

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,
lotfisafal@gmail.com

Received: 29 January 2026

Reviewed: 4 March 2026

Revised: 6 May 2026

Accepted: 9 June 2026

مقاله پژوهشی

بررسی آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی اثر آنتی‌کولین‌استرازی زهر زنبور عسل

محمد کاظم اصلانی^۱، صفا لطفی^{۱*}، الهام رضوان‌نژاد^۱، عباس زارع میرک‌آبادی^۲، مسعود ترکزاده‌ماهانی^۱

^۱ گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
^۲ موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

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

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 (استیل کولین‌استراز و بوتیریل کولین‌استراز) است. ترکیبات طبیعی مثل عصاره گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها و سموم جانوران دارای انواعی از ترکیبات فعال زیستی هستند که به دلیل عوارض کم و اثرگذاری مناسب، از اهمیت ویژه‌ای برای کشف دارو برای بسیاری از بیماری‌ها نظیر آلزایمر برخوردار هستند. زهر زنبور عسل 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 دگرانوله‌کننده ماست سل: MCD، فسفولیپاز A2، هیالورونیداز) بر روی آنزیم استیل کولین‌استراز با استفاده از سرور شبیه‌سازی داکینگ پروتئین-پروتئین HADDOCK پیش‌بینی و از نرم‌افزار LigPlot به منظور آنالیز نتایج به‌دست آمده استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد اثر مهار زهر زنبور روی آنزیم استیل کولین‌استراز که کولین‌استراز اصلی است بسیار بهتر از بوتیریل کولین‌استراز است. نتایج شبیه‌سازی نشان داد پپتیدهای ملیتین، MCD و آنزیم هیالورونیداز می‌توانند با برخی از بنیان‌های آمینواسیدی جایگاه آلوستریک آنیونی محیطی (PAS) آنزیم، پیوند هیدروژنی تشکیل دهند و بدین ترتیب 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 آنتی‌کولین‌استراز برای درمان آلزایمر می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

s.lotfi@kgut.ac.ir,
lotfisafa1@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹ بهمن ۱۴۰۴

تاریخ داور: ۱۳ اسفند ۱۴۰۴

تاریخ اصلاح: ۱۶ اردیبهشت ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۹ خرداد ۱۴۰۵

مقدمه

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. بدین منظور توانایی زهر زنبور در مهار دو آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز با استفاده از روش المن مطالعه شد. همچنین توانایی اتصال مهم ترین اجزای پپتیدی و پروتئینی زهر زنبور (ملیتین، آپامین، MCD، فسفو لیپاز A2، هیالورونیداز) با آنزیم استیل کولین استراز با استفاده از سرور داکینگ پروتئین- پروتئین HADDOCK بررسی شد.

مواد و روش‌ها

زهر زنبور عسل استفاده شده در این پژوهش، مربوط به زنبورهای منطقه سبلان ایران می باشد که با استفاده از روش استاندارد شوک الکتریکی به دست آمده است. آنزیم استیل کولین استراز مارماهی الکتریکی، آنزیم بوتیریل کولین استراز سرم اسب، استیل تیوکولین یداید، S-بوتیریل تیوکولین یداید، نئوستیگمین و معرف المن (DTNB) از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند. دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) و پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) از شرکت مرک (Merck) تهیه شدند.

سنجش فعالیت آنتی کولین استرازی زهر زنبور عسل: به

منظور بررسی فعالیت آنتی کولین استرازی زهر زنبور عسل، از روش المن استفاده شد (۲۸). بدین ترتیب که فعالیت آنزیم های استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز در حضور و عدم حضور ۶ غلظت مختلف از زهر زنبور مورد مطالعه قرار گرفت و برای هر غلظت سه تکرار انجام شد. همه تست های آنزیمی با حجم کلی ۲۰۰ میکرولیتر و در پلیت های ۹۶ خانه اجرا شدند. نتایج به دست آمده از این بخش، به صورت غلظتی از زهر که توانایی مهار فعالیت آنزیمی به میزان ۵۰ درصد را دارد (IC_{50}) بیان شد. از داروی شناخته شده نئوستیگمین، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار ($pH=8$)، آنزیم (استیل کولین استراز و یا بوتیریل کولین استراز) با غلظت نهایی ۰/۱ واحد بر میلی لیتر و DTNB با غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار بود. نمونه های زهر به مدت ۱۰ دقیقه با مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس سوبسترا (استیل تیوکولین یداید و یا S-بوتیریل تیوکولین یداید) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به مخلوط واکنش افزوده و جذب نمونه ها بعد از ۱۰ دقیقه در ۴۰۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر (Elx808 BioTek Instruments) ثبت شد. یک نمونه حاوی همه اجزای واکنش به غیر از آنزیم به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت، درصد مهار فعالیت آنزیم در هر غلظت از زهر زنبور محاسبه شد. سپس

بیماری آلزایمر رایج ترین شکل زوال عقل در سالمندان است که نوعی اختلال تحلیل برنده اعصاب پیش رونده است که در نهایت به مرگ منجر می شود (۱، ۲). براساس فرضیه کولینرژیک پاتوژنز بیماری آلزایمر، ویژگی های بالینی زوال عقل مرتبط با این بیماری به کاهش سطح استیل کولین، یک انتقال دهنده عصبی درگیر در فرآیند حافظه و یادگیری، در هیپوکامپ و قشر مغز نسبت داده می شود (۳، ۴). دو نوع آنزیم کولین استراز در سیستم عصبی وجود دارد: استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز. اگرچه هر دو آنزیم توانایی هیدرولیز استیل کولین را دارند، اما در مغز طبیعی، استیل کولین استراز آنزیم اصلی درگیر در متابولیسم استیل کولین محسوب می شود و فعالیت هیدرولیتیک آن بسیار بالاتر از بوتیریل کولین استراز است. یکی از رایج ترین استراتژی های درمانی مورد استفاده برای بهبود نسبی علائم بیماری آلزایمر، تجویز مهارکننده های آنزیم های کولین استراز است (۵، ۶، ۷). امروزه مطالعات فراوانی در سراسر جهان به منظور شناسایی مهارکننده های جدید آنزیم های کولین استراز با ویژگی های درمانی بهبود یافته و عوارض جانبی کمتر در جریان است. اگرچه بیشتر مهارکننده هایی که تا به امروز برای آنزیم های کولین استراز شناسایی شده اند ترکیبات شیمیایی کوچک هستند اما مطالعات نشان داده اند که این آنزیم ها می توانند توسط پپتیدها و برخی پلی ساکاریدها نیز مهار شوند (۸، ۹، ۱۰، ۱۱). ترکیبات طبیعی مثل عصاره گیاهان، قارچ ها، جلبک ها و سموم جانوران دارای انواعی از ترکیبات فعال زیستی هستند که به دلیل عوارض کم و اثرگذاری مناسب، از اهمیت ویژه ای برای کشف دارو برای بسیاری از بیماری ها نظیر آلزایمر برخوردار هستند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). زهر زنبور عسل مخلوط پیچیده ای از پپتیدهایی مثل ملیتین، آپامین، پپتید گرانول کننده ماست سل (MCD)، آدولاپین، و آنزیم هایی مثل فسفولیپاز A2، فسفولیپاز B، هیالورونیداز و اجزای غیرپپتیدی مختلفی است که در مقادیر متفاوت در نمونه های مختلف یافت می شوند (۱۶، ۱۷). زهر زنبور عسل یک ماده طبیعی با انواعی از ترکیبات فعال با خواص زیستی بسیار متنوع است که در مقابله با بیماری های مختلفی نظیر بیماری های التهابی، دیابت، سرطان و بیماری های 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 می تواند اکتساب حافظه در جوندگان آلزایمری را بهبود بخشد (۲۳، ۲۴)، فسفولیپاز A2 خالص شده از زهر زنبور یک اثر محافظتی عصبی از خود نشان می دهد. بنابراین دارای پتانسیل بالقوه ای برای درمان آلزایمر و پارکینسون است (۲۵، ۲۶). زهر زنبور نشان داد می تواند تا

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>) استفاده شد. بدین منظور فایل PDB آنزیم استیل‌کولین‌استراز (4M0E)، ملیتین (6DST)، آپامین (7OXF)، فسفولیپاز A₂ (1FCQ) و هیالورونیداز (IPOC) از وب سایت PDB (<https://www.rcsb.org/>) (۳۰) دانلود شد. همچنین ساختار PDB پپتید MCD با استفاده از سرور SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) (۳۱) تعیین و به‌منظور 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 زنبور عسل در آزمایشگاه با روش المن، در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقادیر IC₅₀ برای دو آنزیم استیل‌کولین‌استراز و بوتیریل کولین‌استراز به ترتیب 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.

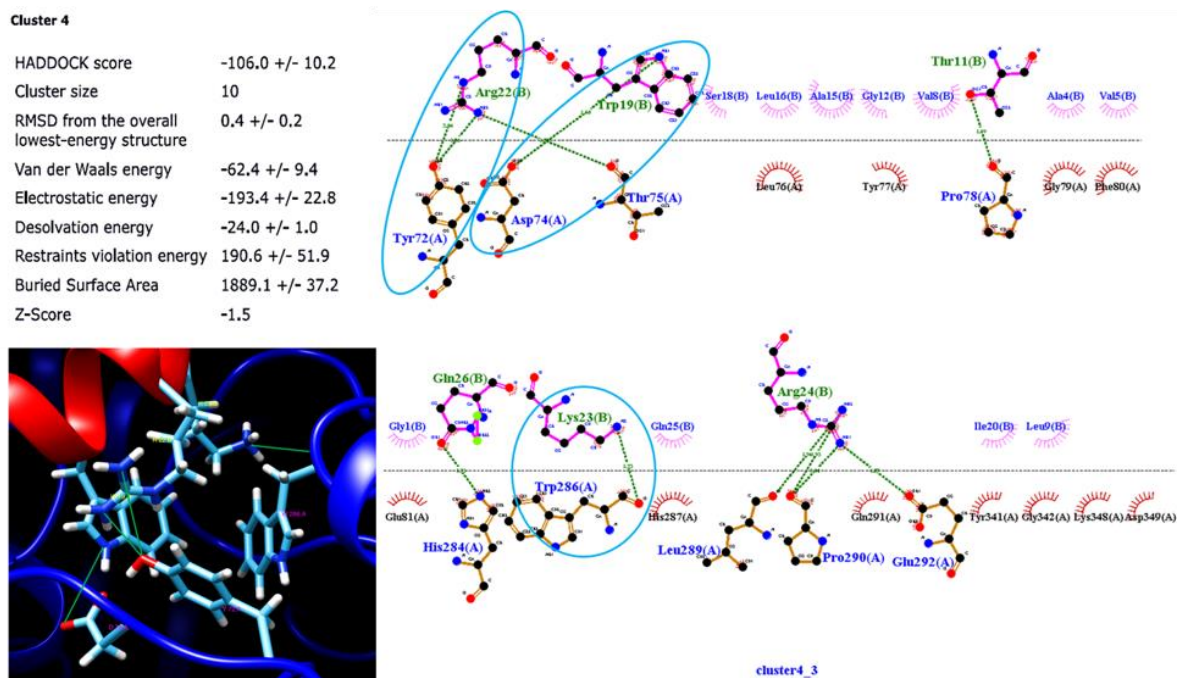
جدول ۱: نتایج به‌دست آمده از بررسی اثر آنتی کولین‌استرازی زهر زنبور عسل با استفاده از روش المن

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

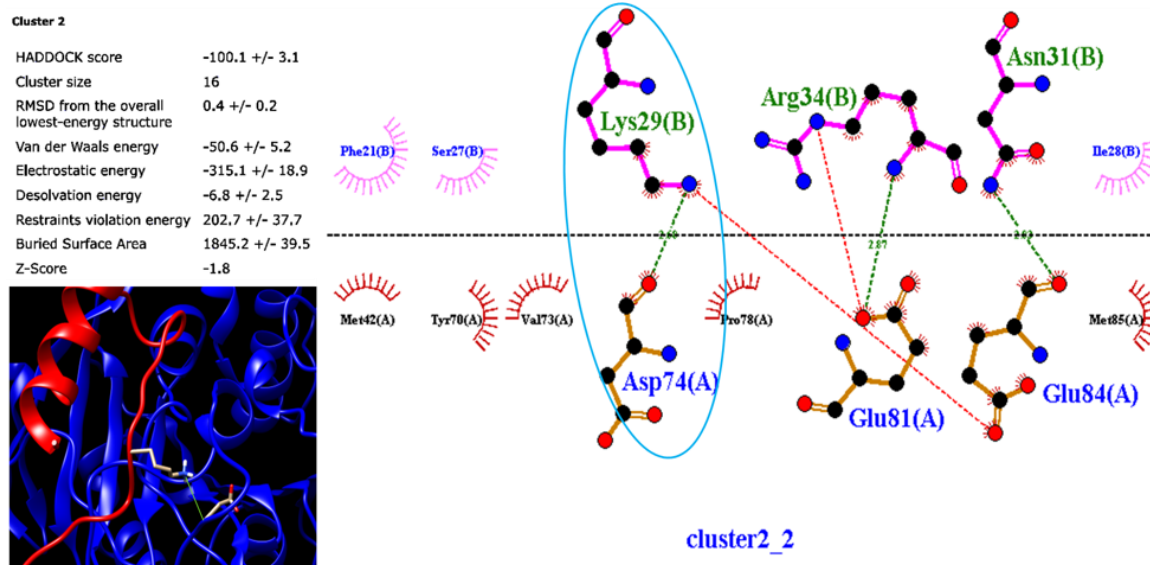
مقادیر IC₅₀ نفوستیگمین، برای استیل‌کولین‌استراز و بوتیریل کولین‌استراز به ترتیب ۰/۱۱۲ و ۰/۱۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

نتایج شبیه‌سازی HADDOCK: همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها اشاره شد جایگاه اتصال اصلی‌ترین ترکیبات زهر زنبور (پپتیدهای ملیتین، آپامین و MCD و آنزیم‌های هیالورونیداز و فسفو لیپاز A₂) بر روی آنزیم استیل‌کولین‌استراز با استفاده از سرور شبیه‌سازی 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 واندروالز، انرژی الکترواستاتیک، انرژی تخریب، محدود کننده‌های انرژی و... را در نظر گرفته و به هر کدام امتیاز خاصی اختصاص می‌دهد و در نهایت در پارامتری به نام 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 تیروزین ۷۲، آسپاراتات ۷۴ و تریپتوفان ۲۸۶، پپتید MCD (شکل ۲) با آسپاراتات ۷۴ و آنزیم هیالورونیداز (شکل ۳) با تیروزین ۷۲ و آسپاراتات ۷۴ جایگاه آنیون محیطی (Peripheral anionic site: PAS) آنزیم، پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند. این در حالی است که پپتید آپامین (شکل ۴) و آنزیم فسفولیپاز A₂ (شکل ۵) با هیچ کدام از بنیان‌های آمینواسیدی شکاف جایگاه فعال، میانکنش نمی‌کنند.



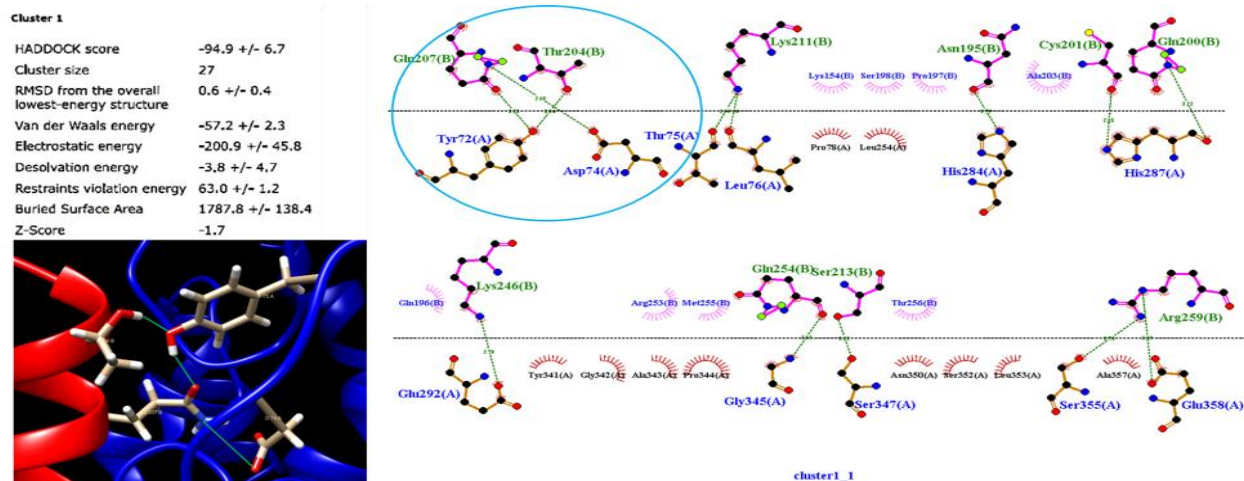
شکل ۱: نحوه اتصال پپتید ملیتین به آنزیم استیل کولین استراز که با سرور HADDOCK شبیه سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به صورت خطوط نقطه چین سبز نمایش داده شده اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. اسید آمینه های ایجاد کننده پیوندهای آب گریز به صورت نیم دایره های قرمز مشخص شده اند. این شکل، با استفاده از نرم افزار 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.



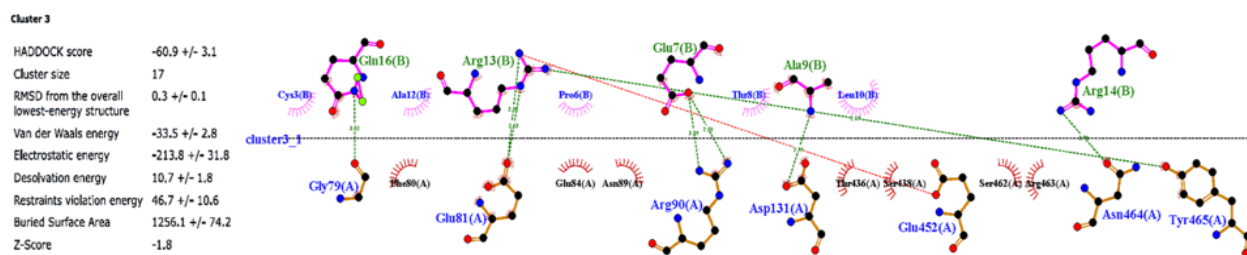
شکل ۲: نحوه اتصال پپتید MCD به آنزیم استیل کولین استراز که با سرور HADDOCK شبیه سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به صورت خطوط نقطه چین سبز نمایش داده شده اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. بنیان های ایجاد کننده پیوندهای آب گریز به صورت نیم دایره های قرمز مشخص شده اند. این تصویر با نرم افزار LigPlot 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.



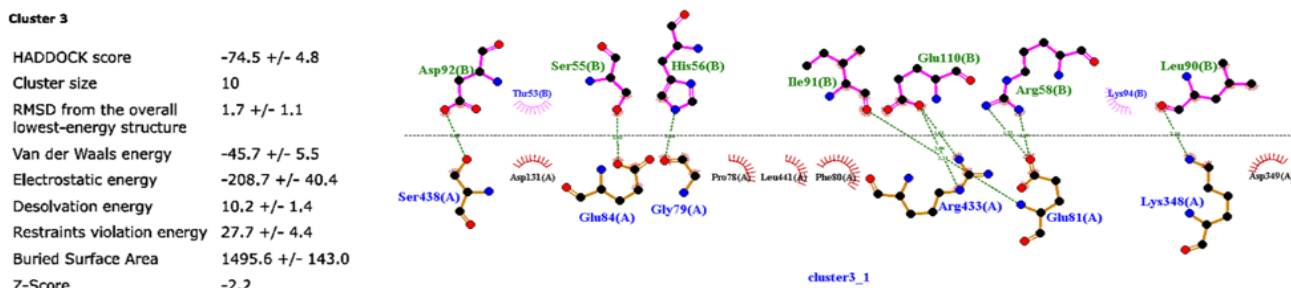
شکل ۳: نحوه اتصال آنزیم هیالورونیداز به آنزیم استیل کولین استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به صورت خطوط نقطه چین سبز نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. اسید آمینه‌های درگیر در پیوندهای آب‌گریز به صورت نیم دایره‌های قرمز مشخص شده‌اند. این شکل، با استفاده 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 استیل کولین استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به صورت خطوط نقطه چین سبز نمایش داده شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. اسید آمینه‌های ایجادکننده پیوندهای آب‌گریز به صورت 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 A₂ به آنزیم استیل کولین استراز که با سرور HADDOCK شبیه‌سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی به صورت خطوط نقطه چین سبز مشخص شده‌اند. طول پیوندها بر حسب آنگستروم است. بنیان‌های آمینواسیدی درگیر در پیوندهای آب‌گریز به صورت 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.

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 ($A\beta$) 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 آنتی‌کولین‌استراز زهر زنبور عسل منتشر نشده است. بنابراین در این پژوهش، فعالیت آنتی‌کولین‌استراز زهر زنبور عسل منطقه سبلان، با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور در مرحله اول، توانایی زهر 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 بوتیریل کولین‌استراز است (جدول ۱). همچنین مقایسه مقادیر IC_{50} ترکیب استاندارد (نئوستیگمین) با نتایج مربوط به زهر نشان داد قدرت آنتی-استیل کولین‌استراز و آنتی بوتیریل کولین‌استراز نئوستیگمین به ترتیب بیش از ۱۸ و ۴۵۷ برابر زهر زنبور مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به این که نئوستیگمین یک ترکیب خالص 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 آنتی کولین‌استراز دارند این اختلاف مشاهده شده بین مقادیر IC_{50} نئوستیگمین و زهر زنبور کاملاً منطقی به نظر 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 استیل کولین‌استراز و بوتیریل کولین‌استراز از خود نشان می‌دهند. علاوه بر پپتیدهای طبیعی، پپتیدهای سنتزی مثل W3، فعالیت مهاری قوی در برابر آنزیم استیل کولین‌استراز 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 استیل کولین‌استراز و بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی شده است. این یافته‌ها پتانسیل مهار کننده‌های کولین‌استراز مبتنی بر پپتید را در توسعه درمان‌های جدید و موثر برای بیماری آلزایمر برجسته می‌کند (۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰). بررسی ساختار سوم آنزیم استیل کولین‌استراز نشان می‌دهد که جایگاه فعال این آنزیم به صورت یک شکاف عمیق و باریک به عمق

۲۰ Å می‌باشد. تریاد کاتالیتیک آنزیم که مسئول هیدرولیز استیل کولین به کولین و استات است و از سه بنیان آمینواسیدی سرین ۲۰۳، گلوتامات ۳۳۴ و هیستیدین ۴۴۷ 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 به نام جایگاه آنیونی محیطی (peripheral anionic site: PAS) وجود دارد. این جایگاه که متشکل از بنیان‌های تیروزین ۷۲، آسپارات ۷۴، تیروزین ۱۲۴، گلوتامات ۲۸۵، تریپتوفان ۲۸۶ و تیروزین ۳۴۱ است علاوه بر تنظیم آلوستریک فعالیت کاتالیزوری آنزیم، در چندین عملکرد غیرکلاسیک مشارکت می‌کند. نشان داده شده است که 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 غیرآمیلوئیدوزن پروتئین آمیلوئید بتا انجام می‌شود (۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۴۶). زهر زنبور عسل کمپلکسی از ترکیبات مختلف از جمله 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 استیل کولین‌استراز میانکشی 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 (تیروزین ۷۲، آسپارات ۷۴ و تریپتوفان ۲۸۶) میانکشی می‌کند. در ضمن بهترین انرژی اتصال نیز مربوط به همین پپتید می‌باشد. با توجه به این که ملیتین، فراوان‌ترین ترکیب زهر زنبور عسل است می‌توان گفت احتمالاً مسئول اصلی ایجادکننده خاصیت آنتی کولین‌استراز زهر زنبور، پپتید ملیتین است. در مجموع نتایج به دست آمده، نشان می‌دهد که زهر زنبور عسل، کاندیدای مناسبی به منظور شناسایی، طراحی و معرفی داروهای جدید آنتی کولین‌استراز برای درمان آلزایمر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

- 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
 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. Anti 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

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
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., Kastiris, 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 GSK3 β 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