Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2017; 20(122): 89-102

Original Article

In Silico Screening *Hepatitis B Virus* DNA Polymerase Inhibitors from Medicinal Plants

Mokhtar Nosrati[1*], Zahra Shakeran[1], Zainab Shakeran[2]

1.PhD Student of Nano Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2.Master Student of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 12 Jun 2017, Accepted: 22 Jul 2017

Abstract

***Background*:** Hepatitis B virus infection (HBV) is a significant global health problem and is a major cause of morbidity and mortality worldwide. Therefore, currently, introducing novel anti Hepatitis B drugs is taken into consideration. This study was planned to in silico screening novel Hepatitis B virus DNA polymerase inhibitors from two medicinal plants *Terminalis chebula* and *Caesalpinia sappan.*

Materials and Methods: This is a descriptive-analytic study. In the study, three-dimensional structure *of the* Hepatitis B *virus* DNA polymerase was predicted using homology modeling method. A set of phytochemicals from mentioned plants were retrieved from Pubchem database in SDF format. In silico screening was carried out using molecular docking between mentioned phytochemicals and modeled polymerase by iGemdock 2.1 software.

Results: Results of the study confirmed that all evaluated ligands have appropriate interactions to the polymerase with least toxicity and without genotoxicity potential. Results also showed that most interactions occur in reverse transcriptase domain which located in 354-694 area in the amino acid sequence of tested polymerase. Analysis of energy and amino acids involved in ligand-polymerase interaction revealed that Terchebin, Chebulinic Acid and Terflavin A have more effective interaction with the polymerase in compared to other ligands.

Conclusion: Based on the results it can be concluded that evaluated compounds could be good candidates for in vitro and in vivo research in order to develop novel anti- *Hepatitis B* drugs.

Keywords: DNA polymerase, Hepatitis B virus, In Silico, Medicinal plant

*Corresponding Author:
Address: Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Email: Mokhtar.nosrati1393@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۵ (شماره پیاپی ۱۲۲)، مرداد ۱۳۹۵، ۱۰۲-۸۹

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

غربال‌گری بیوانفورماتیکی مهارکننده‌های آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی از گیاهان دارویی

مختار نصرتی[1*]، زهرا شاکران[1]، زینب شاکران[2]

۱.دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲.دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: هپاتیت ب انسانی یکی از مشکلات عمده سلامت عمومی و از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان است. بنابراین، اخیراً معرفی داروهای موثر ضد هپاتیت ب مورد توجه قرار گرفته است. هدف از بررسی حاضر، غربال‌گری بیوانفورماتیکی مهارکننده‌های جدید آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب از دو گیاه *Terminalis chebula* و *Caesalpinia sappan* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به روش توصیفی –تحلیلی انجام شد. در پژوهش حاضر ، ساختار سه بعدی آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب به روش هومولوژی مدل‌سازی شد. ترکیبات گیاهی مورد بررسی از گیاهان مذکور نیز از پایگاه داده‌های Pubchem در قالب SDF دریافت شد. غربال‌گری بیوانفورماتیکی با استفاده از داکینگ مولکولی بین ترکیبات گیاهی و آنزیم مدل‌سازی شده توسط نرم افزار iGemdock 2.1 انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تمامی ترکیبات مورد بررسی دارای حداقل سمیت و بدون سمیت ژنتیکی بوده و برهم‌کنش‌های مناسبی را با پلیمراز مورد بررسی ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، مشخص شد که اغلب برهم‌کنش‌ها در ناحیه‌ی رونوشت بردار معکوس در ناحیه‌ی ۶۹۴-۳۵۴ از توالی آمینواسیدی رخ می‌دهند. تحلیل انرژی و آمینواسیدهای درگیر در برهم‌کنش لیگاند-پلیمراز مورد بررسی نشان داد که سه ترکیب Terchebin، Chebulinic Acid و Terflavin A برهم‌کنش‌های موثرتری را با آنزیم مورد بررسی ایجاد می‌کنند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات مورد مطالعه نامزدهای مناسبی جهت بررسی آزمایشگاهی و درون تنی با هدف معرفی داروهای ضد هپاتیت ب می‌باشند.

واژگان کلیدی: آنزیم DNA پلیمراز، بیوانفورماتیک، گیاه دارویی، ویروس هپاتیت ب

***نویسنده مسئول:** ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فن آوری های نوین، گروه بیوتکنولوژی
Email: Mokhtar.nosrati1393@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

مقدمه

حدود چهارصد میلیون نفر در سرتاسر جهان مبتلا به هپاتیت ب بوده و سالیانه ۲ میلیون نفر به این تعداد افزوده می‌شود. بنابراین این بیماری عفونی را می‌توان جزء عفونت‌های رایج به شمار آورد(۱). هپاتیت ب مزمن می‌تواند در ۲۵ درصد از بیماران موجب سیروز و سرطان کبد شود(۲). ویروس مولد بیماری مذکور عامل ۸۰ درصد از سرطان کبد در جهان بوده و بر اساس طبقه‌بندی آژانس بین المللی تحقیقات سرطان، ویروس هپاتیت ب به عنوان یک عامل سرطان‌زا انسانی محسوب می‌شود(۳). بنابراین در دهه‌های اخیر پیش‌گیری و درمان ابتلا به این بیماری، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. ویروس مولد هپاتیت ب، جزو ویروس‌های پوشش دار بوده و از اعضای هپادناویروس‌ها به شمار می‌آید ولی برخلاف سایر ویروس‌های هپاتیت انسانی، که دارای ژنوم حاوی RNA هستند، دارای DNA است(۴). طول ژنوم ویروس هپاتیت ب انسانی در حدود kb ۳/۲ است که در قسمتی از طول خود به صورت دو رشته‌ای بوده و تحت عنوان DNA حلقوی ریلکس (rcDNA) شناخته می‌شود و توانایی تبدیل شدن به مولکول DNA حلقوی بسته‌ی کوالانسی (cccDNA) را دارد(۵). ژنوم این ویروس سازمان یافتگی بالایی دارد و دارای چهار قالب خواندن باز (ORFs) به صورت هم پوشان است که تمامی ژنوم آن را در بر می‌گیرد. بزرگ‌ترین قالب خواندن باز، PORFاست که پلیمراز ویروسی را کد می‌نماید. این آنزیم موجب همانند سازی ژنوم به وسیله RNA حدواسط می‌شود(۶). مطالعات قبلی نشان می‌دهند که آنزیم پلیمراز و آنتی ژن هسته‌ای (موسوم به Core antigen) برای تکثیر DNA ویروسی ضروری هستند. اصلی‌ترین دومین‌های آنزیم DNA پلیمراز شامل بخش‌های ترنسکریپتازی معکوس(RT)، ناحیه‌ی پروتئین انتهایی(TP) و دومین RNaseH می‌باشد. دو موتیف اصلی این آنزیم شامل جایگاه فعال تیروزین-متیونین-آسپارتیک اسید-آسپارتیک اسید در دومین RT و موتیف آسپارتیک اسید-آسپارتیک اسید-گلوتامیک اسید-آسپارتیک اسید در دومین RNaseH است. مطالعات اخیر نشان داده است که استفاده از مهار کننده‌های آنزیم DNA پلیمراز موجب مهار شروع عفونت شده و مورد مذکور بیان‌گر این است که آنزیم DNA پلیمراز می‌تواند در هنگام تبدیل rcDNA به cccDNA در مکانیسم ترمیم نیز نقش داشته باشد(۱، ۷). بنابراین بر اساس موارد ذکر شده، آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی نقش مهم و قابل توجهی در عفونت‌زایی آن دارد و مهار آن می‌تواند در پیش‌گیری از سیروز و سرطان کبد بسیار موثر واقع شود.

در مطالعات متعدد مشخص شده که مهار کننده‌های آنزیم DNA پلیمراز نقش بسیار مهمی در کنترل و درمان هپاتیت ب دارند(۸، ۹). در حال حاضر روش‌های رایج درمان هپاتیت ب استفاده اینترفرون‌ها و آنالوگ‌های نوکلوئوتیدی است که به علت اثرات جانبی و رخداد مقاومت‌های دارویی با محدودیت جدی مواجه هستند. بنابراین طی سال‌های اخیر جستجو ترکیبات دارویی جدید با اثربخشی بالا، عملکرد اختصاصی و بدون اثرات سو جانبی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند(۱۰، ۱۱). در این بین ترکیبات طبیعی به ویژه ترکیبات گیاهی به دلیل منشا طبیعی، در دسترس بودن، ارزان بودن، منابع فراوان و تنوع بالا از اهمیت بالایی برخوردارند(۱۲، ۱۳). بر همین اساس در پژوهش‌های مختلفی نیز اثربخشی ترکیبات حاصل از گیاهان دارویی در مهار فعالیت آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب، به صورت عملی مورد ارزیابی قرار گرفته است(۱۴-۱۶).

تجزیه و تحلیل عملی و آزمایشگاهی اثربخشی ترکیبات گیاهی کاری طاقت فرسا و نیازمند صرف زمان و هزینه‌های بسیار زیادی است. بنابراین به منظور کاهش زمان بررسی و هزینه‌های اجرای آزمایشات می‌توان از روش‌های بیوانفورماتیکی جهت تجزیه و تحلیل اثربخشی ترکیبات مختلف استفاده نمود. روش‌های مذکور با فراهم نمودن امکان پیش بینی اثربخشی، مولکول هدف، برهمکنش‌های احتمالی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی نقش مهمی در طراحی مولکول‌های دارویی نوین دارند(۱۷، ۱۸). در پژوهش حاضر قابلیت مهار کنندگی آنزیم DNA پلیمراز

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

ویروس هپاتیت ب توسط ترکیبات مختلف فیتوشیمیایی حاصل از دو گیاه دارویی *Terminalis chebula* و *Caesalpinia sappan* که طی پژوهش‌های آزمایشگاهی خاصیت ضد هپاتیت ب از آن‌ها گزارش شده است(۱۹، ۲۰) با استفاده از روش داکینگ مولکولی مورد بررسی و مولکول‌هایی که ضمن دارا بودن خصوصیات فیزیکوشیمیایی مناسب و عدم سمیت اثربخشی بالایی در مهار آنزیم مذکور از خود نشان دهند به عنوان گزینه‌های احتمالی طراحی دارو جهت درمان هپاتیت ب معرفی خواهند شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری داده‌های اولیه

این پژوهش به شیوه توصیفی – تحلیلی انجام شد. در پژوهش حاضر مجموعه‌ای از ترکیبات فیتوشیمیایی مربوط به دو گونه گیاهی (*Terminalis chebula* و *Caesalpinia sappan*) که اثربخشی آن‌ها در درمان و کنترل هپاتیت ب طی بررسی‌های آزمایشگاهی تایید شده بود به عنوان لیگاند مورد مطالعه قرار گرفته‌اند(جدول ۱). ساختار سه بعدی لیگاندهای مذکور و نیز لامی وودین به عنوان کنترل مثبت از پایگاه داده‌های ترکیبات شیمیایی به آدرس (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت شد. توالی آمینو اسیدی آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب نیز از پایگاه داده‌های NCBI به آدرس(https://www.ncbi.nlm.nih.gov) با شماره دسترسی (CAA48354.1) دریافت شد تا به عنوان گیرنده، مورد بررسی قرار گیرد.

جدول۱. ترکیبات گیاهی مورد بررسی جهت غربالگری مهارکننده‌های آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب

گونه گیاهی	نام ترکیب	Pubchemکد دسترسی در	فرمول مولکولی
Terminalis chebula	Arjun glucoside I	۱۴۶۵۸۰۵۰	$C_{36}H_{58}O_{11}$
	Arjungenin	۱۲۴۴۴۳۸۶	$C_{30}H_{48}O_6$
	Chebuloside II	۴۴۵۶۷۱۵۰	$C_{36}H_{58}O_{11}$
	Ellagic acid	۵۲۸۱۸۵۵	$C_{14}H_6O_8$
	Gallic acid	۳۷۰	$C_6H_2(OH)_3COOH$
	Ethyl gallate	۱۳۲۵۰	$C_9H_{10}O_5$
	Luteolin	۵۲۸۰۴۴۵	$C_{15}H_{10}O_6$
	Terflavin A	۱۰۱۵۸۹۲۲۶	$C_{48}H_{30}O_{30}$
	Terchebin	۳۰۸۴۳۴۱	$C_{41}H_{30}O_{27}$
	Chebulic acid	۱۲۳۰۲۸۹۲	$C_{14}H_{12}O_{11}$
	Chebulinic acid	۷۲۲۸۴	$C_{41}H_{32}O_{27}$
Caesalpinia sappan	Juglone	۳۸۰۶	$C_{10}H_6O_3$

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

	Sappanol	۱۳۸۴۶۶۴۹	$C_{16}H_{16}O_6$
	3'-deoxysappanol	۱۳۸۴۶۶۶۰	$C_{16}H_{16}O_5$
	Sappanone A	۹۸۱۷۲۷۴	$C_{16}H_{12}O_5$
	Caesalpiniaphenol A	۷۱۴۵۴۳۶۴	$C_{17}H_{16}O_6$
	Caesalpiniaphenol B	۷۱۴۵۷۹۱۴	$C_{14}H_{12}O_6$
	Caesalpiniaphenol C	۷۱۴۵۲۵۹۸	$C_{14}H_{10}O_5$
	Caesalpiniaphenol D	۷۱۴۵۷۹۱۳	$C_{14}H_{12}O_6$
	Protosappanin C	۱۳۸۴۶۶۹۲	$C_{16}H_{14}O_6$
	Brazilin	۷۳۳۸۴	$C_{16}H_{14}O_5$
	Hematein	۱۰۱۳۸	$C_{16}H_{12}O_6$
	Alpha-phellandrene	۷۴۶۰	$C_{10}H_{16}$
	(+)-Lyoniresinol	۱۱۷۱۱۴۵۳	$C_{22}H_{28}O_8$
	(-)-Syringaresinol	۱۱۶۰۴۱۰۸	$C_{22}H_{26}O_8$
	Sappanchalcone	۵۳۱۹۴۹۳	$C_{16}H_{14}O_5$
	Neocaesalpin A	۱۵۲۲۷۲۲۷	$C_{24}H_{34}O_9$
	Neocaesalpin B	۱۵۲۲۷۲۲۸	$C_{24}H_{34}O_8$
کنترل مثبت	lamivudine	۶۰۸۲۵	$C_8H_{11}N_3O_3S$

مدل سازی همسانی و سنجش مدل پیش بینی شده

با توجه به این‌که ساختار کریستالوگرافی آنزیم DNAپلیمراز هپاتیت ب در پایگاه داده‌های پروتئین(PDB) ثبت نشده است، لذا به منظور پیش بینی ساختار سه بعدی آنزیم مذکور از ساختار سه بعدی ترنسکریپتاز معکوس HIV-1 که مطالعات بیوانفورماتیکی مشابه نیز مورد بررسی قرار گرفته بود به عنوان الگو استفاده شد. دو آنزیم ذکر شده دارای درجه‌ی حفاظت شدگی بالایی بین باقیمانده‌های آمینو اسیدهای عملکردی خود هستند. ساختار سه بعدی آنزیم رونوشت بردار معکوس HIV-1 با شماره دسترسی 1RTD از پایگاه داده‌های پروتئین به آدرس(http://www.rcsb.org) دریافت شد. به منظور اجرای مدل سازی همسانی، سرور Swiss model (https://swissmodel.expasy.org/) مورد استفاده قرار گرفت و سپس کیفیت مدل پیش بینی شده توسط سرور PROCHECK (http://services.mbi.ucla.edu) مورد ارزیابی قرار گرفت و نمودار راماچاندران مربوط به آن ترسیم شد.

بهینه سازی ساختار و انرژی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

با توجه به این‌که بررسی برهمکنش لیگاند و گیرنده باید در پایدارترین حالت از لحاظ انرژی و ساختار باشد. قبل از بررسی نهایی ، تمامی لیگاندها و مولکول گیرنده از لحاظ انرژی و ساختار با استفاده از نرم افزار Chimera 5 بهینه سازی شدند.

پیش بینی سمیت و خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیگاندهای مورد بررسی

دارا بودن خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب و عدم سمیت در کنار اثربخشی دارویی از جمله شاخص‌های مهم جهت ارزیابی یک مولکول به عنوان کاندید دارویی است. لذا در پژوهش حاضر خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل حلالیت در آب، میزان قطبیدگی(TPSA)، میزان پخش(logD)، نفوذ(logP)، پتانسیل جهش زایی در سالمونلا تیفی موریوم و قابلیت مهار ۵ سیتوکروم مهم شامل CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 با استفاده از سرور SwissADME به آدرس (http://www.swissadme.ch) و نرم افزار Toxtree 2.6 پیش بینی شد.

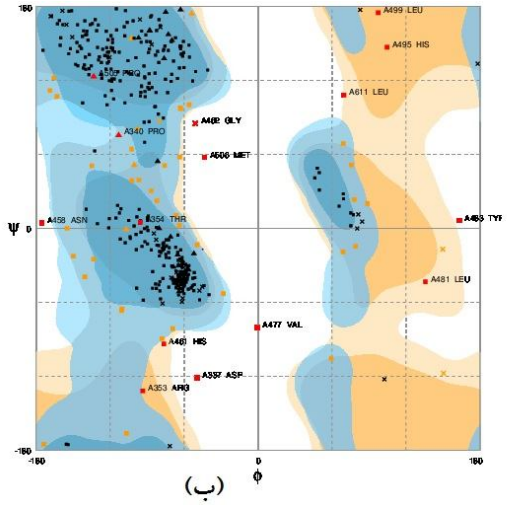
داکینگ مولکولی

به منظور ارزیابی قابلیت ترکیبات مورد بررسی در مهار آنزیم DNA پلیمراز هپاتیت ب از روش داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار iGemdock 2.1 استفاده شد. پارامترهای استفاده شده جهت انجام داکینگ مولکولی در این نرم افزار برای تمامی ترکیبات مورد بررسی ثابت و به صورت نوع داکینگ استاندارد، تعداد دفعات برهمکنش ۷۰، قطر ناحیه برهمکنش ۲۰۰ آنگستروم و بررسی برهمکنش‌های الکتریکی و هیدروژنی با انرژی آستانه‌ی ۲/۵- کیلوژول بر مول ، واندروالسی با انرژی آستانه‌ی ۴- کیلوژول بر مول بود.

یافته‌ها

مدل‌سازی همسانی و سنجش مدل پیش بینی شده

ساختار سه بعدی آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب در تصویر ۱-الف نشان داده شده است. نمودار راماچاندران ترسیم شده برای آنزیم مذکور نیز در تصویر ۱-ب نشان داده شده است. داده‌های به دست آمده از این نمودار نشان داد که ۸۶/۹ درصد اسید آمینه‌ها در نواحی مطلوب، ۹/۷ درصد در ناحیه مجاز و تنها ۳/۴ درصد از اسید آمینه‌ها در ناحیه غیر مجاز قرار گرفته‌اند، بنابراین مدل شبیه سازی شده کیفیت مناسبی برای انجام بررسی نهایی دارد.



(ب) (الف)

تصویر۱. ساختار سه بعدی شبیه سازی شده‌ی آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب (الف) نمودار راماچاندران مدل شبیه سازی شده(ب)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

پیش بینی سمیت و خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیگاندهای مورد بررسی

نتایج حاصل از پیش بینی سمیت و خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات گیاهی مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که هیچ کدام از ترکیبات مورد بررسی پتانسیل جهش‌زایی ندارند. نتایج هم‌چنین نشان داد که در مجموع ترکیبات مورد بررسی پتانسیل سمیت سلولی نداشته و در کل ترکیبات مورد بررسی فقط Sappanchalcone و Luteolin پتانسیل بالایی از سمیت را از خود نشان داند. علاوه بر این مشخص شد که ترکیبات حاصل از گیاه *C. sappan* جذب گوارشی بالاتری دارند. بررسی حلالیت ترکیبات مورد بررسی نیز نشان داد که ترکیبات گیاه *T. chebula* حلالیت بیش‌تری داشته و Terflavin Aو Gallic acid به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین حلالیت در آب را دارند. بالاترین میزان نفوذ در بین ترکیبات مورد بررسی مربوط به Arjungenin و کم‌ترین نفوذ نیز مربوط به Hematein بود. از لحاظ پخش و توزیع ترکیبات نیز مشخص شد که Alpha-Phellandrene بیش‌ترین و Gallic Acid کم‌ترین میزان توزیع را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

Name	logP	logD	TPSA	logS	جذب گوارشی	CYP1A2 مهار سیتوکروم	CYP2C19 مهار سیتوکروم	CYP2C9 مهار سیتوکروم	CYP3A4 مهار سیتوکروم	پتانسیل جهش زایی
Arjungenin	۴/۵۰	۱/۵۹	۱۱۸/۲۲	−۵/۶۷	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Arjunglucoside I	۲/۶۹	۱/۷۴	۱۹۷/۳۷	−۵/۳۴	کم	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Chebulic Acid	−۰/۸۱	−۳/۴۸	۱۹۸/۸۹	−۱/۳۹	کم	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Chebuloside II	−۲/۶۹	−۲/۳۳	۱۹۷/۳۷	−۵/۳۴	کم	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Ellagic Acid	۱/۱۰	۱/۳۲	۱۴۱/۳۴	−۲/۹۴	زیاد	بلی	خیر	خیر	خیر	خیر
Ethyl Gallate	۱/۳۰	۱/۰۱	۸۶/۹۹	−۲/۰۱	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Gallic Acid	۰/۷۰	−۲/۶۵	۹۷/۹۹	−۱/۶۴	زیاد	خیر	خیر	خیر	بلی	خیر
Luteolin	۲/۵۳	۲/۰۰	۱۱۱/۱۳	−۳/۷۱	زیاد	بلی	خیر	خیر	بلی	خیر
Chebulinic Acid	۰/۶۶	۰/۹۲	۴۴۷/۰۹	−۵/۶۶	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Terchebin	−۰/۲۹	−۱/۰۶	۴۵۰/۲۵	−۵/۱۸	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Terflavin A	۲/۰۴	۲/۰۹	۵۱۸/۷۶	−۷/۷۱	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
(-)-Syringaresinol	۲/۲۳	۱/۵۷	۹۵/۸۴	−۳/۷۴	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
(+)-Lyoniresinol	۱/۹۹	۱/۷۴	۱۱۷/۸۴	−۳/۵۳	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
3'-Deoxysappanol	۱/۲۶	۱/۲۹	۹۰/۱۵	−۲/۷۱	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Alpha-Phellandrene	۳/۲۱	۴/۶۴	۰۰/۰	−۲/۶۴	کم	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Brazilin	۱/۵۵	۱/۶۹	۹۰/۱۵	−۳/۰۱	زیاد	بلی	خیر	خیر	خیر	خیر
Caesalpiniaphenol A	۱/۸۶	۱/۵۳	۹۶/۲۲	−۳/۱۶	زیاد	خیر	خیر	خیر	بلی	خیر
Caesalpiniaphenol B	۰/۵۵	۰/۶۸	۹۳/۰۶	−۱/۹۹	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Caesalpiniaphenol C	۲/۰۳	۱/۸۲	۸۶/۹۹	−۳/۱۹	زیاد	بلی	خیر	خیر	بلی	خیر
Caesalpiniaphenol D	۱/۲۳	۰/۷۱	۱۰۷/۲۲	−۲/۵۱	زیاد	بلی	خیر	خیر	خیر	خیر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

Hematein	-۰/۲۳	۰/۸۳	۱۰۷/۲۲	-۱/۷۶	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Juglone	۱/۹۲	۱/۹۴	۵۴/۳۷	-۲/۴۷	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Neocaesalpin A	۰/۶۰	۰/۵۶	۱۳۹/۵۹	-۲/۸۵	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Neocaesalpin B	۱/۸۵	۰/۶۸	۱۱۹/۳۹	-۳/۵۳	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Protosappanin C	۱/۱۹	۱/۱۲	۱۰۷/۲۲	-۲/۸۰	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
Sappanchalcone	۲/۶۰	۲/۵۶	۸۶/۹۹	-۳/۴۱	زیاد	بلی	خیر	بلی	بلی	خیر
Sappanol	۰/۹۱	۰/۵۹	۱۱۰/۳۸	-۲/۵۷	زیاد	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر

داکینگ مولکولی

نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین ترکیبات گیاهی مورد بررسی و آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که تمامی ترکیبات مورد بررسی برهم‌کنش مناسبی را با آنزیم مذکور انجام می‌دهند. مقایسه ترکیبات حاصل از دو گونه‌ی گیاهی مورد بررسی نشان داد که ترکیبات حاصل از *T.chebula* برهم‌کنش محکم‌تری را ایجاد می‌کنند. بررسی مقایسه‌ای ترکیبات مورد بررسی نشان داد که قوی‌ترین و ضعیف‌ترین برهم‌کنش ایجاد شده به ترتیب مربوط به Terchebin و Alpha-Phellandrene می‌باشد. بررسی اسید آمینه‌های درگیر در برهم‌کنش نیز حاکی مشارکت باقیمانده‌های موجود در نواحی ۳۸۰-۳۳۰، ۴۳۰-۴۰۵، ۵۸۰-۵۳۰ و ۶۲۵-۶۰۰ می‌باشد. علاوه بر این مشخص شد که برخی اسید آمینه‌ها شامل His344,His348,Ala421 در برهم‌کنش با اکثر ترکیبات نقش دارند.

جدول۳. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی ترکیبات گیاهی حاصل از *T.chebula* و *C.sappan* با آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب

نام ترکیب	انرژی برهمکنش(کیلوژول بر مول)	اسید آمینه‌های در گیر در برهمکنش
Arjungenin	-۸۸/۷۱	Asp418,Gly586,Lys395,Tyr538,Phe584,Met585,Ile604
Arjunglucoside I	-۱۰۱/۰۰	Arg350,Arg353,Ile351,Pro352,Pro355,Met433,Pro434
Chebulic Acid	-۸۷/۷۲	Asp541,Phe584,Met585,Gly586,Gln597,Ile600,Ile604
Chebuloside II	-۹۳/۶۹	Pro399,Asn400,Thr405,Arg527,Ala535,Phe536,Ser537,Gln602,Lys603
Ellagic Acid	-۸۵/۸۶	Asp337,Gly339,Pro340,Lys367,Glu374,Arg376,Ser420,Ala421,Tyr424

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

His468,Asp469,Tyr470,Tyr476,Leu479	-۷۱/۳۴	Ethyl Gallate
Pro340,Lys367,Arg376,Leu377,Ser420,Ala421,Tyr424,	-۶۸/۷۸	Gallic Acid
Arg350,Ile351,Pro352,Arg353,Pro355,Met433,Pro434,Phe501,	-۸۷/۹۰	Luteolin
Asp366,Asn368,Lys605,Asp618,Arg624,Asn368,Ile604,Lys605,Glu606,Lys620,Arg624,	-۱۰۹/۳۰	Chebulinic Acid
Asn738,Phe708,Glu718,Ala721,Phe724,Ile760,Leu761,Arg762,Gly763,Thr764	-۱۱۹/۰۵	Terchebin
Gln602,Lys603,Gln623,Gly627,Leu643,Met644,Tyr647,Ser709,Ala710	-۱۰۵/۴۳	Terflavin A
Asp541,Asn583,Gly586,Gln597,Tyr538,Met585	-۸۱/۸	(-)-Syringaresinol
Tyr538,Asp541,Met585,Gln597,Phe584,Gly586,Ile600,Gln602,Ile604	-۸۳/۷۷	(+)-Lyoniresinol
Lys603,Ile601,Gln623,Arg624,Gly627	-۷۱/۲۹	3'-Deoxysappanol
Pro352,Met433,Pro434	-۵۳/۴۲	Alpha-Phellandrene
Phe396,Ala397,Ser537,Met539,Lys395,Ala397,Pro399,Phe536,Tyr538	-۸۱/۰۰	Brazilin
Pro340,Lys367,His370,Glu374,Val419,Arg376,Ser420,Ala421,Tyr424,Asn571,Asn573	-۸۴/۷۵	Caesalpiniaphenol A
Arg350,Ser356,Phe501,Ile351,Pro352,Pro355,Met433,Pro434,	۷۶/۰۰	Caesalpiniaphenol B
Lys367,His370,Arg376,Asp418,Val419,Ser420,Ala421,Asp540,Asn571,	-۸۰/۹۰	Caesalpiniaphenol C
Asp337,Gly339,Arg376,TRP338,Gly339,Pro340,Lys367,Glu374,Arg376,Ala421,Tyr424	-۸۹/۷۳	Caesalpiniaphenol D
Pro340, Lys367,His370, Glu374 ,Arg376,Asp418,Val419,Ser420,Ala421,Tyr424,Asn571,Asn573,	-۸۵/۳۹	Hematein
His344,Glu346,His347,His348,His425,Leu426,Pro427,Lys503,Leu566,Glu567,	-۷۶/۳۹	Juglone
Asp418,Tyr538,Asp540,Asp541,Phe584,Met585,Gly586,Gln597,Ile600,Ile604,	-۸۲/۳۷	Neocaesalpin A
Trp338,His344,Glu346,His347,His348,His425,Leu426,Pro427,Lys503,Glu567,His569,	-۷۹/۲۶	Neocaesalpin B

www.SID.ir

Archive of SID

Protosappanin C	-۸۰/۵۵	His344,Glu346,His347,His348,His425,Leu426,Pro427,Lys503,Leu566,Gly567
Sappanchalcone	-۹۰/۱۱	Leu467,His468,Asp469,Tyr470,Tyr476,Leu479,Leu480,Phe486,Gly487,Arg488,
Sappanol	-۸۳/۸۸	Lys603,Lys605,Cys607,Lys620,Gln623,Arg624,Gly627
Sappanone A	-۷۴/۵۷	His344,Glu346,His347,His348,His425,Leu426,Pro427,Lys503,Leu566
Lamivudine	-۸۹/۷۳	His347,His348,Tyr424,His425,Leu426,HisPro,Leu566,Gly567

بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ترکیبات حاصل از دو داروی گیاهی *T.chebula* و *C.sappan* به طور موثری می‌توانند آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی را مهار کنند.

اگرچه با معرفی واکسن نوترکیب مربوط به هپاتیت ب شیوع آن تا حد زیادی کنترل شده، اما عدم دسترسی همه‌ی کشورها خصوصا کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه به واکسن مذکور و هزینه‌ی بالای آن موجب شده تا جمعیت قابل توجهی سالیانه به عفونت هپاتیت ب مبتلا شوند. شیوع سریع، گسترده و نیز آمار بالای ابتلا به سرطان کبد و مرگ و میر ناشی از آن موجب شده تا معرفی راهکارهای درمانی موثر و اختصاصی ضد هپاتیت ب طی سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار بگیرد(۲۱). در این بین منابع طبیعی به علت در دسترس بودن، اثرات جانبی کم‌تر و ارزان بودن از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. گیاهان دارویی به علت سابقه طولانی کاربرد و اثربخشی بالا، اثرات جانبی کم و دارا بودن طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی با اثرات مطلوب دارویی منبع بسیار مهمی برای جستجو و معرفی ترکیبات جدید دارویی خصوصا ترکیبات ضد ویروسی می‌باشند(۱۳، ۲۲ و ۲۳). طی سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی با هدف کشف و معرفی گیاهان دارویی و ترکیبات دارویی حاصل از آن‌ها در کنترل و درمان بیماری‌های هم‌چون سرطان، دیابت، عفونت‌های میکروبی و اختلالات متابولیسمی انجام شده است که نتایج بسیاری از آن‌ها امیدوار کننده بوده است. با توجه به شیوع گسترده بیماری‌های ویروسی و آمار بالای مرگ و میر ناشی از آن‌ها و نیز لزوم معرفی روش‌ها و ترکیبات نوین درمانی اخیرا بررسی‌های متعددی با هدف معرفی گیاهان دارویی با اثرات ضد ویروسی انجام شده است. در همین خصوص طی پژوهشی مشخص شد که عصاره‌ی *Silybum marianum* اثربخشی بالایی در درمان هپاتیت سی به واسطه‌ی مهار پروتئین مرکزی ویروس مذکور دارد(۲۴). در پژوهشی مشابه رحمان و همکاران نشان دادند که عصاره‌ی Acacia nilotica موجب مهار ۵۰ درصدی تکثیر ویروس هپاتیت سی می‌شود(۲۵). در همین خصوص پژوهش‌هایی نیز به منظور بررسی خواص ضد هپاتیت ب گیاهان دارویی و معرفی ترکیبات موثره‌ی آن‌ها انجام شده است. شاین و همکاران در بررسی خود نشان دادند که Ellagic acid (یک فلاوونوئید) استخراج شده از گیاه Phyllanthus urinaria فعالیت ضد هپاتیت ب بالایی از خود نشان می‌دهد(۱۵). ترکیب مذکور در بررسی حاضر نیز برهم‌کنش قوی و مناسبی را با آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی داشت. در بررسی دیگر تایجیان و همکاران نیز مشخص شد که عصاره‌ی چند گونه گیاه دارویی شامل Terminalis chebula, Sanguisorba officinalis ,Rubus coreanus و Rheum palmatum قابلیت چشمگیر ضد هپاتیت ب دارند(۱۹). مطالعه‌ی وون و همکاران نیز نشان داد که عصاره‌ی آبی Agrimonia eupatoria به

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

طور قابل ملاحظه‌ای ترشح آنتی ژن اختصاصی ویروس هپاتیت انسانی را در شرایط آزمایشگاهی مهار می‌کند(۲۶).

بررسی آزمایشگاهی و تجربی خواص ضد میکروبی خصوصا اثرات ضد ویروسی گیاهان دارویی و ترکیبات موثره آن‌ها امری زمان‌بر، پر هزینه و با احتمال رخداد خطای انسانی است. بنابراین طی سال‌های اخیر معرفی روش‌های مکمل یا جایگزین روش‌های تجربی نظیر روش‌های بیوانفورماتیکی و محاسباتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در همین خصوص بررسی‌هایی به منظور پیش بینی خواص ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد ویروسی گیاهان دارویی و ترکیبات موثره آن‌ها انجام شده است.

در همین خصوص نصرتی و همکارن در یک بررسی بیوانفورماتیکی نشان دادند که ترکیبات پیننی و کومارینی موجود در دو گونه گیاه جاشیر می‌توانند با مهار آنزیم DNA ژیراز و پروتئین متصل شونده به پنی سیلین فعالیت ضد باکتریایی داشته باشند(۲۷). سانگانی و همکاران نیز نشان دادند که اورسولیک اسید و بوسولیک اسید می‌توانند با مهار کیناز وابسته به سیکلین فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی داشته باشند. در پژوهشی دیگر مشخص شد که تری‌ترپنوئیدهای موجود در قارچ و گیاهان دارویی می‌توانند با مهار پروتئاز HIV-1 فعالیت ضد ویروسی داشته باشند(۲۸).

بر همین اساس چند پژوهش بیوانفورماتیکی نیز در خصوص پیش بینی خواص ضد هپاتیت ب ترکیبات گیاهی انجام شده است. موهان و همکاران در بررسی خود نشان دادند که ترکیبات موجود در گیاه دارویی *Phyllanthus niruri* با ایجاد برهمکنش‌های قوی و مناسب با آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی می‌توانند به عنوان گزینه‌های مناسبی جهت بررسی آزمایشگاهی خواص ضد هپاتیت ب مطرح شوند. نتایج این پژوهش نشان داد که غالب برهم‌کنش‌های صورت گرفته بین ترکیبات مورد بررسی و آنزیم مذکور در ناحیه‌ی ۴۵-۳۰ است در حالی که نتایج پژوهش حاضر برهم‌کنشی را در این ناحیه نشان نداد(۲۹). در پژوهشی دیگر منگ و همکاران به بررسی قابلیت مهار آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی توسط دو ترکیب گیاهی Repensine و Bentysrepinine پرداختند. نتایج این پژوهش نشان داد که برهم‌کنش ترکیبات مذکور با اسید آمینه‌های آلانین ۴۲۱، فنیل آلانین ۴۲۳، آرژنین ۳۷۶ و آسپارتات ۳۶۶ بوده که کاملا منطبق با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر است(۳۰). با توجه به این‌که فعالیت رونوشت برداری معکوس مربوط به آنزیم DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی توسط اسید آمینه‌های ۶۹۴-۳۵۴ انجام می‌شود، برهم‌کنش‌های ایجاد شده با اسید آمینه‌های این ناحیه می‌تواند در مهار فعالیت آنزیمی و ظهور قابلیت ضد هپاتیت ب موثر باشد. با توجه به این‌که غالب برهم‌کنش‌های صورت گرفته بین ترکیبات مورد بررسی در پژوهش حاضر و آنزیم مذکور خصوصا در مورد سه ترکیب Terchebin، Chebulinic Acid و Terflavin A با اسید آمینه‌های ناحیه‌ی رونوشت بردار معکوس، بنابراین ترکیبات مذکور می‌توانند نامزدهای بسیار مناسبی برای بررسی آزمایشگاهی و درون تنی ضد هپاتیت ب تلقی شوند.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر به منظور بررسی قابلیت ضد هپاتیت ب ترکیبات گیاهی حاصل از دو گونه گیاه دارویی به واسطه‌ی مهار آنزیم حیاتی DNA پلیمراز ویروس هپاتیت ب انسانی انجام گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تمامی ترکیبات مورد بررسی برهم‌کنش‌های مناسبی را با آنزیم مذکور انجام می‌دهند. بررسی ناحیه برهم‌کنش و شدت برهم‌کنش‌ها ی انجام شده نشان داد که سه ترکیب Terchebin، Chebulinic Acid و Terflavin A با ایجاد برهم‌کنش‌های قوی در ناحیه‌ی مسئول فعالیت رونوشت برداری معکوس می‌توانند به عنوان گزینه‌های مناسبی جهت بررسی بیش‌تر به منظور معرفی ترکیبات گیاهی موثر در درمان هپاتیت ب معرفی شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از اساتید گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان بابت راهنمایی در خصوص انجام این پژوهش کمال تشکر را دارند.

منابع

1. Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. Cancer letters. 2009;286(1):52-9.
2. Michel M-L, Deng Q, Mancini-Bourgine M. Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges. Journal of hepatology. 2011;54(6):1286-96.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. International journal of cancer. 2001;94(2):153-6.
4. Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. Journal of hepatology. 2010;52(4):594-604.
5. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. Journal of hepatology. 2010;52(2):282-4.
6. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. World journal of gastroenterology. 2007;13(1):48.
7. Jones SA, Clark DN, Cao F, Tavis JE, Hu J. Comparative analysis of hepatitis B virus polymerase sequences required for viral RNA binding, RNA packaging, and protein priming. Journal of virology. 2014;88(3): 1564–1572.
8. Lam W, Li Y, Liou J-Y, Dutschman GE, Cheng Y-c. Reverse transcriptase activity of hepatitis B virus (HBV) DNA polymerase within core capsid: interaction with deoxynucleoside triphosphates and anti-HBV L-deoxynucleoside analog triphosphates .Molecular pharmacology. 2004;65(2):400-6.
9. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. Virus research. 2008;134(1):235-49.
10. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. Journal of viral hepatitis. 2004;11(2):97-107.
11. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. Hepatology. 2007;45(2):507-39.
12. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery .Environmental health perspectives. 2001;109(Suppl 1):69.
13. Jassim S, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. Journal of Applied Microbiology. 2003;95(3):412-27.
14. Romero MR, Efferth T, Serrano MA, Castaño B, Macias RI, Briz O ,et al. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an “in vitro” replicative system. Antiviral research. 2005;68(2):75-83.
15. Shin MS, Kang EH, Lee YI. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. Antiviral research. 2005;67(3):163-8.
16. Venkateswaran P, Millman I, Blumberg BS. Effects of an extract from Phyllanthus niruri on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: in vitro and in vivo studies. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1987;84(1):274-8.
17. Blundell TL, Sibanda BL, Montalvão RW, Brewerton S, Chelliah V, Worth CL, et al. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2006;361(1467):413-23.
18. Carpy A, Marchand-Geneste N. Structural e-bioinformatics and drug design. SAR and QSAR in Environmental Research. 2006;17(1):1-10.
19. Kim TG, Kang SY, Jung KK, Kang JH, Lee E, Han HM, et al. Antiviral activities of extracts isolated from Terminalis chebula Retz., Sanguisorba officinalis L., Rubus coreanus Miq. and Rheum palmatum L.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:39 +0330 on Monday September 25th 2017

against hepatitis B virus. Phytotherapy research. 2001;15(8):718-20.
20. Zheng M, Zhang Y. Anti-HBsAg herbs employing ELISA technique. Zhong xi yi jie he za zhi= Chinese journal of modern developments in traditional medicine/Zhongguo Zhong xi yi jie he yan jiu hui (chou), Zhong yi yan jiu yuan, zhu ban. 1990;10(9):560-2, 18.
21. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. Hepatology. 2004;39(3):857-61.
22. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews. 1999;12(4):564-82.
23. Dhiman RK, Chawla YK. Herbal medicines for liver diseases. Digestive diseases and sciences. 2005;50(10):1807-12.
24. Kalantari H, Shahshahan Z, Hejazi SM, Ghafghazi T, Sebghatolahi V. Effects of silybum marianum on patients with chronic hepatitis C. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2011;16(3):287.
25. Rehman S, Ashfaq UA, Riaz S, Javed T, Riazuddin S. Antiviral activity of Acacia nilotica against Hepatitis C Virus in liver infected cells. Virology journal. 2011;8(1):220.
26. Kwon DH, Kwon HY, Kim HJ, Chang EJ, Kim MB, Yoon SK, et al. Inhibition of hepatitis B virus by an aqueous extract of Agrimonia eupatoria L. Phytotherapy Research. 2005;19(4):355-8.
27. Nosrati M, Behbahani M. In vitro and in silico antibacterial activity of prangos ferulacea (l.) lindl and prangos uloptera dc, and their mutagenicity in the ames test. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2016;6(3):930.
28. Sanghani HV, Ganatra SH, Pande R. Molecular–Docking Studies of Potent Anticancer Agent. J Comput Sci Syst Biol. 2012;5:012-5.
29. Mekha Mohan PJ, Valsalan R, Nazeem PA. Molecular docking studies of phytochemicals from Phyllanthus niruri against Hepatitis B DNA Polymerase. Bioinformation. 2015;11(9):426.
30. Meng F-c, Xu W-r, Li Y-z, Huang Z-m, Liang G-y, Liu C-x. In silico molecular docking study of repensine and bentysrepinine against HBV DNA polymerase. Chinese Herbal Medicines. 2015;7(1):39-44.

www.SID.ir