JAER

2026, 2(4): 57-64

*Journal of Animal Environmental Reaserch*

Journal homepage: http://www.journalaer.com

***Research Article***

# Experimental and bioinformatic investigation of the anticholinesterase effect of honey bee venom

***Mohammad Kazem Aslani [1], Safa Lotfi [1*], Elham Rezvannejad [1], Abbas Zare Mirakabadi [2], Masoud Torkzadeh Mahani [1]***

*[1] Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran*

*[2] Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran*

**Key Words**

Alzheimer's disease
Anticholinesterase activity
Honey bee venom
Protein-protein docking
HADDOCK server

## Abstract

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly, characterized as a progressive neurodegenerative disorder. One of the primary strategies employed to achieve a relative improvement in AD symptoms is the administration of cholinesterase inhibitors (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase). Natural compounds, such as extracts from plants, fungi, algae, and animal venoms, contain various bioactive compounds that are of significant importance for drug discovery in many diseases, including AD, due to their low side effects and appropriate efficacy. Honey bee venom is a natural substance with diverse active compounds exhibiting a wide range of biological properties, and it has demonstrated therapeutic effects against various diseases, including Alzheimer's.

**Materials & Methods:** In this study, the cholinesterase inhibitory potential of honey bee venom was investigated using the Elman assay. Subsequently, the binding sites of the most important peptidic and protein components of honey bee venom (melittin, apamin, mast cell degranulating peptide (MCD), phospholipase A2, hyaluronidase) on acetylcholinesterase were predicted using the HADDOCK protein-protein docking simulation server. The LigPlot software was utilized for analyzing the obtained results.

**Results:** The results indicated that honey bee venom exhibited a significantly better inhibitory effect on acetylcholinesterase, the primary cholinesterase, compared to butyrylcholinesterase. The simulation results revealed that melittin, MCD, and hyaluronidase could form hydrogen bonds with certain amino acid residues within the peripheral anionic site (PAS) of the enzyme. This interaction not only inhibits enzyme activity but also prevents the formation and aggregation of amyloid-beta.

**Conclusion:** Among the studied compounds, melittin, the main and most abundant component of honey bee venom, showed the best binding energy. Collectively, the findings of this study suggest that honey bee venom is a suitable candidate for the identification, design, and introduction of novel anticholinesterase drugs for the treatment of Alzheimer's disease.

**Article info**

* Corresponding Author's email:
s.lotfi@kgut.ac.ir,
lotfisafa1@gmail.com

Received: 29 January 2026
Reviewed: 4 March 2026
Revised: 6 May 2026
Accepted: 9 June 2026

[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]

## مقاله پژوهشی

# بررسی آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی اثر آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور عسل

*محمد کاظم اصلانی[1]، صفا لطفی[1*]، الهام رضوان‌نژاد[1]، عباس زارع میرک‌آبادی[2]، مسعود ترکزاده‌ماهانی[1]*

[1] گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

[2] موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

**کلمات کلیدی**

بیماری آلزایمر
اثر آنتی‌کولین‌استرازی
زهر زنبور عسل
داکینگ پروتئین- پروتئین
سرور HADDOCK

## چکیده

**مقدمه:** بیماری آلزایمر رایج‌ترین شکل زوال عقل در سالمندان است که نوعی اختلال تحلیل برنده اعصاب پیش‌رونده است. یکی از اصلی‌ترین استراتژی‌های مورد استفاده برای بهبود نسبی علائم بیماری آلزایمر، تجویز مهارکننده‌های آنزیم‌های کولین‌استراز (استیل‌کولین‌استراز و بوتیریل‌کولین‌استراز) است. ترکیبات‌طبیعی مثل عصاره گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها و سموم جانوران دارای انواعی از ترکیبات فعال زیستی هستند که به‌دلیل عوارض کم و اثرگذاری مناسب، از اهمیت ویژه‌ای برای کشف دارو برای بسیاری از بیماری‌ها نظیر آلزایمر برخوردار هستند. زهر زنبورعسل یک ماده طبیعی با انواعی از ترکیبات فعال با خواص زیستی بسیار متنوع است که در مقابله با بیماری‌های مختلفی مثل آلزایمر اثرات درمانی از خود نشان داده است.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، توانایی زهر زنبور در مهار آنزیم‌های کولین‌استراز با روش المن مورد بررسی قرار گرفت. سپس جایگاه اتصال مهم‌ترین اجزای پپتیدی و پروتئینی زهر زنبور (ملیتین، آپامین، پپتید دگرانوله کننده ماست سل: MCD، فسفولیپاز A2، هیالورونیداز) بر روی آنزیم استیل‌کولین‌استراز با استفاده از سرور شبیه‌سازی داکینگ پروتئین-پروتئین HADDOCK پیش‌بینی و از نرم‌افزار LigPlot به‌منظور آنالیز نتایج به‌دست آمده استفاده شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد اثر مهاری زهر زنبور روی آنزیم استیل‌کولین‌استراز که کولین‌استراز اصلی است بسیار بهتر از بوتیریل کولین‌استراز است. نتایج شبیه‌سازی نشان‌داد پپتیدهای ملیتین، MCD و آنزیم هیالورونیداز می‌توانند با برخی از بنیان‌های آمینواسیدی جایگاه آلوستریک آنیونی محیطی (PAS) آنزیم، پیوند هیدروژنی تشکیل دهند و بدین‌ترتیب علاوه بر مهار فعالیت آنزیم، از تشکیل و تجمع آمیلوئید بتا نیز جلوگیری کنند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** از بین ترکیبات مورد مطالعه، بهترین انرژی اتصال مربوط به پپتید ملیتین که اصلی‌ترین و فراوان‌ترین ترکیب زهر زنبور عسل است بود. در مجموع نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، نشان می‌دهد که زهر زنبور کاندیدای مناسبی به‌منظور شناسایی، طراحی و معرفی داروهای جدید آنتی‌کولین استراز برای درمان آلزایمر می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
s.lotfi@kgut.ac.ir,
lotfisafa1@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹ بهمن ١٤٠٤
تاریخ داوری: ۱۳ اسفند ١٤٠٤
تاریخ اصلاح: ١٦ اردیبهشت ١٤٠٥
تاریخ پذیرش: ۱۹ خرداد ١٤٠٥



[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]

## مقدمه

بیماری آلزایمر رایج‌ترین شکل زوال عقل در سالمندان است که نوعی اختلال تحلیل برنده اعصاب پیش‌رونده است که در نهایت به مرگ منجر می‌شود (۱، ۲). براساس فرضیه کولینرژیک پاتوژنز بیماری آلزایمر، ویژگی‌های بالینی زوال عقل مرتبط با این بیماری به کاهش سطح استیل‌کولین، یک انتقال‌دهنده عصبی درگیر در فرآیند حافظه و یادگیری، در هیپوکامپ و قشر مغز نسبت داده می‌شود (۳، ۴). دو نوع آنزیم کولین‌استراز در سیستم عصبی وجود دارد: استیل‌کولین استراز و بوتیریل‌کولین‌استراز. اگرچه هر دو آنزیم توانایی هیدرولیز استیل‌کولین را دارند، اما در مغز طبیعی، استیل‌کولین‌استراز آنزیم اصلی درگیر در متابولیسم استیل‌کولین محسوب می‌شود و فعالیت هیدرولیتیک آن بسیار بالاتر از بوتیریل‌کولین‌استراز است. یکی از رایج‌ترین استراتژی‌های درمانی مورد استفاده برای بهبود نسبی علایم بیماری آلزایمر، تجویز مهارکننده‌های آنزیم‌های کولین‌استراز است (۵، ۶، ۷). امروزه مطالعات فراوانی در سراسر جهان به‌منظور شناسایی مهارکننده‌های جدید آنزیم‌های کولین‌استراز با ویژگی‌های درمانی بهبود یافته و عوارض جانبی کمتر در جریان است. اگرچه بیشتر مهارکننده‌هایی که تا به امروز برای آنزیم‌های کولین‌استراز شناسایی شده‌اند ترکیبات شیمیایی کوچک هستند اما مطالعات نشان داده‌اند که این آنزیم‌ها می‌توانند توسط پپتیدها و برخی پلی‌ساکاریدها نیز مهار شوند(۸، ۹، ۱۰، ۱۱). ترکیبات طبیعی مثل عصاره گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها و سموم جانوران دارای انواعی از ترکیبات فعال زیستی هستند که به‌دلیل عوارض کم و اثرگذاری مناسب، از اهمیت ویژه‌ایی برای کشف دارو برای بسیاری از بیماری‌ها نظیر آلزایمر برخوردار هستند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). زهر زنبورعسل مخلوط پیچیده‌ای از پپتیدهایی مثل ملیتین، آپامین، پپتید گرانول کننده ماست‌سل (MCD)، آدولاپین، و آنزیم‌هایی مثل فسفولیپاز A2 ، فسفولیپاز B، هیالورونیداز و اجزای غیرپپتیدی مختلفی است که در مقادیر متفاوت در نمونه‌های مختلف یافت می‌شوند (۱۶، ۱۷). زهر زنبورعسل یک ماده طبیعی با انواعی از ترکیبات فعال با خواص زیستی بسیار متنوع است که در مقابله با بیماری‌های مختلفی نظیر بیماری‌های التهابی، دیابت، سرطان و بیماری‌های تحلیل برنده اعصاب (مثل آلزایمر) اثرات درمانی از خود نشان داده است (۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲). آپامین یکی از پپتیدهای زهر زنبور است که توانایی عبور از سد خونی مغزی را دارد و می‌تواند اکتساب حافظه در جوندگان آلزایمری را بهبود بخشد (۲۳، ۲۴)، فسفولیپاز A2 خالص شده از زهر زنبور یک اثر محافظتی عصبی از خود نشان می‌دهد. بنابراین دارای پتانسیل بالقوه‌ای برای درمان آلزایمر و پارکینسون است (۲۵، ۲۶). زهر زنبور نشان داد می‌تواند تا حدودی از تجمع آمیلوئید بتا در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند (۲۷). در این پژوهش برای اولین بار، اثرات آنتی کولین استرازی زهر زنبور عسل مورد مطالعه قرار گرفته است. بدین‌منظور توانایی زهر زنبور در مهار دو آنزیم استیل‌کولین‌استراز و بوتیریل‌کولین‌استراز با استفاده از روش المن مطالعه شد. همچنین توانایی اتصال مهم‌ترین اجزای پپتیدی و پروتئینی زهر زنبور (ملیتین، آپامین، MCD، فسفو لیپاز A2، هیالورونیداز) با آنزیم‌استیل‌کولین‌استراز با استفاده از سرور داکینگ پروتئین- پروتئین HADDOCK بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

زهر زنبورعسل استفاده شده در این پژوهش، مربوط به زنبورهای منطقه سبلان ایران می‌باشد که با استفاده از روش استاندارد شوک الکتریکی به دست آمده است. آنزیم استیل‌کولین‌استراز مارماهی الکتریکی، آنزیم بوتیریل‌کولین‌استراز سرم‌اسب، استیل‌تیوکولین‌یداید، S-بوتیریل‌تیوکولین‌یداید، نئوستیگمین و معرف المن (DTNB) از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند. دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات (K2HPO4) و پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH2PO4) از شرکت مرک (Merck) تهیه شدند.

**سنجش فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور عسل:** به منظور بررسی فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور عسل، از روش المن استفاده شد (۲۸). بدین ترتیب که فعالیت آنزیم‌های استیل کولین‌استراز و بوتیریل‌کولین‌استراز در حضور و عدم حضور ۶ غلظت مختلف از زهر زنبور مورد مطالعه قرار گرفت و برای هر غلظت سه تکرار انجام شد. همه تست‌های آنزیمی با حجم کلی ۲۰۰ میکرولیتر و در پلیت‌های ۹۶ خانه اجرا شدند. نتایج به‌دست آمده از این بخش، به‌صورت غلظتی از زهر که توانایی مهار فعالیت آنزیمی به‌میزان ۵۰ درصدرا دارد (IC50) بیان شد. از داروی شناخته شده نئوستیگمین، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH= ۸)، آنزیم (استیل‌کولین‌استراز و یا بوتیریل کولین‌استراز) با غلظت نهایی ۰/۱ واحد بر میلی‌لیتر و DTNB با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار بود. نمونه‌های زهر به‌مدت ۱۰ دقیقه با مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس سوبسترا (استیل تیوکولین یداید و یا S-بوتیریل‌تیوکولین‌یداید) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به مخلوط واکنش افزوده و جذب نمونه‌ها بعد از ۱۰ دقیقه در ۴۰۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر ( Elx808 BioTek Instruments) ثبت شد. یک نمونه حاوی همه اجزای واکنش به‌غیراز آنزیم به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت، درصد مهار فعالیت آنزیم در هر غلظت از زهر زنبور محاسبه شد. سپس



[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]
[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]

تغییرات درصد مهار فعالیت آنزیمی نسبت به لگاریتم غلظت (نمودار دوز- پاسخ) رسم و مقدار IC50 با استفاده از این نمودار تعیین گردید.

**پیش‌بینی جایگاه اتصال مهم‌ترین اجزای پپتیدی و پروتئینی زهر زنبور با آنزیم استیل‌کولین‌استراز با استفاده از سرور شبیه‌سازی HADDOCK:** به‌منظور پیش‌بینی جایگاه اتصال مهم‌ترین اجزای پپتیدی و پروتئینی زهر زنبور عسل (ملیتین، آپامین، MCD، فسفولیپاز A2، هیالورونیداز) با آنزیم استیل‌کولین‌استراز از سرور شبیه‌سازی داکینگ پروتئین- پروتئین HADDOCK (https://bianca.science.uu.nl/haddock2.4) (۲۹) استفاده شد. بدین منظور فایل PDB آنزیم استیل‌کولین‌استراز (4M0E)، ملیتین (6DST)، آپامین (7OXF)، فسفولیپاز A2 (1POC) و هیالورونیداز (1FCQ) از وب سایت PDB (https://www.rcsb.org/) (۳۰) دانلود شد. همچنین ساختار پپتید MCD با استفاده از سرور SWISSMODEL (https://swissmodel.expasy.org) (۳۱) تعیین و به منظور انجام این بخش از پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. سپس مراحل داکینگ پروتئین- پروتئین برای هر یک از این ترکیبات با استفاده از HADDOCK 2.4 انجام شد. در نهایت نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای PyMol و LigPlot (۳۲) بررسی شدند.

## نتایج

**نتایج روش المن:** نتایج به‌دست آمده از بررسی فعالیت آنتی کولین‌استرازی زهر زنبورعسل در آزمایشگاه با روش المن، در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود مقادیر IC50 برای دو آنزیم استیل‌کولین‌استراز و بوتیریل‌کولین‌استراز به‌ترتیب ۲/۰۴ و ۶۳/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین توانایی زهر زنبور مورد مطالعه در مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز بسیار بیشتر از بوتیریل کولین‌استراز می‌باشد.

**جدول ۱: نتایج به‌دست آمده از بررسی اثر آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور عسل با استفاده از روش المن**

**Table 1: Results obtained from the evaluation of the anticholin esterase activity of honey bee venom using the Ellman assay**

| Enzyme | $IC_{50}$ of Neostigmine (µg/mL) | $IC_{50}$ of Honey Bee Venom (µg/mL) |
|---|---|---|
| Acetylcholinesterase | 0.112 | 2.04 |
| Butyrylcholinesterase | 0.138 | 63.1 |

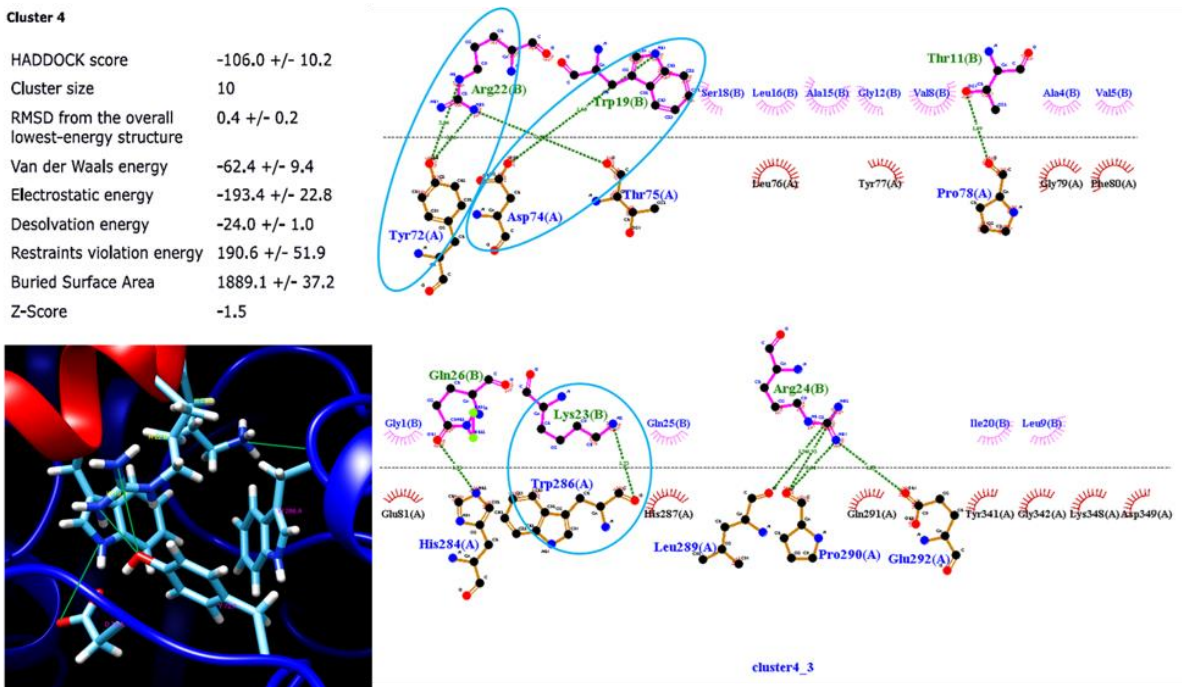
مقادیر IC50 نئوستیگمین، برای استیل‌کولین‌استراز و بوتیریل‌کولین استراز به‌ترتیب ۰/۱۱۲ و ۰/۱۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتراست.

**نتایج شبیه‌سازی HADDOCK:** همان‌طورکه در بخش مواد و روش ها اشاره شد جایگاه اتصال اصلی‌ترین ترکیبات زهر زنبور (پپتیدهای ملیتین، آپامین و MCD و آنزیم‌های هیالورونیدازو فسفو لیپاز A2) بر روی آنزیم استیل‌کولین‌استراز با استفاده از سرور شبیه سازی داکینگ پروتئین- پروتئین HADDOCK مطالعه شد (۲۶). نتایج برای هر ترکیب در ۶ الی ۱۰ Cluster و ۴ نمایش (View) برای هر Cluster به‌دست آمد. الگوریتم سرور HADDOCK به گونه‌ای است که پارامترهای مختلفی مثل اندازه Cluster، ساختار با کمترین میزان انرژی، انرژی واندروالس، انرژی الکترواستاتیک، انرژی تخریب، محدود کننده‌های انرژی و... را در نظر گرفته و به هرکدام امتیاز خاصی اختصاص می‌دهد و در نهایت در پارامتری به‌نام HADDOCK score نتایج را از بهترین به بدترین ترتیب بندی می‌کند (۳۳). پس از به دست آمدن نتایج HADDOCK با استفاده از نرم‌افزار LigPlot (۳۴) نحوه اتصال و مهار ترکیبات در Cluster‌های مختلف با آنزیم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج گزارش شد. بررسی بهترین کمپلکس‌های ایجاد شده بین پپتیدها و پروتئین‌های زهر زنبور و آنزیم استیل کولین‌استراز نشان داد که به ترتیب از لحاظ انرژی اتصال، ملیتین (۱۰۶- کیلو ژول بر مول)، MCD (۱۰۰/۱- کیلو ژول بر مول)، هیالورونیداز (۹۴/۹- کیلو ژول بر مول)، فسفولیپاز A2 (۷۴/۵- کیلو ژول بر مول) و آپامین (۶۰/۹- کیلو ژول بر مول) بیشترین توانایی را برای اتصال به آنزیم از خود نشان می‌دهند. هر دو گروه پیوندهای هیدروژنی و آب‌گریز در فرایند اتصال این ترکیبات به آنزیم نقش دارند. بررسی دقیق بنیان‌های آمینواسیدی درگیر در فرایند اتصال، نشان می‌دهد که پپتید ملیتین (شکل ۱) با تیروزین۷۲، آسپارتات ۷۴ و تریپتوفان۸۶، پپتید MCD (شکل۲) با آسپارتات۷۴ و آنزیم هیالورونیداز (شکل۳) با تیروزین۷۲ و آسپارتات۷۴ جایگاه آنیون محیطی (Peripheral anionic site: PAS) آنزیم، پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند. این در حالی است که پپتید آپامین (شکل۴) و آنزیم فسفولیپاز A2 (شکل۵) با هیچ‌کدام از بنیان‌های آمینواسیدی شکاف جایگاه فعال، میانکنش نمی‌کنند.



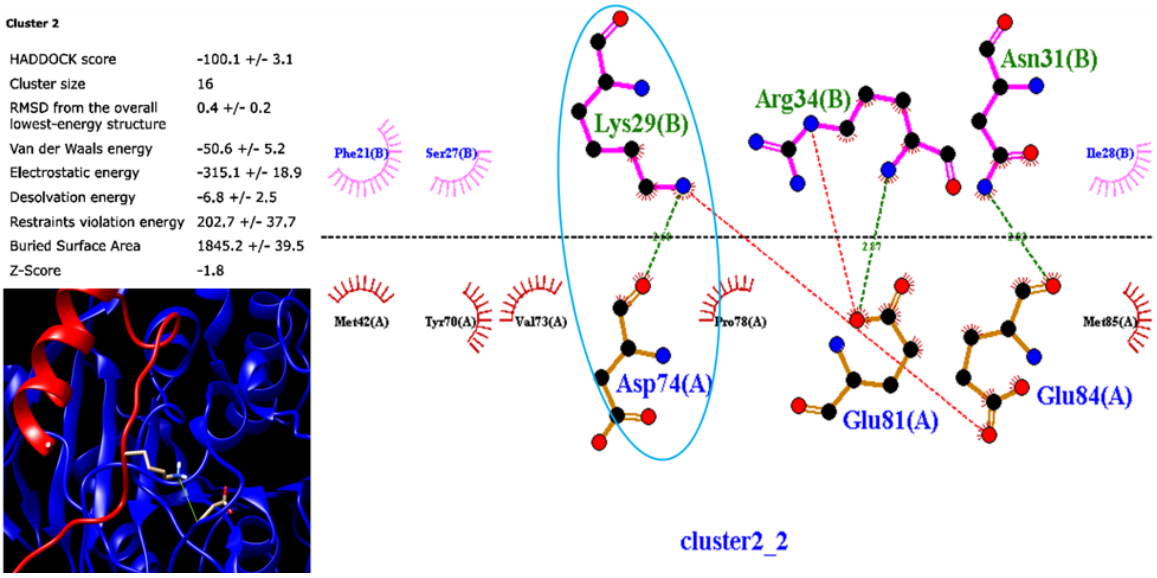
[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]




شکل ۱: نحوه اتصال پپتید ملیتین به آنزیم استیل‌کولین‌استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به‌صورت خطوط نقطه چین سبز نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. اسیدآمینه‌های ایجادکننده پیوندهای آب‌گریز به‌صورت نیم دایره‌های قرمز مشخص شده‌اند. این شکل، با استفاده از نرم‌افزار LigPlot تهیه شده است.

**Figure 1: Simulation of melittin peptide binding to acetylcholinesterase enzyme using the HADDOCK server. Hydrogen bonds are depicted as green dashed lines. Bond lengths are indicated in Angstroms. Hydrophobic amino acids involved in interactions are shown as red semicircles. This figure was generated using LigPlot software.**



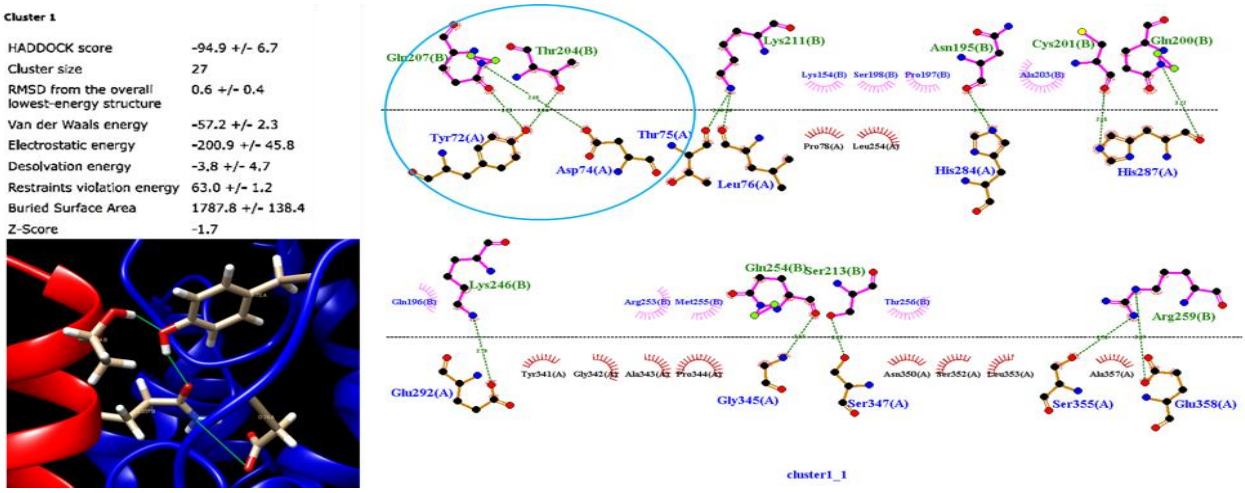

شکل ۲: نحوه اتصال پپتید MCD به آنزیم استیل‌کولین‌استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به‌صورت خطوط نقطه چین سبز نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. بنیان‌های ایجادکننده پیوندهای آب‌گریز به‌صورت نیم دایره‌های قرمز مشخص شده‌اند. این تصویر با نرم‌افزار LigPlot تهیه شده است.

**Figure 2: Simulation of MCD peptide binding to acetylcholinesterase enzyme using the HADDOCK server. Hydrogen bonds are depicted as green dashed lines. Bond lengths are indicated in Angstroms. Hydrophobic residues involved in interactions are shown as red semicircles. This image was generated using LigPlot software.**



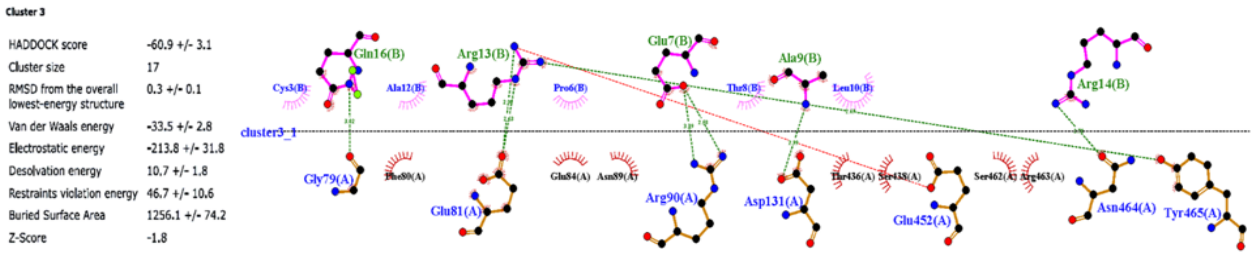
[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]



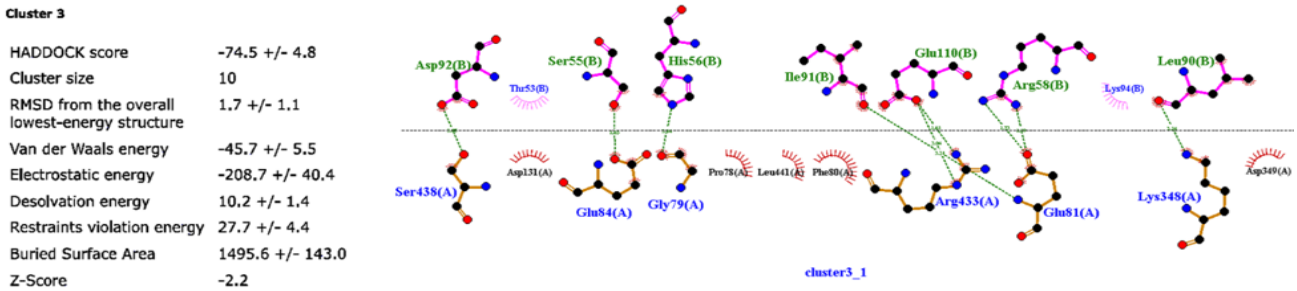

شکل ۳: نحوه اتصال آنزیم هیالورونیداز به آنزیم استیل‌کولین‌استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به‌صورت خطوط نقطه‌چین سبز نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. اسیدآمینه‌های درگیر در پیوندهای آب‌گریز به‌صورت نیم دایره‌های قرمز مشخص شده‌اند. این شکل، با استفاده از نرم‌افزار LigPlot تهیه شده است.

**Figure 3: Simulation of hyaluronidase enzyme binding to acetylcholinesterase enzyme using the HADDOCK server. Hydrogen bonds are depicted as green dashed lines. Bond lengths are indicated in Angstroms. Amino acids involved in hydrophobic interactions are shown as red semicircles. This figure was generated using LigPlot software.**




شکل ۴: نحوه اتصال پپتید آپامین به آنزیم استیل‌کولین‌استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به‌صورت خطوط نقطه‌چین سبز نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. اسیدآمینه‌های ایجادکننده پیوندهای آب‌گریز به‌صورت نیم دایره‌های قرمز مشخص شده‌اند. این تصویر، با استفاده از نرم‌افزار LigPlot تهیه شده است.

**Figure 4: Simulation of apamin peptide binding to acetylcholinesterase enzyme using the HADDOCK server. Hydrogen bonds are depicted as green dashed lines. Bond lengths are indicated in Angstroms. Amino acids involved in hydrophobic interactions are shown as red semicircles. This image was generated using LigPlot software.**




شکل ۵: نحوه اتصال آنزیم فسفولیپاز $A_2$ به آنزیم استیل‌کولین‌استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به‌صورت خطوط نقطه‌چین سبز مشخص شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. بنیان‌های آمینواسیدی درگیر در پیوندهای آب‌گریز به‌صورت نیم دایره‌های قرمز نمایش داده شده‌اند. این تصویر با استفاده از نرم‌افزار LigPlot تهیه شده است.

**Figure 5: Simulation of phospholipase A2 enzyme binding to acetylcholinesterase enzyme using the HADDOCK server. Hydrogen bonds are shown as green dashed lines. Bond lengths are indicated in Angstroms. Amino acid residues involved in hydrophobic interactions are shown as red semicircles. This image was generated using LigPlot software.**



[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]

## بحث

اجزای اصلی زهر زنبور عسل، متشکل از انواعی از پپتیدها و آنزیم‌ها است (۳۵). زهر زنبور عسل پتانسیل امیدوارکننده‌ای را در جلوگیری از تجمع آمیلوئید بتا (Aβ) در بیماری آلزایمر (AD) نشان داده است (۲۷). مطالعات نشان داده‌اند که زهر زنبور عسل و برخی اجزای آن، مانند فسفولیپاز A2 می‌توانند فسفوریلاسیون تائو، التهاب عصبی و اختلال حافظه را کاهش دهند (۳۶). تا به امروز گزارشی مبنی بر مطالعه اثر آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور عسل منتشر نشده است. بنابراین در این پژوهش، فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور عسل منطقه سبلان، با استفاده از روش های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین‌منظور در مرحله اول، توانایی‌زهر زنبور در مهار دو آنزیم کولین‌استراز با روش المن مطالعه شد. نتایج نشان داد که زهر زنبور، هر دو آنزیم را در محدوده میکرو گرم بر میلی‌لیتر مهار می‌کند اما توانایی آن برای مهار آنزیم استیل کولین‌استراز ۳۰ برابر بیشتر از بوتیریل‌کولین‌استراز است (جدول ۱). همچنین مقایسه مقادیر $IC_{50}$ ترکیب استاندارد (نئوستیگمین) با نتایج مربوط به زهر نشان داد قدرت آنتی-استیل‌کولین‌استرازی و آنتی بوتیریل‌کولین‌استرازی نئوستیگمین به ترتیب بیش از ۱۸ و ۴۵۷ برابر زهر زنبور مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به این‌که نئوستیگمین یک‌ترکیب‌خالص با توانایی بسیار بالا در مهار آنزیم‌های کولین‌استراز است، اما زهر زنبور از مجموع چندین ترکیب مختلف تشکیل شده است که فقط تعداد معدودی از آنها توانایی آنتی‌کولین‌استرازی دارند این اختلاف مشاهده شده بین مقادیر $IC_{50}$ نئوستیگمین و زهر زنبور کاملاً منطقی به‌نظر می‌رسد. اخیراً مهارکننده‌های پپتیدی کولین‌استراز در درمان بیماری آلزایمر نوید بخش بوده است. مطالعات مختلف، پپتیدهای مشتق شده از هیدرولیز پروتئین نخود، پپتیدهای شبه افیونی مشتق شده از پروتئین‌های لبنی و فارماکوفورهای دریایی را شناسایی کرده‌اند که فعالیت بازدارندگی در برابر استیل‌کولین‌استراز و بوتیریل‌کولین‌استراز از خود نشان می‌دهند. علاوه بر پپتیدهای طبیعی، پپتیدهای سنتزی مثل W3، فعالیت مهاری قوی در برابر آنزیم استیل‌کولین‌استراز و تجمع پپتید β-آمیلوئید را نشان می‌دهند. همچنین طراحی منطقی آنالوگ‌های پپتیدی مانند W3 با بنیان‌های آروماتیک منجر به افزایش فعالیت بازدارندگی در برابر استیل‌کولین‌استراز و بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی شده است. این یافته‌ها پتانسیل مهار کننده‌های کولین استراز مبتنی بر پپتید را در توسعه درمان‌های جدید و موثر برای بیماری آلزایمر برجسته می‌کند (۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱). بررسی ساختار سوم آنزیم استیل‌کولین‌استراز نشان می‌دهد که جایگاه فعال این آنزیم به‌صورت یک شکاف عمیق و باریک به عمق ۲۰Å می‌باشد. تریاد کاتالیتیک آنزیم که مسئول هیدرولیز استیل کولین به کولین و استات است و از سه بنیان آمینواسیدی سرین ۲۰۳، گلوتامات۳۳۴ و هیستیدین۴۴۷ تشکیل شده است در عمق این شکاف، واقع شده است. در نزدیکی ورودی شکاف جایگاه فعال، یک سایت آلوستریک حاوی تعدادی بنیان آمینواسیدی آروماتیک حفظ شده به‌نام جایگاه آنیونی محیطی (peripheral anionic site: PAS) وجود دارد. این جایگاه که متشکل از بنیان‌های تیروزین۷۲، آسپارتات ۷۴، تیروزین ۱۲۴، گلوتامات۲۸۵، تریپتوفان۲۸۶ و تیروزین ۳۴۱ است علاوه بر تنظیم آلوستریک فعالیت کاتالیزوری آنزیم، در چندین عملکرد غیرکلاسیک مشارکت می‌کند. نشان‌داده شده است‌که PAS می‌تواند تولید فیبریل‌های آمیلوئید بتا را در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر تسریع کند. این عملکرد از طریق یک روش غیرکاتالیزوری با اتصال به فرم غیرآمیلوئیدوژن پروتئین آمیلوئید بتا انجام می‌شود (۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۴۶). زهر زنبور عسل کمپلکسی از ترکیبات مختلف ازجمله پپتیدها و پروتئین‌های بزرگ است. نتایج شبیه‌سازی انجام شده با استفاده از سرور HADDOCK نشان داد اجزای زهر زنبور به دلیل بزرگ بودن، امکان نفوذ به شکاف جایگاه فعال آنزیم را ندارند، اما برخی از اجزای زهر زنبور مانند ملیتین، پپتید MCD و آنزیم هیالورونیداز می‌توانند از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی با برخی از بنیان‌های جایگاه آنیون محیطی (PAS) آنزیم استیل‌کولین‌استراز میانکنش کنند و به احتمال زیاد در روند فعالیت آنزیم اختلال ایجاد کنند. همچنین با توجه به نقش جایگاه آلوستریک PAS در تسریع تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید بتا، این سه ترکیب از پتانسیل بالقوه‌ای برای جلوگیری از تجمع آمیلوئید بتا نیز برخوردار هستند. از بین پنج ترکیب مطالعه شده، بهترین اتصال مربوط به پپتید ملیتین است که با سه آمینواسید از جایگاه PAS (تیروزین۷۲، آسپارتات۷۴ و تریپتوفان۲۸۶) میانکنش می‌کند. در ضمن بهترین انرژی اتصال نیز مربوط به همین پپتید می‌باشد. با توجه به این‌که ملیتین، فراوان‌ترین ترکیب‌زهر زنبور عسل است می‌توان گفت احتمالاً مسئول اصلی ایجادکننده خاصیت آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور، پپتید ملیتین است. در مجموع نتایج به‌دست آمده، نشان می‌دهد که زهر زنبور عسل، کاندیدای مناسبی به‌منظور شناسایی، طراحی و معرفی داروهای جدید آنتی‌کولین استراز برای درمان آلزایمر می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان می‌باشد که بدین‌وسیله نویسندگان از حمایت‌های آن دانشگاه تشکر می‌نمایند.



[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]

## منابع


1. **Vogel, J.W., Iturria-Medina, Y., Strandberg, O.T., Smith, R., Levitis, E., Evans, A.C. and Hansson, O., 2020.** Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. *Nature Communications*. 11(1): 2612. doi: 10.1038/s41467-020-15701-2
2. **Breijyeh, Z. and Karaman, R., 2020.** Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 25(24): 5789. doi: 10.3390/molecules25245789
3. **Mufson, E.J., Counts, S.E., Perez, S.E. and Ginsberg, S.D., 2008.** Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 8(11): 1703-1718. doi: 10.1586/14737175.8.11.1703
4. **Hasselmo, M.E., 2006.** The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*. 16(6): 710-715. doi:10.1016/j.conb.2006.09.002
5. **Galimberti, D. and Scarpini, E., 2016.** Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on investigational Drugs*. 25(10): 1181-1187. doi:10.1080/13543784.2016.1216972
6. **Sharma, K., 2019.** Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*. 20(2): 1479-1487. doi: 10.3892/mmr.2019.10374
7. **De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J. and Sorin, E.J., 2021.** A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules*. 11(4): 580. doi: 10.3390/biom11040580
8. **Zare-Zardini, H., Tolueinia, B., Hashemi, A., Ebrahimi, L. and Fesahat, F., 2013.** Antioxidant and cholinesterase inhibitory activity of a new peptide from Ziziphus jujuba fruits. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®*. 28(7): 702-709. doi: 10.1177/1533317513500839
9. **Tahmasebi, E., Dastan, D. and Ebadi, A., 2020.** Design, synthesis and biological evaluation of anticholinesterase peptides: Fragment-based vs. template-based peptide design. *Bioorganic Chemistry*. 105: 104351. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104351
10. **Deveci, E., Cayan, F., Tel-Cayan, G. and Duru, M.E., 2019.** Structural characterization and determination of biological activities for different polysaccharides extracted from tree mushroom species. *Journal of Food Biochemistry*. 43(9): e12965. doi: 10.1111/jfbc.12965
11. **Prasasty, V., Radifar, M. and Istyastono, E., 2018.** Natural Peptides in Drug Discovery Targeting Acetylcholinesterase. *Molecules*. 23(9): 2344. doi: 10.3390/molecules23092344
12. **Moghadasi, Z., 2017.** In vitro study on cytotoxic effect of methanolic extract from carpet anemone tentacles against brain and colon cell lines. *Journal of Animal Environment*. 9(3): 379-384. GSID: B32MFesl63cJ. (In Persian)
13. **Pishgouii, F., Lotfi, S. and Sedaghati, E., 2023.** *A*nti AChE and Anti-BuChE Screening of the Fermentation Broth Extracts from Twelve *Aspergillus* Isolates and GC-MS and Molecular Docking Studies of the Most Active Extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 195: 5199-5216. doi: 10.1007/s12010-023-04548-0
14. **Klose, J., Griehl, C., Rossner, S. and Schilling, S., 2022.** Natural Products from Plants and Algae for Treatment of Alzheimer's Disease: A Review. *Biomolecules*. 12(5): 1-27. doi: 10.3390/biom12050694
15. **Fonar, G., Polis, B., Sams, D.S., Levi, A., Malka, A., Bal, N., Maltsev, A., Elliott, E. and Samson, A.O., 2021.** Modified Snake alpha-Neurotoxin Averts beta Amyloid Binding to alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Reverses Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Mice. *Molecular Neurobiology*. 58(5): 2322-2341. doi: 10.1007/s12035-020-02270-0
16. **Bellik, Y., 2015.** Bee venom: its potential use in alternative medicine. *Anti-Infective Agents*. 13(1): 3-16. doi: 10.2174/2211352513666150318234624
17. **Badawi, J.K., 2021.** Bee venom components as therapeutic tools against prostate cancer. *Toxins*. 13(5): 337. doi: 10.3390/toxins13050337
18. **Ye, M., Chung, H.S., Lee, C., Yoon, M.S., Yu, A.R., Kim, J.S., Hwang, D.S., Shim, I. and Bae, H., 2016.** Neuroprotective effects of bee venom phospholipase A2 in the 3xTg AD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 13: 1-12. doi: 10.1186/s12974-016-0476-z
19. **Zhang, S., Liu, Y., Ye, Y., Wang, X.R., Lin, L.T., Xiao, L.Y., Zhou, P., Shi, G.X. and Liu, C.Z., 2018.** Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*. 148: 64-73. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.012
20. **Hwang, D.S., Kim, S.K. and Bae, H., 2015.** Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases. *Toxins*. 7(7): 2413-2421. doi: 10.3390/toxins7072413
21. **Shawrang, P., Abbasi, F., Motamedi sede, F. and Sadeghi, M., 2023.** Antimicrobial and anti-inflammatory properties of gamma irradiated honey bee venom. *Journal of Animal Environment*. 15(3): 321-328. doi: 10.22034/AEJ.2022.362124.2884 (In Persian)
22. **Abd El-Wahed, A.A., Khalifa, S.A.M., Sheikh, B.Y., Farag, M.A., Saeed, A., Larik, F.A., Koca-Caliskan, U., AlAjmi, M.F., Hassan, M., Wahabi, H.A., Hegazy, M.-E.F., Algethami, A.F., Büttner, S. and El-Seedi, H.R., 2019.** Chapter 13 - Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. In: Atta ur R, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. 60: 459-484. doi: 10.1016/B978-0-444-64181-6.00013-9
23. **Proulx, É., Power, S., Oliver, D., Sargin, D., McLaurin, J. and Lambe, E., 2020.** Apamin improves prefrontal nicotinic impairment in mouse model of Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex*. 30(2): 563-574. doi: 10.1093/cercor/bhz107
24. **Gu, H., Han, S.M. and Park, K.-K., 2020.** Therapeutic effects of apamin as a bee venom component for non neoplastic disease. *Toxins*. 12(3): 195. doi: 10.3390/toxins12030195
25. **Kim, K.H., Lee, S.Y., Shin, J., Hwang, J.T., Jeon, H.N. and Bae, H., 2019.** Dose-dependent neuroprotective effect of standardized bee venom phospholipase A2 against MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 11: 80. doi: 10.3389/fnagi.2019.00080
26. **Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J.M. and Fajloun, Z., 2019.** Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules*. 24(16): 2997. doi: 10.3390/molecules24162997
27. **Ku, Y.H., Kang, J.H. and Lee, H., 2020.** Effect of bee venom on an experimental cellular model of Alzheimer's




[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]

disease. *The American Journal of Chinese Medicine*. 48(08): 1803-1819. doi: 10.1142/S0192415X20500895

**28.** **Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr. and Feather Stone, R.M., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9

**29.** **Honorato, R.V., Koukos, P.I., Jimenez-Garcia, B., Tsaregorodtsev, A., Verlato, M., Giachetti, A., Rosato, A. and Bonvin, A., 2021.** Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. *Frontiers in Molecular Biosciences.* 8: 729513. doi: 10.3389/ fmolb.2021.729513

**30.** **Burley, S.K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichlow, G.V., Christie, C.H., Dalenberg, K., Di Costanzo, L., Duarte ,J.M., Dutta, S., Feng, Z., Ganesan, S., Goodsell, D.S., Ghosh, S., Green, R.K., Guranovic, V., Guzenko, D., Hudson, B.P., Lawson, C.L., Liang, Y., Lowe, R., Namkoong, H., Peisach, E., Persikova, I., Randle, C., Rose, A., Rose, Y., Sali, A., Segura, J., Sekharan, M., Shao, C., Tao, Y.P., Voigt, M., Westbrook, J.D., Young, J.Y., Zardecki, C. and Zhuravleva, M., 2021.** *RCSB* Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*. 49(D1): D437-D451. doi: 10.1093/nar/gkaa1038

**31.** **Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. and Schwede, T., 2018.** SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research.* 46(W1): W296-W303. doi: 10.1093/nar/gky427

**32.** **Laskowski, R.A. and Swindells, M.B., 2011.** LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 51(10): 2778-2786. doi: 10.1021/ci200227u

**33.** **Van Zundert, G., Rodrigues, J., Trellet, M., Schmitz, C., Kastritis, P., Karaca, E., Melquiond, A., van Dijk, M., De Vries, S. and Bonvin, A., 2016.** The HADDOCK 2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of Molecular Biology.* 428(4): 720-725. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.014

**34.** **Wallace, A.C., Laskowski, R.A. and Thornton, J.M., 1995.** LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*. 8(2): 127-134. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.014

**35.** **Shi, P., Xie, S., Yang, J., Zhang, Y., Han, S., Su, S. and Yao, H., 2022.** Pharmacological effects and mechanisms of bee venom and its main components: recent progress and perspective. *Frontiers in Pharmacology*. 13: 1001553. doi: 10.3389/fphar.2022.1001553

**36.** **Yoo, S.S., Han, S.B., Yun, J., Yeo, I.J. and Ham, H.J., 2023.** Bee Venom Phospholipase A2 Reduces Tau Phosphorylation through Inhibition of GSK3β Expression. *Journal of Biotechnology and Biomedicine*. 6: (2). 202-213. doi: 10.26502/jbb.2642-91280084

**37.** **Elumalai, V., Trobec, T., Grundner, M., Labriere, C., Frangež, R., Sepčić, K., Hansen, J.H. and Svenson, J., 2022.** Development of potent cholinesterase inhibitors based on a marine pharmacophore. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 20(28): 5589-5601. doi: 10.1039/D2OB01064J

**38.** **Asen, N.D., Okagu, O.D., Udenigwe, C.C. and Aluko, R.E., 2022.** In vitro inhibition of acetylcholinesterase activity by yellow field pea (*Pisum sativum*) protein derived peptides as revealed by kinetics and molecular docking. *Frontiers in Nutrition* 9: 1021893. doi: 10.3389/ fnut.2022.1021893

**39.** **Sanchis, I., Spinelli, R., Dias, J., Brazzolotto, X., Rietmann, A., Aimaretti, F. and Siano, A.S., 2023.** Inhibition of Human Cholinesterases and in vitro beta Amyloid Aggregation by Rationally Designed Peptides. *ChemMedChem.* 18(12): e202200691. doi: 10.1002/cmdc.202200691

**40.** **Ji, D., Ma, J., Dai, J., Xu, E., Harris, P., Brimble, M. and Agyei, D., 2022.** Anticholinesterase Inhibition, Drug Likeness Assessment, and Molecular Docking Evaluation of Milk Protein-Derived Opioid Peptides for the Control of Alzheimer's Disease. *Dairy*. 3(3): 422-437. doi: 10.3390/dairy3030032

**41.** **Sanchis, I., Spinelli, R., Aschemacher, N. and Siano, A.S., 2022.** Rational design and synthesis of modified natural peptides from *Boana pulchella* (anura) as acetylcholinesterase inhibitors and antioxidants. *Amino Acids.* 54(2): 181-192. doi: 10.1007/s00726-021-03096-3

**42.** **Kulshreshtha, A. and Piplani, P., 2016.** Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Neurological Sciences.* 37: 1403-1435. doi: 10.1007/s10072-016-2625-7

**43.** **Johnson, G. and Moore, S.W., 2006.** The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current Pharmaceutical Design.* 12(2): 217-225. doi: 10.2174/138161206775193127

**44.** **Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L. and Sussman, J.L., 2010.** Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions.* 187(1-3): 10-22. doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042

**45.** **Agatonovic-Kustrin, S., Kettle, C. and Morton, D.W., 2018.** A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 106: 553-565. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.147

**46.** **Macdonald, I.R., Martin, E., Rosenberry, T.L. and Darvesh, S., 2012.** Probing the peripheral site of human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*. 51(36): 7046-7053. doi: 10.1021/bi300955k




[ Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15 ]

[ DOI: 10.22034/aer.2.4.57 ]