

مقایسه‌ی اثر آلفا-پینن و کوئرستین بر روی فعالیت استیل کولین استراز

نام نویسندگان

محمد علی زارعی^{*}، معین مرادی

وابستگی سازمانی

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^{*} نویسنده مسئول: mazarei@uok.ac.ir

چکیده

کاهش سنتز یا افزایش هیدرولیز استیل کولین در سیستم کولینرژیک یکی از دلایل بروز بیماری آلزایمر می‌باشد. مهار آنزیم استیل کولین استراز یک راهبرد درمانی است. برخی ترکیبات طبیعی گیاهی با خواص بیولوژیکی چون محافظت کننده عصبی، آنتی-اکسیدانی، ضد اضطرابی در سال‌های اخیر بررسی شده‌اند که آلفا-پینن و کوئرستین به ترتیب از زیر گروه مونوترپنوئیدها و فلاونول‌ها از آن جمله‌اند. از روش المن برای تعیین درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز، مقدار IC_{50} و نوع سنتیکی مهار آنزیم در حضور آلفا-پینن، کوئرستین استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارزیابی و نتایج براساس شاخص EC_{50} گزارش شد. سرانجام مطالعات داکینگ مولکولی جهت ارزیابی نتایج فوق انجام شد. بررسی درصد مهار آنزیم برای گالاتامین، آلفا-پینن و کوئرستین، به ترتیب نشان دهنده‌ی مقادیر IC_{50} برابر با ۰/۰۱، ۰/۲۵ و ۱۵/۷۵ میلی مولار بود. سنتیک مهار آنزیم توسط این ترکیبات نشان دهنده الگوی مهار رقابتی برای گالاتامین و الگوی مهار مرکب (نارقابتی- غیررقابتی) برای هردو ترکیب آلفا-پینن و کوئرستین بود. نتایج سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با کنترل مثبت اسکوربات ($EC_{50}=6.22 \mu M$)، کوئرستین با مقدار EC_{50} برابر با ۲۹/۵ میکرومولار و آلفا-پینن با مقدار EC_{50} برابر با ۱/۲۲ میلی مولار دارای ظرفیت آنتی-اکسیدانی قابل توجهی هستند. سرانجام مطالعات داکینگ مولکولی انرژی اتصال برای بهترین حالت آلفا-پینن و کوئرستین به ترتیب ۶/۵- و ۹/۰- کیلوکالری بر مول نشان داد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو ترکیب آلفا-پینن و کوئرستین دارای خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز هستند، ولی توان آنتی‌اکسیدانی کوئرستین از آلفا-پینن بیشتر است. نتایج مطالعات داکینگ مولکولی با نتایج آزمایشات تجربی همسو بود. در چکیده حداکثر ۲۵۰ کلمه و در این قسمت وارد شود.

واژگان کلیدی: استیل کولین استراز، آلفا-پینن، کوئرستین، مهار آنزیمی.

مقدمه

بیماری آلزایمر یک اختلال مغزی پیشرونده است که ۷۵ درصد از کل زوال عقل را به خود اختصاص داده است. این بیماری که شیوع کنونی آن از افراد بالای ۶۰ سال است، علاوه بر درگیر کردن و اذیت شدن بیمار، از نظر اقتصادی نیز هزینه‌های فراوانی برای دولت‌ها و خانواده‌های دارای چنین بیمارانی دارد [۳۲]. در میان مکانیسم‌های آسیب شناسی بیماری‌های اختلال عصبی به ویژه بیماری آلزایمر (آلزایمر)، به فرضیه کولینرژیک توجه فراوانی شده و بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۰]. ثابت شده که آنزیم استیل کولین استراز مناسب‌ترین هدف درمانی برای بهبود علائم آلزایمر است. داروهایی از سوی سازمان غذا و دارو آمریکا، به عنوان مهار کننده آنزیم استیل کولین استراز معرفی شده است. به علت وجود اثرات جانبی این داروها، تلاش برای کشف ترکیبات با اثرات جانبی کمتر و تاثیرگذارتر، بیشتر شده است. مصرف ترکیبات طبیعی گیاهی به عنوان منبعی برای درمان، به روزگاران قدیم باز می‌گردد، که امروزه نیز طبق گزارش منتشر شده سازمان جهانی بهداشت، بیش از ۸۰ درصد از جمعیت جهان برای مراقبت‌های اولیه بهداشتی خود به طب سنتی متکی هستند. گیاهان به دلیل داشتن سبک زندگی بی‌تحرك، متابولیت‌های ثانویه آن‌ها متنوع‌تر و دارای نقش‌های خاص مختلفی هستند [۲۷]. که می‌توان علت اصلی مرکز توجه بودن گیاهان در بحث دارویی باشد. پس نگرش مثبت جمعیت حداکثری جهان به ترکیبات گیاهی سبب مطالعات بیشتر برای کشف داروهای جدید برگرفته از گیاهان شده است. بعضی از گونه‌های گیاهی ترکیبات شیمیایی متنوعی دارند، شامل آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولیک دیگری که دارای فعالیت مهاري آنزیم استیل کولین استراز هستند [۳۲]. در این پژوهش از آلفا-پینین و کوئرستین، به ترتیب ترکیبات ترپنوئیدی و فلاونوئیدی بهره گرفته شد. آلفا-پینین متابولیت ثانویه اصلی در بسیاری از اسانس‌های مشتق شده از مخروطیان است. سقر صمغ درخت بنه عمدتاً از α -Pinene تشکیل شده و همان طور که قبلاً اشاره شد، این ماده با خواص فرار و آبگریز خود دارای رایحه تازه کاج و مزه چوبی می‌باشد [۳]. می‌توان از صنعت خمیر چوب و کاغذ که آلفا-پینین را به صورت محصول جانبی تولید می‌کند و حتی پوست مرکبات در صنایع مربوطه، آلفا-پینین به دست آورد [۲۸]. در تحقیقات متفاوتی که بر روی آلفا-پینین انجام شده، فعالیت‌های بیولوژیکی چون محافظت‌کننده عصبی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب و درد، ضد حساسیت، اثرات مشابه ضد اضطراب، ضد انعقاد، اثر محافظتی برمعدة و اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی، برای پژوهشگران عیان و آشکار شده است [۳]. کوئرستین ترکیبی فلاونوئیدی از زیر گروه فلاونول می‌باشد که به طور گسترده‌ای در سیب، چایی، پیاز، گوجه فرنگی، کلم بروکلی، انواع توت‌ها، انگور قرمز، گیلان، آجیل و سایر میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند. فعالیت‌های بیولوژیکی شناخته شده این ترکیب شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محافظت‌کننده عصبی و مهار کننده استیل کولین استراز، ضد دیابت، ضد سرطان، ضد التهاب، ضد چاقی و فعالیت‌های ضد باکتریایی، ویروسی و قارچی، می‌باشد [۳۴-۱۷-۶]. در سالیان اخیر علاقه به تحقیق و کشف داروها و ترکیبات مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز، در میان ترکیبات طبیعی گیاهی به ویژه ترپنوئیدها و فلاونوئیدها، افزایش یافته است. از ترکیبات برجسته ترپنوئیدی و فلاونوئیدی به ترتیب می‌توان به آلفا-پینین و کوئرستین اشاره نمود. هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان مهار و رفتار سنتیکی آنزیم استیل کولین استراز در حضور دو ترکیب آلفا-پینین و کوئرستین به صورت جداگانه بود.

مواد و روش‌ها

سنجش فعالیت آنزیمی

در اوایل دهه ۱۹۶۰، روشی توسط المن و همکارانش برای ارزیابی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز تعریف شد. طبق این روش استیل تیوکولین ایداید، آنالوگ استیل کولین، توسط آنزیم استیل کولین استراز به تیوکولین و استات تبدیل می‌شود. تیوکولین حاصل از تجزیه آنزیمی با ۵، ۵-دی تیو بیس-۲-نیتروبنزوات واکنش می‌دهد، و نهایتاً ترکیب ۵-تیو-۲-نیتروبنزوات زرد رنگ را تولید می‌کند. [۱۱]. سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۳۰۰ میکرولیتر و هر غلظت در سه تکرار و با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان انجام شد. ۲ میلی گرم گالانتامین (به عنوان کنترل مثبت) در ۲ میلی لیتر متانول حل شده و استوک $48/3 \mu\text{M}$ ($\text{mg/mL}1$) به دست آمد. از ذخیره رقیق سازی پیاپی به صورت ۱:۱۰ به عمل آمد. به ترتیبی که ابتدا در میکروتیوب‌ها $450 \mu\text{L}$ بافر C (بافر تریس ۵۰ میلی مولار حاوی سرم آلبومین گاوی ۱٪ و $\text{pH } 5/8$) ریخته و سپس $50 \mu\text{L}$ از محلول حاوی گالانتامین به آن اضافه شده، رقیق سازی تا غلظت $0/0 \mu\text{M}$ ($\text{mg/mL}0001$) انجام شد. محلول ذخیره آلفا-پینن در غلظت ۸۱۷ میلی گرم بر میلی لیتر (M6)، آماده بود و نیازی به تهیه نداشت. همین ذخیره، اولین غلظت برای این آزمایش شد و از رقیق سازی آن به روش ۱:۱۰ برای تهیه سه غلظت دیگر صورت گرفت. برای رقیق سازی ابتدا در میکروتیوب‌ها $450 \mu\text{L}$ دی متیل سولفوکسید ۵٪ (به غیر از اولین غلظت) ریخته و سپس $50 \mu\text{L}$ از محلول حاوی آلفا-پینن به میکروتیوب‌های مذکور اضافه شد. چون حالت فیزیکی آلفا-پینن مایع و دارای خاصیت نامحلول در آب است، پس برخلاف گالانتامین و کوئرستین که رقیق سازی آن‌ها توسط بافر C انجام شده بود، رقیق سازی آلفا-پینن در دی متیل سولفوکسید ۵ درصد تهیه شد. 10 mg کوئرستین پس از توزین در 1 mL بافر C حل شد. این ترکیب با غلظت 10 mg/mL (33 mM) اولین غلظت آزمایش بود و تا غلظت $1/4 \text{ mM}$ ($1 \text{ mg/mL}25$) رقیق سازی متوالی ۱:۱ انجام شد.

ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی

در این پژوهش برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی آلفا-پینن و کوئرستین از روش DPPH بهره گرفته شد [۱۳]. روش DPPH، روشی سریع، ساده، دقیق و ارزان است [۲۳]. زمانی که محلول DPPH در معرض احیاکننده قرار می‌گیرد، رنگ محلول از بنفش تیره به زرد کم رنگ، تغییر می‌کند [۱۵]. در حضور نور، با O_2 به صورت خیلی جزئی واکنش می‌دهند، پس تاریکی سبب پایداری طولانی مدت محلول‌های رادیکال DPPH می‌شود [۲۶].

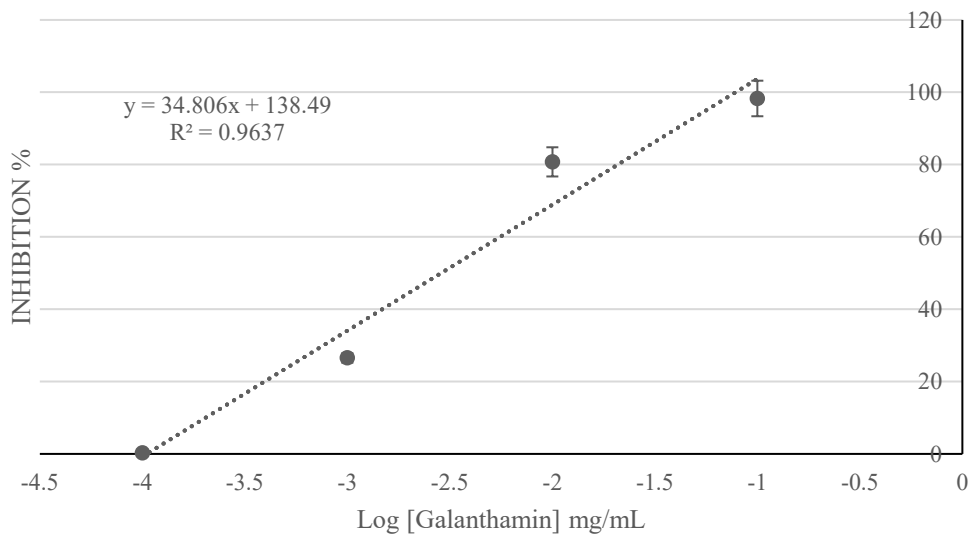
مطالعات داکینگ مولکولی

فایل‌های PDB ویرایش شده آنزیم و لیگاندها با استفاده از برنامه (Auto Dock Tools 1.5.6) [۲۹]، بعد از اضافه کردن هیدروژن‌های قطبی و بارهای گاستایگر (بارهای الکتریکی اتم که به صورت تجربی محاسبه می‌گردد) [۱۴]، و ادغام شدن هیدروژن‌های غیرقطبی در اتم کربن مجاور، به فایل PDBQT تبدیل و ذخیره شدند. گیرنده (آنزیم) به صورت سفت و لیگاندها به صورت منعطف در این مطالعه در نظر گرفته شدند. با توجه به اعمال فاصله $\text{\AA}1$ بین نقاط شبکه، جعبه شبکه به مختصات ($x=36.396$, $y=70.98$, $z=-83.686$) ایجاد گردید. در ادامه، فرآیند داکینگ در نرم افزار (Auto Dock Vina 1.1.2) انجام شد [۳۳] و [۱۱]. سرانجام نتایج حاصله در نرم افزار (BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و از آن تصاویر D^2 و D^3 استخراج شد.

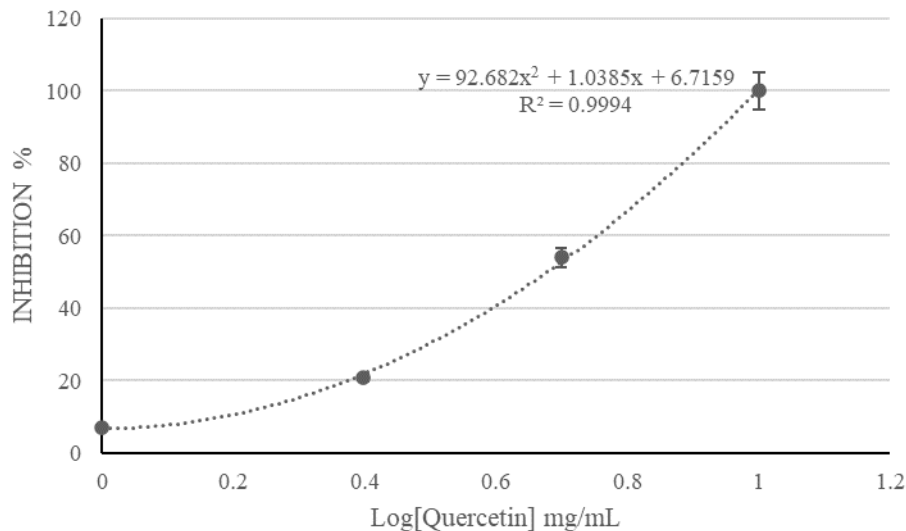
نتایج

تعیین درصد مهار و مقدار IC50

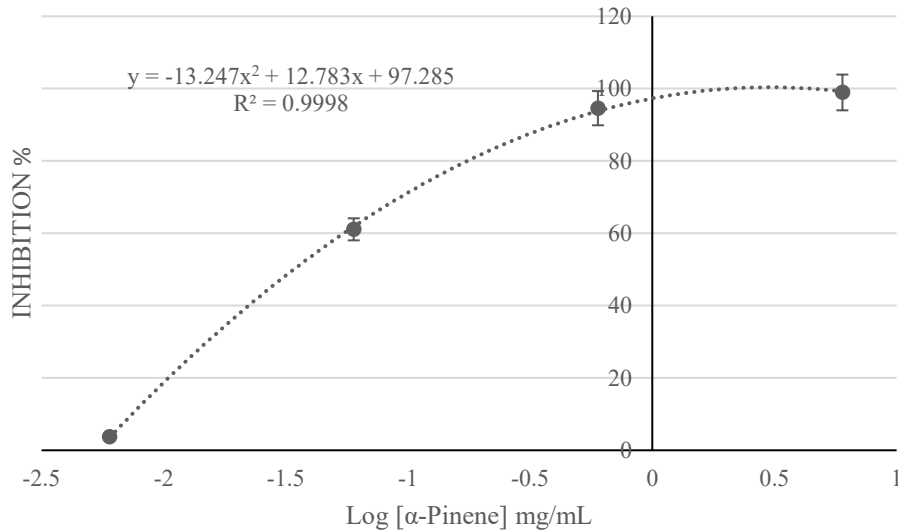
سنجش فعالیت مهارى استیل کولین استراز در حضور گالانتامین، آلفا-پینن و کوئرستین انجام شد. گالانتامین به عنوان یکی از مهارکننده‌های رایج برای مهار آنزیم استیل کولین استراز به کار می‌رود. IC50 با استفاده از نمودار تغییرات درصد مهار علیه لگاریتم غلظت مهارکننده‌ها محاسبه گردید. (شکل ۱ الی ۳).



شکل-۱: تغییرات در صد مهار استیل کلین استراز در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف گالانتامین، جهت محاسبه‌ی IC50 از نمودار لگاریتمی استفاده شد (IC50= 0.00286 mg/ml = 0.001mM).



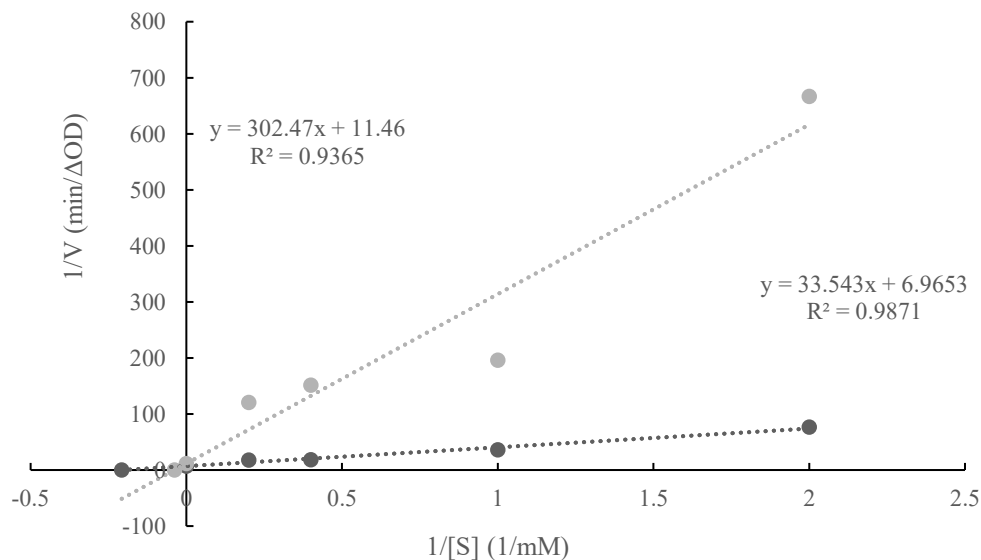
شکل-۲: تغییرات در صد مهار استیل کلین استراز در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف کوئرستین، جهت محاسبه‌ی IC50 از نمودار لگاریتمی استفاده شد (IC50= 4.76 mg/ml = 15.75 mM).



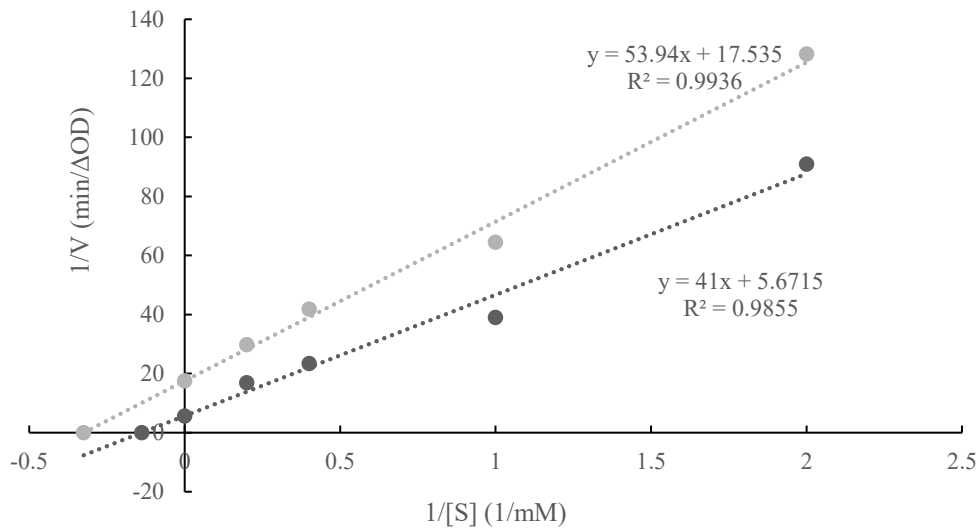
شکل-۳: تغییرات در صد مهار استیل کلین استراز در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف آلفا-پینین، جهت محاسبه ی IC_{50} از نمودار لگاریتمی استفاده شد ($IC_{50} = 0.0341 \text{ mg/ml} = 0.25 \text{ mM}$).

سنیتیک مهار استیل کلین استراز

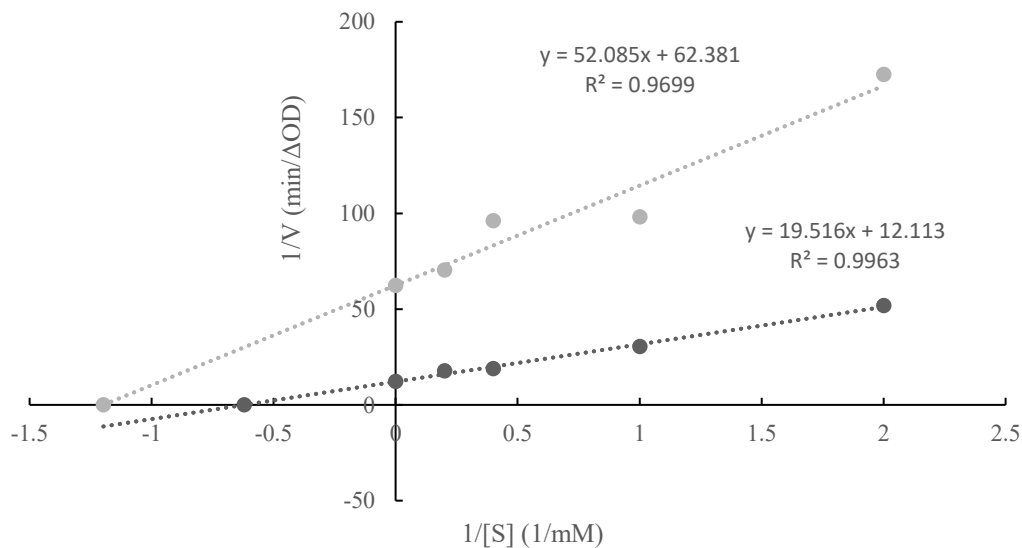
نتایج به دست آمده از نوع مهار استیل کلین استراز اعمال شده توسط گالانتامین، آلفا-پینین و کوئرستین در چهار غلظت‌های متفاوت سوپسترا بر روی نمودار معکوس مضاعف لینویور-برک، نشان از مهار رقابتی گالانتامین و مهار مرکب (نارقاتبی-غیررقابتی) برای دو ترکیب کوئرستین و آلفا-پینین می‌باشد (شکل‌های ۴-۶). و همچنین در جدول ۱ پارامترهای سنیتیکی V_{max} و K_m آورده شده است.



شکل-۴: نمودار معکوس مضاعف مهار استیل کلین استراز در حضور گالانتامین، نوع مهار رقابتی است.



شکل-۵: نمودار معکوس مضاعف مهار استیل کلین استراز در حضور کوئرستین، نوع مهار مرکب (رقابتی-غیر رقابتی) است.



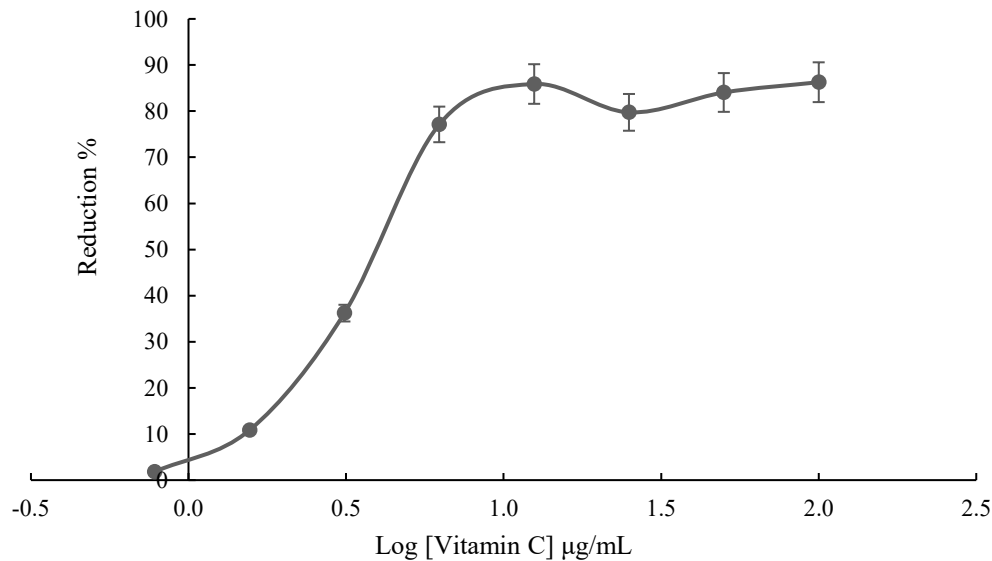
شکل-۶: نمودار معکوس مضاعف مهار استیل کلین استراز در حضور آلفا-پینن، نوع مهار مرکب (رقابتی-غیر رقابتی) است.

جدول - ۱: مقایسه‌ی پارامترهای سنتیکی فعالیت استیل کلین استراز

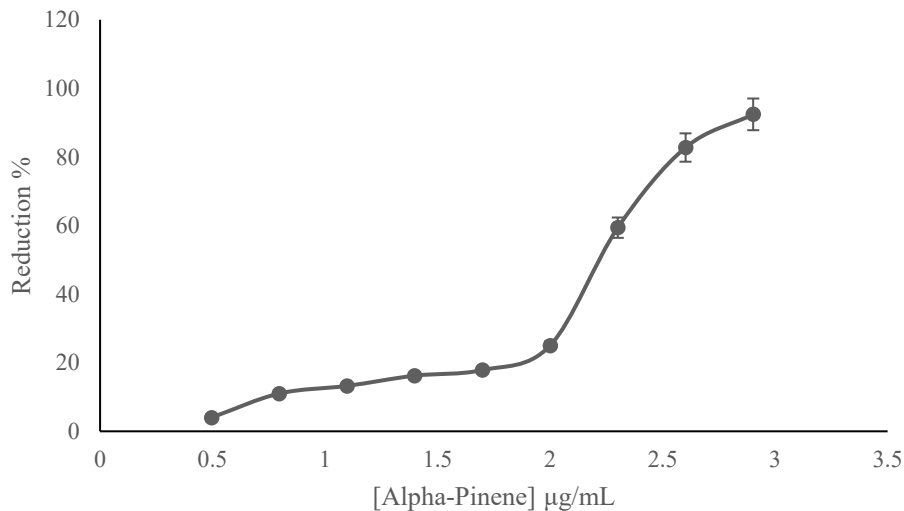
ترکیب	K_m (mM)	V_{max} ($\Delta OD/min$)
کنترل	۱/۶	۰/۰۰۸
گالانتامین	۲/۱۹۷	۰/۰۰۷۷
آلفا-پینن	۰/۸۳۴	۰/۰۱۶
کوئرستین	۳/۰۷۶	۰/۰۵۷

نتایج ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

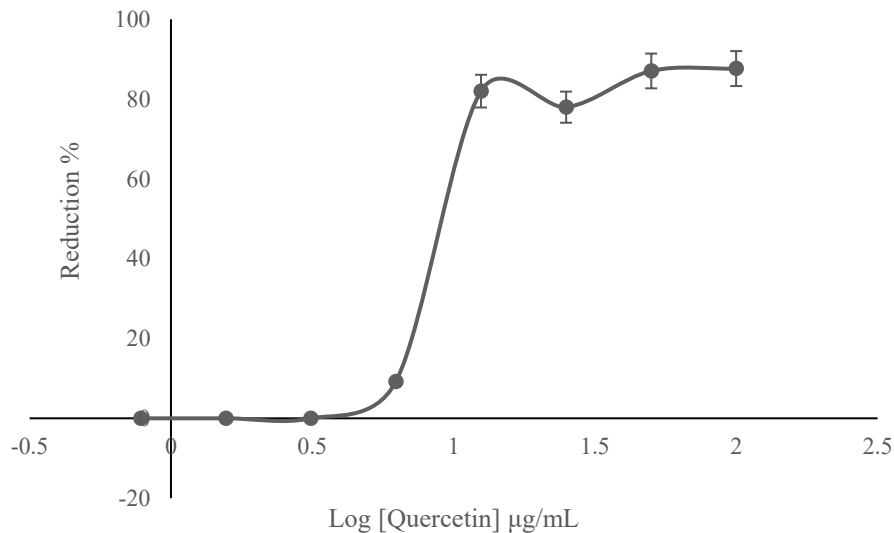
سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین C، آلفا-پنین و کوئرستین، با استفاده از معرف DPPH صورت گرفت. در این سنجش از ویتامین C به عنوان کنترل مثبت استفاده شد، که EC_{50} برابر $3/98$ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($6/22 \mu M$) را نشان داد (تصویر ۷). سپس نتایج به دست آمده برای دو ترکیب دیگر همان طور که در تصویرهای ۸ و ۹ آورده شده است، و کوئرستین ($EC_{50} = 8.91 \mu g/mL = 29.5 \mu M$) در غلظت کمتری (یعنی با قدرت احیاکنندگی بیشتری) نسبت به آلفا-پنین ($EC_{50} = 165.95 \mu g/mL = 1.22 mM$)، سبب احیاء ۵۰ درصد رادیکال‌های DPPH می‌شود.



شکل-۷: نمودار لگاریتمی تغییرات درصد احیای DPPH توسط اسید آسکوربیک ($EC_{50} = 3.98 \mu g/mL = 22.6 \mu M$).



شکل-۸: نمودار لگاریتمی تغییرات درصد احیاء رادیکال DPPH توسط آلفا-پنین ($EC_{50} = 165.95 \mu g/mL = 1.22 mM$).



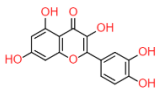
شکل-۹: نمودار لگاریتمی تغییرات درصد احیای DPPH توسط کوئرستین ($\text{EC}_{50}=8.91 \mu\text{g/mL} = 29.5 \mu\text{M}$).

نتایج حاصل از مطالعات داکینگ مولکولی

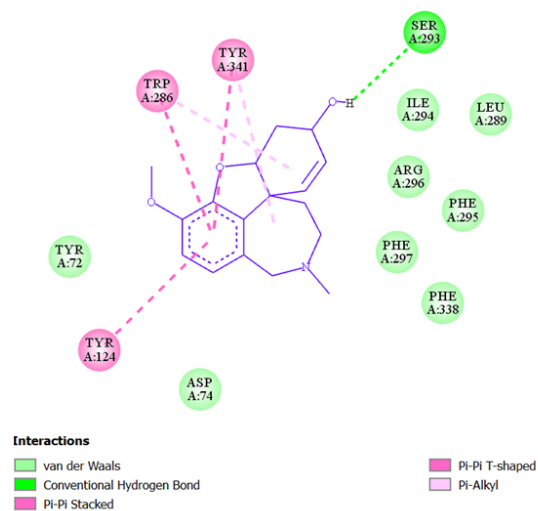
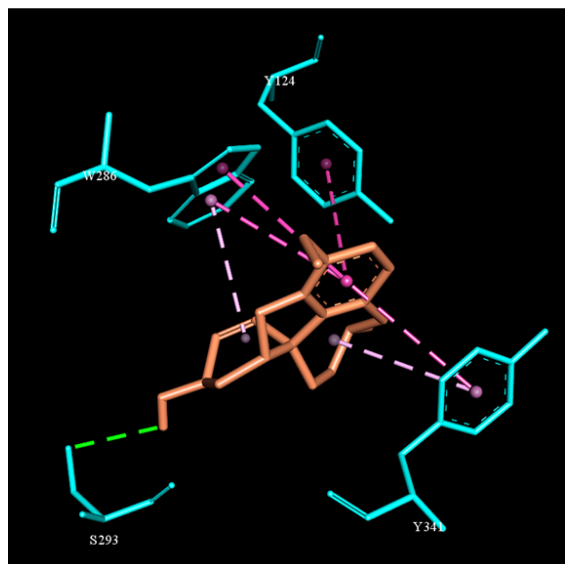
هدف از انجام داکینگ مولکولی در این مطالعه، ارزیابی نحوه‌ی برهمکنش‌ها و انرژی اتصال آلفا-پینن و کوئرستین، با ریشه‌های موجود در جایگاه فعال آنزیم استیل‌کولین استراز بود. همچنین برای مقایسه نتایج حاصل از این دو ترکیب، فرآیند داکینگ هم بر روی داروی استاندارد گالانتامین نیز انجام شد. پس از انجام فرآیند داکینگ، نحوه برهمکنش‌ها توسط نرم افزار BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5 مورد ارزیابی قرار گرفتند. دو معیار در تعیین بهترین حالت داک شده مهم هستند، یکی بیشترین (منفی‌ترین) انرژی اتصال آزاد ($\Delta G_{\text{binding}}$) تخمین زده شده و دومی بیشترین برهمکنش‌های مناسب با آمینواسیدهای اصلی جایگاه فعال است (جدول-۲). گالانتامین، داروی استاندارد به کار رفته به عنوان کنترل مثبت با انرژی اتصال $-8/5$ کیلوکالری بر مول، برهمکنش‌هایی را با آمینو اسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم استیل‌کولین استراز برقرار می‌کند. این ترکیب با سرین (۲۹۳) پیوند هیدروژنی، با تریپتوفان (۲۸۶) و تیروزین (۳۴۱) برهمکنش آگریز از نوع پای-آکیل را ایجاد کرده است. همچنین گالانتامین برهمکنش‌های دیگری از نوع پای-پای با حلقه فنول تیروزین (۱۲۴، ۳۴۱) و حلقه ایندول تریپتوفان (۲۸۶) ایجاد کرده است (تصویر ۱۰-A). آلفا-پینن با انرژی اتصال $-6/5$ کیلوکالری بر مول، تنها از طریق برهمکنش‌های آگریز با تیروزین (۱۲۴، ۳۴۱)، فنیل‌آلانین (۲۹۷، ۳۳۸) و تریپتوفان (۲۸۶)، اثر مهارتی خود را اعمال کرده است (تصویر ۱۰-B). کوئرستین با انرژی اتصال $-9/0$ کیلوکالری بر مول، به سبب دارا بودن بخش‌های هیدروفیل (استخلاف هیدروکسیل) و هیدروفوب (حلقه آروماتیک)، با پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوبی به آمینو اسیدهای جایگاه فعال استیل‌کولین استراز متصل می‌شود. کوئرستین با آسپاراتات (۷۴)، تیروزین (۱۲۴)، تریپتوفان (۲۸۶)، گلوتامین (۲۹۱)، سرین (۲۹۳)، فنیل‌آلانین (۲۹۵) و آرژنین (۲۹۶) پیوند هیدروژنی و با لوسین (۲۸۹) برهمکنشی آگریز از نوع پای-سیگما دارد (تصویر ۱۰-C). همچنین حلقه بنزن A این ترکیب، با فنول تیروزین (۱۲۴، ۳۴۱) و ایندول تریپتوفان (۲۸۶) و نیز حلقه پیرن C آن دوباره با تریپتوفان (۲۸۶)، برهمکنش هیدروفوب از نوع پای-پای ایجاد کرده است. این مطالعات درون رایانه‌ای (*In silico*) نشان داد که دو ترکیب آلفا-پینن و کوئرستین دارای خاصیت مهارکنندگی استیل‌کولین استراز هستند. همچنین نشان داد که کوئرستین

با انرژی اتصال کمتر یعنی میل ترکیبی بیشتر، اثر بازدارندگی بالاتری نسبت به داروی استاندارد یعنی گالانتامین بر روی استیل کولین استراز را دارد.

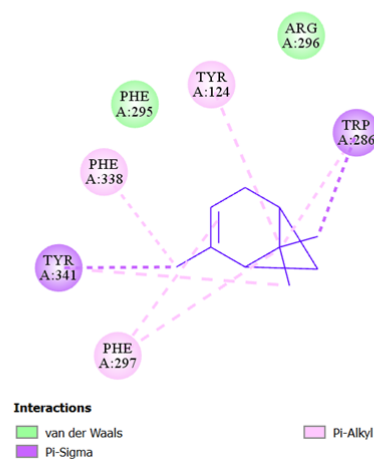
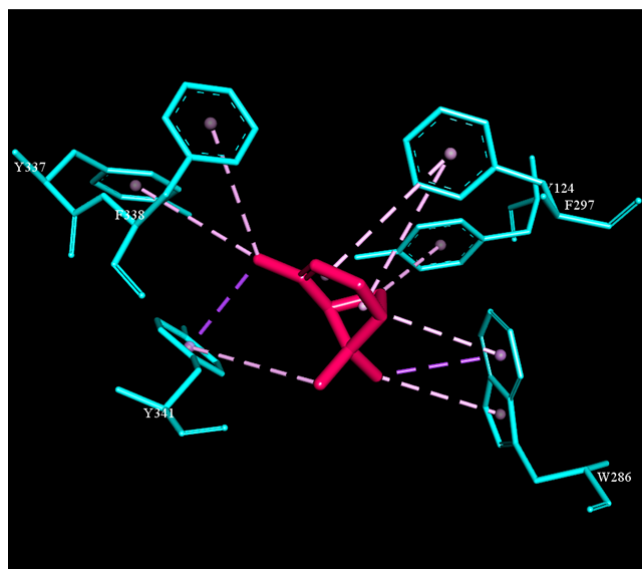
جدول ۲: انرژی اتصال و برهمکنش‌های موجود میان ترکیبات مطالعه شده و آمینو اسیدهای جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز (PDB ID: 1C20).

ساختار	نام ترکیب	انرژی اتصال (kcal/mol)	پیوند هیدروژنی	برهمکنش هیدروفوب	برهمکنش π - π
	گالانتامین	-۸/۵	Ser ₂₉₃	Trp ₂₈₆ , Tyr ₃₄₁	Tyr ₁₂₄ , Trp ₂₈₆ , Tyr ₃₄₁
	بینن	-۶/۵	-	Tyr ₁₂₄ , Trp ₂₈₆ , Phe ₂₉₇ , Tyr ₃₄₁ , Phe ₃₃₈	-
	نورستین	-۹/۰	Asp ₇₄ , Tyr ₁₂₄ , Trp ₂₈₆ , Gln ₂₉₁ , Ser ₂₉₃ , Phe ₂₉₅ , Arg ₂₉₆	Leu ₂₈₉	Tyr ₁₂₄ , Trp ₂₈₆ , Tyr ₃₄₁

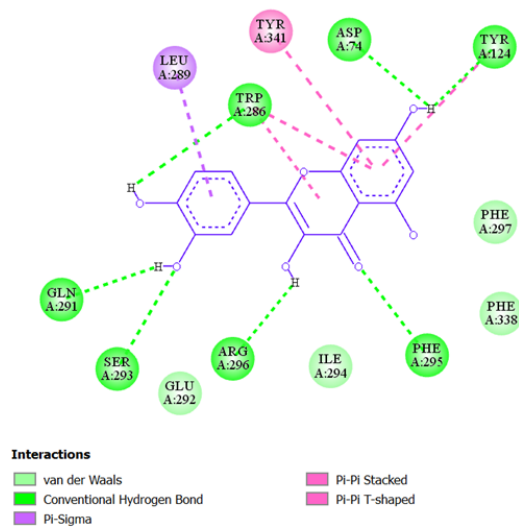
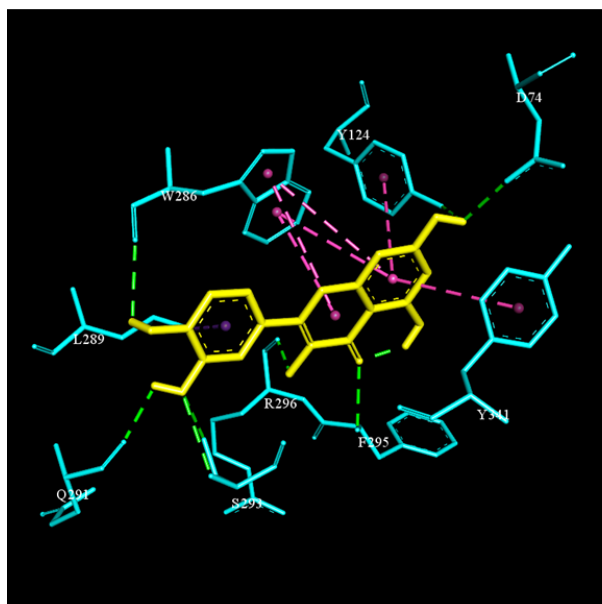
A



B



C



شکل-۱۰: برهمکنش‌های احتمالی گالانتامین (A)، آلفا-پینن (B) و کوئرستین (C) در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز (PDB: 1C20). تصاویر سه بعدی و دو بعدی برگرفته از Discovery Studio. (برای عدم شلوغی تصاویر سه بعدی، از نمایش دادن ریشه‌هایی که با ترکیبات برهمکنش واندروالس برقرار کرده بودند، خودداری شده است).

بحث

براساس نتایج حاصل از این پژوهش بیشترین میزان مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز توسط ترکیب آلفا-پینن، مربوط به غلظت ۸۱۷ میلی گرم بر میلی لیتر (۹۸/۹۴ درصد) از این ماده در حالیکه برای کوئرسیستین بیشترین میزان مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر (۱۰۰ درصد) بود. محاسبات شاخص IC₅₀ مبتنی بر نمودارهای درصد مهار، برای سه ترکیب گالانتامین، آلفا-پینن و کوئرسیستین، به ترتیب نشان دهنده‌ی مقادیر IC₅₀ برابر با ۰/۰۱، ۰/۲۵ و ۱۵/۷۵ میلی مولار بود. بر این اساس دو ترکیب آلفا-پینن و کوئرسیستین، با توجه مقادیر IC₅₀ اختلاف چندانی برای مهار آنزیم استیل کولین استراز ندارند، ولی در مقایسه با گالانتامین در غلظت‌های بیشتری (قدرت مهار کمتر) اثر مهارکنندگی را اعمال می‌کنند. بررسی نتایج سنتیک مهار آنزیمی نشان داد که گالانتامین از الگوی مهار رقابتی پیروی می‌کند. دوریانو لامبا و همکاران نیز در مطالعه‌ای که بر روی مهار آنزیم استیل کولین استراز در حضور گالانتامین انجام دادند، مکانیسم مهار رقابتی را گزارش کردند [۱۹]. مطالعه‌ی دیگری گزارش کرد، گالانتامین با قرار گرفتن در جایگاه فعال، به طور رقابتی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را مهار کرده است [۳۱]. سانتانو بهادرا و همکاران برای گالانتامین مقدار IC₅₀ برابر با ۱۰/۱۴ میکروگرم در میلی لیتر بود [۸]. در مطالعه‌ای دیگر متی فنگ و همکاران مقدار IC₅₀ برابر با ۵/۵۰ میکروگرم در میلی لیتر برای گالانتامین در مهارکنندگی آنزیم استیل کولین گزارش کرده‌اند [۲۴]. نتایج حاصل از این پژوهش در مورد نوع رفتار سنتیکی مهارکنندگی آنزیم استیل کولین در حضور گالانتامین با مطالعات قبلی که نوع مهار رقابتی را مشاهده کرده بودند، همخوانی دارد. ولی در مورد مقادیر IC₅₀ مقادیر متفاوتی گزارش شده است، که مقدار گزارش شده توسط متی فنگ نزدیکتر است. آلفا-پینن و کوئرسیستین هر دو با الگوی مهار مختلط (نارقابتی-غیررقابتی)، سبب مهار آنزیم استیل کولین استراز شدند. میتسوی میازاوا و همکاران نشان دادند که انانتیومرهای (+) و (-) (آلفاپینن مهارکننده‌های نارقابتی قوی استیل کولین استراز گلبول قرمز گاو با IC₅₀ به ترتیب ۰/۴۰ و ۰/۴۴ میلی مولار هستند. علت این برتری را فقدان گروه عاملی اکسیژن دار و پیوند دوگانه درون حلقه‌ای برای مهار آنزیم بیان کردند و احتمال دادند که این دو انانتیومر آلفا-پینن به عنوان آنتاگونیست‌های بالقوه استیل کولین استراز، دارای پتانسیل خوبی برای درمان بیماری آلزایمر می‌باشند [۲۵]. تایان کوئلیو دوس سانتوس و همکاران بیان کردند که ترکیبات طبیعی غیر آلکالوئیدی مانند فلاونوئیدها، ترپن‌ها و ترکیبات فنلی، به صورت غیر-رقابتی فعالیت استیل کولین استراز را مهار می‌کنند [۳۰]. اسانس برگرفته از برگ درخت صنوبر الجزایری که حاوی ۱۰ درصد آلفا-پینن بوده، مقادیر IC₅₀ برابر ۱۵۳/۹۲، ۳۴/۳۹ و ۵۹/۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر را به ترتیب برای آنزیم‌های استیل کولین استراز، آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز نشان داده است [۷].

مطابق نتایج این پژوهش، آلفا-پینن و کوئرسیستین هر دو با الگوی مهار مختلط (نارقابتی-غیررقابتی)، سبب مهار استیل کولین استراز می‌شوند. آلوارز و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که کوئرسیستین با اتصال به بخش PAS آنزیم استیل کولین استراز سبب مهار غیررقابتی آن می‌شود و بیان کردند که این مهار باعث کاهش تجمع بتا-آمیلوئیدها در حضور استیل کولین استراز شده است [۴]. یی جینگ لیائو و همکاران نشان دادند که کوئرسیستین فعالیت استیل کولین استراز را به صورت مختلط مهار می‌کند و با استفاده از مطالعات داکینگ مولکولی نیز به هم‌افزایی بودن اثر مهاري کوئرسیستین و گالانتامین بر روی استیل کولین استراز اشاره کرده‌اند [۲۱]. اینشاچات و همکاران در تحقیقی مقادیر IC₅₀

معادل به ترتیب $1/30$ و $224/30$ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای دو مهارکننده دونپزیل (کنترل مثبت) و کوئرستین بر روی آنزیم استیل کولین استراز گزارش کردند [۱۶]. فاطمه حسین عبدالله و همکاران نشان دادند، افزایش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز ناشی از تاثیرات کادمیوم در موش‌های صحرایی، با درمان توسط کوئرستین به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [۱]. با توجه به نتایج گزارش شده در سایر مطالعات و نتایج مطالعه حاضر، اکثراً نوع مهار نارقابته، غیررقابته و مختلط برای دو ترکیب آلفا-پینن و کوئرستین گزارش شده است، که در این مطالعه براساس نمودار لینویور-برک مهار مرکب (نارقابته- غیررقابته) به دست آمد.

در بررسی توان آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مورد مطالعه، نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که کوئرستین با مقدار EC_{50} برابر با $8/91$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آلفا-پینن با مقدار EC_{50} برابر با $165/95$ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در مقایسه با ویتامین ث با مقدار EC_{50} برابر با $3/98$ میکرو-گرم بر میلی-لیتر دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فراوان و قدرت احیاء DPPH قابل توجهی هستند. لی و همکارانش به روشهای DPPH و ABTS مقادیر EC_{50} به ترتیب $4/57$ و $7/58$ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کوئرستین گزارش شده بوده است [۲۰]. مطابق نتایج این مطالعه آلفا-پینن، هر چند به نسبت کمتر از کوئرستین، در غلظت‌های بالا دارای خصلت آنتی-اکسیدانی است. آیدین و همکاران در جریان مطالعه‌ای، خواص آنتی‌اکسیدانی آلفا-پینن بر روی سلول‌های عصبی اولیه کشت شده موش صحرایی و سلول‌های N2a نوروبلاستوما را بررسی نموده و نشان دادند که، در غلظت‌های خاصی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در سلول‌های عصبی اولیه می‌گردد [۵]. حفصیه بوزنا و همکاران نشان دادند، آلفا-پینن می‌تواند برای دفاع در برابر استرس اکسیداتیو حاصل از آسپرین در سلول‌های اپیتلیال روده کوچک (IEC-6) موش صحرایی کارآمد باشد، و نیز با ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی آلفا-پینن به روش‌های DPPH و FRAP، به ترتیب مقادیر EC_{50} برابر با $310 \mu g/mL$ و $238 \mu g/mL$ را گزارش کردند [۹].

هدف اصلی در انجام مطالعات داکینگ مولکولی یافتن حداقل انرژی اتصال و پایدارترین حالت مجموعه لیگاند-آنزیم برای ترکیبات مورد مطالعه در این پژوهش بود. نتایج به دست آمده میزان انرژی اتصال را برای گالانتامین که به عنوان داروی استاندارد در مهار AChE است، $8/5$ - کیلوکالری بر مول و برای دو ترکیب دیگر یعنی آلفا-پینن و کوئرستین به ترتیب مقادیر $6/5$ - و $9/0$ - کیلوکالری بر مول را نشان داد. منفی بودن انرژی اتصال این دو ترکیب آلفا-پینن و کوئرستین نمایان‌گر همسو بودن مطالعات شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) و مطالعات درون رایانه‌ای (*In silico*) بود. همچنین با توجه به نتایج مطالعات درون رایانه‌ای می‌توان دریافت که میل ترکیبی بین آنزیم و کوئرستین بیشتر از دو ترکیب گالانتامین و آلفا-پینن است. کوئرستین دارای هشت پیوند هیدروژنی با هفت ریشه آسپاراتات (۷۴)، تیروزین (۱۲۴)، تریپتوفان (۲۸۶)، گلوتامین (۲۹۱)، سرین (۲۹۳)، فنیل-آلانین (۲۹۵) و آرژنین (۲۹۶) می‌باشد، که به ترتیب طول هر پیوند بر حسب آنگستروم $2/59$ ، $3/03$ ، $2/86$ ، $2/47$ ، $3/07$ و $3/04$ (با سرین دو پیوند هیدروژنی دارد)، $2/80$ و $2/28$ است. که این پیوندهای هیدروژنی به احتمال قوی بر شبکه پیوند هیدروژنی تاثیر بگذارند و ساختار پایدار جایگاه فعال و حتی ریشه‌های اطراف آن را از بین ببرند و نهایتاً فعالیت کاتالیزوی آنزیم را کاهش دهند. از طرفی ساختارهای حلقوی کوئرستین دارای انباشتگی پایایی- پایایی با تیروزین (۱۲۴)، 341 و تریپتوفان (۲۸۶) سبب فشرده شدن جایگاه فعال و القای مهار هدایت آروماتیکی سطح داخلی از PAS تا CAS می‌شود، که این عمل موجب سرکوب فعالیت آنزیم می‌شود.

باقیمانده‌های گلوتامات (۲۹۲)، ایزولوسین (۲۹۴) و فنیل-آلانیل (۲۹۷، ۳۳۸) نیز کوئرستین را با نیروهای واندروالس احاطه کرده‌اند. آدتوی و همکتران در جریان مطالعه‌ای مقادیر انرژی اتصالی بهترین حالت ریواسیتیگمین (یکی از داروهای استاندارد مهار استیل کولین استراز)، و کوئرستین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز با کد دسترسی EY5۴، به ترتیب ۶/۹- و ۹/۷- کیلوکالری بر مول را گزارش کرده است [۲]. در مطالعه‌ای دیگری که توسط لکمن و همکاران بر روی آنزیم استیل کولین استراز با کد دسترسی EY6۴ انجام شده، مقدار انرژی اتصالی ۹/۸- کیلوکالری بر مول را برای دو ترکیب گالانتامین و کوئرستین گزارش و بیان کردند که کوئرستین در بهترین حالت خود در جایگاه فعال آنزیم با ریشه‌های تیروزین (۷۲، ۱۲۴، ۳۴۱) و والین (۲۹۴) به صورت پیوند هیدروژنی و با ریشه‌های تیروزین (۳۴۱) و تریپتوفان (۲۸۶) به صورت برهمکنش آبگریز، اتصال برقرار کرده است [۲۱]. نتایج داکینگ مولکولی این مطالعه برای آلفا-پپنین نشان داد که فقط از طریق برهمکنش آبگریز پای-سیگما و پای-آلکیل به ریشه‌های تیروزین، تریپتوفان و فنیل-آلانیل جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز اتصال می‌یابد. این نوع برهمکنش به احتمال زیاد به دلیل ویژگی و خصلت آبگریز بودن آلفا-پپنین می‌باشد. مطالعه‌ای مقادیر انرژی اتصالی بهترین حالت دونپزیل (یکی از داروهای استاندارد مهار آنزیم استیل کولین استراز) و آلفا-پپنین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز با کد دسترسی EVE۱، به ترتیب ۹/۳۱- و ۵/۲۵- کیلوکالری بر مول را گزارش کرده است [۱۸]. متن بحث را اینجا وارد کنید.

نتیجه گیری

در خاتمه باید گفت که بر اساس نتایج این پژوهش، کوئرستین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد، که آلفا-پپنین این خاصیت را نشان نداد. از نظر فعالیت مهار آنزیم با توجه به مقادیر IC₅₀ به دست آمده، هر دو ترکیب آلفا-پپنین و کوئرستین در غلظت‌های بالا اثر مهارکنندگی را اعمال می‌کنند و هر دو ترکیب از الگوی سنتیکی مهار مرکب (نارقاتبی- غیررقاتبی) پیروی می‌کنند. نتایج مطالعات درون آزمایشگاهی (In vitro) و درون رایانه‌ای (In silico)، در خصوص اثر مهارکنندگی آلفا-پپنین و کوئرستین را بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز همسو بودند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان از شرکت سقزسازی کردستان (وَن) به دلیل اهدای نمونه کاری آلفا-پپنین تولیدی آن شرکت، صمیمانه تشکر می‌نمایند.

فهرست منابع

1. Abdalla, F. H., Cardoso, A. M., Pereira, L. B., Schmatz, R., Gonçalves, J. F., Stefanello, N., ... & Mazzanti, C. M. (2013). Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 381, 1-8.
2. Adetuyi, A. R., Ayenero, M. E., Olaleye, M. T., Akindahunsi, A. A., & Akinmoladun, A. C. (2024). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities, in silico analyses, and anti-Alzheimer's disease potential of leaf extracts of three Nigerian endemic medicinal plants (Spondias mombin, Carica pa paya and Kalanchoe crenata). *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 6.

3. Allenspach, M., & Steuer, C. (2021). α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*, 190, 112857.
4. Álvarez-Berbel, I., Espargaró, A., Viayna, A., Caballero, A. B., Busquets, M. A., Gámez, P., ... & Sabaté, R. (2022). Three to Tango: Inhibitory effect of quercetin and apigenin on acetylcholinesterase, amyloid- β aggregation and acetylcholinesterase-amyloid interaction. *Pharmaceutics*, 14(11), 2342.
5. Aydin, E., Türkez, H., & Geyikoğlu, F. (2013). Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α -pinene on N2a neuroblastoma cells. *Biologia*, 68, 1004-1009.
6. Azeem, M., Hanif, M., Mahmood, K., Ameer, N., Chughtai, F. R. S., & Abid, U. (2023). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: A review. *Polymer Bulletin*, 80(1), 241-262.
7. Benouchenne, D., Bellil, I., Bensouici, C., AbdullahYilmaz, M., Akkal, S., Kesinkaya, H. B., & Khelifi, D. (2022). GC-MS Chemical Profile, Antioxidant Ability, Antibacterial Effect, A-Glucosidase, A-Amylase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Algerian Fir Essential Oil. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(2).
8. Bhadra, S., Mukherjee, P. K., Kumar, N. S., & Bandyopadhyay, A. (2011). Anticholinesterase activity of standardized extract of *Illicium verum* Hook. f. fruits. *Fitoterapia*, 82(3), 342-346.
9. Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Giroux-Metges, M. A., Elfeki, A., & Talarmin, H. (2017). Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 93, 961-968.
10. dos Santos, P., Leide, C., Ozela, P. F., de Fatima de Brito Brito, M., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., ... & Izabel, L. (2018). Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Current medicinal chemistry*, 25(26), 3141-3159.
11. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of chemical information and modeling*, 61(8), 3891-3898.
12. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
13. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.
14. Gasteiger, J., & Marsili, M. (1978). A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron letters*, 19(34), 3181-3184.
15. Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8), 2248.
16. Inthachai, W., Chantong, B., Pitchakarn, P., Takoon, C., Karinchai, J., Suttisansanee, U., & Temviriyankul, P. (2024). Enhancing Therapeutic Efficacy of Donepezil, an Alzheimer's Disease Drug, by *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. and Its Phytochemicals. *Pharmaceutics*, 17(3), 341.
17. Jadhav, R., & Kulkarni, Y. A. (2023). Neuroprotective effect of Quercetin and Memantine against AlCl₃-Induced neurotoxicity in albino Wistar rats. *Molecules*, 28(1), 417.

18. Karakaya, S., Bingol, Z., Koca, M., Demirci, B., Gulcin, I., & Baser, K. H. C. (2020). Screening of non-alkaloid acetylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors of *Leiotulus dasyanthus* (K. Koch) Pimenov & Ostr. (Apiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 227-241.
19. Lamba, D., & Pesaresi, A. (2022). Kinetic modeling of time-dependent enzyme inhibition by pre-steady-state analysis of progress curves: the case study of the anti-Alzheimer's drug galantamine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5072.
20. Le, T. H., Nguyen, T. H. C., Tran, T. V. T., Le, L. S., Ho, X. A. V., Tran, T. M., ... & Le, Q. V. (2023). Quercetin-incorporated collagen/chitosan/SiO₂ composite toward the robust antioxidant biomaterials. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-8.
21. Lekmine, S., Benslama, O., Tahraoui, H., Ola, M. S., Laouani, A., Kadi, K., ... & Ali, A. (2024). Anti-Cholinergic Effects of the Phenolic Extract from the *Astragalus crenatus* Plant: A Computational and Network Pharmacology Study. *Pharmaceuticals*, 17(3), 348.
22. Liao, Y., Mai, X., Wu, X., Hu, X., Luo, X., & Zhang, G. (2022). Exploring the inhibition of quercetin on acetylcholinesterase by multispectroscopic and in silico approaches and evaluation of its neuroprotective effects on PC12 cells. *Molecules*, 27(22), 7971.
23. Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1), 11-24.
24. Metiefeng, N. T., Tamfu, A. N., Fotsing Tagatsing, M., Tabopda, T. K., Kucukaydin, S., Noah Mbane, M., ... & Dinica, R. M. (2023). In Vitro and In Silico Evaluation of Anticholinesterase and Antidiabetic Effects of Furanolabdanes and Other Constituents from *Graptophyllum pictum* (Linn.) Griffith. *Molecules*, 28(12), 4802.
25. Miyazawa, M., & Yamafuji, C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1765-1768.
26. Özçelik, B., Lee, J. H., & Min, D. B. (2003). Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2).
27. Rajčević, N., Bukvički, D., Dodoš, T., & Marin, P. D. (2022). Interactions between natural products—A review. *Metabolites*, 12(12), 1256.
28. Salehi, B., Upadhyay, S., Erdogan Orhan, I., Kumar Jugran, A., LD Jayaweera, S., A. Dias, D., ... & Sharifi-Rad, J. (2019). Therapeutic potential of α -and β -pinene: A miracle gift of nature. *Biomolecules*, 9(11), 738.
29. Sanner, M. F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 17(1), 57-61.
30. Santos, T. C. D., Gomes, T. M., Pinto, B. A. S., Camara, A. L., & Paes, A. M. D. A. (2018). Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 387238.
31. Shi, W., Han, W., Liao, Y., Wen, J., & Zhang, G. (2024). Inhibition mechanism of fisetin on acetylcholinesterase and its synergistic effect with galantamine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 305, 123452.
32. Taqui, R., Debnath, M., Ahmed, S., & Ghosh, A. (2022). Advances on plant extracts and phytocompounds with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease. *Phytomedicine plus*, 2(1), 100184.

33. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
34. Yang, D., Wang, T., Long, M., & Li, P. (2020). Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), 8825387.

Comparison of the effect of alpha-pinene and quercetin on the activity of acetylcholinesterase

Mohammad Ali Zarei *, Moein Moradi

Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, IRAN.

*Corresponding author: mazarei@uok.ac.ir

Abstract

Decreased synthesis or increased hydrolysis of acetylcholine in the cholinergic system is one of the causes of Alzheimer's disease. Acetylcholinesterase enzyme inhibition is a therapeutic strategy. Several natural plant compounds with biological properties such as neuroprotective, antioxidant, antianxiety and antimicrobial effects have been investigated in recent years, which alpha-pinene and quercetin, respectively, from the subgroup of monoterpenoids and flavonols, are among them. Ellman's method was used for the determination of inhibition percentage, IC₅₀ value, and the kinetic type of acetylcholinesterase inhibition. The antioxidant activity of alpha-pinene and quercetin was evaluated, and the results were reported based on the EC₅₀ index. Finally, molecular docking studies were performed to evaluate the above results. Examining the percentage of enzyme inhibition for galantamine, alpha-pinene, and quercetin showed IC₅₀ values of 0.001, 0.25, and 15.75 mM, respectively. Kinetics of enzyme inhibition by these compounds showed a mixed inhibition pattern (uncompetitive-noncompetitive) for both alpha-pinene and quercetin. Using ascorbate as a positive control (EC₅₀ = 22.6 μM), the antioxidant capacities of alpha-pinene and quercetin were (EC₅₀ = 1.22 mM) and (EC₅₀ = 29.5 μM), respectively. Finally, molecular docking studies revealed the binding energies for the optimal states of alpha-pinene and quercetin to be -5.6 and -0.9 kcal/mol, respectively. The results obtained from this study show that both alpha-pinene and quercetin have inhibitory properties of the acetylcholinesterase enzyme, but the antioxidant power of quercetin is higher than alpha-pinene. The results of the molecular docking studies were consistent with the experimental results.

Key Words: Acetylcholinesterase, Alpha-Pinene, Quercetin, Enzyme inhibition