

İzotretinoin Bileşiğinin SARS-CoV-2 Üzerinde Etkisinin In Silico Yöntemlerle Araştırılması

Investigation of the Effect of Isotretinoin Compound on SARS-CoV-2 by In Silico Methods

 Büşra ÇINAR¹,

 Vesim NASİF²,

 Dilara ATASEVEN³

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem 6, Sivas, Türkiye

² Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Sivas, Türkiye

³ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Sivas, Türkiye

Corresponding author:

Vesim NASİF, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Sivas, Türkiye

E-mail:

vesimnasif9290@gmail.com

Received/Accepted: Jan 2022

Conflict of interest: There is not a conflict of interest.

How to Cite

Çınar, B., Nasif, V., Ataseven, D. (2022). İzotretinoin Bileşiğinin SARS-CoV-2 Üzerinde Etkisinin İn Silico Yöntemlerle Araştırılması. *Health Sciences Student Journal*, 2(1), 7-12.

<https://www.healthssj.com/izotretinoin-bilesiginin-sars-cov-2-uzerinde-etkisinin-in-silico-yontemlerle-arastirilmesi/>

ÖZET

2019 yılında dünya sağlık örgütü tarafından salgın ilan edilen ve ilk kez Çin de görülen SARS-CoV-2 halen tüm canlıları tehdit etmeye devam etmektedir. Bu çalışmada izotretinoin bileşiğinin COVID19 üzerindeki etkisi araştırılmıştır. SARS-CoV-2 virüsünün ana proteaz, spike glikoproteini ve RNA polimeraz enzimleri hedef alınmıştır. Yapılan araştırma neticesinde ilgili bileşiğin söz konusu virüse karşı etkili olabileceği bulundu. Fakat daha ileri araştırmalarında mutlaka yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: İzotretinoin, Moleküler Doking, Proteaz, Salgın, SARS-CoV-2, Spike, Virüs.

ABSTRACT

SARS-CoV-2, which was declared an epidemic by the world health organization in 2019 and first seen in China, still continues to threaten all living things. In this study, the effect of isotretinoin compound on COVID19 was investigated. The main protease, spike glycoprotein and RNA polymerase enzymes of SARS-CoV-2 virus were targeted. As a result of the research, it was found that the related compound could be effective against the virus in question. However, further research must be done.

Keywords: Isotretinoin, Molecular Docking, Protease, Pandemic, SARS-CoV-2, Spike, Virus.

1. GİRİŞ

COVID-19 Virolojisi

Coronavirüs (CoV); nidovirales takımı, coronaviridae ailesi, coronavirinae alt ailesinden gelir. Coronavirinae alt ailesi genomik yapıya göre α , β , γ , δ CoV'den oluşur. Bunlar arasından insanları etkileyenler esas olarak alfa ve beta cinsleridir. Coronavirüs betakoronavirüslerin bir üyesidir. 8,4-12 kDa'lık viral RNA genomuna sahip zarflı pozitif tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Viral genomlar 5' ve 3' termalden oluşur. 5' terminal, viral replikasyondan sorumlu proteinleri kodlayan açık okuma çerçeveleri içerir. 3' terminal, yapısal proteinleri içerir. Virüs partikülü yuvarlak veya oval şekilli ve 60-100 nm çapındadır.^{1,2}

SARS-CoV-2 viryonu genomik RNA ve fosforile nükleokapsid (N) proteininden oluşan bir nükleokapside sahiptir. Nükleokapsid, fosfolipit çift katmanların arasına gömülüdür ve iki farklı tipte başak proteini ile kaplanır: tüm CoV'lerde bulunan sivri glikoprotein düzeltici (S) ve yalnızca bazı CoV'ler arasında paylaşılan hemagglutinin-esteraz (HE). Membran (M) proteini ve zarf (E) proteini viral zarftaki S proteinleri arasında bulunur. Virüsün dış yüzeyinde taç benzeri bir yapı oluşturan spike (S) glikoproteini virüsün karakteristik özelliğinden sorumludur. S proteini, S1 ve S2 olmak üzere iki alt birime ayrılır. SARS-CoV ve SARS-CoV-2 virüslerindeki S protein yapıları büyük oranda benzerdir. N proteini, virüs transkripsiyonuna ve birleşmesine yardımcı olan RNA kompleksleri oluşturur. M proteini en bol bulunan yapısal proteindir ve viral zarf şeklini tanımlar. E proteini, viral replikasyon döngüsü sırasında enfekte olmuş hücrede yüksek oranda eksprese edilen ana

yapısal proteinin en küçük ve en gizemli olanıdır. HE proteini, reseptör bağlanmasından ve konakçı özgülüğünden sorumludur.^{1,3}

SARS-CoV-2'nin ACE-2 reseptörlerine etkin bağlanmasında S proteinin reseptör bağlanma alanındaki (RDB) mutasyonlar, O-bağlantılı glikanlar ve furin bölünme bölgesinin varlığı rol oynar.³

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun bulaşması

CoV'ler hızlı mutasyon oranları olan zoonotik virüslerdir. Yaralarının en olası rezervuar olduğu gösterilmiştir.² Yüz yüze iken konuşma, öksürme veya hapşırma ile dışarı atılan damlacıklar en yaygın bulaş şeklidir. Enfekte bir kişiye uzun bir süre maruz kalma (en az 15 dakika 6 fit mesafede) ve semptomatik olan kişilere daha kısa süre maruz kalma bulaş riskini arttırmaktadır.⁴ Viral yük hastalığı şiddetli geçirenlerde daha yüksek ve daha uzun sürelidir. Üzerinde virüs bulunan yüzeylerle temas etmek başka bir bulaş şeklidir. Ayrıca havada asılı kalan aerosollerle ve fekal-oral yolla da düşük oranda bulaş olabilir. Perinatal bulaş tespit edilmemiştir. Virüs büyük oranda presemptomatik taşıyıcılar ile yayılmaktadır.⁴

Reseptör etkileşimleri ve hücreye girişi

Enfeksiyonun erken döneminde SARS-CoV-2, burun, bronşial epitel hücreleri ve pnömosit gibi hücreleri hedef alır. SARS-CoV-2, ACE-2 olarak adlandırılan konakçı hücrenin membran protein reseptörüne bağlanarak konakçı hücreye girer. ACE-2, akciğer, kalp, böbrek ve bağırsakta bulunan bir membran proteindir.¹ S1 alt biriminin RBD'si ACE-2 reseptörü ile bağlanırken, S2 alt birimi konak ve viral hücre zarı arasındaki füzyonu kolaylaştırır. Konakçı hücrede bulunan tip 2 transmembran serin proteaz (TMPRSS2), ACE-2'yi bölerek ve

S proteinini aktive ederek viral girişi teşvik eder.² ACE-2 ve TMPRSS2, konakçı hedef hücrelerde, özellikle alveolar epitel tip 2 hücrelerde ifade edilmektedir.

Patogenez

Spike proteinleri üzerindeki S1 alt biriminin RBD'si esas olarak akciğerde tip-2 pnömositlerde bulunan hACE-2 reseptörüne bağlanır. Bu bağlanma hACE-2 reseptörlerinde down regülasyona yol açar. ACE-2 reseptörlerinin down regülasyonu ACE1 tarafından anjiyotensin-2 (AT-2) üretiminin artmasına yol açabilir. AT-2 üretiminin artması pulmoner vasküler geçirgenliği artırır ve akciğer hasarına neden olabilir.³

Ayrıca SARS-CoV-2, konağın antijen sunan hücreleri olan dentritik hücrelerle makrofajları aktive eder. Proinflamatuvar sitokinlerin (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α , TGF- β vb.) ve kemokinlerin (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL10, vb.) aşırı salınmasıyla şiddetli immünolojik reaksiyona yol açan bir sitokin fırtınası oluşur. Bu enflamatuvar araçlar epitel hücrelerinin zarına daha çok zarar verir ve kan dolaşımına geçerek diğer organlara yayılır.³

Klinik

Semptomlar ortalama 5 (2-7) günde ortaya çıkar. Enfekte bireyin bağışıklık sisteminin gücüne bağlı olarak asemptomatik seyirden yoğun bakıma yatışı gerektirecek kadar geniş bir klinik semptom dizisi vardır.⁴ Bu virüsler solunum, enterik, hepatik ve nörolojik hastalıklara neden olabilir.

Kadınlara göre erkekler, 60 yaş üstündekiler, sigara içenler, hipertansiyon, KOAH, diyabet ve kardiyovasküler hastalığı olanlar daha duyarlıdır.^{3,5} Çocuklar, daha yüksek antikolarlar, virüse önceden daha az maruz kalma ve bağışıklık

sistemlerindeki nispeten düşük seviyelerdeki inflamatuvar sitokinler nedeniyle daha az etkilenirler.⁴

Ateş, öksürük, kas ağrısı veya yorgunluk, balgam ve nefes darlığı en yaygın semptomlardır. Daha az görülen semptomlar ise baş ağrısı, hemoptizi, anozmi, kas güçsüzlüğü, boğaz ağrısı, plöritik ağrı ve ishaldir.^{1,6} Nadiren bulantı, kusma, göğüste sıkışma görülebilir.⁷ Özellikle genç kadın hastalar sıklıkla anozmi ve disguzi semptomları bildirmiştir. Daha şiddetli hastalığı olanlarda ise solunum yetmezliği, septik şok ve/veya çoklu organ işlev bozukluğu görülebilmektedir. İshalli hastalar, solunum semptomlarının gelişmesinden önce gelebilir ve vakaları küçük bir kısmında tek semptom bu olabilir. İshal, fekal-oral geçişe neden olabilir ve bulaşı azaltma stratejileri geliştirilmesinde halk sağlığı açısından önemli olabilir.⁸

COVID-19'a bağlı ölümler solunum yetmezliği, sepsis, çoklu organ yetmezliği, kalp yetmezliği ve böbrek yetmezliğine bağlıdır.³

Teşhisi

COVID-19 tespiti, swablar (nazofarenks, orofarenks), balgam ve dışkı örnekleri kullanılarak RT-PCR ile virolojik saptamaya dayanmaktadır.^{1,5} Yanlış negatif sonuçlar olabileceğinden klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulgularının birlikte değerlendirilmesi tanıda önemlidir. Görüntüleme bulguları pozitif ancak RT-PCR sonuçları negatif olan hastaların izole edilmesi ve yanlış tanıdan kaçınmak için RT-PCR tekrarlanması önerilir.⁹

Laboratuvar

Kan testleri normal olabileceği lenfositopeni, trombositopeni, lökopeni görülebilir.³ Hastaların çoğunda infla-

matuar belirteç (CRP, eritrosit sedimantasyon hızı, ferritin, TNF- α , IL-1, IL-6) ve daha az oranda ALT, AST, CK, BUN yüksekliği gözlenir.^{3,7} Protrombin zamanında uzama, D-dimer yüksekliği, düşük fibrinojen gibi anormal pıhtılaşma parametreleri görülür. Lenfositopeninin ciddiyeti hastalığın şiddetini yansıtır.⁵

Görüntüleme

Hastaların büyük kısmında bilateral göğüs tutulumu vardır.¹ Göğüs BT'sinde bilateral lobüler ve subsegmental konsolidasyon alanları, arka kısım veya alt lob eğilimi olan buzlu cam opasiteleri, interlobüler septal kalınlaşma, hava bronkogramları, komşu plevranın kalınlaşması görülür.^{1,5,7,9}

Tedavi

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun önlenmesi ve tedavisi için henüz uygun bir ilaç geliştirilmemiş ve onaylanmamıştır. Destekleyici bakım, hastaların çoğu için ana tedavidir.^{5,10}

Yatak istirahati, kalori alımı sağlanmalı; sıvı ve elektrolit dengesi ve hemostaz korunmalı; hayati değerleri ve oksijen saturasyonu yakından izlenmelidir. Gereksiz ve uygunsuz antimikrobiyal kullanımdan özellikle geniş spektrumlu tedavilerden kaçınılmalıdır.¹⁰

Kardiyovasküler endikasyonlar için kullanılan ACEİ ve ARB gibi ilaçlarla ACE-2 reseptörlerinin upregülasyonunun SARS-CoV-2 enfeksiyonuna duyarlılığı ve enfeksiyon şiddetini arttırdığı varsayılsa da büyük gözlemsel kohort çalışmaları bu ilaçlarla enfeksiyon riski arasında bir ilişki bulamamıştır.

Klorokin, ribavirin, nitazoksanid, pensiklovir, nafamosmat olmak üzere beş farklı FDA onaylı ilacın yanı sıra geniş spektrumlu antiviral ajan favipiravir ve

remdesivirin COVID-19 enfeksiyonuna karşı etkili olabileceği tahmin edilmiştir.

Uygun zamanda yüksek doz IVIG uygulamasının hastalığın ilerlemesini önleyebileceği ve hastalığın erken evrelerinde iyileşme oranlarını arttırabileceği gösterilmiştir.

Remdesivir, ölüm oranını önemli ölçüde düşürmüştür. Potansiyel klinik bir iyileşme için hastalığın erken döneminde uygulanabilir. Favipiravir, enfeksiyon semptomlarını iyileştirir ve ateşin süresini kısaltır. Klorokin ve hidroklorokin, in vitro olarak umut verici sonuçlar göstermiştir ama hastalar üzerinde faydaları doğrulanmamıştır.³

C vitamini alt solunum yolu enfeksiyonlarının şiddetini azaltabileceğinden COVID-19'u önlemede etkili olabilir. D vitamini ve E vitamini takviyesinin SARS-CoV-2'ye karşı direnci arttırabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle diğer tedavilerin yanında vitamin takviyeleri yapılması iyi olabilir.

Yapılan çalışmalar COVID-19 ile enfekte olan bireylerin, SARS-CoV-2 spike proteinine karşı güçlü immünoglobulin G antikor tepkileri oluşturduğunu ve oluşan antikor titrelerinin 3 ay boyunca stabil kaldığını ve 5 ayda orta düzeyde düşüşler olduğunu göstermiştir. Kesin kanıtlar olmamakla birlikte bu antikor tepkilerinin yeniden enfeksiyon olasılığını azaltacağı ve yeniden enfeksiyon durumunda hastalığı hafifletebileceği düşünülmektedir.¹¹

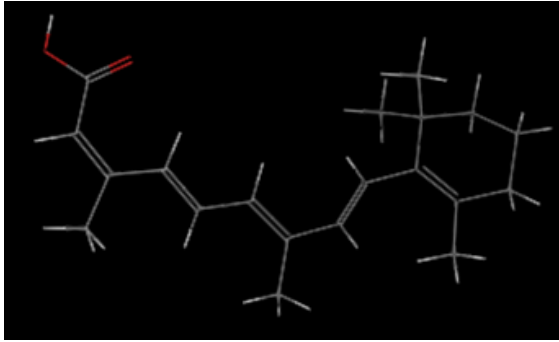
MATERYAL ve METOT

İzotretinoin PubChem web sitesinden yüklenmiştir. COV.19 tarafından 5PF1, 6X6P ve 7BV2 proteinlere karşı denenmiştir. Bu hedef proteinleri PDB web

aracından alınmıştır. 5RF1 SARS-COV-2 ana proteaz, 6X6P spike Proteini ve 7BV2 ise RNA polimerazıdır. Bu proteinler, pH = 5 ± 4 'te doking hesaplamalarına hazırlamak için OPLS3e yöntemi kullanılarak en aza indirilmiştir. Bu proteinlerin aktif bölgeleri Maestro 12.2 programı kullanılarak hazırlanmıştır. Tüm bu hesaplamalar Maestro 12.2 Schrödinger yazılım programı ile OPLS3e yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

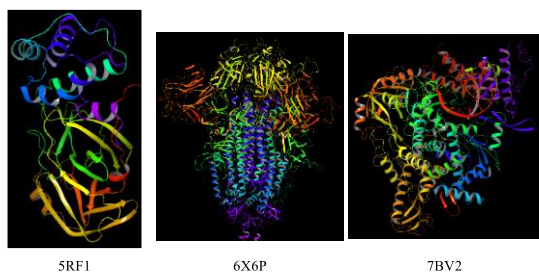
İzotretinoin PubChem Kimliği, adı ve yapısı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. İzotretinoin yapısı.

Tüm bileşikler POLS3e yöntemi ile minimize edilmiş ve hesaplamalarda pH 5 ± 4 kullanılmıştır. Çalışılan tüm bileşikler için pH = 5 ± 4 'te olası durum yapısı belirlenmiştir.

5PF1, 6X6P ve 7BV2 adı geçen tüm hedef proteinleri PDB'dan alınmıştır. Onların yapıları Maestro 12.2 Schrödinger yazılım programı ile OPLS3e yöntemi kullanılarak optimize ve minimize edilmiştir. Bahsedilen bu proteinleri yapılarını Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Hedef proteinlerin yapıları.

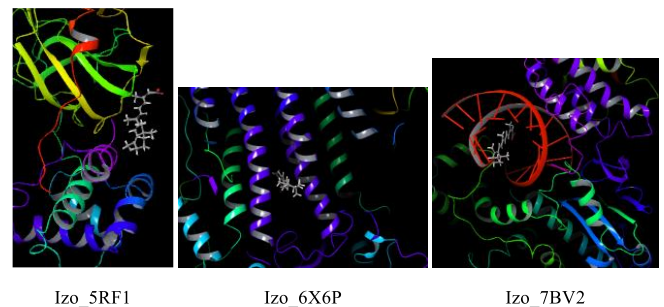
Moleküle Doking Analizleri

Kimyasalların biyolojik aktiviteleri, hesaplama teknikleri kullanılarak moleküler doking analizleri ile öngörülebilir. Moleküler doking hesaplamaları, incelenen izotretinoin ve hedef proteinler arasında gerçekleş-tirilmiştir. Doking sonuçları; doking skor (DS), van der-walls enerji (E_{vdw}), coulomb enerji (E_{coul}) ve etkileşim enerji (E_{Int}) Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İzotretinoin'in SARS CoV-2'ye Karşı Moleküler Doking sonuçları				
Bileşik	DS ^a	E_{vdw} ^a	E_{coul} ^a	E_{Int} ^a
5RF1				
İzotretinoin	-	-	-	-
	2.511	13.844	3.798	17.642
6X6P				
İzotretinoin	-4.700	-21.443	-2.540	-23.984
7BV2				
İzotretinoin	-	-	3.538	-
	1.168	16.798		13.260

Tablo 1'e göre izotretinoinin çalışılan tüm proteinlere karşı etkili değildir. 7BV2 proteinine karşı coulomb enerjisinin (E_{coul}) değerine göre aktif olmadığı açık bir şekilde belirlenirken, 5RF1 ve 6X6P proteinlere karşı ise etkilidir. Özellikle 6X6P ye karşı daha fazla etkinlik göstermektedir.

Ek olarak, izotretinoinin 5RF1,6X6P ve 7BV2 ile kenetlenme yapıları Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. İzotretinoin ve hedef proteinler ile kenetlenme yapıları.

Sonuç

Bu çalışmada izotretinoin yapısını PubChem web sitesinden alınmıştır. SARS-CoV-2 tarafından 5PF1, 6X6P ve 7BV2

proteinlere karşı denenmiştir. Hedef proteinleri (5RF1, 6X6P ve 7BV2) Protein Data Bank (PDB) sitesinden yüklenmiştir. Bunların doking hesaplamaları yapılmıştır.

Doking sonuçlarına göre izotretinoin 5RF1 (SARS-CoV-2 ana proteaz) ve 6X6P (SARS-CoV-2 spike Proteini) proteinlerine karşı etkili bulunmuştur.

KAYNAKÇA

1. Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. (2020). Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/V12040372>
2. Lvov, D. K., & Alkhovsky, S. v. (2020). [Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus Sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus Merbecovirus)]. *Voprosy Virusologii*, 65(2), 62–70. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70>
3. Samudrala, P. K., Kumar, P., Choudhary, K., Thakur, N., Wadekar, G. S., Dayaramani, R., Agrawal, M., & Alexander, A. (2020). Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *European Journal of Pharmacology*, 883. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173375>
4. Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., & Prescott, H. C. (2020). Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, 324(8), 782–793. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.12839>
5. Umakanthan, S., Sahu, P., Ranade, A. v., Bukelo, M. M., Rao, J. S., Abrahao-Machado, L. F., Dahal, S., Kumar, H., & Kv, D. (2020). Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal*, 96(1142), 753–758. <https://doi.org/10.1136/POSTGRADMEDJ-2020-138234>
6. Ortiz-Prado, E., Simbaña-Rivera, K., Gómez-Barreno, L., Rubio-Neira, M., Guaman, L. P., Kyriakidis, N. C., Muslin, C., Jaramillo, A. M. G., Barba-Ostria, C., Cevallos-Robalino, D., Sanches-SanMiguel, H., Unigarro, L., Zalakeviciute, R., Gadian, N., & López-Cortés, A. (2020). Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(1). <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2020.115094>
7. Lotfi, M., Hamblin, M. R., & Rezaei, N. (2020). COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 508, 254–266. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2020.05.044>
8. Perisetti, A., Gajendran, M., Mann, R., Elhanafi, S., & Goyal, H. (2020). COVID-19 extrapulmonary illness - special gastrointestinal and hepatic considerations. *Disease-a-Month: DM*, 66(9). <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2020.101064>
9. Long, C., Xu, H., Shen, Q., Zhang, X., Fan, B., Wang, C., Zeng, B., Li, Z., Li, X., & Li, H. (2020). Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *European Journal of Radiology*, 126. <https://doi.org/10.1016/J.EJRAD.2020.108961>
10. Song, Y., Zhang, M., Yin, L., Wang, K., Zhou, Y., Zhou, M., & Lu, Y. (2020). COVID-19 treatment: close to a cure? A rapid review of pharmacotherapies for the novel coronavirus (SARS-CoV-2). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(2). <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106080>
11. Wajnberg, A., Amanat, F., Firpo, A., Altman, D. R., Bailey, M. J., Mansour, M., McMahon, M., Meade, P., Mendu, D. R., Muellers, K., Stadlbauer, D., Stone, K., Strohmeier, S., Simon, V., Aberg, J., Reich, D. L., Krammer, F., & Cordon-Cardo, C. (2020). Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6521), 1227–1230. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD7728>