

بررسی تأثیر گیاه آویشن باغی در مهار آنزیم استیل کولین استراز به منظور درمان بیماری آلزایمر

مژگان نادری^۱، دکتر عزیزه اسدزاده^{۲*}، دکتر فاطمه حیدریان نائینی^۳

۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان، ایران
۲. دکترای بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان، ایران
۳. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر، شایع‌ترین علت زوال عقل در سالمندان است و با از دست دادن حافظه و عملکردهای شناختی، مشخص می‌شود. آنزیم استیل کولین استراز (ACHE) با هیدرولیز نوروترانسمیتر استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک مغز، در ختم پیام عصبی، نقش دارد. یکی از روش‌ها برای مهار پیشرفت بیماری آلزایمر، تجویز داروهای مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز به‌خصوص با منشأ گیاهی می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی بیوانفورماتیکی و به دست آوردن میزان خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز توسط عصاره آبی-الکلی اندام‌های هوایی گیاه *Thymus vulgaris* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا برای به دست آوردن نحوه اتصال ترکیبات به جایگاه فعال آنزیم، مطالعات داکینگ به وسیله نرم‌افزار AutoDock 4.2 انجام گرفت، سپس عصاره آبی-الکلی گیاه *Thymus vulgaris* به منظور بررسی فعالیت مهارتی آن بر استیل کولین استراز، به روش المن در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد سنجش قرار گرفت. **یافته‌ها:** مطالعات داکینگ، ترکیبات موجود در عصاره، قادر به اشغال جایگاه فعال آنزیم با سطح انرژی اتصال ۴/۱۲- تا ۶/۵۸ Kcal/mol بودند. مطابق نتایج آزمایشگاهی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درصد مهار ۴۶/۹۹ و میزان IC₅₀ برابر ۲/۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی‌های *in vitro* و *in silico* نشان می‌دهد که عصاره این گیاه، حاوی ترکیبات مهارکننده مؤثری می‌باشد و تلاش برای استفاده از این ترکیبات، موضوع مناسبی برای پژوهش‌های آینده با هدف دستیابی به مهارکننده‌های دارای کاربرد دارویی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها:

آلزایمر، داکینگ مولکولی، روش Ellman، آنزیم استیل کولین استراز، گیاه آویشن باغی

۱. مقدمه

بتا آمیلوئید و رشته‌های نوروفیبریل در مغز، از نشانه‌های بیماری آلزایمر است. در این بیماری، هم آنزیم سنتزکننده و هم آنزیم هیدرولیزکننده استیل کولین تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱). روش‌های درمانی مشخص و قطعی برای این بیماری وجود ندارد لیکن با روش‌های مختلف می‌توان این بیماری را کنترل

بیماری آلزایمر، شایع‌ترین علت زوال عقل است که از دست رفتن اتصالات سیناپسی (synaptic loss) و نورون‌ها، آستروگلیوزیس (astrogliosis) و تجمع رسوبات حاوی پروتئین، از نشانه‌های پاتولوژیکی عمده آن می‌باشد. وجود پلاک‌های

* نویسنده مسئول: عزیزه اسدزاده

نشانی: ایران، اصفهان، میمه، مؤسسه آموزش عالی نور دانش، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

دورنگار: ۰۳۱-۴۵۴۲۷۶۰۰

تلفن: ۰۳۱-۴۵۴۲۷۶۰۱

رایانامه: az.asadzadeh@yahoo.com

شناسه ORCID: 0000-0002-6530-0392

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۷، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۹، ص ۵۹۳-۶۰۲

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

طرح، با هدف بررسی و شناسایی دقیق مکانیزم اتصال ۲۵ ترکیب از مواد تشکیل‌دهنده آویشن باغی به جایگاه فعال آنزیم استیل‌کولین‌استراز، روش مولکولار داکینگ اجرا و نتایج به‌دست‌آمده از آن، تجزیه و تحلیل شد. پس از آنالیز مولکولار داکینگ، تولنایی مهارکنندگی این آنزیم در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت مهار موفق در شرایط *in vitro* و *in silico* برای تکمیل تحقیق در محیط *in vivo* نیز بررسی گردد.

۲. مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از نرم‌افزار اتوداک (AutoDock 4.2) برای انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. بدین منظور، نرم‌افزار اتوداک در کامپیوتر پنج‌هسته‌ای که تحت سیستم عامل لینوکس بود، نصب شد. ۲۵ ترکیب از مواد تشکیل‌دهنده عصاره آویشن باغی، مورد بررسی قرار گرفت. ساختار ترکیبات مورد مطالعه، از سایت <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> به‌دست آمد. نام و جزئیات ساختاری ترکیبات مورد مطالعه، در جدول ۱ آورده شده است. ساختار کریستالی مناسب، از آنزیم استیل‌کولین‌استراز، حاوی بخش کاتالیتیکی مرکزی از سایت <http://www.rcsb.org/pdb> انتخاب و دانلود شد. کد این آنزیم در این سایت 4EY7 با وضوح $2/3509 \text{ \AA}$ می‌باشد.

۲.۱. آماده کردن لیگاندها و پروتئین 4EY7 برای داکینگ

ساختار دو بعدی لیگاندهای موردنظر با برنامه ChemDraw Ultra 8.0 ترسیم شدند و سپس با استفاده از نرم‌افزار Hyperchem و توسط الگوریتم Polak-Ribiere از نظر انرژی بهینه شدند. در مرحله بعد، لیگاندهای بهینه شده به‌عنوان ورودی نرم‌افزار اتوداک تولز، استفاده شد و سپس با استفاده از Gasteiger-Marsili بار جزئی برای مولکول‌های مهارکننده، محاسبه شد. هیدروژن‌های غیر یونیزه، ادغام گردید و پس از مشخص کردن مرکز ثقل مولکول، تمامی باندهای قابل چرخش، تعیین گردید. با استفاده از نرم‌افزار DS Visualizer 3.5، لیگاندهای کوکریستال مولکول‌های آب، حذف شدند. پس از حذف قسمت‌های غیرضروری در عملیات داکینگ، پروتئین به‌عنوان ورودی نرم‌افزار اتوداک تولز استفاده شد. تا پس از اضافه شدن اتم‌های هیدروژن به پروتئین، بار کلی آن با استفاده از Kollman charge تعیین گردد، سپس هیدروژن‌های غیر یونیزه در اتم کربن مجاور، ادغام شدند.

در جدول ۱ نام و جزئیات ساختاری ترکیبات مورد مطالعه نشان داده شده است.

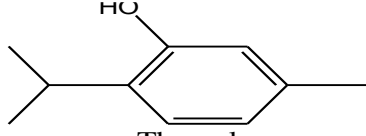
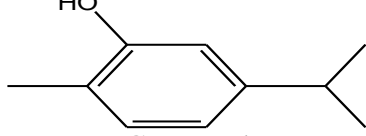
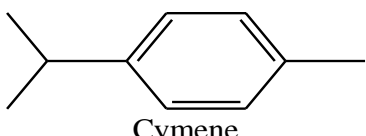
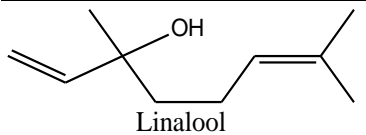
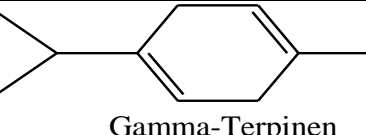

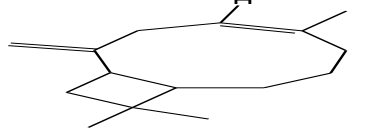
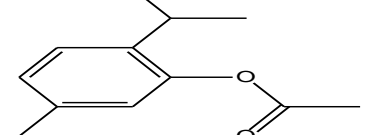
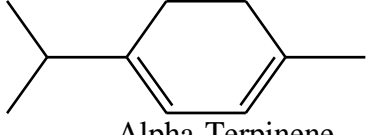
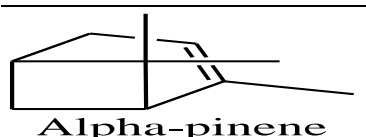
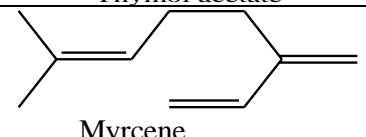
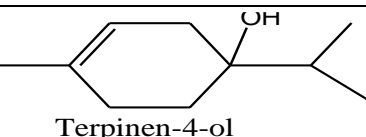
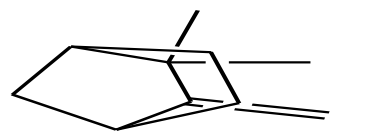
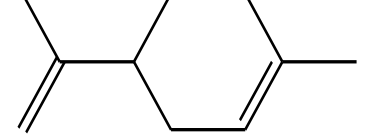
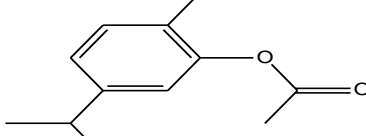
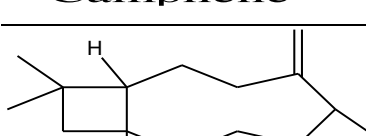
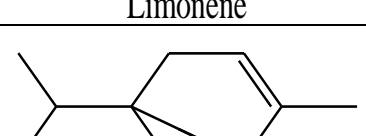
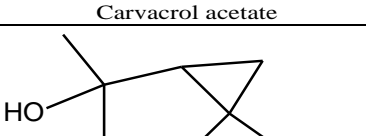
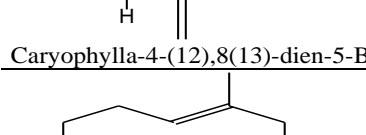
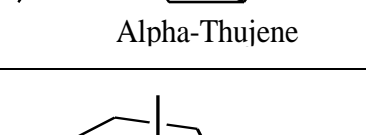
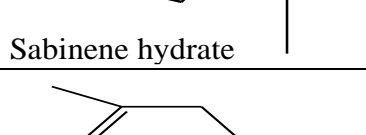
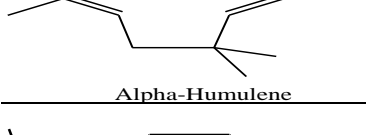
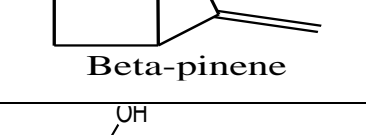
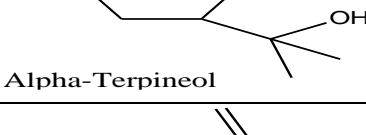
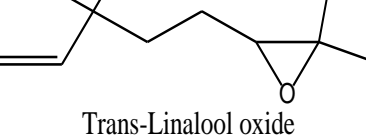
کرد و عوارض آن را کاهش داد. در این راستا می‌توان استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و مهارکننده‌های استیل‌کولین‌استراز و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی را نام برد.

استرازاها در اصل، گروهی از هیدرولازها هستند. هیدرولازها سبب تسهیل عمل هیدرولیز اتصالات گوناگون می‌شوند. استیل‌کولین‌استراز از نظر فیزیولوژی و مکانیسم عملکرد، دارای اهمیت زیادی می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان شاخص برای مطالعه فرایند سیناپتوزن و میانکنش عصبی-عضلانی، بررسی شود. استیل‌کولین‌استراز باعث تجزیه استیل‌کولین در مواضع سیناپسی می‌گردد. آنزیم استیل‌کولین‌استراز (EC:3.1.1.7) آنزیمی است که به میزان زیادی در سیستم‌های عصبی محیطی و مرکزی وجود دارد. این آنزیم را اولین بار در سال ۱۹۳۸ ناخمنزون و لدرر، کشف کردند و از ماهی مرکب (*Torpedo marmurata*) به صورت یک عصاره خام استخراج گردید (۲). استیل‌کولین‌استراز در بافت‌های عصبی و عضلانی از تعدادی ایزوآنزیم‌ها تشکیل شده است که به اشکال مختلف مونومر، دایمر، تترامر و کمپلکس می‌باشند که در این تحقیق، بر فرم مونومر داکینگ انجام گرفت (۳). اغلب اطلاعات به دست آمده در مورد این آنزیم، شامل استیل‌کولین‌استرازهای تخلص شده از مارماهی الکتریکی، موش، خرگوش و مرغ هستند (۴).

Thymus vulgaris یا آویشن باغی، از خانواده نعناعیان بومی نواحی شرقی مدیترانه می‌باشد. آویشن باغی، گیاهی چندساله با بوته‌های مترکم با ارتفاع بین ۲۰ تا ۵۰ سانتی‌متر است. آویشن که به اسانس تیم (Thyme) معروف است دارای فنل‌هایی مثل تیمول و کارواکرول و نیز سیمن، لینالول، پینن و دیگر ترکیبات است (۵). تیمول و کارواکرول، مهم‌ترین اجزای اسانس هستند که اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی قوی دارند. در آویشن، مواد چرب، رنگی، رزین، منگنز فراوان و ویتامین‌های A، B و E وجود دارد. همچنین دارای اسانس موسوم به اسانس سرپوله می‌باشد که یک ماده ضدعفونی‌کننده قوی است (۶). تیمول موجود در گیاه، سبب تحریک سیستم عصبی مرکزی، تقویت اعصاب و قوای فکری در انسان می‌شود (۷).

نرم‌افزارهای محاسباتی، یک روش جدید می‌باشد که پیدایش و عمومیت آن با پیشرفت قدرت محاسبات طی چندین دهه اخیر، همراه بوده است؛ به طوری که همراه با دیگر روش‌ها برای درک واکنش‌ها و فرایندهای بیوشیمیایی استفاده می‌شود. روش‌های محاسباتی برای بیان و پیشگویی نحوه اتصال لیگاند به گیرنده، ارزیابی اختلاف انرژی بین حالت‌های مختلف و توضیح مسیرها و مکانیسم‌های واکنش در سطح اتمی می‌باشد (۸-۱۰). در این

جدول ۱. نام و جزئیات ساختاری ترکیبات مورد مطالعه

 Thymol	 Carvacrol	 Cymene
 Linalool	 Gamma-Terpinen	 Borneol
 Caryophyllene	 Thymol acetate	 Alpha-Terpinene
 Alpha-pinene	 Myrcene	 Terpinen-4-ol
 Camphene	 Limonene	 Carvacrol acetate
 Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5-Beta-ol	 Alpha-Thujene	 Sabinene hydrate
 Alpha-Humulene	 Beta-pinene	 Alpha-Terpineol
 Alpha-Phllandrene	 Trans-Linalool oxide	 Aromadendrene
	 Piperitone	

۲.۲. انجام داکینگ مولکولی

به منظور دستیابی به نحوه اتصال ترکیبات مورد مطالعه با

جایگاه فعال آنزیم، از داکینگ مولکولی استفاده شد. برای داکینگ مهارکننده‌ها از اندازه باکس $40 \times 40 \times 40$ استفاده شد. به منظور

الکلی). مخلوط حاصل را درون انکوباتور شیکردار با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm قرار دادیم تا به طور کامل، یکنواخت شود. وضعیت عصاره، طی روزهای متوالی بررسی و در روز دوازدهم عصاره‌گیری، عصاره از درون انکوباتور شیکردار خارج شد. لایه پودری (فاز رویی) با استفاده از تیغ اسکالپ، جداسازی و درون میکروتیوب استریل، ریخته شد. سپس با ورق آلومینیوم و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۱).

در این مطالعه، به منظور سنجش قدرت مهارکنندگی عصاره بر روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز، از روش المن و همکاران استفاده شد. عصاره در چهار غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت و از گالاتامین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای این آزمون، از دستگاه اسپکتروفوتومتری در حجم کل ۶۰۰ میکرولیتر استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات (pH=۸)، ۵۰ میکرولیتر از عصاره محلول در بافر، ۵۰ میکرولیتر از آنزیم استیل کولین استراز (U/Ml) ۰/۲۲ (محلول در بافر) و ۲۵۰ میکرولیتر از DTNB ۳ میلی‌مولار (محلول در بافر)، در کووت مورد نظر ریخته شد. برای شروع واکنش، ۵۰ میکرولیتر سوپسترا (ATCI 15mM) به مخلوط فوق اضافه شد. سپس جذب آن، در طول موج ۴۰۵ نانومتر، قرائت شد. سنجش‌ها با سه بار تکرار انجام شد (۱۲).

۳. یافته‌های پژوهش

سنجش اولیه آنزیم در فقدان عصاره، صورت گرفت و میانگین مقدار جذب در ۳ بار تکرار در حضور عصاره انجام شد و از طریق فرمول زیر درصد مهارتی آنزیم محاسبه شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار prism مقدار عددی IC₅₀ که بیان‌کننده میزان غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم را مهار کند، تعیین شد.

$$100 \times \frac{\text{نمونه جذب} - \text{کنترل جذب}}{\text{کنترل جذب}} = \text{درصد مهارتی}$$

در ابتدا برای اعتبارسنجی عملیات داکینگ، مولکول کوکریستال دونیزیل از جایگاه فعال، آنزیم استیل کولین استراز برداشته شد و مجدد مورد داکینگ قرار گرفت. در شکل ۱ نتایج بررسی نرم‌افزار Discovery Studio نشان داده شده است. پس از اعتبارسنجی پروتکل داکینگ، ساختار سه‌بعدی ترکیبات مهارکننده به داخل جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز داک شدند. نتایج نشان می‌دهد که مولکول‌های فعال در فضای مشابه با دونیزیل قرار می‌گیرند. داده‌های مربوط به تغییرات انرژی آزاد، انرژی درون مولکولی، انرژی الکترواستاتیک، انرژی کل درونی، انرژی پیچشی، پیوندهای هیدروژنی و انواع برهم‌کنش‌های π در

به‌دست آوردن اندازه مناسب باکس برای هر مهارکننده، از نرم‌افزار DS Visualizer 3.5 استفاده شد. به این ترتیب که دورترین دو نقطه در مهارکننده، انتخاب و سپس فاصله آن‌ها محاسبه شد و در نهایت ۴ برابر فاصله به‌دست‌آمد. در این مرحله، به منظور چرخش آزادانه مهارکننده در جایگاه فعال، بیشترین عدد، انتخاب می‌شود. Point spacing عدد ۰/۳۷۵ (معادل یک‌چهارم طول پیوند کربن-کربن) انتخاب شد.

۲.۲. مشاهده و آنالیز نتایج داکینگ

پس از انجام عملیات داکینگ، نتایج؛ شامل کنفورماسیون‌های ترکیب، خوشه‌ها، انرژی اتصال لیگاندها (ΔG_{bind})، انرژی درونی مولکول، انرژی الکترواستاتیک، انواع برهم‌کنش‌های لیگاند با پروتئین شامل برهم‌کنش‌های هیدروژنی، برهم‌کنش‌های هیدروفوبی، انواع برهم‌کنش‌های π توسط نرم‌افزارهای DS Visualizer 3.5، Autodock tools و Ligplot تجزیه و تحلیل شد.

۴.۲. روش آزمایشگاهی

۴.۲.۱. مواد شیمیایی

آنزیم استیل کولین استراز (ACHE) از مارماهی الکتریکی (نوع VI-S)، استیل تیوکولین‌یدید (ATCI)، دی‌تیوبیس‌نیتروبنزوتیک اسید (DTNB)، گالاتامین هیدروبروماید، از شرکت سیگما-آلدريج^۱، پتاسیم دی‌هیدروژن‌ارتوفسفات (KH₂PO₄) و اتانول و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک^۲ آلمان تهیه شدند.

۴.۲.۲. جمع‌آوری گیاه

لندام‌های هوایی گیاه آویشن باغی، از مناطق اطراف شهر بروجن جمع‌آوری شد و مورد تأیید کارشناس قرار گرفت. پس از شناسایی و رده‌بندی، گیاهان جمع‌آوری شده در سایه و دمای محیط آزمایشگاه، خشک شدند. پیش از تهیه پودر از گیاه مورد مطالعه، آن‌ها از لحاظ نظافت و آلوده نبودن به خاک یا سایر گیاهان، بررسی شدند. سپس به‌وسیله قیچی باغبانی، به قطعات کوچکی خرد شدند و به وسیله آسیاب خانگی مولینکس، به صورت پودر نرم درآمدند. پودر به‌دست‌آمده، پس از توزین، در ظروف درب‌دار پلاستیکی تا زمان عصاره‌گیری، در دمای اتاق نگهداری شد.

۴.۲.۳. تهیه عصاره آبی-الکلی

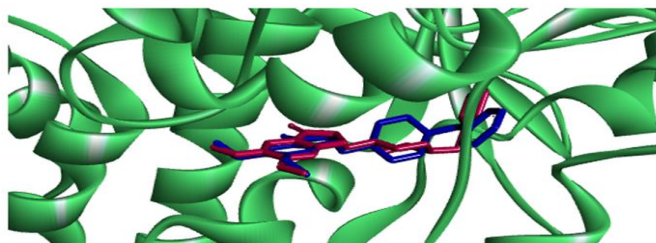
۱۰ گرم از پودر گیاه در مرحله آماده‌سازی، تهیه و پس از توزین با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۲۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق، مخلوط گردید (در مجموع ۴۰ میلی‌لیتر حلال آبی-)

میزان انرژی منفی باشد قدرت اتصال و تمایل، بیشتر است. سطح انرژی اتصال برای ترکیبات از مقدار عددی ۴/۱۲- تا ۶/۸۳- کیلوکالری بر مول بود.

تأثیر عصاره در چهار غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، بررسی شد. بررسی شیب غلظت عصاره نشان داد که در غلظت‌های پایین تر از ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، تأثیر مهار مشاهده نشد و در غلظت‌های بالای ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، میزان مهار، تغییری نداشت. از طرفی، برای بررسی دقیق تر و مقایسه جزئی تر بین نتایج *in vitro* و *in silico* بهتر است که اجزای عصاره جدا شود و مورد ارزیابی قرار گیرند تا تأثیر عوامل دیگر، حذف گردد. نتایج آزمایشگاهی نشان دادند میزان IC₅₀ آنزیم استیل کولین استراز برابر با ۲/۰۳ mg/ml بوده است و بیشترین مهار آنزیم با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر با درصد مهار ۴۶/۹۹ می باشد.

جدول ۲ آورده شده است. در جدول ۳ کلیه برهم کنش‌های هیدروفوبی، بیان شده است.

با بررسی دقیق ساختار ترکیبات که در جدول ۱ آورده شده است کاملاً مشخص است که ترکیبات موجود در عصاره علاوه بر بخش‌های آبگریز مانند گروه‌های هیدروکربنی، بخش‌های آب دوست مانند مویت هیدروکسیل و کربونیل دارد. در جدول ۲ و ۳ پیوندهای متعدد هیدروژنی و هیدروفوبی که ترکیبات عصاره قادر به تشکیل آن بودند بیان شده است. عوامل آبگریز با آمینواسیدهای آبگریز تریپتوفان، فنیل آلانین، تیروزین و والین که در جایگاه فعال است پیوند هیدروفوب قوی برقرار می کنند و عوامل آب دوست نیز برهم کنش‌های قوی هیدروژنی در سایت فعال آنزیم استیل کولین استراز ایجاد می کنند. انرژی اتصال که در جدول ۲ آورده شده است بیانگر تمایل مهارکننده به اتصال به جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز می باشد که هر چقدر این



شکل ۱. داکینگ مجدد لیگاند دونپزیل در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز

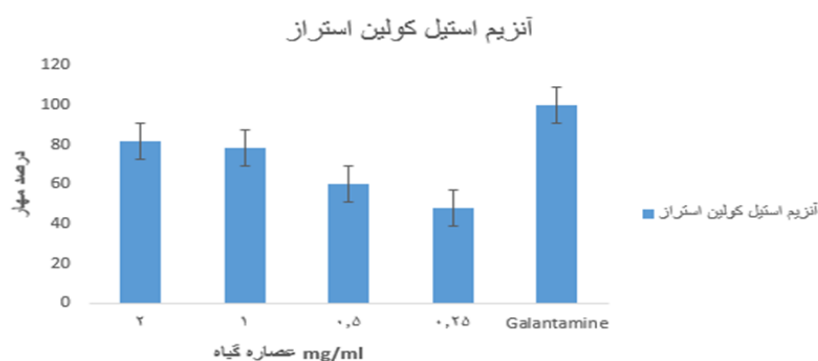
جدول ۲. برهم کنش‌های موجود بین ترکیبات مورد مطالعه و اسید آمینه‌های جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز و انرژی ترکیبات داک شده (واحد انرژی تمامی داده‌ها kcal/mol است)

Compound	Binding enrgy	Intermol enrgy	Electro static enrgy	Total internal	Torsional enrgy	H-Band	Pi Interactions
Thymol	-5	-5.59	-0.22	-0.14	0.6	Phe295 Arg296	-
Carvacrol	-5.28	-5.57	-0.13	-0.13	0.3	Phe295	-
Cymen	-4.71	-4.71	-0.01	0.0	0.0	---	-
Linalool	-4.98	-5.88	-0.22	0.1	0.89	Phe295	-
γ -Terpinen	-4.46	-4.75	-0.01	-0.11	0.3	---	-
Borneol	-4.85	-5.15	-0.22	0.03	0.3	Phe295 Arg296	-
Caryophyllene	-6.54	-6.54	0.0	0.0	0.0	-	Trp286 (Pi-Sigma)
Thymol acetate	-5.53	-6.42	-0.16	-0.34	0.89	Phe295 Arg296	-
α -Terpinene	-5.15	-5.15	-0.02	0.0	0.0	-	-
α -pinene	-4.88	-4.88	0.0	0.0	0.0	-	Tyr341 (Pi-Sigma)
Myrcene	-4.12	-5.01	-0.01	-0.2	0.89	-	-
Terpinen-4-ol	-4.81	-5.11	-0.13	0.02	0.3	Phe295	Tyr341 (Pi-Sigma)
Camphene	-4.86	-4.86	0.01	0.0	0.0	-	-
Limonene	-5.04	-5.04	0.0	0.0	0.0	-	-
Carvacrol acetate	-5.73	-6.03	-0.06	-0.17	0.3	Phe295 Arg296	-
Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- β -ol	-6.03	-6.33	-0.26	0.05	0.3	Ser203 Val294 Phe295 Arg296	-
α -Thujene	-5.54	-5.54	-0.01	0.0	0.0	---	-
Sabinene hydrate	-4.86	-5.16	-0.24	-0.12	0.3	Phe295	-

α -Humulene	-5.45	-5.45	-0.01	0.0	0.0	-	-
β -Pinene	-4.78	-4.78	0.0	0.0	0.0	-	Tyr341 (Pi-Sigma)
α -Terpineol	-5.45	-5.45	-0.22	0.0	0.0	Tyr124	-
α -Phellandrene	-5.06	-5.06	0.0	0.0	0.0	-	-
Trans-Linalool oxide (Furanoid)	-5.23	-6.13	-0.41	-0.14	0.89	-	Tyr341 (Pi-Sigma)
Aromadendrene	-6.83	-6.83	0.01	0.0	0.0	-	Trp286 (Pi-Sigma)
Piperitone	-5.32	-5.62	-0.08	0.0	0.3	Phe295	-

جدول ۳. برهم کنش پیوندهای هیدروفوبی ترکیبات مورد مطالعه

Compound	Hydrophobic Interactions
Thymol	Arg296-Phe338-Phe295-Val294-Tyr124-Phe297-Tyr341-Trp286-Ser293
Carvacrol	Phe295-Val294-Phe338-Tyr337-Tyr341-Tyr124-Trp286-Phe297-Arg296
Cymen	Phe338-Tyr341-Ser293-Phe295-Arg296-Val294-Trp286-Phe297
Linalool	Phe295-Tyr341-Tyr337-Phe297-Tyr124-Phe338-Trp286-Ser293-Val294-Arg296
γ -Terpinen	Trp286-Val294-Arg296-Phe338-Tyr341-Tyr124-Phe297-Phe295
Borneol	Arg296-Phe297-Phe295-Tyr124-Trp286-Ser293-Tyr341-Val294-Phe338
Caryophyllene	Val294-Ser293-Tyr72-Trp286-Tyr124-Tyr341-Phe338-Phe297-Phe295
Thymol acetate	Arg296-Trp286-Tyr72-Tyr341-Tyr124-Ser293-Phe297-Phe338-Phe295-Val294-Leu289
α -Terpinene	Ser293-Phe295-Arg296-Tyr341-Phe338-Tyr124-Phe297-Trp286-Val294
α -pinene	Phe338-Phe295-Tyr341-Phe297-Arg296-Trp286-Val294-Tyr124
Myrcene	Trp286-Tyr341-Tyr337-Phe338-Phe297-Phe295-Val294-Arg296
Terpinen-4-ol	Phe295-Val294-Ser293-Arg296-Phe297-Trp286-Tyr124-Phe338-Tyr341
Camphene	Arg296-Tyr124-Tyr341-Phe297-Val294-Phe295-Phe338-Trp286
Limonene	Tyr341-Phe295-Phe338-Arg296-Val294-Ser293-Trp286-Phe297-Tyr124
Carvacrol acetate	Arg296-Phe295-Val294-Trp286-Asp74-Tyr72-Tyr341-Tyr124-Phe297-Phe338-Ser293
Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- β -ol	Arg296-Ser293-Phe297-Trp286-Tyr341-Leu289-Val294-Phe295
α -Thujene	Phe297-Tyr341-Val294-Trp286-Tyr124-Arg296-Phe295-Ser293-Phe338
Sabinene hydrate	Phe295-Val294-Ser293-Arg296-Trp286-Tyr124-Phe297-Asp74-Tyr341-Phe338
α -Humulene	Trp286-Arg296-Val294-Ser293-Tyr124-Tyr341-Phe338-Phe297-Phe295
β -Pinene	Arg296-Trp286-Phe297-Val294-Phe295-Tyr124-Tyr341-Phe338
α -Terpineol	Tyr124-Trp286-Arg296-Phe295-Val294-Ser293-Phe338-Tyr341-Phe297
α -Phellandrene	Arg296-Trp286-Ser293-Val294-Tyr341-Phe295-Tyr124-Phe338-Phe297
Trans-Linalool oxide (Furanoid)	Phe295-Arg296-Val294-Ser293-Tyr124-Phe297-Tyr337-Phe338-Tyr341
Aromadendrene	Asp74-Tyr341-Trp286-Tyr72-Phe297-Arg296-Val294-Tyr124-Phe295-Phe338
Piperitone	Phe295-Arg296-Ser293-Trp286-Tyr124-Phe297-Tyr341-Val294-Phe338



شکل ۲. درصد مهار آویشن باغی در غلظت‌های مختلف

استیل کولین استراز می‌شوند اهمیت زیادی دارد؛ زیرا می‌تواند منجر به شناسایی مهارکننده‌های جدید و قوی‌تر و در عین حال، با تأثیرات جانبی کمتر شود (۱۳).
نتایج حاصل از داکینگ نشان داد که ترکیبات آویشن باغی مورد مطالعه می‌توانند به جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز

۴. بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات انجام شده بر گیاهان در مناطق مختلف جهان، منجر به معرفی مهارکننده‌های جدیدی شده است؛ بنابراین، تحقیق در مورد گیاهانی که به صورت لنتخلبی، باعث مهار

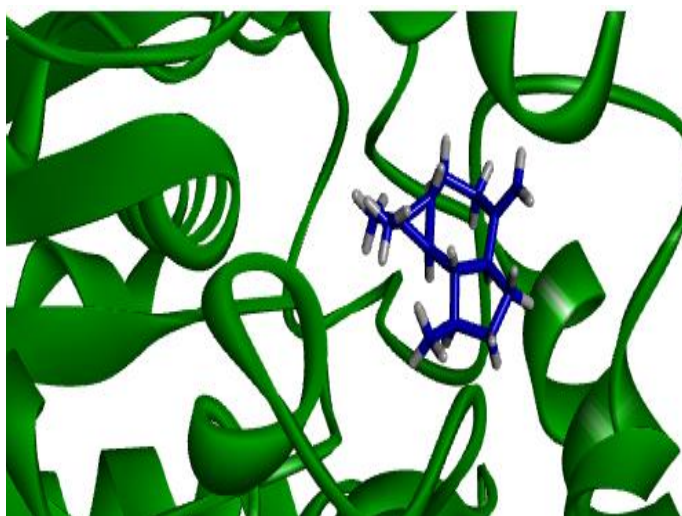
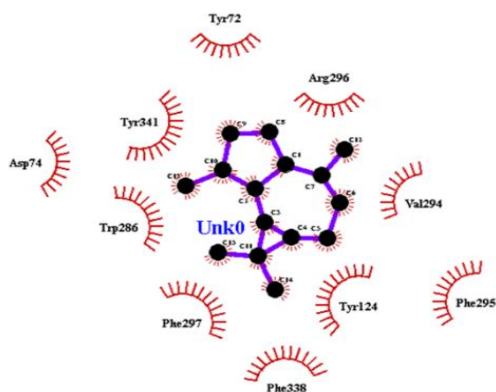
آنزیم استیل کولین استراز را مهار می کند و در جایگاه فعال برهم کنش فلزی برقرار می کند. Fang و همکاران (۲۰۱۴) انجام نشان دادند که مشتقات Genistein، بازدارنده آنزیم استیل کولین استراز هستند که با اسیدهای آمینه Tyr₁₂₄، Val₂₉₄ پیوند هیدروژنی برقرار می کنند (۱۸). همان طور که در جدول های ۲ و ۳ مشخص است بیشتر ترکیبات موجود در عصاره، قادر به ایجاد پیوند هیدروفوبی یا هیدروژنی با این دو اسید آمینه هستند. این دو اسید آمینه در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز قرار دارند. از دیگر مهارکننده هایی که برای مهار آنزیم استیل کولین استراز مورد مطالعه قرار گرفته Benzothiazole-piperazines می باشد. این ترکیب همانند دونپزیل عمدتاً با اسید آمینه Phe₂₉₅ در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می کند (۱۹).

آمینواسیدهای Tyr₇₂، Trp₂₈₆، Tyr₃₄₁، Asp₇₄، His₄₄₇، Glu₃₃₄، Ser₂₀₃، Tyr₁₂₄ در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز قرار دارند (۲۱-۱۸). از بین این اسید آمینه ها، دونپزیل و مشتقات گیاهی آویشن باغی با آمینواسیدهای Trp₂₈₆، Tyr₃₄₁، Tyr₇₂، Asp₇₄، Tyr₁₂₄، Ser₂₀₃ در تشکیل پیوند هیدروژنی و هیدروفوبی شرکت می کنند.

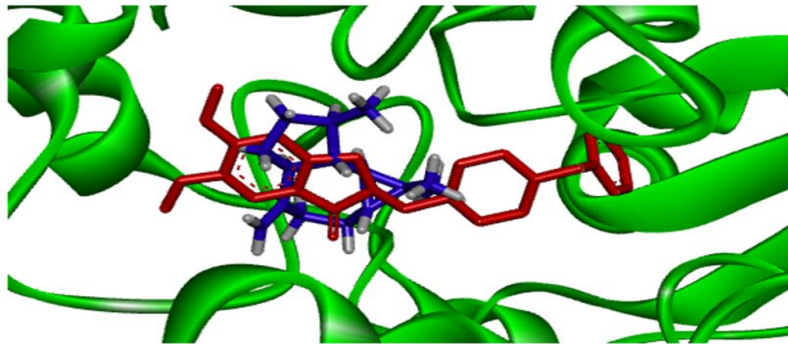
بنابراین می توان نتیجه گرفت بیشتر ترکیبات موجود در آویشن باغی با پتانسیل مهاری خوبی قادر بودند آنزیم استیل کولین استراز را مهار کنند و با آمینواسیدهای کلیدی جایگاه فعال که با مهارکننده های دیگر نیز مشترک بود، پیوندهای مختلف هیدروژنی، هیدروفوبی یا سیگما برقرار کنند.

متصل و موجب مهار این آنزیم گردند. براساس نتایج داکینگ، پتانسیل مهاری ترکیبات مورد مطالعه با هم فرق می کنند و سطح انرژی اتصال از ۴/۱۲- تا ۶/۸۳- می باشد. بیشترین پتانسیل مهاری مربوط به ترکیب Aromadendrene و کمترین انرژی اتصال مربوط به ترکیب Myrcene است. ترکیب Aromadendrene با آمینواسیدهای Asp₇₄، Trp₂₈₆، Tyr₃₄₁، Tyr₇₂، Phe₂₉₇، Arg₂₉₆، Val₂₉₄، Tyr₁₂₄، Phe₂₉₅، Phe₃₃₈ در تشکیل پیوندهای هیدروفوب شرکت می کند.

در مطالعه تلبت، نشان داده شد که ROS (گونه های رادیکال های آزاد اکسیژن) در آسیب های سیستم عصبی مرتبط با پیری مانند آلزایمر، نقش مهمی دارد (۱۴). بیماری آلزایمر، منجر به افزایش پروتئین تائو و β آمیلوئید در مغز می شود و افزایش شکل گیری β آمیلوئید موجب افزایش فرایند التهاب و ایجاد رادیکال های آزاد می گردد. افزایش رادیکال های آزاد، به تدریج، سطح MDA (مالون دی آلدئید) و پراکسیداسیون لیپیدی را در سلول های عصبی افزایش می دهد که می تواند به مرگ سلولی منجر شود (۱۵). در تحقیق قریب، نشان داده شد که عصاره آویشن باعث کاهش استرس اکسیداتیو، آسیب عصبی هیپوکامپ (که پس از ایسکمی مغزی است) می شود. همچنین این گیاه، ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم و مغز را افزایش می دهد و سطح MDA سلول های عصبی را کاهش می دهد (۱۶). در مطالعه Luo و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده شد که دونپزیل در *in vitro* با رنج IC₅₀ برابر ۰/۰۵ ± ۰/۰۳۵ میکرومولار، قادر به مهار آنزیم استیل کولین استراز بود (۱۷). در مطالعه داکینگ نیز این مهارکننده با انرژی اتصال ۷/۶۲ Kcal/mol- به خوبی



شکل ۳. نتایج داکینگ ترکیب Aromadendrene با منفی ترین پتانسیل مهاری همراه با آمینواسیدهایی که در تشکیل پیوندهای هیدروفوبی شرکت دارند



شکل ۴. نتایج داکینگ ترکیب Aromadendrene (مولکول با رنگ آبی) با لیگاند کوکریستال تروپولن (مولکول با رنگ قرمز) نشان می‌دهد که موقعیت قرارگیری دو مولکول در جایگاه فعال آنزیم، یکسان است

نتایج کلی نشان می‌دهد که عصاره آبی-الکلی گیاه آویشن باغی دارای خاصیت مهارکنندگی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز است. نظر به اینکه این گیاه دارای ترکیبات فنلی است که یک گروه متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به طور گسترده، در سراسر گیاه پخش شده‌اند و تأثیرات بیولوژیکی متعددی چون فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی دارند (۲۵).

آویشن محتوی ۰/۸ تا ۲/۶ درصد (معمولاً ۱ درصد) اسانس است که قسمت اعظم آن را فنل‌ها (۲۰ تا ۸۰ درصد)، هیدروکربن‌های مونوترپنی (مثل cymene و terpinen) و الکل‌ها (مثل linalool و a-terpinene) تشکیل می‌دهد که گاهی هر کدام از این ترکیبات تا ۸۰ درصد (یا بیشتر) از ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند (۲۶).

شاید بتوان این ترکیبات را عامل اصلی تأثیرات مهارتی گیاهان دانست ولی اثبات این امر، نیاز به AChE این جنس روی آنزیم به خالص‌سازی ترکیبات و بررسی تأثیرات آن‌ها دارد. از آنجایی که ترکیبات عصاره گیاهی توانستند تأثیر مهارتی خود را بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مطالعات بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی اعمال کنند و با استناد به دریافت چنین پاسخ مهارتی در شرایط *in vivo* می‌توان مسیر پروژه را به سمت طراحی دارو و درمان بیماری آلزایمر سوق داد.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران این مطالعه، مراتب تشکر و سپاس خود را از جناب آقای دکتر زمانی و اعضای هیئت مؤسس مؤسسه آموزش عالی نور دانش اعلام می‌دارند.

رافائل و همکاران، فعالیت مهاری یک آلکالوئید استخراج شده از دلنه گیاه *Physostigma venenosum* را بررسی کردند. نتایج نشان داد که فیزوستیگمین از هیدرولیز استیل کولین به وسیله استیل کولین استراز، جلوگیری می‌کند و در نتیجه، با افزایش سطح استیل کولین در سیناپس عصبی، انتقال تکان‌های عصبی در محل اتصال عصب-عضله را تسهیل می‌کند (۲۲).

همچنین ناجی ثابت و همکاران مطالعه‌ای درباره بر گیاه *Ferula* از تیره چتریان داشتند که برخی از گونه‌های آن شامل *F. Hezaralezarica*, *F. hirtella*, *F. oopoda*, *F. ovina* و *F. persica* var. *Persica* و *F. szowitsiana* در رفع بیماری‌ها با منشأ عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبات نسبتاً غیرقطبی گیاه *F. persica* var. *Persica* دارای تأثیرات مهارکنندگی استیل کولین استراز می‌باشد. با توجه به وجود سزکویی‌ترین کومارین‌ها به عنوان ترکیبات شاخص این گونه گیاهی، این ترکیبات، منشأ اصلی مهار استیل کولین استراز است که از کاهش استیل کولین در بیماری آلزایمر جلوگیری می‌کند (۱۴). پژوهش‌های بسیاری در زمینه یافتن ترکیبات جدید با منشأ گیاهی انجام شده است.

تاکرین و دونیزیل، از مهارکننده‌های غیررقابتی و برگشت‌پذیر استیل کولین استراز هستند که در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) است و قدرت نفوذ کافی به CNS دارد و روی بافت‌های محیطی تأثیر کمی دارد و باعث افزایش استیل کولین خارج سلولی می‌شود و نتایج خوبی در درمان بیماری آلزایمر و تقویت حافظه دارد (۲۳). درمان اولیه و حالت متوسط آلزایمر، اکثراً براساس استفاده از مهارکننده‌های آنزیم استیل کولین استراز، از جمله دونیزیل (Donepezil) سنتزی و گالانتامین (Galanthamine) استخراج شده از گیاه *Galanthus nivalis* و موارد مشابه می‌باشد (۲۴).

References

- [1]. Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM. Astroglialosis: an integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 2016;144:121-41.
- [2]. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001;2(4):294.
- [3]. Rochais C, Lecoutey Cd, Gaven F, Giannoni P, Hamidouche K, Hedou D, et al. Novel multitarget-directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(7):3172-87.
- [4]. Santillo MF, Liu Y. A fluorescence assay for measuring acetylcholinesterase activity in rat blood and a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2015;76:15-22.
- [5]. Hosseinzadeh S, Jafarikukhdan A, Hosseini A, Armand R. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*. 2015;6(09):635-42.
- [6]. Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, Plessas S, Theodoridou I, Papaemmanouil V, et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial ecology in health and disease*. 2015;26(1):23289.
- [7]. Nemati Z, Barzegar R, Khosravinezhad M, Talebi E, Safaei HR. Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris* essential oil. *Advanced Herbal Medicine*. 2017;3(2):26-32.
- [8]. Asadzadeh A, Fassih A, Yaghmaei P, Pourfarzam M. Docking studies of some novel kojic acid derivatives as possible tyrosinase inhibitors. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2015;8(2):535-45.
- [9]. Asadzadeh A, Fassih A, Yaghmaei P, Pourfarzam M. In silico approach for designing potent inhibitors against tyrosinase. *Biotech Res Asia*. 2015;12.
- [10]. Asadzadeh A, Sirous H, Pourfarzam M, Yaghmaei P, Afshin F. In vitro and in silico studies of the inhibitory effects of some novel kojic acid derivatives on tyrosinase enzyme. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2016;19(2):132.
- [11]. Komaki A, Hoseini F, Shahidi S, Baharlouei N. Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2016;6(3):257-61.
- [12]. Esmaili S, Ara L, Hajimehdipoor H, Kolivand H, Mohammadi Motamed S. Acetylcholinesterase inhibitory effects of some plants from Rosaceae. *RJP*. 2015;2(4):33-7.
- [13]. Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Dua TK. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015;5(2):75-84.
- [14]. Tabet N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! Age and ageing. 2006;35(4):336-8.
- [15]. Qiang W, Yau W-M, Lu J-X, Collinge J, Tycko R. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature*. 2017;541(7636):217.
- [16]. GHARIB NMK. Effect of *Zataria multiflora* Boiss leaf hydroalcoholic extract on rat ileum. 2003.
- [17]. Luo W, Yu Q-s, Kulkarni SS, Parrish DA, Holloway HW, Tweedie D, et al. Inhibition of human acetyl- and butyrylcholinesterase by novel carbamates of (-)- and (+)-tetrahydrofurobenzofuran and methanobenzodioxepine. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49(7):2174-85.
- [18]. Fang J, Wu P, Yang R, Gao L, Li C, Wang D, et al. Inhibition of acetylcholinesterase by two genistein derivatives: kinetic analysis, molecular docking and molecular dynamics simulation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2014;4(6):430-7.
- [19]. Anand P, Singh B, Singh N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2012;20(3):1175-80.
- [20]. Cao Y, Himmeldirk KB, Qian Y, Ren Y, Malki A, Chen X. Biological and biomedical functions of penta-O-galloyl-D-glucose and its derivatives. *Journal of natural medicines*. 2014;68(3):465-72.
- [21]. Hosseini SA, Moghimi A, Iman M. Design and Docking Study of Novel Oximes as Reactivators of Inhibited Acetylcholinesterase with Nerve Agents. *Journal Mil Med*. 2018;20(2):170-80.
- [22]. Asthana S, Raffaele KC, Berardi A, Greig NH, Haxby JV, Schapiro MB, et al. Treatment of Alzheimer disease by continuous intravenous infusion of physostigmine. *Alzheimer disease and associated disorders*. 1995.
- [23]. Ismaili L, Refouvet B, Benchekroun M, Brogi S, Brindisi M, Gemma S, et al. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*. 2017;151:4-34.
- [24]. Khonakdari MR, Mirjalili MH, Gholipour A, Rezadoost H, Farimani MM. Quantification of galantamine in *Narcissus tazetta* and *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) populations growing wild in Iran. *Plant Genetic Resources*. 2018;16(2):188-92.
- [25]. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology and medicine*. 2004;36(7):838-49.
- [26]. Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food chemistry*. 2015;173:339-47.

Study the Effect of Thymus Vulgaris In Inhibiting Acetylcholinesterase Enzyme in Order To Treat Alzheimer's Disease

Naderi M.¹, Asadzadeh A.^{2*}, Heidaryan Naeini F.³

1. MSc of biochemistry, Department of biology, faculty of science, Nour Danesh institute of higher education, Meymeh, Isfahan, Iran
2. PhD of biochemistry, Department of biology, faculty of science, Nour Danesh institute of higher education, Meymeh, Isfahan, Iran
3. Assistant Professor, Department of biology, faculty of science, Nour Danesh institute of higher education, Meymeh, Isfahan, Iran

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease is the most common cause of dementia in the elderly and is characterized by loss of memory and other cognitive functions. The acetylcholinesterase enzyme (ACHE) with hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine in the cholinergic synapses of the brain plays a role in ending the neural message. One of the methods used to control the progression of Alzheimer's disease is the administration of cholinesterase inhibitors, especially plant- originated medicines. The aim of this study was to study bioinformatics and obtain the level of inhibitory effect of acetylcholinesterase enzyme by hydro-alcoholic extract of aerial organs of Thymus vulgaris.

Materials and Methods: In order to investigate how the compounds are attached to the active site of the enzyme, first, Docking studies were conducted using AutoDock 4.2 software, the hydro-alcoholic extract of Thymus vulgaris was measured at concentrations 2, 1, 0.5, 0.25 mg/ml in order to determine its inhibitory effect on acetylcholinesterase.

Results: The compounds present in the extract were able to occupy the active site of the enzyme with a binding energy level of -4.12 to -6.58 kcal / mol. According to the laboratory results, concentrations of 2mg/ml were 46.99% and $IC_{50} = 2.03$ mg/ml.

Conclusion: The results of in silico and in vitro studies indicate that the extract of this plant contains effective inhibitory compounds, and trying to use these compounds is a suitable topic for future research with the aim of acquiring pharmacologically inhibitors.

Received: 2019/04/15

Accepted: 2019/05/20

Keywords: Alzheimer's disease, molecular docking, Ellman method, acetylcholine esterase enzyme, Thymus vulgaris