, Paramasivam A, Anandan B, Malathi R, Chandra SR, et al. Molecular mechanism underlying hesperetin-induced apoptosis by in silico analysis and in prostate cancer PC-3 cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:4347-52.
14. Project E, Nachliel E, Gutman M. Force field dependant structural divergence revealed during long time simulations of Calbindin d9k. *J Comput Chem* 2010;31:1864-72.
15. Jeyam M, Karthika G, Poornima V, Sharanya M. Molecular understanding and in silico validation of traditional medicines for Parkinson's disease. *Asian J Pharma Clin Res* 2012;5:125-8.
16. Saffari-Chaleshtori J, Heidari-Sureshjani E, Moradi F, Jazi HM, Heidarian E. The study of apoptosis-inducing effects of three pre-apoptotic factors by gallic acid, using simulation analysis and the comet assay technique on the prostatic cancer cell line PC3. *Malays J Med Sci* 2017;24:18-29.
17. Spoel DVD, Berendsen H. Molecular dynamics simulations of Leu-enkephalin in water and DMSO. *Biophys J* 1997;72: 2032-41.
18. Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, et al. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog* 2006;45:164-74.
19. Kumar B, Gupta SK, Srinivasan B, Nag TC, Srivastava S, Saxena R. Hesperetin ameliorates hyperglycemia induced retinal vasculopathy via anti-angiogenic effects in experimental diabetic rats. *Vascul Pharmacol* 2012;57:201-7.
20. Heidarian E, Keloushadi M, Ghatreh-Samani K, Valipour P. The reduction of IL-6 gene expression, pAKT, pERK1/2, pSTAT3 signaling pathways and invasion activity by gallic acid in prostate cancer PC3 cells. *Biomed Pharmacother* 2016;84:264-9.
21. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.

22. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sci* 2015;124:64-74.
23. Saffari-Chaleshtori J, Heidari-Soreshjani E, Asadi-Samani M. Computational study of quercetin effect on pre-apoptotic factors of Bad, Bak and Bim. *J Herbmed Pharmacol* 2016;5:61-6.
24. Wu D, Zhang J, Wang J, Li J, Liao F, Dong W. Hesperetin induces apoptosis of esophageal cancer cells via mitochondrial pathway mediated by the increased intracellular reactive oxygen species. *Tumour Biol* 2016;37:3451-9.
25. Tekin Gm, Ozturk Br. Effects of Quercetin and Hesperetin on MCF-7 Cell Proliferation by Using Real-Time Cell Analyzer. *J Basic Clin Pharm* 2017;8:121-6.
26. Alshatwi AA, Ramesh E, Periasamy V, Subash Babu P. The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways. *Fundam Clin Pharmacol* 2013;27:581-92.
27. Carugo O, Pongor S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci* 2001;10:1470-3.