

## بررسی میانکنش ترکیبات فلاونوئیدی بره‌موم با آنزیم استیل‌کولین‌استراز انسانی با استفاده از روش داکینگ مولکولی

صفا لطفی<sup>۱\*</sup>، الهام رضوان نژاد<sup>۱</sup> و حسین لنجانیان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی.

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشگاه علوم غدد درون ریز، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی غدد درون ریز.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

### چکیده

استفاده از مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین‌استراز (آنتی‌کولین‌استرازاها) بمنظور بهبود علائم بیماری آلزایمر و سایر فرم‌های زوال عقل و اختلالات سیستم عصبی مرکزی بسیار رایج است. بره‌موم (پروپولیس) یک ماده رزینی چسبیده است که توسط زنبور عسل تولید می‌شود و فعالیتهای زیستی متعددی نظیر ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروبی و ضدقارچی را از خود نشان می‌دهد. اخیراً مقالاتی مبنی بر فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی بره‌موم نیز منتشر شده است. در این مطالعه، میانکنش ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی بره‌موم با آنزیم استیل‌کولین‌استراز انسانی (hAChE) با روش داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعات با نرم‌افزار اتوداک‌وینا انجام گرفت و گرید باکس به گونه‌ای طراحی شد که بر روی شکاف جایگاه فعال آنزیم قرار گیرد. نتایج بدست آمده نشانگر آن بود که تمامی این ترکیبات با انرژی اتصال مناسبی (۷- تا ۸/۹- کیلوکالری بر مول) به این شکاف متصل می‌شوند. بیشترین و کمترین انرژی اتصال بترتیب مربوط به راتین و فیستین می‌باشد. بررسی آمینواسیدهای درگیر در میانکنش نشان داد که همه این ترکیبات با جایگاه آنیونی محیطی (PAS) و پاکت آسیل میانکنش می‌نمایند. دو ترکیب کافئیک‌اسید فن‌اتیل‌استر (CAPE) و مایرستین با جایگاه آنیونی کاتالیتیک (CAS) و حفره اکسی‌آنیون نیز میانکنش می‌نمایند. مایرستین تنها ترکیبی است که توانایی اتصال به دو اسیدآمینو تریاد کاتالیتیک را نیز دارا می‌باشد. نتایج بدست آمده از این مطالعه پیشنهاد می‌نماید که همه این ترکیبات فلاونوئیدی از طریق اتصال به شکاف جایگاه فعال hAChE می‌توانند این آنزیم را مهار نمایند و بنابراین گزینه‌های مناسبی بمنظور انجام مطالعات بیشتر در راستای طراحی داروهای جدید آنتی‌کولین‌استراز محسوب می‌شوند.

**کلمات کلیدی:** مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین‌استراز (آنتی‌کولین‌استرازاها)، بیماری آلزایمر، بره‌موم (پروپولیس)، فلاونوئید، داکینگ مولکولی.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۱، پست الکترونیکی: s.lotfi@kgut.ac.ir

### مقدمه

بیماری آلزایمر، یک اختلال تحلیل برنده عصبی پیشرونده است که در نهایت به مرگ منجر می‌شود. این بیماری شایع‌ترین دلیل بروز زوال عقل در افراد بالای ۶۵ سال است (۱۲). بر اساس فرضیه کولینرژیک پاتوژنز بیماری آلزایمر، ویژگیهای بالینی زوال عقل مشاهده شده در این بیماری به کاهش سطح استیل‌کولین، یک انتقال‌دهنده

عصبی درگیر در حافظه و یادگیری، در هیپوکامپ و قشر مغز نسبت داده می‌شود (۱۴، ۲۷). تا به امروز هیچ نوع درمان قطعی برای این بیماری شناخته نشده است. اما تجویز مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین-استراز (آنتی‌کولین‌استرازاها) برای بهبود نسبی علائم انواع

چسبنده است که به وسیله زنبور عسل (*Apis mellifera*) با مخلوط کردن موم و بزاق حاوی آنزیم‌های خاص با مواد مترشحه از گیاهان که اساساً از برگ‌ها، جوانه‌های گل، ساقه‌ها و شکاف‌های تنه گونه‌های متعددی از درختان جمع‌آوری شده است تولید می‌شود (۱، ۳۵، ۴۹). زنبورها از بره موم بعنوان یک ماده درزگیر و ضدعفونی‌کننده استفاده می‌کنند. این ماده بمنظور مسدود کردن حفره‌ها و شکاف‌های کندوها و هموار کردن سطح داخلی و حفظ دمای درونی آنها و همچنین جلوگیری از هجوم موجودات مزاحم مورد استفاده قرار می‌گیرد. بره موم دارای عطر بسیار مطبوعی است و به واسطه دارا بودن فعالیت ضد میکروبی باعث ضدعفونی شدن محیط داخلی کندو نیز می‌شود (۳، ۴۱). همچنین این ماده بمنظور پوشاندن (مومیایی کردن) بدن مرده جانوران بزرگ مهاجم که انتقال آن‌ها به بیرون از کندو سخت است استفاده می‌شود (۹).

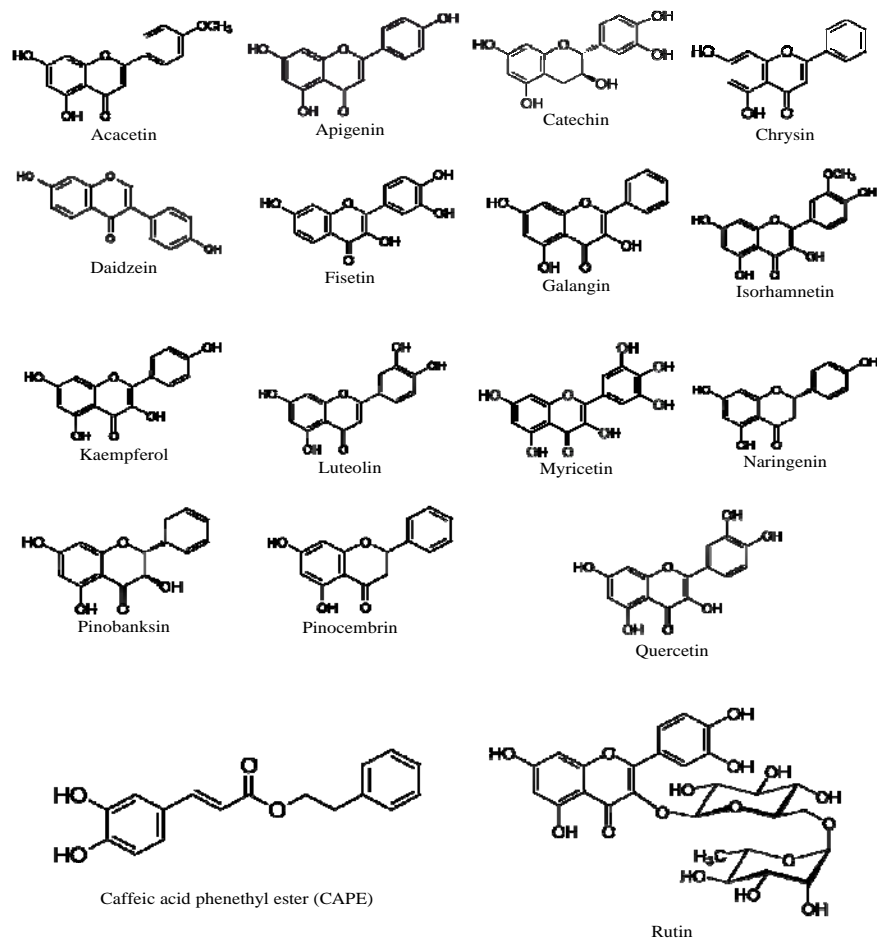
ترکیب دقیق مواد تشکیل‌دهنده، عطر و رنگ بره موم خام (سبز، قرمز، قهوه‌ای و زرد) به فاکتورهای متعددی نظیر منبع گیاهی، سن آماده‌سازی عسل، مناطق جغرافیایی و فصل جمع‌آوری بستگی دارد (۵۲). بره موم اساساً از رزین (۵۰ درصد)، موم (۳۰ درصد)، روغن‌های ضروری (۱۰ درصد)، گرده (۵ درصد) و ترکیبات آلی دیگر (۵ درصد) تشکیل شده است (۲۳). ترکیبات فنولی، استرها، فلاونوئیدها، تری‌ن‌ها، بتا استروئیدها، آلدئیدهای معطر و الکل‌ها ترکیبات آلی مهم موجود در بره‌موم محسوب می‌شوند (۲۸). بره موم همچنین حاوی ویتامین‌های مهم نظیر ویتامین B1، B2، B6، C و E، مواد معدنی مفید منیزیم، کلسیم، پتاسیم، سدیم، مس، روی، منگنز و آهن می‌باشد. تعداد معدودی آنزیم شامل سوکسینیک دهیدروژناز، گلوکوز ۶-فسفاتاز، آدنوزین تری فسفاتاز و اسید فسفاتاز نیز در بره موم یافت می‌شوند (۳۱). بر اساس داده‌های علمی منتشر شده، بره موم می‌تواند طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی نظیر ضد سرطان، ضد فشار خون، محافظت از کبد، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروبی،

خفیف تا نسبتاً شدید آلزایمر بسیار رایج است. از این مهارکننده‌ها همچنین برای مدیریت سایر فرم‌های زوال عقل و اختلالات سیستم عصبی مرکزی نظیر بیماری پارکینسون، زوال عقل مرتبط با اجسام لویی، اختلال خفیف شناختی، سندرم داون، بیماری کورساکوف و زوال عقل عروقی استفاده می‌شود (۱۳، ۲۶، ۳۷). امروزه محققان در سراسر جهان به دنبال طراحی، سنتز و ارزیابی داروهای جدید برای درمان آلزایمر هستند که علاوه بر اثربخشی بالاتر، کمترین عوارض جانبی را از خود نشان دهند. همچنین در حال حاضر، مطالعه منابع طبیعی بمنظور یافتن داروهای جدید برای این بیماری مورد توجه فراوان قرار دارد (۱۸، ۱۹).

مطالعات انجام شده بر روی ساختار آنزیم استیل کولین استراز (AChE) نشان می‌دهد که جایگاه فعال این آنزیم متشکل از چندین بخش مختلف و به صورت یک شکاف (Gorge) عمیق و باریک در سطح پروتئین می‌باشد. جایگاه استراتیک که متشکل از سه اسیدآمینه سرین، گلوتامات و هیستیدین (تریاد کاتالیتیک) است در عمق این شکاف واقع شده است. همچنین جایگاهی با عنوان حفره اکسی‌آنیون نیز در عمق شکاف وجود دارد که نقش مهمی را در فرایند کاتالیز ایفا می‌نماید. جایگاه آنیونی کاتالیتیک (Catalytic Anionic Site: CAS) و پاکت آسیل که در نزدیکی عمق شکاف واقع شده اند بترتیب در اتصال به بخش کولین و استیل سوستر (استیل کولین) نقش دارند (۲۰، ۵۵). نزدیک ورودی شکاف، یک جایگاه آلوستریک متشکل از چندین آمینواسید آروماتیک حفظ شده وجود دارد که جایگاه آنیونی محیطی (PAS: Peripheral Anionic Site) نامیده می‌شود. این جایگاه علاوه بر تنظیم آلوستریک فعالیت کاتالیتیکی آنزیم، در چندین عملکرد دیگر نیز نقش دارد (۴، ۳۰).

بره موم (پروپولیس) که عموماً بعنوان چسب زنبور نیز شناخته می‌شود یک ماده طبیعی رزینی و به شدت

این کار تحقیقاتی میانکنش ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی یافت شده در نمونه‌های بره موم (۳۵، ۴۱، ۵۰) با آنزیم استیل-کولین‌استراز انسانی (hAChE) با استفاده از روش داکینگ مولکولی مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان توانایی فلاونوئیدهای موجود در بره موم در مهار hAChE می‌باشد. اسامی و ساختار فلاونوئیدهای بررسی شده در این مقاله، در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱- ساختار ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی بره موم زنبور عسل که در این پژوهش، میانکنش آنها با آنزیم استیل‌کولین‌استراز انسانی مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش داکینگ مولکولی گیرنده-لیگاند و از نرم افزار اتوداک وینا (AutoDock Vina 1.1.2) استفاده شد (۴۸). گیرنده در واقع همان آنزیم استیل‌کولین‌استراز انسانی (hAChE) است و ترکیبات فلاونوئیدی، لیگاند محسوب

ضد قارچی و ضد انگلی را از خود نشان دهد (۳۵، ۴۱، ۴۲، ۴۹). اخیراً مقالاتی مبنی بر فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی عصاره‌های بره موم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف نیز به چاپ رسیده است (۷، ۵۲).

همانطور که در مباحث بالا اشاره شد فلاونوئیدها از جمله ترکیبات آلی مهم موجود در بره موم محسوب می‌شوند. انواع متنوعی از فلاونوئیدها در نمونه‌های بره موم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف دنیا شناسایی شده است. در

## مواد و روشها

تهیه فایل‌های PDBQT گیرنده و لیگاندها: بمنظور بررسی نحوه میانکنش ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی بره موم، از

شده AutoDock 4 که توسط همین موسسه معرفی شده است در اتوداک وینا، دقت پیش بینی نحوه اتصال لیگاند و همچنین سرعت اجرای داکینگ به میزان قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. این افزایش سرعت با استفاده از مالتی تردینگ (multithreading) بر روی سیستم‌های حاوی چندین پردازنده (CPU) محقق شده است (۴۸).

در این مرحله، فایل‌های کانفیگ (Config) مورد نیاز برای اجرای داکینگ نیز تهیه شد. بدین منظور با استفاده از نرم-افزار AutoDock Tools، اندازه و محل قرارگیری گرید-باکس مشخص گردید. ابعاد و مراکز X، Y و Z گریدباکس به گونه ای در نظر گرفته شد که کلیه بخش های شکاف جایگاه فعال آنزیم را که متشکل از تریاد کاتالیتیک، حفره اکسی آنیون، جایگاه آنیونی کاتالیتیک (CAS)، پاکت آسپیل، و جایگاه آنیونی محیطی (PAS) می باشد پوشش دهد. سپس اطلاعات مورد نیاز در فایل کانفیگ ثبت و ذخیره شد و برای هر لیگاند، فایل کانفیگ اختصاصی تهیه گردید. بمنظور اجرای داکینگ، به هر لیگاند یک پوشه اختصاص داده شد که حاوی فایل های PDBQT گیرنده و لیگاند و فایل کانفیگ مربوطه بود. در نهایت با استفاده از بخش Command prompt و اطلاعات این پوشه ها، عملیات داکینگ برای هر ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی با نرم‌افزار اتوداک وینا انجام شد.

**آنالیز نتایج بدست آمده از داکینگ مولکولی:** نتایج کلی بدست آمده از داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار AutoDock Tools مورد بررسی قرار گرفت. بمنظور بررسی دقیق‌تر نتایج، برای هر ترکیب فلاونوئیدی، کمپلکس لیگاند-گیرنده مربوط به کنفورماسیون با بالاترین انرژی اتصال تهیه و با استفاده از دو نرم افزار LigPlot و PyMol مورد بررسی قرار گرفت و اسیدآمینه های درگیر در فرایند اتصال مشخص گردید.

می شوند. بمنظور اجرای داکینگ مولکولی با نرم افزار اتوداک وینا ابتدا باید فایل PDBQT گیرنده و لیگاند تهیه شود. فایل PDB آنزیم (PDB ID: 4M0E) از سایت RCSB (<https://www.rcsb.org/>) دانلود شد. سپس با نرم افزار PyMol، مولکول های لیگاند و آب از پروتئین جدا گردید و زنجیره A و B پروتئین به صورت جداگانه به صورت فایل PDB ذخیره شدند. با توجه به اینکه تعداد آمینواسیدهای تعیین ساختار نشده زنجیره B نسبت به زنجیره A کمتر بود از زنجیره B در مراحل بعدی استفاده شد. زنجیره B، فاقد دو اسیدآمینه آرژینین ۴۹۳ و آسپاراتات ۴۹۴ بود. این دو اسیدآمینه که در جایگاه فعال آنزیم حضور نداشتند با نرم افزار Modeller و استفاده از زنجیره B بعنوان الگو به ساختار پروتئین اضافه شدند. در نهایت این زنجیره با نرم‌افزار GROMACS 5.2 (۸) و فورس فیلد OPLS-AA، انرژی مینیمایز و بعنوان گیرنده برای مراحل بعدی استفاده شد. بمنظور تهیه فایل‌های PDB مولکول‌های لیگاند، ابتدا فایل SDF هر ۱۷ ترکیب از سایت Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) دانلود گردید. سپس با استفاده از نرم افزار Mercury 1.4.2 فایل‌های SDF این ترکیبات به فایل‌های PDB تبدیل شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار ChemBio3D Ultra 14.0، فایل های PDB لیگاندها، انرژی مینیمایز و ذخیره شد. در مرحله آخر، با نرم افزار AutoDock Tools 1.5.6 و با استفاده از فایل های PDB آنزیم و مولکول های لیگاند بعنوان ورودی، فایل های PDBQT مورد نیاز برای اجرای داکینگ مولکولی تهیه و ذخیره گردید.

**اجرای داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار اتوداک وینا:** همانطور که قبلا اشاره شد بمنظور اجرای داکینگ مولکولی، از نرم‌افزار اتوداک وینا استفاده گردید. وینا توسط موسسه تحقیقاتی اسکریپس (Scripps Research Institute) طراحی و ارائه شده است. این نرم‌افزار، از یک روش بهینه سازی گرادیان پیچیده در فرایند بهینه سازی موضعی استفاده می‌نماید. در مقایسه با نرم افزار شناخته

## نتایج و بحث

داکینگ مولکولی یک روش بیوانفورماتیکی است که امروزه به میزان زیادی از آن در روش‌های منطقی طراحی دارویی مبتنی بر ساختار استفاده می‌شود. برنامه‌های داکینگ، چگونگی میانکنش یک ماکرومولکول زیستی (گیرنده، آنزیم و یا اسیدنوکلئیک) را با لیگاندهای کوچک نظیر سوبستراها، مهارکننده‌ها و یا کاندیداهای دارویی دیگر شبیه‌سازی می‌نمایند (۲، ۴۳، ۴۵).

بره موم (پروپولیس)، یک ماده طبیعی رزینی است که توسط زنبور عسل تولید می‌شود و خواص زیستی متعددی

شامل آنتی‌اکسیدان، آنتی‌کولین‌استراز، ضد میکروبی، ضدقارچی و ضد سرطان به آن نسبت داده می‌شود (۱، ۳۵، ۴۱، ۵۲). در این کار تحقیقاتی، میانکنش ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی موجود در بره موم با جایگاه فعال hAChE با استفاده از داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که تمامی این ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی، توانایی میانکنش با این آنزیم را دارند و بهترین انرژی اتصال آنها بین -۸/۹ تا -۷ کیلوکالری بر مول متغیر است. بالاترین و کمترین انرژی داکینگ بترتیب مربوط به ترکیب راتین و فیستین می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- بهترین انرژی اتصال میانکنش ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی بره موم با آنزیم hAChE که با روش داکینگ مولکولی بدست آمده است.

ردیف	نام ترکیب فلاونوئیدی	بهترین انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)
۱	راتین	-۸/۹
۲	کافئیک اسید فن اتیل استر	-۸/۲
۳	پینوبنکسین	-۸/۲
۴	کرایسین	-۸/۱
۵	پینوسمیرین	-۸/۱
۶	آکاستین	-۸
۷	نارینژین	-۸
۸	لوتولین	-۷/۹
۹	آپیژنین	-۷/۸
۱۰	کاتچین	-۷/۷
۱۱	دایدزین	-۷/۵
۱۲	گالانگین	-۷/۴
۱۳	کوئرستین	-۷/۴
۱۴	ایزورهامنتین	-۷/۳
۱۵	مایریستین	-۷/۳
۱۶	کامفرول	-۷/۳
۱۷	فیستین	-۷

نتایج مربوط به این بخش در جدول ۲ نمایش داده شده است. اسیدآمین‌ه‌هایی از hAChE که با ایجاد پیوندهای هیدروژنی و آب‌گریز در فرایند اتصال هر لیگاند به آنزیم نقش دارند در دو ستون مختلف مشخص شده‌اند.

همانطور که در بخش مواد و روش‌ها اشاره شد بمنظور بررسی دقیق‌تر نتایج بدست آمده از داکینگ مولکولی، کمپلکس لیگاند-گیرنده برای کنفورماسیون با بهترین انرژی اتصال برای هر ترکیب فلاونوئیدی تهیه و با استفاده از نرم افزار LigPlot مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲- اسیدآمین‌های مشارکت‌کننده در میانکشی ترکیبات فلاونوئیدی با آنزیم hAChE که با نرم افزار LigPlot شناسایی شده اند.

ردیف	ترکیب فلاونوئیدی	اسیدآمین‌های hAChE ایجاد کننده پیوندهای هیدروژنی	اسیدآمین‌های hAChE ایجاد کننده پیوندهای آب‌گریز
۱	راتین	آسپاراتات ۷۴، ترئونین ۷۵، تیروزین ۱۲۴، هیستیدین ۲۸۷، گلوتامین ۲۹۱	تیروزین ۷۲، لوسین ۷۶، تریپتوفان ۲۸۶، لوسین ۲۸۹، گلوتامات ۲۹۲، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۲	کافئیک اسید فن ایل استر	تیروزین ۱۲۴، تیروزین ۱۳۳، گلوتامات ۲۰۲	آسپاراتات ۷۴، تریپتوفان ۸۶، گلیسین ۱۲۰، گلیسین ۱۲۱، گلیسین ۱۲۶، تریپتوفان ۲۸۶، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، تیروزین ۳۳۷، فنیل آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۳	پینونکسین	تیروزین ۷۲، سرین ۲۹۳، تیروزین ۳۴۱	تیروزین ۱۲۴، تریپتوفان ۲۸۶، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷
۴	کرایسین	تیروزین ۷۲، تریپتوفان ۲۸۶	تیروزین ۱۲۴، لوسین ۲۸۹، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل - آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۵	پینوسمیرین	تیروزین ۷۲	تیروزین ۱۲۴، تریپتوفان ۲۸۶، لوسین ۲۸۹، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل - آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۶	آکاستین	تریپتوفان ۲۸۶	تیروزین ۷۲، تیروزین ۱۲۴، هیستیدین ۲۸۷، لوسین ۲۸۹، فنیل آلانین ۲۹۷، تیروزین ۳۴۱، فنیل آلانین ۳۳۸
۷	نارینژنین	تیروزین ۷۲، تیروزین ۱۲۴	تریپتوفان ۲۸۶، لوسین ۲۸۹، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل - آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۸	لوتولین	تیروزین ۷۲، تیروزین ۱۲۴، تریپتوفان ۲۸۶، فنیل آلانین ۲۹۵	لوسین ۲۸۹، والین ۲۹۴، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۹	آپیژنین	تیروزین ۷۲، تیروزین ۱۲۴	تریپتوفان ۲۸۶، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۱۰	کاتچین	تیروزین ۷۲، تیروزین ۱۲۴، تریپتوفان ۲۸۶، فنیل آلانین ۲۹۵	هیستیدین ۲۸۷، سرین ۲۹۳، والین ۲۹۴، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۱۱	دایدزین	تیروزین ۱۲۴، تریپتوفان ۲۸۶	لوسین ۲۸۹، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۱۲	گالانگین	تیروزین ۱۲۴	تریپتوفان ۲۸۶، گلوتامات ۲۹۲، سرین ۲۹۳، والین ۲۹۴، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل - آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۱۳	کوئرستین	تریپتوفان ۲۸۶، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، آرژنین ۲۹۶، تیروزین ۳۴۱	هیستیدین ۲۸۷، والین ۲۹۴، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل آلانین ۳۳۸
۱۴	ایزورهامتین	تیروزین ۱۲۴	تریپتوفان ۲۸۶، هیستیدین ۲۸۷، لوسین ۲۸۹، گلوتامات ۲۹۲، سرین ۲۹۳، والین ۲۹۴، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۱۵	مایریستین	آسپاراتات ۸۷، گلوتامات ۲۰۲، سرین ۲۰۳، سرین ۱۲۵، تیروزین ۳۳۷، هیستیدین ۴۴۷	آسپاراتات ۷۴، ترئونین ۸۳، تریپتوفان ۸۶، گلیسین ۱۲۰، گلیسین ۱۲۱، گلیسین ۱۲۲، تیروزین ۱۲۴، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، فنیل آلانین ۳۳۸
۱۶	کامفرول	تیروزین ۱۲۴	تریپتوفان ۲۸۶، گلوتامات ۲۹۲، سرین ۲۹۳، والین ۲۹۴، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل - آلانین ۳۳۸، تیروزین ۳۴۱
۱۷	فیستین	تیروزین ۷۲، آسپاراتات ۷۴، تیروزین ۱۲۴	ترئونین ۷۵، لوسین ۷۶، تریپتوفان ۲۸۶، سرین ۲۹۳، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷، تیروزین ۳۴۱

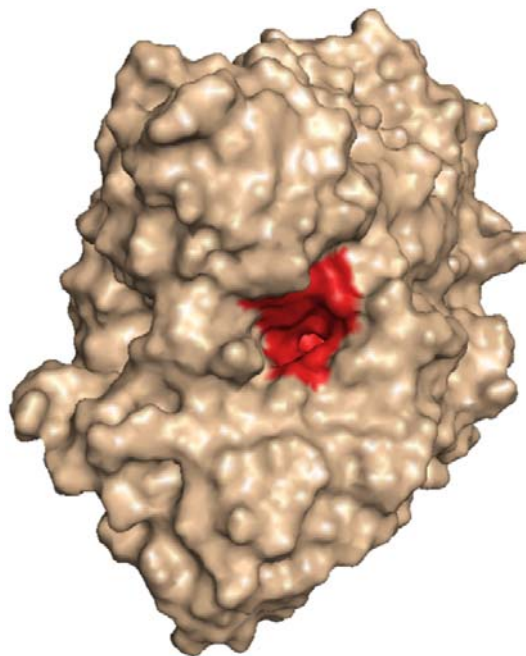
جایگاه استراتیک (تریاد کاتالیتیک: سرین ۲۰۳، گلوتامات ۳۳۴ و هیستیدین ۴۴۷)، حفره اکسی آنیون (گلیسین ۱۲۱، گلیسین ۱۲۲ و آلانین ۲۰۴) (۵۵)، پاکت آسیل (تریپتوفان ۲۳۶، فنیل آلانین ۲۹۵، فنیل آلانین ۲۹۷ و

همانطور که قبلا در بخش مقدمه اشاره شد جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز که به صورت یک شکاف عمیق و باریک است متشکل از چندین بخش می باشد (شکل ۲). آمینواسیدهای مربوط به هر بخش به این شرح است:

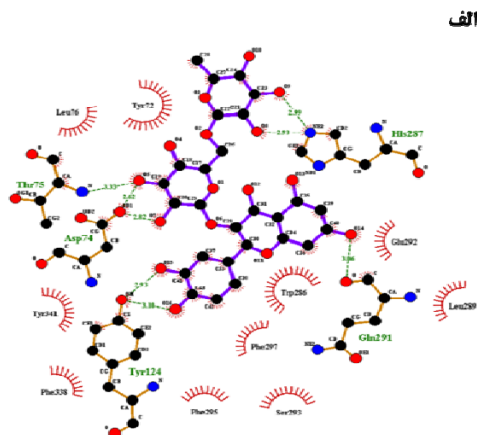
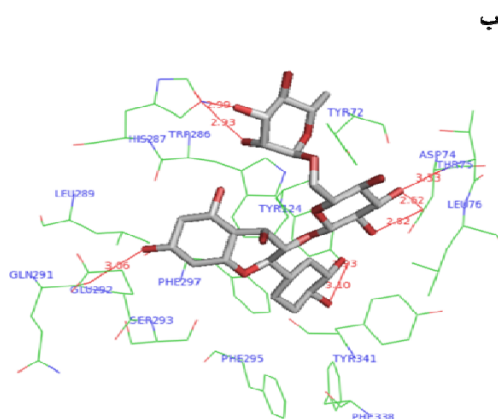
همانطور که از نتایج بدست آمده مشخص است بسیاری از اسیدآمین‌های درگیر در فرایند اتصال، مشابه هستند. تمامی ترکیبات با بخش PAS و پاکت آسیل می‌انگش دارند. همانطور که قبلاً اشاره شد بخش PAS یک جایگاه آلوستریکی است که در نزدیکی ورودی شکاف جایگاه فعال قرار دارد و پاکت آسیل که در نزدیکی عمق شکاف قرار دارد در اتصال به گروه استیل سوبسترا نقش دارد. اما فقط دو ترکیب فلاونوئیدی کافئیک‌اسید فن‌اتیل‌استر (CAPE) و مایریستین با بخش عمیق‌تر شکاف جایگاه فعال میانگش می‌نمایند. این دو ترکیب با CAS که نسبت به پاکت آسیل در عمق بیشتری قرار دارد و همچنین با حفره اکسی‌آنیون که در عمق شکاف قرار دارد میانگش می‌نمایند. نکته جالب‌تر آنکه ترکیب مایریستین با دو آمینواسید جایگاه استراتیک نیز میانگش می‌نماید و بنابراین ازین لحاظ نسبت به سایر ترکیبات فلاونوئیدی مورد مطالعه، منحصر به فرد است.

همانطور که در جدول ۱ مشخص شده است ترکیب راتین نسبت به سایر ترکیبات، با قدرت بیشتری با جایگاه فعال hAChE میانگش می‌نماید (انرژی اتصال: -۸/۹ کیلوکالری بر مول). نحوه میانگش این ترکیب با hAChE در شکل ۳ نمایش داده شده است.

فنیل‌آلانین (۳۳۸) (۱۵، ۵۳)، CAS (تریپتوفان ۸۶، گلوتامات ۲۰۲ و تیروزین ۳۳۷) (۳۶)، PAS (تیروزین ۷۲، آسپارتات ۷۴، تیروزین ۱۲۴، تریپتوفان ۲۸۶ و تیروزین ۳۴۱) (۳۶، ۶).

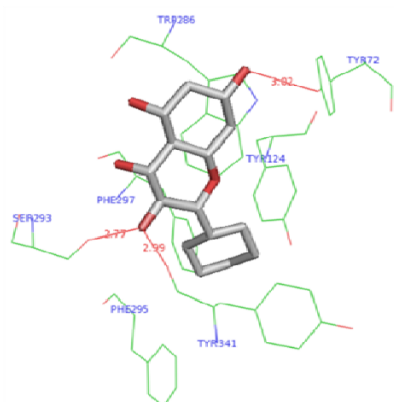


شکل ۲- ساختار آنزیم استیل کولین استراز انسانی (hAChE) که به فرمت surface نمایش داده شده است (PDB ID: 4M0E). جایگاه فعال این آنزیم که به صورت یک شکاف عمیق و باریک است متشکل از چندین بخش می‌باشد. این شکاف با رنگ قرمز مشخص شده است.

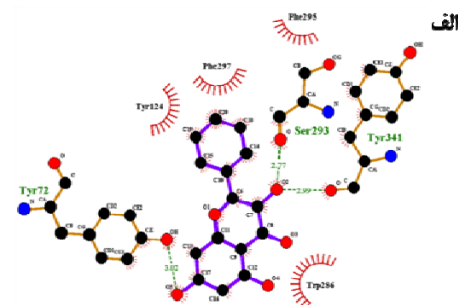


شکل ۳- نحوه میانگش راتین با جایگاه فعال hAChE که با دو نرم افزار LigPlot (الف) و PyMol (ب) تهیه شده است. پیوندهای هیدروژنی بترتیب به صورت خطوط نقطه چین سبز و خطوط قرمز ممتد در PyMol و Ligplot نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. در تصویر مربوط به Ligplot، اسیدآمین‌های ایجادکننده پیوندهای آب‌گریز به صورت نیم دایره‌های قرمز مشخص شده‌اند.

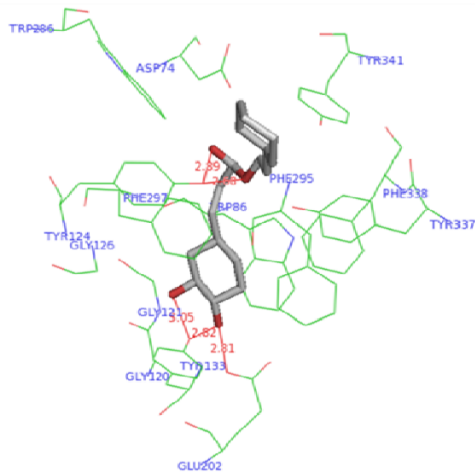
متنوعی نظیر ضد تومور و ضد میکروبی که اساساً با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی این ترکیب مرتبط می‌باشد به این فلاونوئید نسبت داده می‌شود. راتین و متابولیت‌هایش توانایی عبور از سد خونی مغزی را دارند. گزارش‌هایی مبنی بر توانایی این ترکیب در تغییر علائم شناختی و رفتاری مرتبط با بیماری‌های تحلیل‌برنده اعصاب نظیر آلزایمر وجود دارد و به طور کلی راتین به عنوان یک عامل محافظت‌کننده اعصاب مطرح می‌باشد (۵۱، ۲۴، ۱۰).



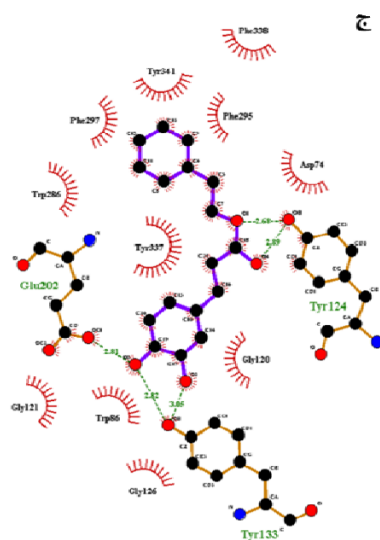
ب



الف



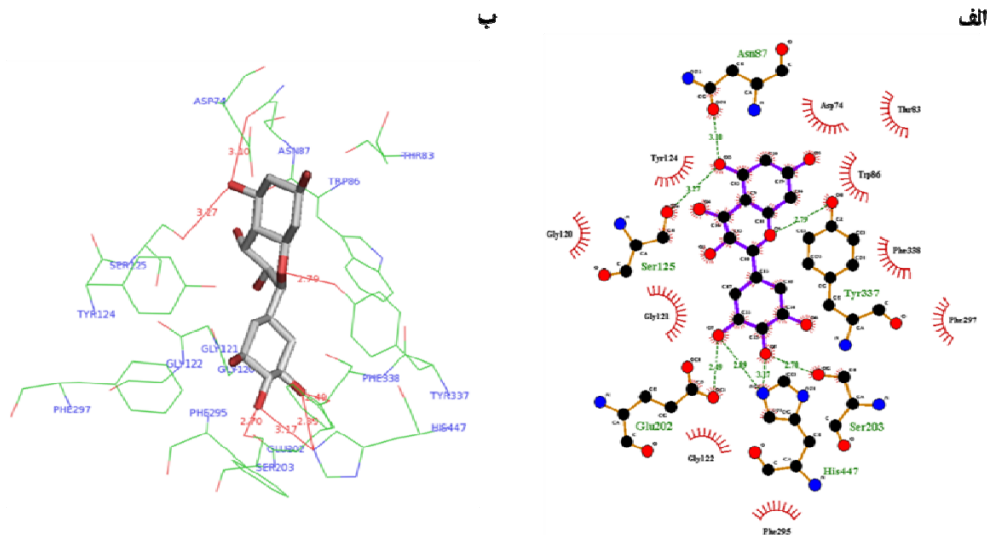
د



ج

شکل ۴- نمایش دوبعدی و سه بعدی نحوه میانکنش پینوبنکسین (الف و ب) و کافنیک اسید فن اتیل استر (CAPE) (ج و د) با جایگاه فعال hAChE. تصاویر سمت راست و چپ بترتیب با استفاده از نرم افزار LigPlot و PyMol تهیه شده‌اند. پیوندهای هیدروژنی بترتیب به صورت خطوط نقطه چین سبز و خطوط قرمز ممتد در PyMol و Ligplot نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. در تصاویر تهیه شده با Ligplot، اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده پیوندهای آب‌گریز به صورت نیم‌دایره‌های قرمز مشخص شده‌اند.





شکل ۵- نحوه میانکنش مایرستین با جایگاه فعال hAChE تهیه شده با دو نرم افزار LigPlot (الف) و PyMol (ب). پیوندهای هیدروژنی بترتیب به صورت خطوط نقطه‌چین سبز و خطوط قرمز ممتد در Ligplot و PyMol مشخص شده اند و طول آنها بر حسب آنگستروم است. در تصویر مربوط به Ligplot اسید آمینه های ایجادکننده پیوندهای آب گریز به صورت نیم دایره های قرمز مشخص شده اند.

متابولیسم راتین نشان داد که نه تنها استفاده از این حلال‌ها در مقایسه با آب، موجب افزایش سطح پلاسمایی راتین می‌شود بلکه ماندگاری این ترکیب در پلاسما را نیز افزایش می‌دهد (۲۱). در تحقیقی که بر روی موش‌ها و خوکچه‌های هندی بمنظور ارزیابی سمیت راتین انجام گرفت مشخص شد که این فلاونوئید به صورت حاد و یا مزمن، سمیت مشخصی را در این جانوران آزمایشگاهی ایجاد نمی‌نماید (۵۴).

همانطور که در شکل ۳ به خوبی دیده می‌شود راتین از طریق بخش کوئرستین ساختارش به درون شکاف جایگاه فعال نفوذ می‌نماید و با ایجاد هشت پیوند هیدروژنی و چندین پیوند آب گریز با hAChE میانکنش می‌نماید. از بین این هشت پیوند هیدروژنی، پنج پیوند بین بخش قندی و سه پیوند بین بخش کوئرستین راتین و آنزیم ایجاد می‌شود. چندین آمینو اسید متعلق به ناحیه PAS در میانکنش این لیگاند با آنزیم مشارکت دارند (تیروزین ۷۲، آسپاراتات ۷۴، تیروزین ۱۲۴، تیروزین ۳۴۱ و تریپتوفان ۲۸۶)، همچنین سه اسید آمینه پاکت آسیل، فنیل آلانین ۲۹۵، ۲۹۷ و ۳۳۸، با راتین میانکنش آب گریز برقرار می‌نمایند. راتین

شاخص‌های فارماکوکینتیک (ADMET) متشکل از جذب (Absorption)، انتشار (Distribution)، متابولیسم (Metabolism)، دفع (excretion) و سمیت (Toxicity) می‌باشد (۲۲). مطالعات متنوعی بر روی شاخص‌های فارماکوکینتیک راتین انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد. در مطالعه‌ای که نتایج آن در سال ۲۰۱۳ به چاپ رسید عصاره برگ‌های درخت توت که سرشار از کوئرستین و راتین است به صورت خوراکی به موش‌ها داده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که راتین به سرعت جذب و سپس غلظت آن به آرامی کاهش می‌یابد و نمودار غلظت پلاسمایی نسبت به زمان این ترکیب با مدل دو محفظه‌ای (two-compartment model) مطابقت دارد. در این تحقیق همچنین متابولیت‌های حاصل از متابولیسم راتین در ادرار و مدفوع جانوران مورد مطالعه شناسایی شدند (۴۰). در مطالعه دیگری که بر روی موش‌های آزمایشگاهی انجام شد و نتایج آن در سال ۲۰۱۶ به چاپ رسید راتین در آب و چندین حلال یونکتیک عمیق طبیعی (NADES: Natural deep eutectic solvents) حل و به موش‌ها خوراندند شد. بررسی جذب و

علیه واکنش‌های دارویی نامطلوب القا شده توسط شیمی درمانی می‌باشد (۳۹، ۴۷). همچنین گزارش‌های مبنی بر اثرات محافظتی این ترکیب در بیماری آلزایمر وجود دارد (۲۵).

در بخش ج و د شکل ۴، میانکنش CAPE با hAChE نمایش داده شده است. همانطور که به خوبی مشخص است پنج پیوند هیدروژنی بین آنزیم و CAPE تشکیل شده است. چندین آمینواسید از ناحیه PAS (آسپاراتات ۷۴، تیروزین ۱۲۴، تیروزین ۳۴۱ و تریپتوفان ۲۸۶) در فرایند اتصال این لیگاند به hAChE نقش دارند. همچنین سه اسیدآمینه پاکت آسیل (فنیل آلانین ۲۹۵، ۲۹۷ و ۳۳۸) نیز با CAPE میانکنش می‌نمایند. CAPE نسبت به راتین و پینوبنکسین به عمق بیشتری از شکاف جایگاه فعال نفوذ می‌نماید و با گلاسیسین ۱۲۱ از حفره اکسی‌آنیون و تریپتوفان ۸۶، گلوتامات ۲۰۲ و تیروزین ۳۳۷ از CAS نیز میانکنش می‌کند.

مایریستین یک ترکیب فلاونوئیدی طبیعی است که در دهه اخیر شواهد فراوانی مبنی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری و ضد التهابی آن ارائه شده است. در مطالعاتی که بر روی انواع متنوعی از سلول‌های سرطانی انجام گرفته است مشخص شده است که این ترکیب هجوم و متاستاز سلول‌های سرطانی را سرکوب و موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۷، ۲۹). این ترکیب همچنین چندین فعالیت که مرتبط با سیستم عصبی مرکزی می‌باشد از خود نشان می‌دهد و مطالعات متعددی پیشنهاد نموده اند که این ترکیب ممکن است در مقابل بیماری‌هایی نظیر پارکینسون و آلزایمر اثر محافظتی داشته باشد (۴۴، ۴۶).

بهترین انرژی اتصال مایریستین-hAChE که با استفاده از داکینگ مولکولی بدست آمده است ۷/۳- کیلوکالری بر مول می‌باشد (جدول ۱). اما نحوه اتصال این ترکیب با آنزیم نسبت به سایر ترکیبات فلاونوئیدی مورد مطالعه، منحصر به فرد می‌باشد. همانطور که در شکل ۵ به خوبی

قادر به برقراری میانکنش با بخش‌های عمیق‌تر جایگاه فعال نظیر CAS، حفره اکسی‌آنیون و یا جایگاه استراتیک نمی‌باشد و میانکنش این ترکیب فلاونوئیدی با hAChE به ناحیه PAS و پاکت آسیل محدود می‌شود.

پینوبنکسین و مشتقات استری آن از ترکیبات تشکیل دهنده بره موم هستند. مطالعات انجام شده بر روی نوعی بره موم جمع‌آوری شده از مکزیک نشان دهنده آن است که پینوبنکسین و استرهایش یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده خواص ضدسرطانی این نوع بره موم می‌باشند. این ترکیبات با القای آپوپتوز، اثر ضد سرطانی خود را اعمال می‌نمایند (۵، ۵۶). همچنین مطالعه انجام شده بر روی پینوبنکسین-۳-سینامات نشان داد این ترکیب قادر به بهبود شناخت و کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های مبتلا به زوال عقل عروقی می‌باشد (۳۸).

در مقایسه با راتین، تعداد کمتری اسیدآمینه در اتصال پینوبنکسین به hAChE مشارکت می‌نمایند (بخش الف و ب شکل ۴). تنها سه پیوند هیدروژنی در میانکنش پینوبنکسین با آنزیم نقش دارد. چهار آمینواسید ناحیه PAS (تیروزین ۷۲، تیروزین ۱۲۴، تریپتوفان ۲۸۶ و تیروزین ۳۴۱) و دو آمینواسید پاکت آسیل (فنیل آلانین ۲۹۵ و ۲۹۷) در اتصال این ترکیب فلاونوئیدی به جایگاه فعال hAChE درگیر هستند.

کافئیک اسید فن ایل استر (CAPE) از جمله ترکیبات فعال بره موم است که مطالعات بسیار گسترده‌ای بر روی آن انجام گرفته است. این فلاونوئید اثرات متنوعی شامل آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، حفاظت از سلول، ضد سرطان، ضد میکروب و ضد ویروس از خود نشان می‌دهد. این ترکیب همچنین اثرات محافظتی بر علیه ایسکمی-خون‌رسانی مجدد (I/R) القا شده توسط آسیب در چندین بافت نظیر مغز، شبکه، قلب، ماهیچه اسکلتی، بیضه، تخمدان، روده، کولون و کبد را دارا می‌باشد. به علاوه نتایج چندین مطالعه علمی، نشانگر اثرات محافظتی این فلاونوئید بر

این مطالعه، این توانایی را دارا بودند که به طور همزمان به ناحیه PAS و همچنین جایگاه اتصال سوبسترا (پاکت آسیل) متصل شوند در گروه این مهارکننده‌ها قرار می‌گیرند. همانطور که در مباحث بالا اشاره شد ترکیب CAPE و مایریستین علاوه بر میانکنش با این دو ناحیه، توانایی اتصال به CAS و حفره اکسی‌آنیون را نیز دارا می‌باشند. مایریستین همچنین با دو اسیدآمینه تریاد کاتالیتیک نیز میانکنش می‌نماید.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشانگر آن است که تمامی ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی یافت شده در نمونه‌های بره‌موم قادرند با انرژی اتصال مناسبی (۷- تا ۸/۹- کیلوکالری بر مول) با شکاف جایگاه فعال hAChE میانکنش و فعالیت این آنزیم را مهار نمایند. این نتایج با داده‌های علمی منتشر شده که نشانگر فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی فلاونوئیدها است مطابقت دارد (۳۲، ۳۳). با توجه به اینکه فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی چند نمونه بره‌موم به اثبات رسیده است (۷، ۵۲) می‌توان پیشنهاد نمود که فلاونوئیدها در ایجاد این ویژگی زیستی بره‌موم نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. بنابراین در مجموع با توجه به داده‌های بدست آمده، میتوان این ترکیبات فلاونوئیدی را بعنوان کاندیداهای مناسب برای انجام تحقیقات گسترده‌تر در راستای طراحی داروهای جدید درمان آلزایمر و سایر اختلالات سیستم عصبی مرکزی پیشنهاد نمود. از بین این ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی ترکیب راتین به دلیل انرژی اتصال بالا (۸/۹- کیلوکالری بر مول) و مایریستین به دلیل توانایی اتصال همزمان به تمامی بخش‌های شکاف جایگاه فعال آنزیم از بیشترین پتانسیل در این زمینه برخوردار می‌باشند.

دیده می‌شود تعداد زیادی آمینواسید در میانکنش این فلاونوئید با جایگاه فعال hAChE مشارکت دارند. تعداد پیوند هیدروژنی دخیل در این فرایند، هفت پیوند می‌باشد. مایریستین با اسیدآمینه‌های ناحیه PAS (آسپاراتات ۷۴ و تیروزین ۱۲۴)، پاکت آسیل (فیل آلانین ۲۹۵، ۲۹۷ و ۳۳۸)، CAS (تریپتوفان ۸۶، گلوتامات ۲۰۲ و تیروزین ۳۳۷)، حفره اکسی‌آنیون (گلایسین ۱۲۱ و ۱۲۲) و جایگاه استراتیک (سرین ۲۰۳ و هیستیدین ۴۴۷) میانکنش می‌نماید. هرچند CAPE نیز نسبت به راتین و پیونیکسین به عمق بیشتری از جایگاه فعال آنزیم نفوذ می‌نماید اما بر خلاف مایریستین، توانایی برقراری میانکنش با تریاد کاتالیتیک را ندارد.

شواهد حاصل از مطالعات علمی پیشنهاد می‌نماید که PAS توانایی تسریع تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید بتا را در مغز افراد مبتلا به آلزایمر دارا می‌باشد. این عملکرد از طریق یک مکانیسم غیرکاتالیتیک و با اتصال به فرم غیرآمیلوئیدوزنیک پروتئین آمیلوئید بتا اتفاق می‌افتد (۱۱)، (۱۶). بنابراین مهارکننده‌هایی که توانایی اتصال همزمان به جایگاه کاتالیتیکی آنزیم (تریاد کاتالیتیک) و یا جایگاه اتصال سوبسترا (CAS و پاکت آسیل) و PAS را دارند می‌توانند از طریق دو مکانیسم موجب بهبود علائم آلزایمر شوند. زیرا علاوه بر آنکه موجب افزایش سطح استیل-کولین در مغز بیماران می‌شوند می‌توانند فرایند تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید بتا را نیز کند نمایند. این گروه از مهارکننده‌ها بعنوان عوامل درمانی جدیدی برای درمان هر چه کارآمدتر آلزایمر در نظر گرفته می‌شوند (۵۷). با توجه به اینکه تمامی ۱۷ ترکیب فلاونوئیدی مورد بررسی در

## منابع

- ۱- زهری، ص.، اصغری، ع. و دادخواه، م. ۱۳۹۲. تنوع جمعیت‌های زنبور عسل بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و ریزوماهواره (microsatellite) در استان اردبیل. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). (۴) ۲۶، ۴۶۲-۷۱.
- ۲- داوری، ک.، نوروزی، ج.، حسینی، ف.، اخوان سپهی، ع. و میرزایی، س. ۱۳۹۸. کشف مهارکننده علیه بتا لاکتاماز -CTX M-9 باکتری E.coli با استفاده از مطالعات داکینگ ملکولی، MM/PBSA و دینامیک ملکولی. (۱) ۳۲، ۳۳-۴۶.

- 3- Afrouzan H, Tahghighi A, Zakeri S, and Es-haghi A. 2018. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iran Biomed J*; 22(1): 50-65.
- 4- Agatonovic-Kustrin S, Kettle C, and Morton DW. 2018. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*; 106: 553-65.
- 5- Alday E, Valencia D, Carreno AL, Picerno P, Piccinelli AL, Rastrelli L, Robles-Zepeda R, Hernandez J, and Velazquez C. 2015. Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Biol Interact*; 242: 35-44.
- 6- Atanasova M, Yordanov N, Dimitrov I, Berkov S, and Doytchinova I. 2015. Molecular Docking Study on Galantamine Derivatives as Cholinesterase Inhibitors. *Mol Inform*; 34(6-7): 394-403.
- 7- Baltas N, Yildiz O, and Kolayli S. 2016. Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 31(sup1): 52-55.
- 8- Berendsen HJC, van der Spoel D, and van Drunen R. 1995. GROMACS :A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*; 91(1): 43-56.
- 9- Bonamigo T, Campos JF, Oliveira AS, Torquato HFV, Balestieri JBP, Cardoso CAL, Paredes-Gamero EJ, de Picoli Souza K, and Dos Santos EL. 2017. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. *PLoS One*; 12(9): e0183983.
- 10- Budzynska B, Faggio C, Kruk-Slomka M, Samec D, Nabavi SF, Sureda A, Devi KP, and Nabavi SM. 2019. Rutin as Neuroprotective Agent: From Bench to Bedside. *Curr Med Chem*; 26(27): 5152-64.
- 11- Carvajal FJ, Inestrosa NC. 2011. Interactions of AChE with A $\beta$  Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front Mol Neurosci*; 4: 1-11.
- 12- Castellani RJ, Rolston RK, and Smith MA. 2010. Alzheimer disease. *Dis Mon*; 56(9): 484-546.
- 13- Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, and Vasic VM. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*; 11(3): 315-35.
- 14- Contestabile A. 2011. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res*; 221(2): 334-40.
- 15- Damuka N, Kammari K, Potshangbam AM, Rathore RS, Kondapi AK, and Vindal V. 2020. Discovery of dual cation- $\pi$  inhibitors of acetylcholinesterase: design, synthesis and biological evaluation. *Pharmacol Rep*; 72(3): 705-18.
- 16- De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, and Inestrosa NC. 2001. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry*; 40(35): 10447-57.
- 17- Devi KP, Rajavel T, Habtemariam S, Nabavi SF, and Nabavi SM. 2015. Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. *Life Sci*; 142: 19-25.
- 18- Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, and Pandey DK. 2017. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmacotherapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol Adv*; 35(2): 178-216.
- 19- Dos Santos TC, Gomes TM, Pinto BAS, Camara AL, and Paes AMA. 2018. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Front Pharmacol*; 9: 1192.
- 20- Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, and Sussman JL. 2010. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*; 187(1-3): 10-22.
- 21- Faggian M, Sut S, Perissutti B, Baldan V, Grabnar I, and Dall'Acqua S. 2016. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a Tool for Bioavailability Improvement: Pharmacokinetics of Rutin Dissolved in Proline/Glycine after Oral Administration in Rats: Possible Application in Nutraceuticals. *Molecules*; 21 (11).
- 22- Ferreira LLG, Andricopulo AD. 2019. ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug Discov Today*; 24(5): 1157-65.
- 23- Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, and

- Fernandez-Gutierrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal*; 41(4): 1220-34.
- 24- Habtemariam S. 2016. Rutin as a Natural Therapy for Alzheimer's Disease: Insights into its Mechanisms of Action. *Curr Med Chem*; 23(9): 860-73.
- 25- Habtemariam S. 2017. Protective Effects of Caffeic Acid and the Alzheimer's Brain: An Update. *Mini Rev Med Chem*; 17(8): 667-74.
- 26- Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, and Jonas DE. 2008. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging*; 3(2): 211-25.
- 27- Hasselmo ME. 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*; 16(6): 710-5.
- 28- Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, and Hu FL. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*; 19(12): 19610-32.
- 29- Jiang M, Zhu M, Wang L, and Yu S. 2019. Antitumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomed Pharmacother*; 120: 109506.
- 30- Johnson G, Moore SW. 2006. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des*; 12(2): 217-25.
- 31- Khalil ML. 2006. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*; 7(1): 22-31.
- 32- Khan H, Marya, Amin S, Kamal MA, and Patel S. 2018. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomed Pharmacother*; 101: 860-70.
- 33- Khan MT, Orhan I, Senol FS, Kartal M, Sener B, Dvorska M, Smejkal K, and Slapetova T. 2009. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact*; 181(3): 383-9.
- 34- Kitz RJ, Braswell LM, and Ginsburg S. 1970. On the question: is acetylcholinesterase an allosteric protein? *Mol Pharmacol*; 6(2): 108-21.
- 35- Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, and Musik I. 2018. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxid Med Cell Longev*; 2018: 7074209.
- 36- Kua J, Zhang Y, Eslami AC, Butler JR, and McCammon JA. 2003. Studying the roles of W86, E202, and Y337 in binding of acetylcholine to acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *Protein Sci*; 12(12): 2675-84.
- 37- Kulshreshtha A, Piplani P. 2016. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Neurol Sci*; 37(9): 1403-35.
- 38- Liu H, Zhao M, Yang S, Gong DR, Chen DZ, and Du DY. 2015. (2R,3S)-Pinobanksin-3-cinnamate improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. *J Nat Med*; 69(3): 358-65.
- 39- Murtaza G, Karim S, Akram MR, Khan SA, Azhar S, Mumtaz A, and Bin Asad MH. 2014. Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *Biomed Res Int*; 2014: 145342.
- 40- Ou-yang Z, Cao X, Wei Y, Zhang W-W-Q, Zhao M, and Anh Tuan L. 2013. Pharmacokinetic study of rutin and quercetin in rats after oral administration of total flavones of mulberry leaf extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*; 23: 776-82.
- 41- Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, and Gan SH. 2017. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*; 2017: 1259510.
- 42- Rezvannejad E, Shakeri SH, and Nasirifa E. 2017. Study and comparison of antibacterial effects of propolis and honey on *Penibacillus alvei* secondary factor for European Foulbrood in honeybee. *Veterinary Researches and Biological Products (Pajouhesh va Sazandegi)*; 30(3 (116)): 139-46.
- 43- Rudnitskaya A, Török B, and Török M. 2010. Molecular docking of enzyme inhibitors: A COMPUTATIONAL TOOL FOR

- STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN. *Biochem Mol Biol Educ*; 38(4): 261-5.
- 44- Semwal DK, Semwal RB, Combrinck S, and Viljoen A. 2016. Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*; 8(2): 90.
- 45- Sledz P, Caffisch A. 2018. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Curr Opin Struct Biol*; 48: 93-102.
- 46- Stefanescu R, Stanciu GD, Luca A, Paduraru L, and Tamba BI. 2020. Secondary Metabolites from Plants Possessing Inhibitory Properties against Beta-Amyloid Aggregation as Revealed by Thioflavin-T Assay and Correlations with Investigations on Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Biomolecules*; 10(6).
- 47- Tolba MF, Omar HA, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Naim AB, and Abdel-Rahman SZ. 2016. Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Review of Its Antioxidant Activity, Protective Effects against Ischemia-reperfusion Injury and Drug Adverse Reactions. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 56(13): 2183-90.
- 48- Trott O, Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*; 31(2): 455-61.
- 49- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, and Perez-Alvarez JA. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*; 73 (9): R117-24.
- 50- Volpi N. 2004. Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*; 25(12): 1872-8.
- 51- Wang SW, Wang YJ, Su YJ, Zhou WW, Yang SG, Zhang R, Zhao M, Li YN, Zhang ZP, Zhan DW, and Liu RT. 2012. Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology*; 33(3): 482-90.
- 52- Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo SO, Kwon HW, Perumalsamy H, and Ahn YJ. 2016. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement Altern Med*; 16: 65.
- 53- Wiesner J, Kriz Z, Kuca K, Jun D, and Koca J. 2007. Acetylcholinesterases--the structural similarities and differences. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 22(4): 417-24.
- 54- Wilson RH, Mortarotti TG, and Doxtader EK. 1947. Toxicity studies on rutin. *Proc Soc Exp Biol Med*; 64(3): 324-7.
- 55- Zhang Y, Kua J, and McCammon JA. 2002. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. *J Am Chem Soc*; 124(35): 10572-7.
- 56- Zheng YZ, Deng G, Chen DF, Liang Q, Guo R, and Fu ZM. 2018. Theoretical studies on the antioxidant activity of pinobanksin and its ester derivatives: Effects of the chain length and solvent. *Food Chem*; 240: 323-29.
- 57- Zueva I, Dias J, Lushchekina S, Semenov V, Mukhamedyarov M, Pashirova T, Babaev V, Nachon F, Petrova N, Nurullin L, Zakharova L, Ilyin V, Masson P, and Petrov K. 2019. New evidence for dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as improved drugs for treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*; 155: 131-41.

## Investigation of interaction of propolis flavonoid compounds with human acetylcholinesterase using molecular docking

Lotfi S.<sup>1</sup>, Rezvannejad E.<sup>1</sup> and Lenjanian H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran.

### Abstract

Acetylcholinesterase inhibitors (anticholinesterases) are commonly used to improve the symptoms of Alzheimer's disease and the other forms of dementia and central nervous system disorders. Propolis is a sticky resinous substance produced by honey bees and exhibits a variety of biological activities such as anticancer, antioxidant, antimicrobial and antifungal. Recently, a number of articles have been published on the anticholinesterase activity of propolis. In this study, the interaction of 17 propolis flavonoid compounds with human acetylcholinesterase (hAChE) was investigated using molecular docking. These studies were performed with AutoDock Vina software and the grid box was designed to be placed on the active site gorge of the enzyme. The results obtained showed that all these compounds bind to this region with good binding energy (-7 to -8.9 kcal/mol). The highest and lowest binding energies are related to rutin and fisetin, respectively. Investigation of the amino acids involved in the interaction demonstrated that all of these compounds interact with PAS and acyl pocket. The two compounds, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and myricetin, also interact with CAS and oxyanion hole. Myricetin is the only compound that has the ability to bind to two amino acids belonging to the catalytic triad. The results of this study suggest that all of these flavonoid compounds have the ability to inhibit the hAChE activity by binding to the active site gorge of the enzyme and are therefore suitable candidates for further studies to design new anticholinesterase drugs.

**Key words:** Acetylcholinesterase inhibitors (anticholinesterases), Alzheimer's disease, Propolis, Flavonoid, Molecular docking.