# غربالگری بیوانفورماتیکی مهارکننده(های) پروتئاز NS3/4A ویروس هپاتیت سی از دو گیاه دارویی *Cornus officinalis* و *Syzygium aromaticum*

**زهرا شاکران**: دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
***مختار نصرتی**: دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران (*نویسنده مسئول).
mokhtar.nosrati1393@gmail.com
**زینب شاکران**: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۶

**چکیده**

**زمینه و هدف**: عفونت ناشی از ویروس هپاتیت سی یکی از معضلات مهم پیش روی سلامت عمومی ویکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان است. بنابراین اخیرا پژوهش‌های زیادی با هدف معرفی ترکیبات جدید و موثر ضد هپاتیت سی بویژه ترکیبات گیاهی انجام شده است. هدف از پژوهش حاضر غربالگری بیوانفورماتیکی مهارکننده(های) پروتئاز ویروس هپاتیت سی از دو گیاه دارویی *Cornus officinalis* و *Syzygium aromaticum* می‌باشد.

**روش کار**: ابتدا ساختار سه بعدی پروتئاز ویروس هپاتیت سی و ترکیبات غالب گیاهان مذکور به ترتیب از پایگاه داده‌های پروتئین و Pubchem دریافت شد. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات گیاهی و پتانسیل سمیت سلولی و جهش زایی آن‌ها با استفاده از نرم افزارهای Swiss ADMEو Toxtree پیش‌بینی شد. در نهایت ترکیبات گیاهی و پروتئاز هپاتیت سی در بررسی داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار iGemdock 2.1 مورد مطالعه قرار گرفتند.

**یافته‌ها**: نتایج نشان داد که ترکیبات مورد بررسی فاقد پتانسیل جهش‌زایی و سمیت سلولی هستند. نتایج بدست آمده حاکی از برهمکنش‌های قوی و مناسب ترکیبات مورد مطالعه با آنزیم NS3/4A خصوصا در ناحیه‌ی مسئول فعالیت پروتئازی است. افزون بر این مشخص شد که ۱،۲،۶-Trigalloylglucose،Hyperoside ،Isoquercitrin ،Rhamnetin ،Ursolic acid و Methyl salicylate برهمکنش‌های قوی‌تری را با اسیدآمینه‌های کلیدی جایگاه فعال آنزیم ایجاد می‌کنند.

**نتیجه‌گیری**: بر اساس نتایج حاصل شده می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات گیاهی مورد بررسی می‌توانند به عنوان نامزدهای مناسبی جهت بررسی‌های برون و درون تنی به منظور دستیابی به ترکیبات ضد هپاتیت سی مورد ارزیابی قرار گیرند.

**کلیدواژه‌ها**: پروتئاز NS3/4A، ویروس هپاتیت سی، بیوانفورماتیک، ترکیبات گیاهی

## مقدمه

ویروس هپاتیت سی در سال ۱۹۸۹ توسط چو و همکاران شناسایی شد و بر اساس مطالعات صورت گرفته بیش از یکصدوهفتاد میلیون نفر در سرتاسر جهان به این ویروس آلوده هستند (۱ و ۲). ویروس هپاتیت سی غالباً موجب هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و در موارد شدیدتر موجب سرطان کبد می‌شود (۳). ژنوم این ویروس دارای قالب خواندن باز (ORF) منحصربه‌فردی است که موجب تولید پلی پروتئین منفرد طویلی می‌شود. این پروتئین تحت تأثیر پروتئازهای سلول میزبان و نیز پروتئازهای کد شده توسط ویروس، به قطعات کوتاه‌تری تبدیل می‌شود (۴). پروتئازهای ویروس هپاتیت سی بر روی نواحی غیر ساختاری این پروتئین طویل شامل نواحی NS3/NS4A، NS4A/4B، NS4B/5A و NS5A/5B اثر گذاشته که این عمل وابسته به فعالیت سرین پروتئاز NS3 (Cpro-2) است. پروتئین NS4 نیز به‌عنوان کوفاکتور پروتئاز NS3 عمل می‌نماید. شکسته شدن پلی پروتئین مذکور توسط فعالیت پروتئازی NS3، در تکثیر ویروس و تکمیل چرخه عفونی آن از اهمیت بالایی برخوردار است (۵).

پروتئین NS3 یک پروتئین هترودیمر از اعضای خانواده‌ی کموتریپسین سرین پروتئاز با عملکرد چندگانه بوده و فعالیت سرین پروتئازی آن در ناحیه‌ی یک سوم انتهای آمینی می‌باشد. ناحیه‌ی

دو سوم انتهایی کربوکسیلی دارای فعالیت هلیکازی NTPase/RNA است (۶). پروتئین NS3/4A ویروس هپاتیت سی قابلیت فرار از سیستم ایمنی را به واسطه‌ی مهار فعالیت عامل تنظیمی اینترفرون ۳ (IRF-3) دارا می‌باشد (۷ و ۸). مهارکنندگان پروتئاز NS3/4A موجب کنترل تکثیر و کنترل چرخه‌ی عفونی ویروس هپاتیت سی می‌شوند. هدفگیری پروتئین NS3 از دو مسیر می تواند اثر مهارکنندگی بر روی ویروس هپاتیت سی داشته باشد که شامل مهار همانندسازی ویروسی و نیز بازگرداندن کنترل ایمنی ذاتی سلول‌های کبدی برای مقابله با این ویروس است؛ بنابراین هدف گیری پروتئاز ویروس هپاتیت سی بوسیله عوامل و ترکیبات ضد ویروسی می تواندرهیافتی برای مبارزه با پیشرفت این بیماری شود (۹).

تاکنون هیچ واکسنی به‌منظور پیشگیری از هپاتیت سی تایید نشده است و داروهایی نیز که برای درمان این بیماری تجویز می شوند کارایی بالایی نداشته و یا همراه با اثرات جانبی بر سلول‌ها وبافت های بدن هستند. یکی از چالش‌های انتخاب مهارکننده‌های پروتئاز ویروس هپاتیت سی عدم اثرجانبی مهار کننده بر سلول‌های سالم و نیز جلوگیری از بروز زود هنگام مقاومت‌های دارویی است. یکی از داروهای رایج جهت در مان هپاتیت سی، ترکیب اینترفرون آلفای پگیله شده و ریباویرین است که تنها برای برخی از بیماران مؤثر بوده و دارای اثرات جانبی فراوان است؛ بنابراین جهت درمان بیماری هپاتیت سی نیاز به بهره گیری و طراحی سیستم های دارویی نوین، کارآمد، ارزان و ایمن است که بتواند به صورت اختصاصی بر روی عوامل مولکولی درگیر در مسیر تکثیر ویروس عمل نمایند. هدفگیری و مهار پروتئاز NS3/4A بوسیله عوامل و ترکیبات طبیعی می تواند در بهبود و درمان هپاتیت سی مؤثر باشد (۱۰). ترکیبات دارویی با منشاء گیاهی علاوه بر ایمن بودن به دلیل در دسترس بودن، تنوع در ساختارها و ارزان بودن از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. در یافته های مختلفی نیز تأثیر عوامل و ترکیبات گیاهی بر روی پروتئازهای ویروس هپاتیت سی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱ و ۱۴).

بررسی اثربخشی ترکیبات دارویی و اثرات جانبی آن‌ها اعم از سمیت ژنتیکی و سلولی و نیز خصوصیات فیزیکوشیمیایی با استفاده از روش‌های مرسوم نیازمند تجهیزات پیشرفته و صرف وقت و هزینه‌های زیادی می‌باشد. لذا روش‌های موازی و مکمل به‌ویژه روش‌های محاسباتی که با ضریب اطمینان بالا اثربخشی ترکیبات دارویی و نیز سمیت احتمالی آن‌ها را پیش‌بینی می‌کنند طی سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۱۵).

بر این اساس ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلفی با هدف پیش‌بینی خواص دارویی نظیر اثرات ضدمیکروبی، سمیت سلولی و ژنتیکی طی سال‌های اخیر معرفی شده‌اند. استفاده از ابزارهای مذکور در کنار و یا قبل از کارآزمایی‌های آزمایشگاهی و بالینی علاوه بر کاهش هزینه‌ها و زمان پژوهش‌های مختلف احتمال بروز خطا را نیز کاهش می‌دهند (۱۶).

وجود طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی در گیاهان ارزیابی اثربخشی آن‌ها در کاربردهای مختلف را با محدودیت مواجه کرده است. بنابراین استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی جهت ارزیابی ایمنی و نیز مکانیسم اثر آن‌ها رهیافتی مؤثر در راستای نیل به اهداف پژوهش‌های مختلف و نیز کاهش هزینه‌هاست (۱۵ و ۱۷).

با توجه به نرخ بالای عفونت‌زایی و اهمیت بالای هپاتیت سی اخیراً پژوهش‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی زیادی به‌منظور دست‌یابی به ترکیبات نوین جهت درمان یا کنترل این بیماری انجام شده است. در این راستا مادهیوی و همکاران در پژوهش خود به غربالگری ترکیبات مؤثر دارویی با قابلیت مهار تکثیر ویروس هپاتیت سی پرداختند. نتیجه پژوهش آن‌ها نشان داد که کوئرستاگتین به‌طور مؤثری می‌تواند آنزیم RNA پلیمراز وابسته به RNA ویروس مذکور را مهار کند(۱۸). در پژوهشی دیگر گالانی و همکاران نشان دادند که عصاره‌ی متانولی *Trichilia dregeana*، Detarium microcarpum و *Phragmanthera*

*capitata* قابلیت ضد ویروسی چشمگیری علیه ویروس هپاتیت سی از خود نشان می‌دهند(۱۹). نتیجه‌ی پژوهش جاکوب و همکاران نیز نشان داد که عصاره‌ی آبی خار مریم قابلیت ضد ویروسی چشمگیری علیه ویروس هپاتیت سی دارد(۲۰). مپراسرت و همکاران در مطالعه‌ای بیوانفورماتیکی به غربالگری مهارکننده‌های مؤثر آنزیم پروتئاز ویروس هپاتیت سی پرداختند. نتیجه مطالعه آن‌ها نشان داد که برخی ترکیبات موجود در پایگاه داده‌های مواد شیمیایی (ZINC) می‌توانند گزینه-های مناسبی برای درمان هپاتیت سی باشند(۲۱). لیو و همکاران نیز در مطالعه خود به بررسی قابلیت ضد هپاتیت سی فلاوونویدها پرداخته و با استفاده از داکینگ مولکولی نشان دادند که لتئولین و قابلیت ضد ویروسی چشمگیری دارند(۲۲). باستو و همکاران نیز به غربالگری بیوانفورماتیکی مهارکننده‌های مؤثر تکثیر ویروس هپاتیت سی پرداخته و نشان دادند که مشتقات مختلف پیرولون قابلیت ضد ویروسی چشمگیری علیه ویروس مذکور دارند(۲۳).

زغال اخته با نام علمی *Cornus officinalis* از جمله گیاهان خوراکی با خواص متعدد دارویی است که طی بررسی انجام شده توسط وانگ و همکاران مشخص شد که این گیاه دارای خواص ضد ویروسی چشمگیری علیه ویروس هپاتیت سی است(۲۴). افزون بر این در پژوهشی مشابه در مورد خواص ضد ویروسی گیاه میخک با نام علمی *Syzygium aromaticum* نیز مشخص شد که اسانس این گیاه دارای اثرات ضد ویروسی چشمگیری علیه ویروس هپاتیت سی می‌باشد (۱۱). بر این اساس در پژوهش حاضر، اثربخشی ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف دو گونه گیاهی *C. officinalis* و *S. aromaticum* که درپژوهش‌های آزمایشگاهی اثرات ضد ویروسی آن‌ها تایید شده در مهار آنزیم پروتئاز ویروس هپاتیت سی با استفاده از روش داکینگ مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

## روش کار

*جمع آوری داده‌های اولیه:* پژوهش حاضر به شیوه ی توصیفی – تحلیلی انجام گرفته است. در گام نخست مجموعه ای از ترکیبات گیاهی مربوط به دو گونه (*C. officinalis* و *S. aromaticum*) که اثربخشی آن‌ها در درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری هپاتیت سی طی بررسی های آزمایشگاهی تایید شده بود به‌عنوان لیگاند انتخاب شدند(جدول ۱). ساختار سه بعدی لیگاندهای مذکور از پایگاه داده‌های ترکیبات شیمیایی به آدرس (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت شد. ساختار سه بعدی آنزیم NS3/4A ویروس هپاتیت سی نیز از پایگاه داده های پروتئین به آدرس (http://www.rcsb.org) با شماره دسترسی 4NWL دریافت شد.

*بهینه سازی ساختار و انرژی:* به‌منظور بررسی برهمکنش لیگاند و گیرنده در پایدارترین حالت از لحاظ انرژی و ساختار، پیش از بررسی نهایی، ساختار سه بعدی تمامی لیگاندها و مولکول گیرنده از لحاظ انرژی و ساختار با استفاده از بخش بهینه سازی نرم افزار Chimera5 بهینه سازی شدند.

*پیش‌بینی سمیت و خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیگاندهای مورد بررسی:* دارا بودن خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب و عدم سمیت در کنار اثربخشی دارویی از جمله شاخص های مهم جهت ارزیابی یک مولکول به‌عنوان نامزد دارویی است. لذا در پژوهش حاضر خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل حلالیت در آب، میزان قطبیدگی(TPSA)، پخش (logD)، نفوذ (logD)، و قابلیت مهار ۵ سیتوکروم مهم شامل: CYP1A2، CYP2C19، CYP2C، CYP3A4 با استفاده از سرور SwissADME به آدرس (http://www.swissadme.ch) پیش‌بینی شد. سرور مذکور در واقع یک نرم افزار آنلاین بوده که با دریافت اطلاعات مولکول شیمیایی در قالب فایل mol یا SMILEامکان پیش‌بینی خصوصیات فیزیکو شیمیایی و سمیت سلولی را فراهم می‌آورد. علاوه بر این پتانسیل جهش زایی ترکیبات مورد بررسی توسط نرم افزار Toxtree2.6 پیش‌بینی شد. این نرم افزار با دارا بودن کتابخانه از گروه های عاملی و ترکیبات شیمیایی جهش زا ترکیب مورد بررسی

جدول ۱- ترکیبات گیاهی مورد بررسی جهت غربالگری مهارکننده های آنزیم NS3/4A ویروس هپاتیت سی

| گونه گیاهی | نام ترکیب | کد دسترسی در Pubchem | فرمول مولکولی |
|---|---|---|---|
| *Cornus officinalis* | oleanolic acid | ۱۰۴۹۴ | C30H48O3 |
| | ursolic acid | ۶۴۹۴۵ | C30H48O3 |
| | 1,2,6-Trigalloylglucose | ۴۴۰۳۰۸ | C27H24O18 |
| | kaempferol | ۵۲۸۰۸۶۳ | C15H10O6 |
| | Kaempferide | ۵۲۸۱۶۶۶ | C16H12O6 |
| | quercetin | ۵۲۸۰۳۴۳ | C15H10O7 |
| | Isoquercitrin | ۵۲۸۰۸۰۴ | C21H20O12 |
| | Hyperoside | ۵۲۸۱۶۴۳ | C21H20O12 |
| | Loganin | ۸۷۶۹۱ | C17H26O10 |
| *Syzygium aromaticum* | Acetyleugenol | ۷۱۳۶ | C12H14O3 |
| | beta-caryophyllene | ۵۲۸۱۵۱۵ | C15H24 |
| | vanillin | ۱۱۸۳ | C8H8O3 |
| | crategolic acid | ۷۳۶۵۹ | C30H48O4 |
| | methyl salicylate | ۴۱۳۳ | C8H8O3 |
| | Eugenin | ۱۰۱۸۹ | C11H10O4 |
| | kaempferol | ۵۲۸۰۸۶۳ | C15H10O6 |
| | Rhamnetin | ۵۲۸۱۶۹۱ | C16H12O7 |
| | Eugenitin | ۳۰۸۳۵۸۱ | C12H12O4 |
| | oleanolic acid | ۱۰۴۹۴ | C30H48O3 |
| | stigmasterol | ۵۲۸۰۷۹۴ | C29H48O |
| | campesterol | ۱۷۳۱۸۳ | C28H48O |
| کنترل مثبت | Boceprevir | ۱۰۳۲۴۳۶۷ | C27H45N5O5 |

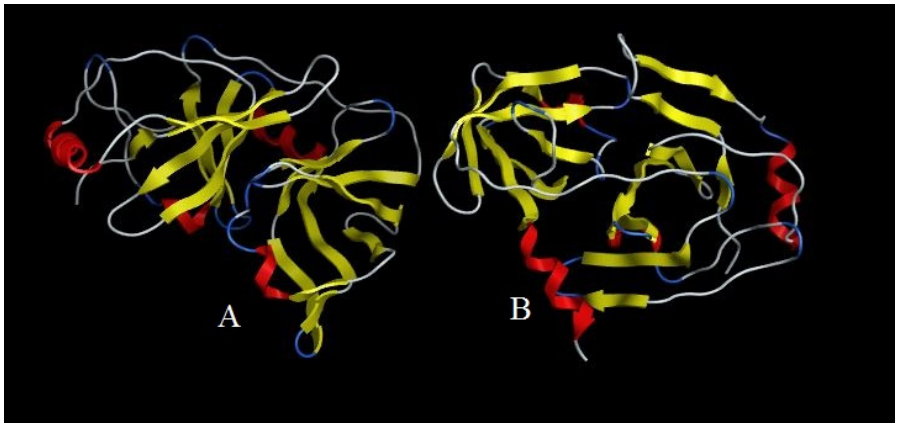
را از لحاظ ساختار بررسی کرده و بر اساس وجود یا عدم وجود گروه های جهش زا ماده ی مورد آزمون را در یکی از دو گروه بی خطر و جهش زا طبقه بندی می‌کند.

*داکینگ مولکولی*: به‌منظور ارزیابی قابلیت ترکیبات گیاهی مورد بررسی در مهار آنزیم NS3/4A ویروس هپاتیت سی 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 برهمکنش های الکتریکی، هیدروژنی (با آستانه‌ی انرژی ۲/۵- کیلوژول بر مول) ، واندروالسی (با انرژی آستانه ی ۴- کیلوژول بر مول) بود.

## یافته‌ها

*بررسی ساختار سه بعدی آنزیم NS3/4A*: ساختار سه بعدی پروتئاز NS3/4A ویروس هپاتیت سی از پایگاه داده‌های مربوط به پروتئین ها، RCSB، به آدرس (https://www.rcsb.org) با شماره دسترسی 4NWL بدست آمد. ساختار پروتئین مذکور با فرمت (PDB) در تصویر ۱ نشان داده شده است.آنزیم مذکور متشکل از ۲۱۹ اسید آمینه است که در دو زنجیره‌ی A و B ساماندهی شده است.

*پیش‌بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پتانسیل سمیت ترکیبات مورد بررسی*: نتایج حاصل از پیش‌بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پتانسیل سمیت ترکیبات گیاهی مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصل شده، هیچ کدام از لیگاندهای مورد بررسی پتانسیل جهش زایی و سمیت سلولی ندارند. همچنین مشخص شد که ترکیبات حاصل از گیاه *S. aromaticum* از لحاظ تئوری جذب گوارشی بالاتری دارند. نتایج




تصویر ۱- ساختار سه بعدی آنزیم NS3/4A ویروس هپاتیت سی

جدول ۲- نتایج حاصل از پیش بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پتانسیل سمیت سلولی و ژنتیکی در ترکیبات گیاهی مورد بررسی

| Name | logP | logD | TPSA | logS | جذب گوارشی | CYP1A2 inhibitor مهار سیتوکروم | CYP2C19 inhibitor مهار سیتوکروم | CYP2C9 inhibitor مهار سیتوکروم | CYP3A4 inhibitor مهار سیتوکروم | پتانسیل جهش زایی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,2,6-Trigalloylglucose | ۰/۳۶ | -۰/۵۸۸ | ۳۱۰/۶۶ | -۳/۶۵ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| hyperoside | ۰/۳۶ | -۰/۷۶۷ | ۲۱۰/۵۱ | -۳/۰۴ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| Isoquercitrin | ۰/۳۶ | -۰/۷۶۷ | ۲۱۰/۵۱ | -۳/۰۴ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| Kaempferide | ۲/۲۲ | ۲/۲۲۲ | ۱۰۰/۱۳ | -۳/۵۱ | زیاد | بلی | خیر | خیر | بلی | خیر |
| kaempferol | ۱/۹۰ | ۱/۸۶۴ | ۱۱۱/۱۳ | -۳/۳۱ | زیاد | بلی | خیر | خیر | بلی | خیر |
| loganin | -۱/۳۹ | -۱/۵۴۸ | ۱۵۵/۱۴ | -۱/۰۵ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| oleanolic acid | ۷/۴۹ | ۵/۰۹۹ | ۵۷/۵۳ | -۷/۳۲ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| quercetin | ۱/۵۴ | ۱/۵۲۹ | ۱۳۱/۳۶ | -۳/۱۶ | زیاد | بلی | خیر | خیر | بلی | خیر |
| ursolic acid | ۷/۳۴ | ۴/۸۹۲ | ۵۷/۵۳ | -۷/۲۳ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| acetyl eugenol | ۲/۳۰ | ۲/۶۱۱ | ۳۵/۵۳ | -۲/۵۳ | زیاد | بلی | خیر | خیر | خیر | خیر |
| beta-caryophyllene | ۴/۳۸ | ۵/۷۶۱ | ۰/۰۰ | -۳/۸۷ | کم | خیر | بلی | بلی | خیر | خیر |
| campesterol | ۸/۸۰ | ۹/۱۸۲ | ۲۰/۲۳ | -۷/۵۴ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| crategolic acid | ۶/۵۱ | ۳/۹۵۱ | ۷۷/۷۶ | -۶/۸۱ | زیاد | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| eugenitin | ۲/۴۵ | ۲/۰۸۶ | ۵۹/۶۷ | -۳/۱۵ | زیاد | بلی | خیر | خیر | خیر | خیر |
| flavonoids eugenin | ۲/۵۸ | ۱/۷۹۳ | ۵۹/۶۷ | -۳/۱۷ | زیاد | بلی | خیر | خیر | خیر | خیر |
| kaempferol | ۱/۹۰ | ۱/۸۴۸ | ۱۱۱/۱۳ | -۳/۳۱ | زیاد | بلی | خیر | خیر | بلی | خیر |
| methyl salicylate | ۲/۵۵ | ۲/۱۳۱ | ۴۶/۵۳ | -۲/۶۶ | زیاد | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| oleanolic acid | ۷/۴۹ | ۵/۰۹۹ | ۵۷/۵۳ | -۷/۳۲ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| rhamnetin | ۱/۸۷ | ۱/۸۶۸ | ۱۲۰/۳۶ | -۳/۳۶ | زیاد | بلی | خیر | خیر | بلی | خیر |
| stigmasterol | ۸/۵۶ | ۹/۱۷۳ | ۲۰/۲۳ | -۷/۴۶ | کم | خیر | خیر | بلی | خیر | خیر |
| vanillin | ۱/۲۱ | ۱/۲۰۶ | ۴۶/۵۳ | -۱/۸۲ | زیاد | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |

بدست آمده از پیش‌بینی حلالیت لیگاندها در آب نیز بیانگر حلالیت بالاتر ترکیبات گیاه *S. aromaticum* می‌باشد، که در این بین campesterol بیشترین میزان حلالیت در آب را دارا می‌باشد. این ترکیب دارای ساختاری شبیه به کلسترول بوده و در غالب میوه‌ها، دانه ها و مغزها در مقادیر مختلفی وجود دارد. در مقابل کمترین میزان حلالیت مربوط به ترکیب loganin موجود در گیاه *C. officinalis* می‌باشد ترکیب مذکور یکی از شناخته شده ترین اریدوئید گلیکوزیدهاست. علاوه براین نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان قابلیت نفوذ در بین لیگاندهای مورد بررسی به ترتیب مربوط به ترکیب campesterol و loganin می‌باشد. بررسی پخش و توزیع ترکیبات نیز حاکی از بیشترین و کم‌ترین درجه توزیع برای campesterol و loganin

جدول ۳- پیش بینی برهمکنش بین لیگاندهای فیتوشیمیایی و پروتئاز NS3/4A ویروس هپاتیت سی با روش داکینگ مولکولی

| نام ترکیب | انرژی برهمکنش (کیلوژول بر مول) | اسیدآمینه های درگیر در برهمکنش |
|---|---|---|
| 1,2,6-Trigalloylglucose | -۱۲۴/۶ | ARG118 – SER1 – GLY2 – ASP3 – THR4 – ALA5 – TYR105 – ALA111 – SER102 – ARG118 – ASP3 – TYR105 – VAL113 – VAL113 |
| hyperoside | -۱۱۲/۳ | ARG118 – ARG118 – ASP121 – ASP121 – SER128 – ARG118 – ARG119 – GLY120 – ASP121 – ASP121 – TYR105 – PRO115 |
| Isoquercitrin | -۱۰۱/۳ | SER102 – SER125 – TYR105 – CYS145 – PRO146 – ARG117 – ARG118 – ARG119 – TYR105 – VAL113 – VAL125 |
| Kaempferide | -۹۲/۸ | HIS57 – LEU135 – GLY137 – SER138 – SER139 – ALA157 – HIS57 – ASP81 – PHE154 – ARG155 – ALA156 – ALA157 |
| kaempferol | -۹۷/۳ | THR42 – HIS57 – GLY137 – SER138 – SER139 – ALA157 – THR42 – PHE43 – HIS57 – LYS136 – GLY137 – SER139 – PHE154 |
| loganin | -۸۷/۷ | THR42 – LEU135 – GLY137- SER138 – SER139 – GLN41 – HIS57 – LYS136 – LYS136 – GLY137 – GLN53 |
| oleanolic acid | -۸۰/۹ | ARG118 – GLY120 – ARG118 – ARG118 – ARG119 – GLY120 – TYR105 – VAL113 – VAL125 |
| quercetin | -۹۳ | HIS57 – LEU135 – GLY137 – SER138 – SER139 – ARG155 – ALA157 – PHE154 – ARG155 – ALA156 – ALA157 |
| ursolic acid | -۷۸/۶ | LYS136 – GLY137 – SER138 – SER139 – HIS57 – LYS136 – GLY137 – SER139 – ALA156 – ALA157 |
| acetyl eugenol | -۷۰/۶۴ | LYS68 – GLN89 – SER66 – PRO67 – PRO88 – GLN89 |
| beta-caryophyllene | -۵۹/۵ | GLY41 – PHE43 – HIS57 – LYS 136 – GLY137 |
| campesterol | -۸۶/۳ | ARG130 – ASP3 – THR4 – ASP112 – ASP112 – VAL113 – VAL113 – VAL125 – ILE126 |
| crategolic acid | -۸۲/۷ | ARG117 – ARG117 – SER101 – ARG117 – PRO146 – PRO146 – ALA147 |
| eugenitin | -۹۳/۳ | HIS57 – – HIS 57 – LEU135 – GLY137 – SER138 – SER139 – SER139 LYS136 – LYS136 – SER138 – SER139 |
| flavonoids eugenin | -۸۰/۸ | ARG11 – GLY12 – THR42 – VAL5 – GLU13 – SER37 – THR42 – VAL7 – VAL7 |
| kaempferol | -۹۷/۳ | THR42 – HIS57 – GLY137 – SER138 – SER139 – ALA157 – THR42 – PHE43 – HIS57 – LYS136 – GLY137 – SER139 – PHE154 |
| methyl salicylate | -۷۶/۳ | HIS57 – LEU135 – GLY137 – SER138 – SER139 – SER139 – HIS57 – LYS136 – LYS136 – SER139 |
| oleanolic acid | -۸۰/۹ | ARG118 – GLY120 – ARG118 – ARG118 – ARG119 – GLY120 – TYR105 – VAL113 – VAL125 |
| rhamnetin | -۱۰۰/۳ | SER20 – GLN21 – THR38 – GLU13 – CYS 16 – GLN17 – GLN17 – SER37 – THR38 – ALA39 – VAL7 |
| stigmasterol | -۷۸/۸ | GLY31 – SER1 – SER1 – GLY2 – ASP3 – ASP3 – THR4 – TYR6 – GLU30 |
| vanillin | -۷۱/۴ | SER1 – GLY2 – SER1 – TYR6 – GLU30 |
| Boceprevir | -۱۰۹/۱۸۹ | ALA5 – ALA111 – ASP112 – ALA5 – TYR105 – ASP112 – ASP112 – VAL113 – VAL113 – VAL125 – VAL125 |

می‌باشد. با توجه به ساختار شیمیایی ترکیبات مذکور و شبه کلسترولی بودن campesterol نفوذ و پخش بالای این ترکیب را می‌توان در ارتباط با ساختار آن دانست.

*داکینگ مولکولی*: نتایج حاصل داکینگ مولکولی بین ترکیبات گیاهی و پروتئاز ویروس هپاتیت سی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که، غالب ترکیبات مورد بررسی، برهمکنش مناسبی با آنزیم NS3/4A دارند. بررسی برهمکنش‌های صورت گرفته بین ترکیبا گیاهی و آنزیم مذکور نشان داد که پیوندهای واندروالسی و هیدروژنی برهمکنش‌های غالب مابین ترکیبات گیاهی و آنزیم می‌باشند. علاوه بر این بررسی مقایسه ای نتایج نشان داد که ترکیبات حاصل از گیاه *C. officinalis* دارای برهمکنش قوی تری با پروتئاز NS3/4A هستند. محکم ترین برهمکنش مربوط به ترکیب 1,2,6-Trigalloylglucose می‌باشد که انرژی آن معادل با ۱۲۴/۶- کیلوژول بر مول است. ضعیف ترین میزان برهمکنش نیز مربوط به ترکیب beta-caryophyllene موجود در گیاه *S. aromaticum* با انرژی معادل ۵۹/۵- کیلوژول بر مول می‌باشد. آمینواسیدهایی که در موقعیت های ۱-۵، ۴۲-۵۷، ۱۰۰-۱۱۳، ۱۱۸-۱۲۱، ۱۳۵-۱۴۶ و ۱۵۴-۱۵۷ حضور دارند،

بیشترین نقش را در برهمکنش مابین ترکیبات گیاهی و آنزیم NS3/4A ایفا می کنند. بررسی اسید آمینه‌های درگیر در برهمنکش‌ها نیز حاکی از نقش کلیدی باقی مانده های HIS57، SER138، SER139 و GLY137 است بطوری که باقی مانده‌های مذکور در برهمکنش‌های صورت گرفته با غالب ترکیبات مورد بررسی حضور داشتند.

## بحث و نتیجه‌گیری

در سال های اخیر بررسی فعالیت ضدویروسی ترکیبات فیتوشیمیایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، اثربخشی ترکیبات حاصل از دو گونه گیاه دارویی *C. officinalis* و *S. aromaticum* در مهار پروتئاز ویروس هپاتیت سی بااستفاده از داکینگ مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که این ترکیبات می توانند به‌طور مؤثری آنزیم مذکور را مهار نمایند.

تاکنون هیچ واکسنی برای ویروس هپاتیت سی تایید نشده است و داروهایی نیز که برای درمان این بیماری تجویز می شوند معمولاً بازدهی همراه با تاخیر دارند به گونه ای که ترکیب دارویی اینترفرون آلفای پگیله شده تأثیر درمانی خود را پس از ۲۴-۴۸ هفته نشان می دهد و علاوه بر این دارای اثرات جانبی فراوانی مانند ایجاد علایم شبیه به آنفولانزا، کم خونی و همولیز می‌باشد (۲۱). بنابراین طی سال های اخیر، مطالعات فراوانی با توجه به شیوع گسترده بیماری هپاتیت سی و آمار بالای مرگ و میر در اثر ابتلا به سرطان کبد مرتبط با این ویروس صورت گرفته است. با این وجود به دلیل هزینه بالا، کارایی اندک و اثرات جانبی فراوان داروهای موجود، نیاز به پژوهش های بیشتر جهت ارائه‌ی راهکارهای اختصاصی و مؤثر در درمان این بیماری وجود دارد (۲۵). دراین بین ترکیبات فعال زیستی مشتق از گیاهان دارویی با داشتن اثرات دارویی چندگانه و مکمل، می توانند علاوه بر تأثیر بر روی همانندسازی ویروس، سنتز آنزیم های ویروسی را نیز محدود نمایند. بنابراین ترکیبات فیتوشیمیایی فعال می توانند به‌عنوان ساختارهای نوین دارویی برای مقابله با گستره بزرگی از مولکول های هدف مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، هزینه تولید و توسعه ی این ترکیبات بسیار پایین تر از داروهای مرسوم بوده و اثر بخشی بالا و اثرات جانبی اندک نیز از دیگر ویژگی های منحصر به فرد آن ها است (۲۶). بنابراین طی سال های اخیر بهره گیری از متابولیت ها و ترکیبات حاصل از گیاهان دارویی جهت مهار و درمان بیماری های ویروسی، بویژه ویروس هپاتیت سی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. به این منظور، پژوهش های بسیاری به‌منظور دست‌یابی به ترکیبات متنوع گیاهی با قابلیت هدف گیری مولکول ها اختصاصی بویژه آنزیم های ویروسی انجام گرفته و نتایج مؤثر و امیدوارکننده ای را نیز به همراه داشته است. در این راستا در مطالعه ای که توسط رومرو و همکاران انجام شد، تأثیر ترکیب زیستی آرتمیزینین و مشتقات آن از جمله آرتزانات بر روی پروتئین های سطحی ویروس هپاتیت بی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این ترکیبات در غلظت خاصی تأثیر مهارکنندگی قوی بر روی تولید این ویروس دارد درحالی که هیچگونه اثری را بر روی سلول های بافت کبدی نشان نمی دهد (۲۷). در پژوهشی دیگر که توسط شاین و همکاران انجام شد، ترکیبات فلاونوئیدی مستخرج از گیاه *Phyllanthus amarus* فعالیت مهار کنندگی و درمان هپاتیت ب را از خود نشان دادند (۲۸). در همین خصوص در مطالعه ای مشابه که توسط راوی کومار و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، تأثیر عصاره همین گونه ی گیاهی بر روی پروتئاز NS3 ویروس هپاتیت سی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که عصاره ریشه این گیاه تأثیر چشمگیری در مهار این آنزیم دارد (۱۳). در پژوهشی که توسط جاود و همکاران صورت گرفت، عصاره متانولی و کلروفرمی بذور گیاه *Solanum nigrum* موجب مهار پروتئاز NS3 ویروس هپاتیت سی شد (۲۹). لین و همکاران نیز در پژوهی مشابه نشان دادند که ترکیبات اپی‌کتکین فنولی مرتبط با گیاه چای سبز در مهار همانندسازی ویروس هپاتیت سی مؤثر هستند (۱۴). در پژوهشی دیگر،

تأثیر عصاره های آبی و متانولی یازده گیاه بـر روی ویروس هپاتیت سی مورد بررسی قرار گرفـت. ایـن گیاهان طی فرآیند غربالگری از بین سـی و چهـار گونه گیاهی به دلیل دارا بـودن اثـرات مهـاری بـر روی این ویروس انتخاب شده بودنـد. سـپس طـی مراحل غربالگری ثانویه مشخص شد که سـه گونـه گیـاهی *Piper cubeba*، *Quercus infectoria* و *Syzygium aromaticum* دارای بیشترین تأثیر بـر روی مهـار ویـروس هپاتیـت سـی بـا میـزان مهارکنندگی بالای ۹۰٪ در غلظت ۱۰۰ میکروگـرم بر میلی لیتر از عصاره ی تـام ایـن گیاهـان بودنـد (۱۱).

تعـدد ترکیبـات زیسـتی و طبیعـی موجـود در گیاهـان دارویـی ارزیـابی اثربخشـی آن‌هـا را بـا محدودیت مواجه ساخته است.بر ایـن اسـاس طـی سال‌های اخیر استفاده از ابزارهای بیوانفورمـاتیکی به‌منظور غربالگری مواد مـوثره گیـاهی، پیش‌بینـی مکانیسـم اثـر و سـمیت احتمـالی آن‌هـا بـه‌عنوان رهیافتی مؤثر و جدید مطرح شـده اسـت. بـه ایـن منظـور اخیـراً پـژوهش هـای متعـددی بـا هـدف پیش‌بینی تأثیر ترکیبات فیتوشیمیایی بر عفونت‌ها باکتریایی، ویروسی وانواع سرطان هـا انجـام شـده است. در مطالعه ای کـه توسـط آپارنـا و همکـاران انجام گرفت برهمکنش و تـأثیر ترکیبـات طبیعـی گیاهی بر روی مهار پمپ های خروجی مربـوط بـه گونه های باکتریـایی اشریشـیاکلی و سـودوموناس آئروجینـوزا بـا روش هـای بیوانفورماتیـک مـورد بررسی قرار گرفت (۳۰). در پژوهشـی کـه توسـط نصرتی و همکاران صورت گرفـت، تـأثیر ترکیبـات فیتوشیمیایی موجود در گونه ی گیاهی جاشیر بـر روی آنزیم DNA ژیراز و پروتئین متصل شونده به پنی سـیلین باکتریـایی بـا روش هـای محاسـباتی مـورد بررسـی قـرار گرفـت و نشـان داد کـه ایـن ترکیبات می توانند به گونه ی مؤثری موجب مهـار آنزیم ها و پروتئین های مذکور می شوند (۳۱). در مطالعه ای مشابه مشخص شـد کـه سـه ترکیبـات Terchebin ، Chebulinic Acid و Terflavin A حاصـل از دو گونـه ی گیـاهی *Terminalis chebula* و *Caesalpinia sappan* مـی تواننـد برهمکنش محکم و مؤثری با آنزیم DNA پلیمـراز ویروس هپاتیت ب برقـرار نماینـد و از ایـن طریـق موجب مهار آن شوند (۳۲).

بـر همـین اسـاس بررسـی‌هـای بیوانفورمـاتیکی متعددی در زمینه ی پیش‌بینـی بـرهمکنش هـای مـؤثر بـین ترکیبـات فیتوشـیمیایی گیـاهی و ساختارهای مولکولی موجـود در ویـروس هپاتیـت سی بویژه پروتئاز این ویروس صورت گرفته است. در پژوهشـی کـه توسـط نایکـا و همکـاران انجـام گرفت، تـأثیر بـرهمکنش ترکیبـات موجـود در دو گونـه ی گیـاهی *Clematis gouriana* و *Naravelia zeylanica* بـر روی پروتئـاز NS3 ویروس هپاتیت سـی بـه روش داکینـگ مولکـولی مورد بررسی قـرار گرفـت و نتـایج نشـان داده کـه Ursolic acid و Berberine بیشترین تـأثیر را بـر روی مهار این آنزیم دارنـد. نتـایج مطالعـه مـذکور نشان داد که برهمکنش ترکیبات بکار برده شده بـا اسـیدآمینه هـای هیسـتیدین ۵۷، سـرین ۱۳۸، سـرین ۱۳۹ و گلایسـین ۱۳۷ پروتئـاز ویـروس هپاتیت سی بوده که در پژوهش حاضر نیـز نقـش فعالی در برهمکنش پروتئـاز بـا ترکیبـات گیـاهی داشـتند (۲۶). در مطالعـه ای دیگـر، اثربخشـی ترکیـب Andrographolide کـه نـوعی دی تـرپن برگرفتـه از گیـاه *Andrographis paniculata* است، در مهار پروتئـاز NS3-4A ویـروس هپاتیـت سی از طریـق داکینـگ مولکـولی و شـبیه سـازی داینامیک پیش‌بینی شد، نتایج این پژوهش نشـان داد که ایـن ترکیـب در مقایسـه بـا Asunaprevir امتیـاز داکینـگ بهتـری را در بـرهمکنش دارد و شـبیه سـازی داینامیـک مولکـولی نیـز حـاکی از اتصالات محکم این ترکیب با پروتئین هـدف بـود. همچنـین مشـخص شـد کـه نـواحی درگیـر در برهمکنش با پروتئاز مذکور کاملاً منطبق بر نتـایج بدست آمده در این پـژوهش اسـت و بـاقی مانـده های اصـلی درگیـر در آن شـامل هیسـتیدین ۵۷، سرین ۱۳۸، سرین ۱۳۹ و گلایسین ۱۳۷ نیـز بـه وضوح قابل مشاهده هستند (۳۳). در پژوهش های دیگری نیز تأثیر برهمکنش مولکول هـای کوچـک زیستی در مهار پروتئازNS3-4A ویـروس هپاتیـت سی به روش های داکینگ مولکولی و شبیه سـازی داینامیک مورد بررسی قرار گرفته است و ترکیباتی

که موثرترین برهمکنش را داشته اند، انتخاب و معرفی شده‌اند (۳۴ و ۳۵).

بر اساس مطالعه ای که توسط واردینی و همکاران انجام شد, جایگاه فعال پروتئاز ویروس هپاتیت سی شامل اسیدآمینه های گلوتامین ۴۱، فنیل آلانین ۴۳، هیستیدین ۵۷، گلایسین ۵۸، آسپارتیک اسید ۸۱، آرژنین ۱۰۹، لیزین ۱۳۶، گلایسین ۱۳۷، سرین ۱۳۸، سرین ۱۳۹، گلایسین ۱۴۰، گلایسین ۱۴۱، فنیل آلانین ۱۵۴، آرژنین ۱۵۵، آلانین ۱۵۶، آلانین۱۵۷، آسپارتیک اسید۱۶۸، متیونین ۴۸۵، والین ۵۲۴، آسپارتیک اسید ۵۲۶ و هیستیدین ۵۲۸ می‌باشد (۳۵). همچنین مشخص شده است که آمینو اسیدهای ناحیه ۱-۱۸۰ این آنزیم مرتبط با فعالیت پروتئازی آن بوده در صورتی که آمینواسید های ناحیه ۱۸۱-۶۳۱ در ارتباط با فعالیت هلیکازی این آنزیم عمل می کنند (۳۴). اکثر اسیدآمینه های مذکور در این پژوهش نیز در برهمکنش بین آنزیم و ترکیبات گیاهی درگیر بوده اند. با توجه به این که غالب برهکمنش های صورت گرفته در ناحیه اسید آمینه ای ۵۰ تا ۱۶۰ که مرتبط با بخش پروتئازی این پروتئین است اتفاق افتاده بنابراین ترکیبات 1,2,6-Trigalloylglucose، hyperoside، Isoquercitrin و rhamnetin به دلیل امکان برقراری برهمکنش های محکم با این ناحیه از پروتئین می توانند به‌عنوان نامزدهای مناسبی جهت بررسی های بیشتر در نظر گرفته شوند. علاوه بر این، ترکیبات ursolic acid و methyl salicylate نیز به دلیل برهمکنش با باقیمانده های مهم موجود در جایگاه فعال نظیر هیستیدین ۵۷، سرین ۱۳۸، سرین ۱۳۹ و گلایسین ۱۳۷و همچنین ویژگی های فیزیکوشیمیایی مطلوب مانند حلالیت در آب، قابیت نفوذ و پراکندگی بالا می توانند جهت کارآزمایی‌های درون و برون تنی مورداستفاده قرار گیرند.

در پژوهش حاضر، اثربخشی ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف دو گونه گیاهی *C. officinalis* و *S. aromaticum* در مهار آنزیم پروتئازNS3-4A ویروس هپاتیت سی با استفاده از روش داکینگ مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. نتایج حاصل، نشان دهنده این است که اکثر ترکیبات گیاهی مورد بررسی دارای برهمکنش مطلوب با جایگاه فعال آنزیم مذکور بوده اند. همچنین مشخص شد که چهار ترکیب 1,2,6-Trigalloylglucose، hyperoside، Isoquercitrin و rhamnetin با ایجاد برهمکنش قوی در ناحیه مربوط به جایگاه فعال، می توانند موجب مهار فعالیت آنزیم پروتئازNS3-4A شوند. همچنین ترکیبات acid و methyl salicylate به دلیل برهمکنش با اسیدآمینه های مؤثر در جایگاه فعال به همراه ویژگی های فیزیکوشیمیایی مطلوب، نقش مؤثری در مهار این آنزیم داشته و می توانند به‌عنوان نامزدهای مناسبی جهت اجرای تحقیقات بیش تر آزمایشگاهی مورد توجه قرار گیرند.

## تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از اساتید گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان به دلیل راهنمایی‌های ارزشمند در انجام این پژوهش تشکر و قدر دانی می‌نمایند.

## منابع

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepititis Genome. Science; 1989. 244: 359.
2. Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. J Viral Hepat; 2002. 9: 84-100.
3. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences; 1990. 87: 6547-9.
4. Failla C, Tomei L, De Francesco RA. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. J Virol; 1994. 68: 3753-60.
5. Bartenschlager R. Molecular targets in inhibition of hepatitis C virus replication. Antiviral Chemist Chemotherap; 1997. 8: 281-301.
6. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. J Hepatol; 2011. 55: 192-206.
7. Johnson CL, Gale Jr M. CARD games between virus and host get a new player. Trends Immunol;

2006. 27: 1–4.
8. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2005; 102: 2992-7.
9. An NS. Protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus Lamarre. Nature; 2003. 426: 186-9.
10. Yu X, Sainz B, Petukhov PA, Uprichard SL. Identification of hepatitis C virus inhibitors targeting different aspects of infection using a cell-based assay. Antimicrob Ag Chemotherap; 2012. 56: 6109-20.
11. Hussein G, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. Phytotherap Res; 2000. 14: 510-6.
12. Mathewa S, Fatimab K, Qadric I. Challenge Hepatitis C with Herbs as Drugs. J Tradi Med Clin Natur; 2016. 5: 184.
13. Ravikumar YS, Ray U, Nandhitha M, Perween A, Naika HR, Khanna N, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: Phyllanthus amarus as potent natural source. Virus Res; 2011. 158: 89-97.
14. Lin YT, Wu YH, Tseng CK, Lin CK, Chen WC, Hsu YC, et al. Green tea phenolic epicatechins inhibit hepatitis C virus replication via cycloxygenase-2 and attenuate virus-induced inflammation. PloS one; 2013. 8: 54466.
15. Harvey AL. Natural products in drug discovery. Drug Discover Today; 2008. 13 :894-901.
16. Vinukonda VP, Palakeerti SK, Christ B. In silico studies of Justicia adhatoda, Ocimum sanctum plant compounds as mycobacterium tuberculosis FTSZ inhibitors. Int J Bioass; 2012. 1: 22-5.
17. Chen X, Ung CY, Chen Y. Can an in silico drug-target search method be used to probe potential mechanisms of medicinal plant ingredients? Natural Prod Rep; 2003. 20: 432-44.
18. Madhvi A, Hingane S, Srivastav R, Joshi N, Subramani C, Muthumohan R, et al. A screen for novel hepatitis C virus RdRp inhibitor identifies a broad-spectrum antiviral compound. Sci Rep. 2017. 7(1):5816.
19. Galani BR, Sahuc ME, Njayou FN, Deloison G, Mkounga P, Feudjou WF, et al. Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection in vitro. Front Microbiol; 2015. 6:488.
20. Jacob JR, Korba BE, You JE, Tennant BC, Kim YH. Korean medicinal plant extracts exhibit antiviral potency against viral hepatitis. J Alterna Complement Med;2004. 10(6):1019-26.
21. Meeprasert A, Rungrotmongkol T, Suan Li M, Hannongbua S. In silico screening for potent inhibitors against the NS3/4A protease of hepatitis C virus. Curr Pharmaceu Design; 2014. 20(21):3465-77.
22. Liu MM, Zhou L, He PL, Zhang YN, Zhou JY, Shen Q, et al. Discovery of flavonoid derivatives as anti-HCV agents via pharmacophore search combining molecular docking strategy. Eur J Med Chemist; 2012. 52:33-43.
23. Bassetto M, Leyssen P, Neyts J, Yerukhimovich MM, Frick DN, Brancale A. Shape-based virtual screening, synthesis and evaluation of novel pyrrolone derivatives as antiviral agents against HCV. Bioorgan Med Chemist Letter; 2017. 27(4):936-40.
24. Yue W, Zhengquan L, Lirong C, Xiaojie X. Antiviral compounds and one new iridoid glycoside from Cornus officinalis. Progress Nat Sci; 2006. 16(2):142-6.
25. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. J Hepatol; 2011. 55: 192-206.
26. Naika HR, Lingaraju K, Chandramohan V, Krishna V. Evaluation of Phytoconstituents and Molecular Docking Against NS3 Protease of Hepatitis C Virus. J Pharmaceu Sci Pharmacol; 2015. 2: 96-103.
27. 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 Res; 2005. 68: 75-83.
28. Shin MS, Kang EH, Lee YI. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. Antiviral Res; 2005. 67: 163-8.
29. Javed T, Ashfaq UA, Riaz S, Rehman S, Riazuddin S. In-vitro antiviral activity of Solanum nigrum against Hepatitis C Virus. Virol J; 2011. 8: 26.
30. Aparna V, Dineshkumar K, Mohanalakshmi N, Velmurugan D, Hopper W. Identification of natural compound inhibitors for multidrug efflux pumps of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa using in silico high-throughput virtual screening and in vitro validation. PLoS One; 2014. 9: 101840.
31. 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. J Microbiol Biotechnol Food Sci; 2016. 6: 930.
32. Nosrati M, Shakeran Z, Shakeran Z. In Silico Screening Hepatitis B Virus DNA polymerase Inhibitors from Medicinal Plants. Amuj; 2017. 20: 89-102. (Persian)
33. Chandramohan V, Kaphle A, Chekuri M,

Gangarudraiah S, Bychapur Siddaiah G. Evaluating andrographolide as a potent inhibitor of NS3-4A protease and its drug-resistant mutants using in silico approaches. Advance Virol; 2015. 2015.

34. Wadood A, Riaz M, Uddin R. In silico identification and evaluation of leads for the simultaneous inhibition of protease and helicase activities of HCV NS3/4A protease using complex based pharmacophore mapping and virtual screening. PloS one; 2014. 9: 89109.

35. Vardhini SR. In silico evaluation for the potential naturally available drugs for breast cancer. J Recept Sig Transduct Res; 2014. 34: 174-9.

# In silico screening of hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor(s) from *Cornus officinalis* and *Syzygium aromaticum*

**Zahra Shakeran**, PhD Student of Nano Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
***Mokhtar Nosrati**, PhD Student of Nano Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran (*Corresponding Author). mokhtar.nosrati1393@gmail.com
**Zainab Shakeran**, MSc Student of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

## Abstract

**Background**: The hepatitis C virus (HCV) infection is a major global health problem and one of the common causes of mortality worldwide. Therefore, currently many studies have been focused on introducing novel and effective anti HCV agents especially plant materials. Therefore, the study was aimed to screening novel HCV protease inhibitor(s) from two medicinal plants including *Cornus officinalis* and *Syzygium aromaticum* using bioinformatics tools.

**Methods*:*** For this purpose, first three dimension structures of HCV protease and dominant compounds of the plants were retrieval from Protein Data Bank (PDB) and Pubchem database respectively. In the next step, physicochemical properties and probable mutagenic and cytotoxicity effects of the phytochemicals were predicted using Swiss ADME and Toxtree software respectively. And finally, these molecules were subjected to molecular docking studies using iGemdock 2.1 software.

**Results*:*** The results indicated that any of the phytochemical compounds have cytotoxicity and mutagenic properties. Results also showed that most studied compounds had strong and appropriate interaction with the NS3/4A enzyme especially in the protease region. Furthermore, the results indicated that six compounds including 1,2,6-Trigalloylglucose, Hyperoside, Isoquercitrin, Rhamnetin, Ursolic acid and Methyl salicylate have more strong interactions to key amino acids in the active site of the enzyme .

**Conclusion*:*** Based on the results it can be concluded that the mentioned compounds can be good candidates for in vitro and in vivo studies as novel anti-HCV agents.

**Keywords*:*** NS3/4A protease, *Hepatitis C virus*, In silico, Phytochemical compounds