دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و پنجم، شماره ۴، صفحه ۳۲۵-۲۹۷ (مهر و آبان ۱۴۰۱)

Iran South Med J 2022; 25(4): 297-325

مطالعه فعالیت‌های آنتی‌کولین استرازی در شرایط *in vitro* و *in silico* زهر خام ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس خلیج‌فارس– بوشهر

حمیده دهقانی (MSc)[1*]، مرضیه راشدی‌نیا (PhD)[1]، غلامحسین محبی (PhD)[2**]، امیر وزیری‌زاده (PhD)[3]، عمار مریم‌آبادی (PhD)[2]، علیرضا برمک (PhD)[2]

[1] گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز- ایران
[2] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[3] گروه زیست‌شناسی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج‌فارس، دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۲/۲۵- پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۲۸)

چکیده

زمینه: ستاره‌های شکننده، علاوه بر دفاع فیزیکی، قادر به تولید توکسین‌های شناخته شده‌ای می‌باشند که مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف آن‌ها است. با توجه به فراوانی این زیست‌مندان دریایی در آب‌های ساحلی خلیج‌فارس و با علم به اثرات بیولوژیک متعدد آن‌ها، این مطالعه با هدف شناسایی متابولیت‌های ثانویه و ارزیابی فعالیت‌های ***in vitro*** و ***in silico*** آنتی‌کولین استرازی زهر خام اکینودرم اوفیوکوما اریناسئوس خلیج‌فارس انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پس از لیوفیلیزاسیون نمونه ستاره شکننده، آزمون‌های LD_{50}، فعالیت‌های مهارکنندگی کولین‌استرازی، شناسایی متابولیت‌های ثانویه و ارزیابی درون‌رایانه‌ای آن‌ها به‌ترتیب با روش‌های اسپیرمن-کاربر، اسپکتروسکوپی المن، کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) و روش محاسباتی داکینگ انجام گردیدند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، میزان LD_{50} نمونه ۰/۱۳±۶/۰۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. مقادیر IC_{50} مربوط به آنزیم استیل کولین‌استراز و بوتیریل کولین‌استراز آن‌ها به‌ترتیب ۰/۰۵۵±۳۷/۹۲۵ و نیز ۰/۰۲±۵/۳۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با استاندارد گالانتامین به دست آمدند. آنالیز GC-MS نمونه تعداد ۲۵ ترکیب شیمیایی زیست‌فعال با ساختارهای مختلف نظیر آلکالوئیدها، ترپن‌ها و استروئیدها را نشان داد. نتایج محاسباتی ترکیبات نیز، نتایج تجربی را تأئید نمودند. از این میان، ترکیب آلکالوئیدی BS_4 دارای بیشترین تمایل برای هر دو آنزیم بود.

نتیجه‌گیری: از نظر قدرت سمیت، نمونه زهر خام ستاره شکننده در گروه "خیلی سمی" قرار گرفت. آنالیز کروماتوگرافی گازی زهر خام، متابولیت‌های زیست‌فعال ثانویه متعددی با ساختارهای شیمیایی متفاوتی را نشان داد. نتایج تجربی و محاسباتی، روی فعالیت آنزیم‌های کولین‌استرازی نمونه نشان داد که زهر، به‌عنوان مهارکننده قابل ملاحظه آنزیم‌ها عمل می‌نماید. مطالعات بیشتری برای تعیین اینکه آیا ترکیب BS_4 می‌تواند کاندیدای درمان بیماری آلزایمر باشد، مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: اکینودرم، آنتی‌کولین‌استراز، اوفیوکوما اریناسئوس، ستاره شکننده، متابولیت ثانویه، ونوم

** بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
E.mail: Mohebbihsn@yahoo.com
*** ORCID: 0000-0002-1619-989x**
**** ORCID: 0000-0003-3393-702X**

مقدمه

طبیعت نخستین کارخانه دارویی است که قادر به طراحی و سنتز مولکول‌های دارویی منحصر به فرد است (۱). ارگانیسم‌های دریایی برای دهه‌ها به‌عنوان منبع متابولیت‌های ثانویه مختلف با فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲). برتری ترکیبات طبیعی دریایی از منظر نوآوری و فعالیت‌های زیستی خود نسبت به منابع زمینی مشخص شده است (۳). متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در دفاع شیمیایی موجودات کم‌تحرک و آهسته رهش دریایی ایفاء می‌نمایند (۴).

اکینودرم‌های بی‌مهره دریایی متعلق به شاخه اکینودرماتا[1] هستند که از لغات یونانی باستان اکینوس[2] به معنی"خاردار" و درما[3] (پوست) و با هم به‌معنای "پوست خاردار" گرفته شده است. این شاخه، شامل حدود ۷۰۰۰ گونه زنده است که آن‌ها را پس از کرودات‌ها، به دومین گروه بزرگ دوتروستوم‌ها[4] تبدیل نموده است (۵).

اکینودرم‌ها معمولاً با تقارن پنج شعاعی مشخص می‌گردند و به شش دسته کرینوئیده[5] (نیلوفرهای دریایی و ستاره‌های پر[6])، هولوتوروئیده[7] (خیارهای دریایی)، آستروئیده[8] (ستاره‌های دریایی)، کونسنتریسیکلوئیده[9] (بابونه‌های دریایی)، اکینوئیده[10] (توتیاهای دریایی) و اوفیوروئیده[11] (ستارگان شکننده) تقسیم می‌شوند (۶). همه آن‌ها دریازی هستند و تقریباً در تمام اعماق و مناطق جغرافیایی دریاها و اقیانوس‌ها در سراسر جهان پراکنده شده‌اند (۷).

آن‌ها جدا از اثرات سلامتی و زیست محیطی، منابع منحصر به فرد متابولیت‌های شگفت‌انگیز با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی هستند. برخی از اکینودرم‌ها توکسین‌های قوی با کشندگی قابل توجهی برای جانوران تولید می‌نمایند. با این‌حال، اثرات بیولوژیکی آن‌ها به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند (۷). ساپونین‌ها متابولیت‌های بسیار متنوع، رایج و فراوانی هستند که مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی این گروه می‌باشد (۸). آن‌ها طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی و عملکردهای زیست محیطی از فعالیت‌های سیتوتوکسیک، همولیتیک، ضدباکتری، ضدویروسی، ضدقارچی، ضدالتهابی، تعدیل‌کنندگی ایمنی، ایکتیوتوکسیسیتی گرفته تا جذب شکارچیان یا همزیست‌ها را از خود نشان می‌دهند (۹).

اوفیوروئیده یا ستاره‌های شکننده، ستاره‌های سبدی[12] (اوریالیدها[13] بازوهای شاخه‌ای) و ستاره‌های ماری[14] (اوریالیدهای بدون شاخه)، با ۲۰۶۴ گونه شناخته شده، بزرگ‌ترین گروه در بین اکینودرم‌های موجود هستند که در فاصله جزر و مدی تا بیشترین اعماق اقیانوس‌های جهان یافت می‌شوند. نام اوفیوروئیده از واژه‌های یونانی اوفیس[15] به معنی مار و اورا[16] به معنی دم گرفته شده است که به بازوهای فنری یا حلزونی مانند و نازک آن‌ها اشاره دارد. کشف گونه‌های موجود کنونی با توصیف دو گونه (آستریاس کاپوت- مدوزا لینائوس[17]، ۱۷۵۸) یا گرگونوسفالوس[18] کنونی و (آستریاس اوفیورا لیناسئوس[19]، ۱۷۵۸) یا اوفیورای کنونی آغاز و در مقاله‌ای در سیستما نیچر[20] منتشر گردید (۱۰). از نیمه

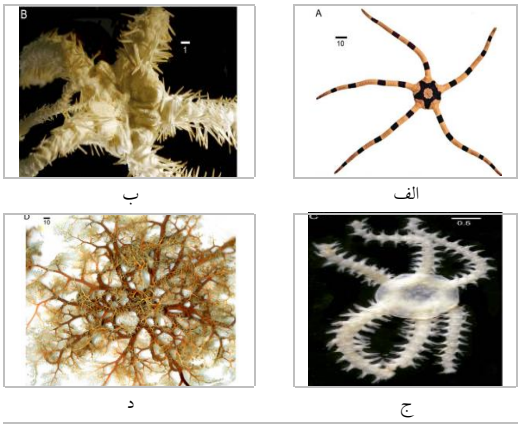
[1] Echinodermata
[2] Echinus
[3] Derma
[4] Deuterostomes
[5] Crinoidea
[6] Feather stars
[7] Holothuroidea
[8] Asteroidea
[9] Concentricycloidea
[10] Echinoidea
[11] Ophiuroidea
[12] Basket Stars
[13] Euryalids
[14] Snake Stars
[15] Ophis
[16] Oura
[17] *Asterias caput-Medusae Linnaeus*
[18] Gorgonocephalus
[19] *Asterias ophiura Linnaeus*
[20] Systema Naturae

قرن هیجدهم میلادی، سرعت کشف این جانوران به مدت یک قرن بطور خارق‌العاده‌ای افزایش یافت.

قابل ذکر است که اولین جانوری که در اعماق دریا گزارش گردید، ستاره شکننده گرگونوسفالوس کاپوتمدوزا[21] بود که در سال ۱۸۱۸ به‌طور تصادفی توسط سر جان راس[22] در اعماق خلیج بافین[23] شناسایی شد (۱۱). اولین فسیل اوفیوروئیده مربوط به آستریس اسکوتلاتوس بلومنباخ[24]، ۱۸۰۴ یا آسپیدوریلای[25] کنونی، در اوایل سال ۱۸۰۴ از ترياسه میانی گوتینگن آلمان یافت گردید (۱۲). بر اساس توصیف وود[26] (۱۸۹۸)،"ستاره‌های شکننده، موجودات بی‌قرار و کنجکاوی هستند که برای دهم ثانیه در یک حالت باقی نمی‌مانند و دائماً بازوهای بلند خود را به‌سان مارهایی بر سر مدوزا می‌پیچانند"(۱۳).

شناسایی مارسانان در حد گونه، به دلیل شباهت‌های ریخت‌شناسی مشکل می‌باشد. شاخص‌هایی که در شناسایی مارسانان در نظر گرفته می‌شوند شامل بررسی دیسک از قسمت پشتی، شکل و پوشش سپر شعاعی، دیسک از قسمت دهانی، تعداد شکاف تناسلی بورسا[27] در ناحیه بین بازویی، نوع و شکل پاپیلا[28]، یکسان یا متفاوت بودن پوشش ناحیه بین بازویی از دیسک پشتی، طول بازوها نسبت به قطر دیسک، شکل و تقسیمات صفحات پشتی بازو، شکل، اندازه و تعداد خار بازو در هر طرف از صفحه بازو، شکل صفحات بازوی دهانی، تعداد و شکل فلس‌های بازویی[29] یا تانتاکل می‌باشد (۱۴). البته در شناسایی به رنگ، توزیع و پراکنش، عمق و مکان زندگی، تغذیه، نوع لارو و تولید مثل گونه نیز توجه می‌گردد (۱۵).

به‌طور معمول، بدن اوفیوروئیدها از یک حالت پنج ضلعی تا یک صفحه دیسک مرکزی مدور تشکیل شده است که با پنج بازوی شعاعی، محصور گردیده است. هر چند، تعداد قابل توجهی از گونه‌ها از این شکل کلی مستثنی می‌شوند. گونه‌هایی با شش، هفت و تا ده بازو نیز یافت شده‌اند. در ستاره‌های سبدی، بازوها به یک یا چند شاخه تقسیم می‌شوند (شکل ۱).



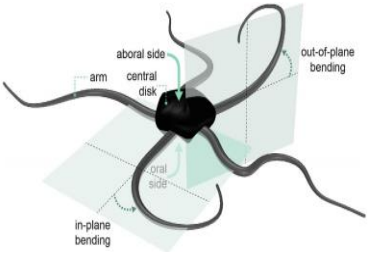
شکل ۱) اوفیولپیس سوپربا[30] یک شکل معمولی پنج بازویی با بازوهای ساده (الف)؛ اوفیاکانتا انوپلا وترنا[31] شکلی با بازوهایی با خارهای دندانه‌دار بلند و خارهای روی دیسک (ب)؛ اوفیاکتیس تایلری[32] شکل شش بازویی (ج)؛ یوراله اسپرا[33] یک ستاره سبدی با بازوهای شاخه‌دار (د) (۱۰).

Fig 1). *Ophiolepis superba*, a typical five-armed form with simple arms (a); *Ophiacantha enopla veteran*, a form with long jagged arm spines and spines covering the disc (b); *Ophiactis tyleri*, Six-armed form (C); *Euryale aspera*, a basket star with branched arms (d) (10).

به علت فقدان سر، واژه‌ای که برای توصیف محور بدن یک ستاره شکننده به کار می‌رود بر اساس موقعیت دهانی است که در قسمت میانی دیسک مرکزی، به سطح دهانی[34] و پشتی[35] و یا به‌ترتیب شکمی[36] و

[21] *Gorgonocephalus Caputmedusae*
[22] Sir John Ross
[23] Baffin Bay
[24] *Asterites scutellatus Blumenbach*
[25] Aspiduriella
[26] Wood
[27] Bursa
[28] Papillae
[29] Podial Scales
[30] *Ophiolepis superba*
[31] *Ophiacantha enopla Veterna*
[32] *Ophiactis tyleri*
[33] *Euryale aspera*
[34] Oral
[35] Aboral
[36] Ventral

پشتی[37] قرار می‌گیرند. قطر دیسک مرکزی از ۳ تا ۵۰ میلی‌متر و طول بازوی آن‌ها از دو تا بیست برابر قطر دیسک و یا حتی بیشتر در بعضی از گونه‌ها متغیر است (۱۶). پنج بازو به‌صورت متقارن در یک موقعیت پنج قطبی در اطراف دیسک مرکزی قرار گرفته‌اند که می‌توانند به هر طرف عمودی و افقی بچرخند (شکل ۲) (۱۷).



شکل ۲) آناتومی بیرونی یک ستاره شکننده (۱۸)
Fig 2) The external anatomy of a brittle star (18)

ترکیبات موجود در مایع سلومیک ستاره شکننده، غنی از ملکول‌های پپتیدی، فاکتورهای رشد و نوروپپتیدهایی است که در فرآیندهای سیگنالینگ توأم، شرکت دارند. از طرفی، ملکول‌های لکتین، پرفورین، آگلوتین و سیتوکینین موجود در ستاره شکننده در خنثی شدن و یا از بین بردن مواد خارجی، تسهیل مهاجرت و آگلوتیناسیون سلولی شده و در مکانیسم ترمیم زخم حائز اهمیت می‌باشند. ساپونین، ترکیبات ساپونینی و گلیکوزیدهای استروئیدی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه، از جمله ترکیباتی هستند که فعالیت‌های ضدعفونی کننده، ضدقارچی، ضدپاتوژنی، ضدتوموری و ضددیابتی داشته و در ستاره شکننده به‌وفور یافت می‌شوند (۱۹ و ۲۰). این ترکیبات به‌دلیل فعالیت سطحی خود، قادر به ایجاد اختلال در غشای سلولی و تشکیل گروه‌هایی با کلسترول غشای سلول می‌باشند؛ از این عمل لیتیک بر روی غشای گلبول‌های قرمز برای شناسایی ساپونین استفاده می‌گردد (۲۱). همچنین ستاره شکننده، حاوی ترکیبات آلی آبگریز سمی مانند بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه و هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقوی است که انتظار می‌رود فعالیت‌های زیستی متعددی را موجب شوند (۲۲). متابولیت‌های ثانویه مختلفی نظیر ترکیبات استروئیدی، گروه‌های مختلف ترپن‌ها، کاروتنوئیدها (۹)، گانگلیوزیدها، ایندول‌های برومینه و فنیل پروپانوئیدها (۲۳)، استروئیدهای سولفاته (۲۴)، از ستارگان شکننده جدا شده‌اند. نشان داده شده است که اثرات ضدویروسی ستاره شکننده، به‌دلیل متابولیت‌های زیست‌فعال استرولی، گلیکوزیدهای استروئیدی، سولفات‌های کاروتنوئیدی و نفتوکینون‌های آن‌ها است که به حیات آن‌ها در محیط زیست خود کمک می‌نماید (۲۵). ترکیبات استروئیدی ستاره شکننده اوفیوسنمیس مورموراتا[38] دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی، همولیتیک و سیتوتوکسیک هستند (۲۶)، همچنین مشخص گردیده است که پلی‌هیدروکسی استروئیدهای دی‌سولفاته ستاره شکننده اوفیوفولیس آکولئات[39] اقیانوس آرام، به‌عنوان یک آگونیست قوی Ca^{+2} در سیستم‌های سلولی پستانداران عمل می‌نماید (۲۷).

بیماری آلزایمر یک اختلال عصبی کشنده است که موجب از دست رفتن عصب و افزایش اختلال عملکرد شناختی می‌گردد (۲۸ و ۲۹). از مؤثرترین درمان‌ها جهت برخی از اثرات آلزایمر خفیف تا متوسط، افزایش انتقال عصبی کولینرژیک با تجویز یک مهارکننده استیل‌کولین‌استراز (AChEI)، نظیر دونپزیل، گالانتامین و ریواستیگمین برای سرکوب هیدرولیز استیل کولین آزاد شده (ACh) است. یکی از جذاب‌ترین رویکردها برای درمان این بیماری، جستجوی ترکیبات زیست فعال مؤثر با فعالیت‌های بازدارندگی کولین‌استراز از

[37] Dorsal
[38] *Ophiocnenmis mormorata*
[39] *Ophiopholis aculeate*

منابع طبیعی زمینی و دریایی است (۲۸). ترکیبات طبیعی و توکسین‌های دریایی به‌ندرت برای فعالیت‌های آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۳۰ و ۳۱). با وجودی که، برخی از آن‌ها فعالیت‌های مهاری آنزیمی قوی‌تری نسبت به استانداردهای مرجع خود نشان داده‌اند (۲۸). مطالعات محاسباتی روابط ساختار- فعالیت، فرصتی برای تلاش‌های تحقیقاتی آینده در مورد توکسین‌های دریایی برای دستیابی به داروهای جدید را فراهم می‌نماید (۳۱). با توجه به وفور ستاره شکننده اوفیوکوما ارینا‌سئوس[40] خلیج‌فارس در گستره سواحل بوشهر و از طرفی آگاهی از برخی اثرات بیولوژیکی این زیستمندان دریایی بر اساس متون، مطالعه حاضر به منظور بررسی فعالیت‌های مهارکنندگی استیل کولین استرازی و بوتیریل کولین استرازی در شرایط آزمایشگاهی زهر خام و مطالعات بیوانفورماتیکی متابولیت‌های ثانویه مرتبط با آن انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

تمام مواد شیمیایی، حلال‌ها و استانداردهای مورد استفاده جهت استخراج و آنالیز نمونه از شرکت‌های شیمیایی مرک (دارمشتات[41]، آلمان) و سیگما (دیسنهافن[42]، آلمان) تهیه گردیدند.

نمونه‌گیری و آماده‌سازی اولیه نمونه

این مطالعه، توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز- ایران، تأیید و به صورت مشترک با دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام گردید. کلیه تست‌های حیوانی، مطابق با دستورالعمل ملی اخلاقی برای تحقیقات حیوانی در ایران (۲۰۰۵)، تحت مجوز پروژه مورد تأیید کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (IR.SUMS.REC .۱۴۰۰.۷۵۱) انجام گردید.

تعداد ۳۰ نمونه زنده ستاره شکننده اوفیوکوما ارینا‌سئوس توسط غواصان پژوهشکده زیست پزشکی دریایی خلیج‌فارس دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به‌وسیله تور صیادی، از بندر صیادی جفره ماهینی خلیج‌فارس- بوشهر (28°58'18.5"N, 50°49'06.6"E)، در بهار ۱۴۰۰ صید گردید (شکل ۳- الف). نمونه‌ها توسط آب دریا جهت رفع آلودگی‌هایی از قبیل شن و ماسه شستشو داده شدند و بلافاصله در جعبه یونولیت، به آزمایشگاه سم‌شناسی و آنالیز دستگاهی معاونت غذا و دارو بوشهر منتقل گردید. شناسایی گونه توسط گروه زیست‌شناسی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج‌فارس، دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر- ایران، انجام گردید. ابتدا نمونه‌های ستاره شکننده اوفیوکوما ارینا‌سئوس با آب مقطر شستشو داده شدند تا آب دریا و نمک اضافی آن جدا شود؛ سپس، جهت آماده‌سازی و انجام عمل عصاره‌گیری، با قرار دادن جانوران در جعبه محتوی کلروفروم، بیهوش گردیدند. پس از بیهوشی و مرگ جانور، ابتدا بخش‌های دیسک مرکزی و بازوهای ستاره شکننده با قیچی به قطعات کوچک‌تر تبدیل و سپس توسط هموژنایزر (IKA، آلمان)، هموژن گردیدند. جهت حذف حداکثری رسوبات، نمونه‌ها در دور ۴۰۰۰ دور بر دقیقه (rpm)، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C، سانتریفیوژ شدند (اپندورف، آلمان) و جهت خشک شدن کامل، به دستگاه فریز درایر ۸۱°C- منتقل گردید (کریست[43]، انگلستان). نمونه‌های لیوفیلیزه در ویال‌های سر بسته تا مرحله کوتاه آنالیز در ۲۰°C- نگهداری گردیدند (شکل ۳) (۲۸).

[40] *Ophiocoma erinaceus*
[41] Darmstadt
[42] Deisenhofen
[43] Christ

شکل ۳) محل نمونه‌گیری ستاره شکننده اوفیوکوما ارییناسئوس. بندر صیادی جفره ماهینی بوشهر- خلیج‌فارس (28°58'18.5"N, 50°49'06.6"E) (الف)؛ نمونه‌های ستاره‌های شکننده (ب)؛ لیوفیلیزه کردن نمونه‌ها (ج)؛ نمونه‌های لیوفیلیزه (د).

Fig 3) Location map of the sampling area of Brittle Star *Ophiocoma erinaceus.* (Jofreh-Mahini Quay waters, Bushehr- Persian Gulf (28°58'18.5"N, 50°49'06.6"E) (a); the Brittle star samples (b); lyophilization of the samples (c); lyophilized samples (d).

فاکتورهای مورد مطالعه

در این مطالعه فاکتورهای تعیین LD_{50} به روش اسپیرمن-کاربر[44]، سنجش میزان مهار فعالیت آنزیم‌های کولین‌استراز به روش اصلاح شده اسپکتروسکوپی المن[45]، تعیین ترکیبات شیمیایی فرار (متابولیت‌های ثانویه) به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی[46]، مطالعه درون رایانه‌ای اثرات آنتی‌کولین استرازی به روش داکینگ و با سه بار تکرار انجام گرفتند. آزمون‌ها در آزمایشگاه سم‌شناسی و آنالیز دستگاهی معاونت غذا و داروی بوشهر، پژوهشکده زیست‌پزشکی دریایی علوم پزشکی بوشهر و مرکز مطالعات دانشگاه خلیج‌فارس- بوشهر انجام گرفتند.

تعیین میزان LD_{50}

به منظور تعیین LD_{50} نمونه لیوفیلیزه ستاره شکننده اوفیوکوما ارییناسئوس، از روش اسپیرمن- کاربر، بهره برده شد (۳۲). به‌طور خلاصه، ابتدا یک محلول حاوی ۵ میلی‌گرم از نمونه لیوفیلیزه در ۰/۵ میلی‌لیتر سرم نرمال سالین استریل ساخته شد. نمونه، ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس و به مدت ۴ ساعت با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه، توسط روتاتور به‌هم زده شد. پس از آن، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برداشته شد و با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر گردید. سپس غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه گردید؛ پس از رقت‌سازی، سه تزریق ۰/۵ میلی‌لیتری حاوی غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به موش صحرائی نر نژاد ویستار به میانگین وزن ۲±۱۸۰ گرمی (هر گروه چهار حیوان)، به‌صورت داخل وریدی انجام گردید تا LD_{50} در زمان

[44] Spearman-Karber
[45] Ellman
[46] GC-MS

۲۴ ساعته تعیین شود. همین حجم، به یک گروه به‌عنوان کنترل، نرمال سالین تزریق گردید. برای تشخیص گروه‌های مختلف موش‌ها از رنگ‌آمیزی استفاده گردید.

تعیین فعالیت آنزیم‌های استیل و بوتیریل‌کولین‌استراز

نمونه پودر لیوفیلیزه ستاره شکننده اوفیوکوما ارییناسئوس برای توانایی مهار فعالیت استیل و بوتیریل- کولین‌استرازی (Electrophorus electricus AChE, type V, 1000 unit/ mg protein, Sigma- Aldrich C2888-)، با توجه به‌روش کینیتیک اصلاح شده المن توسط وورک (Worek) و همکاران (۳۳) انجام گردید. استیل‌تیوکولین‌یدید[47] و بوتیریل‌تیوکولین‌یدید[48]، به‌ترتیب به عنوان سوبسترا برای بررسی فعالیت استیل و بوتیریل‌کولین استراز، مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت‌های کولین‌استرازی در نمونه در حضور مهار کننده انتخابی گالانتامین، تعیین شد. اساس این روش اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به عنوان محصول کاتالیز آنزیمی بر روی استیل‌تیوکولین‌یدید می‌باشد. تیوکولین به محض تولید با دی‌تیو دی‌نیترو دی‌بنزوئیک اسید (DTNB) واکنش می‌دهد تا آنیون زردرنگ تیونیتروبنزوات ایجاد شود (۳۴).

برای این آزمون، در ابتدا غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نمونه در آب مقطر تهیه شد. برای تهیه بافر فسفات با غلظت ۰/۱ مولار و pH:7.4، ابتدا مقدار ۱۷/۸ گرم $Na_2HPO_4.2H_2O$ در یک لیتر آب مقطر (محلول A) و سپس مقدار ۲/۷۲ گرم از KH_2PO_4 در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (محلول B) حل گردیدند و سپس در دمای اتاق، محلول آماده شده B آنقدر به محلول A اضافه گردید تا pH محلول به ۷/۴ برسد. محلول بافر فسفات به‌دست آمده، صاف شد. برای تهیه واکنش‌گر المن با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، میزان ۳۹۶/۳ میلی‌گرم از DTNB به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه و توسط همزن مغناطیسی بهم زده شد. سپس به قسمت‌های ۵ میلی‌لیتری تقسیم و در دمای ۲۰°C- نگهداری گردیدند. محلول‌های استیل تیوکولین یدید با غلظت ۲۸/۳ میلی‌مولار و بوتیریل تیوکولین یدید با غلظت ۶۳/۲ میلی‌مولار، به‌طور جداگانه به‌ترتیب با اضافه نمودن ۸۲/۲۴ میلی‌گرم از استیل تیوکولین یدید به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰/۴۷ میلی‌گرم از بوتیریل تیوکولین در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ساخته شدند و در میکروتیوب به قسمت‌های یک میلی‌لیتری تقسیم و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. فعالیت استیل‌کولین استراز در حضور مهار کننده انتخابی بوتیریل‌کولین استراز یعنی اتوپروپازین اندازه‌گیری گردید تا فعالیت آنزیم مذکور در تعیین میزان فعالیت AChE مزاحمتی ایجاد ننماید. اتوپروپازین با غلظت ۶ میلی‌مولار با ۲۰/۹۴ میلی‌گرم اتوپروپازین در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۱۲ میلی‌مولار به آهستگی حل و به قسمت‌های مساوی ۵۰۰ میکرولیتری تقسیم و در دمای ۲۰°C- نگهداری گردیدند.

جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز، برای هر نمونه دو کووت در نظر گرفته شد؛ یکی جهت اندازه‌گیری آنزیم و دیگری برای بلانک آماده گردیدند. ابتدا، مقادیر دو میلی‌لیتر بافر فسفات، ۰/۱ میلی‌لیتر معرف DTNB، ۰/۰۱ میلی‌لیتر معرف اتوپروپازین- به‌عنوان مهار کننده انتخابی آنزیم BChE- و نیز ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم AChE به کووت اندازه‌گیری آنزیم افزوده شدند. پس از آن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به تعادل نگهداری و بلافاصله پس از پایان زمان انکوباسیون، به کووت محتوی آنزیم، مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر سوبسترای استیل‌تیوکولین‌یدید افزوده شد. جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز، ابتدا به کووت

[47] ASCh

[48] BSCh

آنزیم، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۰/۱ میلی‌لیتر معرف DTNB، ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم BChE اضافه گردید. به همین ترتیب، برای رسیدن به تعادل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بلافاصله پس از پایان زمان انکوباسیون، به کووت محتوی آنزیم، مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر بوتیریل تیوکولین‌یدید به‌عنوان سوبسترای آنزیم افزوده شد. بلافاصله، فعالیت آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز در ۴۳۶ نانومتر در طی سه دقیقه در فواصل ۱۵ ثانیه‌ای با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV-VIS CECIL) و با استفاده از نرم‌افزار کینیتیک که میزان تغییرات جذب را بر حسب زمان نشان می‌دهد، اندازه‌گیری گردید (۳۳). این سنجش، برای هر نمونه در سه بار تکرار انجام گردید. جهت نمونه بلانک، از بافر فسفات به جای هر دو آنزیم استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری فعالیت هر آنزیم در حضور نمونه، همانند روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مورد ذکر عمل گردید با این تفاوت که مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر نمونه با غلظت ۱ میلی‌گرم بر مول، قبل از انکوباسیون به مواد در کووت مورد نظر اضافه گردید. علاوه بر این، از گالانتامین (۶۰ میکرولیتر)، بعنوان استاندارد مهارکننده فعالیت آنزیم استفاده گردید. فعالیت هر یک از آنزیم‌ها میکرومول بر لیتر بر دقیقه (µmol/l/min) با استفاده از رابطه (i) و درصد مهاری آنزیم‌های استیل و بوتیریل‌کولین استراز با استفاده از رابطه (ii) محاسبه گردیدند:

رابطه (i):

$$\text{Enzyme activity (µmol/l/min)} = \frac{\text{Sample (mE/min)} - \text{Blank (mE/min)}}{10.6}$$

رابطه (ii):

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(E - S)}{E} \times 100$$

که در آن "E" فعالیت‌های آنزیم بدون نمونه‌های مورد آزمون و "S" فعالیت‌های آنزیم در حضور نمونه مورد آزمون می‌باشد. غلظت‌های نمونه‌هایی که موجب مهار ۵۰ درصدی هیدرولیز سوبسترا (IC_{50}) می‌گردند با آنالیز رگرسیون خطی بین درصدهای مهاری در مقابل غلظت‌های نمونه توسط اکسل تعیین گردیدند (۲۸).

تعیین ترکیبات شیمیایی (متابولیت‌های ثانویه) به روش GC-MS

جهت تعیین ترکیبات شیمیایی، ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه پودر لیوفیلیزه ستاره شکننده اوفیوکوما ارناسئوس، با ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال‌های متانول: استونیتریل: اتیل‌استات (۲:۲:۱) به مدت ۴ ساعت با سرعت rpm ۱۲۰ توسط روتاتور به هم زده شدند. پس از آن، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برداشته و با کاغذ واتمن شماره (۱) فیلتر گردیدند. پس از آن، حلال‌ها توسط روتاری اواپراتور، تغلیظ گردیدند. جهت تعیین نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه، مقدار یک میکرولیتر از عصاره آلی، به دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز جرمی (Agilent 5977A-MS، 5890B-GC) و یک ستون کاپیلاری HP-5MS (طول: ۳۰ متر، قطر داخلی: ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت فیلم: ۰/۲۵ میکرومتر)، تزریق گردیدند. در برنامه‌ریزی دمایی، دمای آون، سه دقیقه پس از تزریق نمونه، از دمای ۸۰°C به ۲۳۰°C افزایش یافت و به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت شد. همچنین، زمان اجرا ۳۷/۶۶ دقیقه بود. دماهای اینجکتور و دتکتور به‌ترتیب ۲۵۰°C و ۲۴۰°C و نیز، دماهای منبع یون و چهار قطبی به‌ترتیب ۲۲۰°C و ۱۵۰°C بودند. از گاز هلیم با فلوی ۲۱/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و فشار چهار psi با نسبت ۳۰:۱ به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. پردازش توسط نرم‌افزار کمستیشن صورت گرفت. طیف‌سنج جرمی چهار قطبی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت مورد استفاده قرار گرفت. شناسایی ترکیبات، بر اساس طیف‌های جرمی با استفاده از داده‌های

کتابخانه‌های وایلی[49] و ان آی اس تی آدامز[50] دستگاه انجام گردیدند. از پابکم[51] نیز جهت تائید ساختارها استفاده گردید. شناسایی و فراوانی نسبی (٪) هر یک از مؤلفه‌ها با مقایسه میانگین سطح زیر پیک به کل سطح موجود، اندازه‌گیری گردیدند (۲۸).

فعالیت‌های آنتی‌کولین‌استرازی به روش درون رایانه‌ای

جهت مطالعه درون رایانه‌ای فعالیت‌های آنتی‌کولین استرازی پودر لیوفیلیزه ستاره شکننده، داکینگ ترکیبات شناسایی شده توسط GC-MS، انجام گردیدند؛ بدین منظور، ترکیبات شناسایی شده از GC-MS و گالانتامین (به‌عنوان استاندارد مهارکننده استیل‌کولین‌استراز)، ابتدا ساختار آن‌ها با نرم افزار گوس‌ویو 5.0[52] (340 Quinnipiac St Bldg 40 Wallingford, CT 06492 USA) تهیه و ساختار لیگاندها با استفاده از روش DFT و مجموعه پایه b31yp/6-311g بهینه‌سازی شد. ساختارهای حاصله جهت مطالعات داکینگ در برابر استیل‌کولین‌استراز (PDB Code:4BDT) و بوتیریل‌کولین‌استراز (PDB Code:4TPK) توسط نرم‌افزار اوتوداک وینا[53] مورد استفاده قرار گرفتند (۳۱).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام و داده‌های هر گروه بر اساس میانگین (±SD)، بیان گردیدند. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ و جهت رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد. به‌منظور بررسی اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA) و به دنبال آن از آزمون تعقیبی دانت جهت مقایسه با گروه کنترل در سطح معناداری آزمون ($p<۰/۰۵$) استفاده گردیدند. مدیریت دستگاه GC-MS توسط نرم‌افزار کمستیشن[54] انجام گرفت.

یافته‌ها

تعیین میزان LD_{50}

میزان LD_{50} نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس به‌صورت تجویز داخل وریدی در موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲±۱۸۰ گرم در یک دوره مشاهده ۲۴ ساعته، معادل ۰/۱۳۰±۶/۰۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش بود.

فعالیت‌های مهاری استیل و بوتیریل‌کولین‌استراز

داده‌های تجربی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی المن نشان داد که زهر خام ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس به‌عنوان مهارکننده‌های قابل قبول استیل کولین‌استراز و قوی بوتیریل‌کولین‌استراز عمل می‌کند. بر اساس نتایج، میانگین درصدهای مهاری (I٪) نمونه زهر خام ستاره شکننده مربوط به آنزیم استیل‌کولین استراز در دمای ۳۷°C برابر ۰/۰۵۷±۱۵/۸۹۹ و برای استاندارد گالانتامین ۰/۱۳۰±۴۳/۵۱۴ درصد بودند. بر اساس آنالیز آماری، میزان میانگین درصد مهاری (I٪) آنزیم AChE نمونه زهر خام در مقایسه با استاندارد گالانتامین دارای تفاوت معناداری بود ($p<۰/۰۰۱$). علاوه بر این، مقادیر درصد مهاری (I٪) مربوط به آنزیم بوتیریل‌کولین‌استراز نمونه ستاره شکننده ۰/۰۲ ± ۶۶/۲۲۳ و این مقدار مهاری برای استاندارد گالانتامین به میزان ۰/۰۲۹±۵۳/۰۰۵ درصد بود. میزان درصد مهاری (I٪) آنزیم BChE نمونه نسبت به استاندارد گالانتامین دارای تفاوت معناداری بود ($p<۰/۰۰۱$).

بر اساس نتایج، مقادیر IC_{50} مربوط به آنزیم استیل کولین استرازی نمونه، ۰/۰۵۵±۳۷/۹۲۵ میکروگرم بر

[49] Willy
[50] NIST Adams
[51] PubChem
[52] Gauss view
[53] Autodok Vina Software
[54] GC/MSD ChemStation

میلی‌لیتر بود. علاوه بر این، مقدار IC_{50} مربوط به بوتیریل‌کولین‌استراز آن ۰/۰۲۰±۵/۳۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. جهت مقایسه، مقادیر IC_{50} مربوط به استاندارد گالانتامین برای آنزیم‌های استیل و بوتیریل‌کولین استراز به‌ترتیب ۰/۱۲۶±۹/۳۰۷ و ۰/۰۳۱ ± ۹/۳۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. بر اساس آنالیز آماری، میزان IC_{50} مربوط به آنزیم AChE و BChE نمونه در مقایسه با استاندارد گالانتامین دارای تفاوت معناداری بودند ($p<0/001$). بر اساس نتایج، نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما ارناسئوس دارای میزان IC_{50} پایین‌تر و میزان فعالیت مهاری بالاتری علیه بوتیریل‌کولین استراز در مقایسه با استاندارد گالانتامین بود. لازم به ذکر است که ترکیباتی با IC_{50} زیر ۱۰ دارای مهارکنندگی قوی، بین ۱۰۰–۱۰ متوسط و بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار ضعیف محسوب می‌شوند (۳۵).

نتایج حاصل از آنالیز GC-MS نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما ارناسئوس

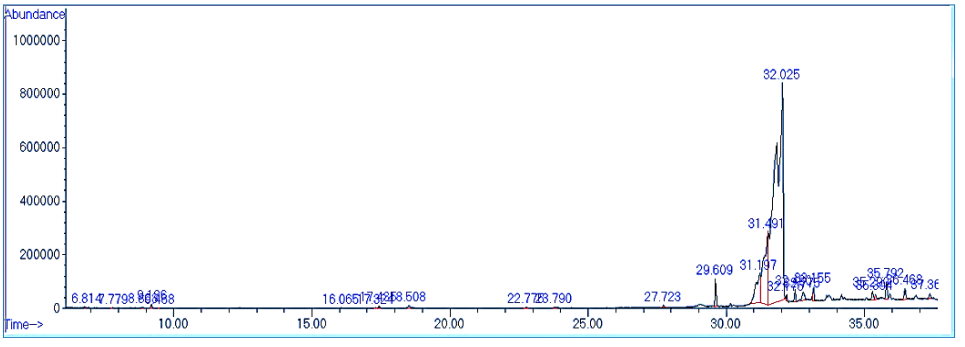
جدول (۱)، تعداد ۲۵ ترکیب شیمیایی مختلف حاصل آنالیز GC-MS، در عصاره اتیل‌استات: استونیتریل: متانولی (۲:۲:۱)، مربوط به نمونه ستاره شکننده به‌دست آمده از سواحل بوشهر را نشان می‌دهد.

جدول ۱) ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در عصاره اتیل‌استات: استونیتریل: متانولی (۲:۲:۱) نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما ارناسئوس به دست آمده از سواحل بوشهر بر اساس آنالیز GC-MS

ردیف	ترکیب شیمیایی	گروه عاملی و یا هسته	فرمول مولکولی	جرم مولکولی (g/mol)	فراوانی (٪)	RT (دقیقه)
BS_1	1-Pentanamine, N-nitro-	نیترامین	$C_5H_{12}N_2O_2$	۱۳۲/۱۶	۰/۰۱۸	۶/۸۱۴
BS_2	2-Bromononane	آلکان برومینه	$C_9H_{19}Br$	۲۰۷/۱۵	۰/۰۲۳	۷/۷۷۹
BS_3	Decane,2,4,6-trimethyl-	آلکان	$C_{13}H_{28}$	۱۸۴/۳۶	۰/۰۳۲	۸/۸۶۸
BS_4	(3H) Pyrazole,3,5-diphenyl-3-methyl-	آلکالوئید	$C_{16}H_{14}N_2$	۲۳۴/۲۹	۰/۲۰۸	۹/۱۸۶
BS_5	1H-Tetrazol-5-amine	آلکالوئید	CH_3N_5	۸۵/۰۷	۰/۰۱۰	۹/۴۶۸
BS_6	Squalene	تری‌ترپن	$C_{30}H_{50}$	۴۱۰/۷	۰/۰۳۱	۱۶/۰۶۵
BS_7	Anosmagenin	ساپونین استروئیدی؛ پلی‌هیدروکسی–استروئید	$C_{27}H_{42}O_5$	۴۴۶/۶۱	۰/۰۲۳	۱۷/۳۲۴
BS_8	n-Hexadecanoic acid	اسید چرب	$C_{16}H_{32}O_2$	۲۵۶/۴۲	۰/۱۴۴	۱۷/۴۳۵
BS_9	Ethaneperoxoic acid,1-cyano-1-[2-(-phenyl-1,3-dioxolan-2-yl) ethyl] penthyl ester	کتال	$C_{19}H_{25}NO_5$	۳۴۷/۴	۰/۱۸۹	۱۸/۵۰۸
BS_{10}	3H-1,2,4-Triazole-3-thione,2,4-dihydro-2,4,5-trimethyl-	آلکالوئید	$C_5H_9N_3S$	۱۴۳/۲۱	۰/۰۶۱	۲۲/۷۷۵
BS_{11}	Octadecanoic acid	اسید چرب	$C_{18}H_{36}O_2$	۲۸۴/۵	۰/۰۷۸	۲۳/۷۹۰
BS_{12}	Ergotaman-3′,6′,18-trione,12′-hydroxy-2′-methyl-5′-(2-methylpropyl)-, (5′à)-	آلکالوئید ارگوت	$C_{30}H_{37}N_5O_5$	۵۴۷/۶	۰/۲۰۰	۲۲/۷۲۳
BS_{13}	Pseduosarsasapogenin-5,20-dien	ساپونین استروئیدی؛ پلی‌هیدروکسی–استروئید	$C_{27}H_{42}O_3$	۴۱۴/۶	۱/۱۵۰	۲۹/۶۰۹
BS_{14}	Spirost-8-en-11-one, 3-hydroxy-, (3à, 5à, 14à, 20à,22à, 25R)-	استرول اسپیروست؛ پلی‌هیدروکسی استروئید	$C_{27}H_{40}O_4$	۴۲۸/۶	۵/۶۶۷	۳۱/۱۹۷
BS_{15}	Pregnane-3,11,20,21-tetrol, cyclic 20,21- (butylboronate), (3à, 5à,11à, 20R)-	پلی‌هیدروکسی استروئید؛ استرول پرگنان	$C_{25}H_{43}BO_4$	۴۱۸/۴	۱۲/۹۳۳	۳۱/۴۹۱
BS_{16}	Megestrol Acetate	پلی‌هیدروکسی استرول	$C_{24}H_{32}O_4$	۳۸۴/۵	۷۳/۶۷۹	۳۲/۰۲۵
BS_{17}	Ergosta-5,22-dien-3-ol, acetate, (3à, 22E)-	استرول	$C_{30}H_{48}O_2$	۴۴۰/۷	۰/۲۳۳	۳۲/۱۷۵
BS_{18}	5-(P-Aminophenyl) -4-(p-tolyl) -2-thiazolamine	آلکالوئید	$C_{16}H_{15}N_3S$	۲۸۱/۴	۰/۴۶۰	۳۲/۴۸۰
BS_{19}	5-Pregnen-3à, 9à-diol-20-one 3-acetate	پلی‌هیدروکسی استرول	$C_{23}H_{34}O_4$	۳۷۴/۵	۰/۸۷۸	۳۲/۷۷۵
BS_{20}	Cholesta-3,5-diene	استرول	$C_{27}H_{44}$	۳۶۸/۶	۰/۶۵۴	۳۳/۱۵۵
BS_{21}	Sarpagan-17-ol,16-[(acetyloxy)methyl]-, acetate (ester)	ایندول آلکالوئید	$C_{24}H_{28}N_2O_4$	۴۰۸/۵	۰/۵۸۰	۳۵/۲۹۰
BS_{22}	Demecolcine	آلکالوئید	$C_{21}H_{25}NO_5$	۳۷۱/۴	۰/۳۳۹	۳۵/۳۹۴
BS_{23}	psi.,.psi.-Carotene, 1,1',2,2'-tetrahydro-1,1'-dimethoxy-	گزانتوفیل	$C_{42}H_{64}O_2$	۶۰۱/۰	۱/۱۳۰	۳۵/۷۹۲
BS_{24}	à-Hydroxy quebrachamine	ایندول آلکالوئید	$C_{19}H_{26}N_2O$	۲۹۸/۴	۰/۹۰۱	۳۶/۴۶۸
BS_{25}	Cholic acid	پلی‌هیدروکسی استرول	$C_{24}H_{40}O_5$	۴۰۸/۶	۰/۳۷۸	۳۷/۳۶۸

از بین ۲۵ ترکیب شیمیایی نمونه ستاره شکننده (**BS_1–BS_{25}**)، علاوه بر ترکیبات آلکانی، اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها، تعداد قابل ملاحظه‌ای شامل نه استروئید و مشتقات آن، هشت آلکالوئید با هسته‌های مختلف پیرازولی، تترازولی، تریازولی، ایندولی و تیازول آمینی و سایر ترکیبات پر اهمیتی چون ترپن‌ها و کارتنوئیدها یافت گردید.

در شکل (۴)، نمونه‌ای از کروماتوگرام GC-MS مربوط به عصاره اتیل‌استات: استونیتریل: متانولی (۲:۲:۱)، مربوط به نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس به‌دست آمده از سواحل بوشهر نشان داده شده‌است.



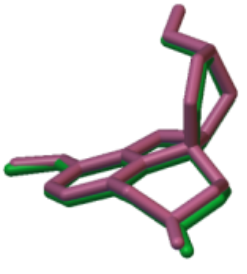
شکل ۴) کروماتوگرام GC-MS مربوط به ترکیبات شیمیایی ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس سواحل بوشهر

Fig 4) The GC-MS chromatogram related to the chemical composition of the brittle star *Ophiocoma erinaceus* on Bushehr coast

نتایج داکینگ مولکولی

هر دو روش تجربی و محاسباتی، نقش‌های کلیدی را در کشف و توسعه داروها ایفاء می‌نمایند. داکینگ مولکول‌های زیستی با ساختارهای شناخته شده، حتی با شواهد تجربی محدود، به سرعت به یک ابزار استاندارد برای توسعه زیست شناسی ساختاری و کشف داروها تبدیل شده است (۳۶). از این رو، برای درک بهتر نتایج تجربی، داکینگ مولکولی ترکیبات حاصل از آنالیز GC-MS نمونه لیوفیلیزه ستاره شکننده نیز انجام شد.

جهت اعتبارسنجی روش داکینگ مولکولی، لیگاند گالانتامین از ساختار آنزیم حذف گردید و پس از انجام داکینگ، با ساختار کریستالی آنزیم اولیه به همراه لیگاند گالانتامین مقایسه گردید. بدین جهت، ساختارهای به دست آمده در برنامه Autodock Tools ویرایش ۱.۵.۷ بر روی هم انطباق داده شدند (شکل ۵) و میزان خطای جذر میانگین مربعات (RMSD)[55] برای آن‌ها محاسبه گردید. مقادیر کوچک‌تر از ۲ نشان از انطباق مطلوب ساختارهای داکینگ شده با نتایج تجربی دارد و مؤید صحت محاسبات داکینگ می‌باشد (۳۶). میزان RMSD، برای این مطالعه برابر ۰/۳۳۸ برآورد گردید که نشان از صحت محاسبات انجام شده دارد.

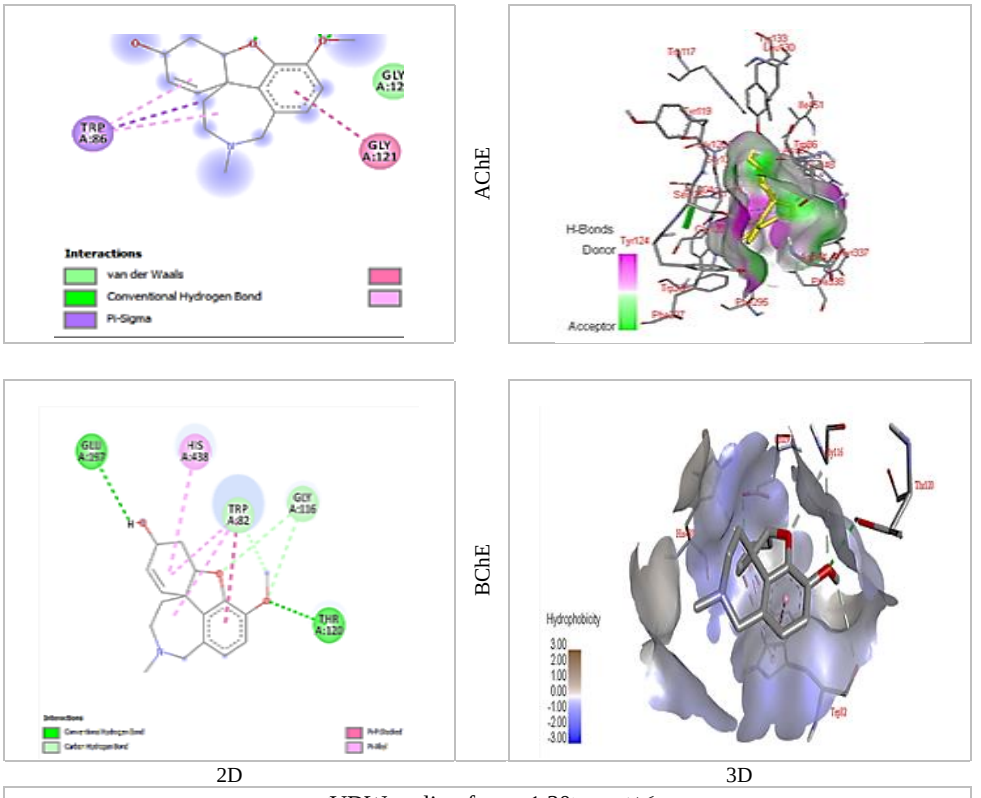


شکل ۵) همپوشانی لیگاند گالانتامین در جایگاه فعال آنزیم استیل‌کولین استراز (سبز: نتایج تجربی، قرمز: نتایج داکینگ مولکولی)

Fig 5) Overlap of the galantamine ligand in the active site of AChE enzyme (green: experimental results, red: molecular docking results)

[55] Root Mean Square Deviation

در شکل (۶)، مولکول گالانتامین در جایگاه فعال آنزیم‌های AChE و BChE همراه با بقایای لیگاند آنزیم آورده شده است.



گالانتامین (VDW scaling factor 1.30)

شکل ۶) تصاویر دو بعدی و سه بعدی داکینگ ملکولی گالانتامین (به عنوان استاندارد) در جایگاه‌های فعال آنزیم‌های AChE و BChE

Fig 6) Two-dimensional and three-dimensional images of molecular docking of galantamine (as standard) with the active sites of AChE and BChE enzymes

نتایج تمایل[56] ($Kcal\ mol^{-1}$) و انتخاب‌گری[57] حاصل از روش داکینگ برای گالانتامین و ۲۵ ترکیب حاصل از آنالیز نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس با استفاده از روش GC-MS در برابر آنزیم‌های استیل و بوتیریل‌کولین‌استراز در جدول (۲) خلاصه شده است. فاکتور تمایل (افینیتی)، نشان دهنده قدرت برهمکنش‌های ترکیب لیگاندهای مولکولی به محل اتصال مناسب گیرنده، از طریق پیوندهای مختلف شیمیایی مختلف نظیر کووالانسی، واندروالس و یونی می‌باشند. جهت نشان دادن تمایل یک ترکیب به آنزیم‌های استیل‌کولین استراز یا بوتیریل کولین استراز، از فاکتور انتخاب‌گری استفاده می‌گردد. از نسبت میزان تمایل آنزیم BChE به میزان تمایل آنزیم AChE، انتخاب‌گری یا سلکتیویتی AChE به دست می‌آید. همچنین، میزان انتخاب‌گری BChE، از نسبت تمایل آنزیم AChE به تمایل BChE محاسبه می‌گردد (۳۱). نزدیک بودن انتخابگری دو آنزیم به هم، نزدیکی تمایل ترکیب را به هر دو آنزیم نشان می‌دهد. با این حال، معدودی مهارکننده‌های بسیار انتخابی و قوی بوتیریل کولین استراز گزارش شده‌اند.

[56] Affinity

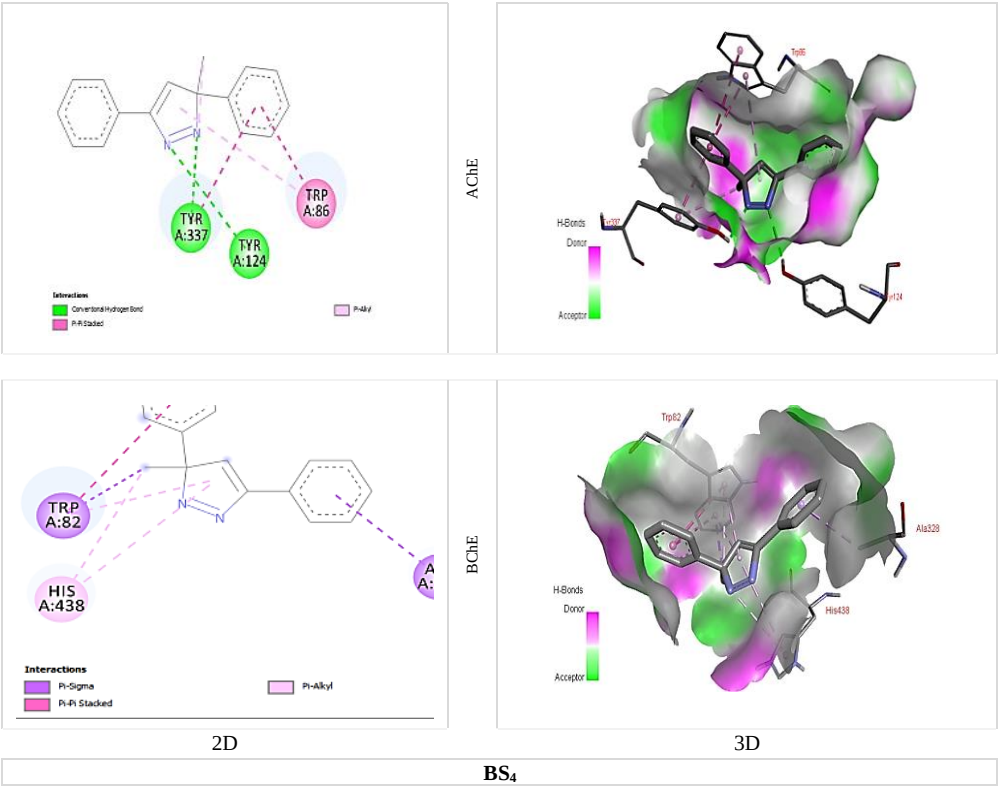
[57] Selectivity

جدول ۲) نتایج مربوط به تمایل ($kcal\ mol^{-1}$) و انتخاب‌گری حاصل از روش داکینگ برای گالانتامین و ترکیبات حاصل از آنالیز GC-MS نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس در برابر آنزیم‌های AChE و BChE

ترکیب	تمایل (*kcal/mol*)		*انتخاب‌گری	
	AChE	BChE	AChE	BChE
BS_1	−۵/۲	−۴/۷	۰/۹۰۳	۱/۱۰۶
BS_2	−۵/۹	−۴/۸	۰/۸۱۳	۱/۲۲۹
BS_3	−۶/۴	−۵/۲	۰/۸۱۲	۱/۲۳۰
BS_4	−۱۰/۱	−۸/۲	۰/۸۱۱	۱/۲۳۱
BS_5	−۴/۵	−۳/۸	۰/۸۴۴	۱/۱۸۴
BS_6	−۸/۷	۰/۹	−۰/۱۰۳	−۹/۶۶
BS_7	−۵/۳	۲۱/۶	−۴/۰۷۵	−۰/۲۴۵
BS_8	−۶/۵	−۵/۵	۰/۸۴۶	۱/۱۸۱
BS_9	−۸/۷	−۷/۴	۰/۸۵۰	۱/۱۷۵
BS_{10}	−۵/۳	−۴/۵	۰/۸۴۹	۱/۱۷۷
BS_{11}	−۶/۸	−۵/۵	۰/۸۰۸	۱/۲۳۶
BS_{12}	−۰/۷	۸/۹	−۱۲/۷۱۴	−۰/۰۷۸
BS_{13}	−۲/۲	−۰/۶	۰/۲۷۲	۳/۶۶۶
BS_{14}	−۵/۳	۱۴/۲	−۲/۶۷۹	−۰/۳۷۳
BS_{15}	−۵/۹	−۵/۷	۰/۹۶۶	۱/۰۳۵
BS_{16}	−۵/۹	−۶/۳	۱/۰۶۷	۰/۹۳۶
BS_{17}	−۲/۲	۱/۴	−۰/۶۳۶	−۱/۵۷۱
BS_{18}	−۱۰/۰	−۵/۸	۰/۵۸	۱/۷۲۴
BS_{19}	−۵/۸	−۵/۶	۰/۹۶۵	۱/۰۳۵
BS_{20}	−۵/۷	−۵/۰	۰/۸۷۷	۱/۱۴
BS_{21}	−۸/۲	−۵/۳	۰/۶۴۳	۱/۵۴۷
BS_{22}	−۸/۵	−۵/۰	۰/۵۸۸	۱/۷
BS_{23}	۶/۲	۱۱۲/۹	۱۸/۲۰۹	۰/۰۵۴
BS_{24}	−۸/۰	−۶/۷	۰/۸۳۷	۱/۱۹۴
BS_{25}	−۴/۰	−۳/۶	۰/۹	۱/۱۱۱
گالانتامین	−۷/۱	−۵/۹	۰/۸۳۰	۱/۲۰۳

*Selectivity for AChE is defined as Affinity (BChE) /Affinity (AChE) and Selectivity for BChE is defined as Affinity (AChE)/ Affinity (BChE)

بر اساس جدول (۲)، در ارزیابی داکینگ مولکولی ترکیبات با آنزیم AChE، از بین ۲۵ ترکیب شناسایی شده در نمونه ستاره شکننده، تعداد هفت ترکیب دارای انرژی پیوند بالاتری نسبت به گالانتامین (۷/۱- کیلوکالری بر مول) بودند. بیشترین میزان تمایل، مربوط به ترکیب **BS_4** (۱۰/۱- کیلوکالری بر مول) بود. به استثنای ترکیب **BS_{23}** (۶/۲ کیلوکالری بر مول)، سایر ترکیبات با وجود انرژی پیوند کمتر از گالانتامین دارای افینیته قابل قبولی بودند. علاوه بر این، در مورد آنزیم BChE، تعداد چهار ترکیب دارای تمایل بیشتری نسبت به گالانتامین به عنوان استاندارد (۵/۹- کیلوکالری بر مول)، بودند. به طور مشابه، بیشترین میزان تمایل به آنزیم BChE نیز مربوط به‌ترکیب **BS_4** (۸/۲- کیلوکالری بر مول) بود. شکل (۷)، تصاویر دو بعدی و سه بعدی داکینگ ترکیبات با بیشترین انرژی پیوند دارای فعالیت مهاری علیه آنزیم‌های AChE و BChE را نشان می‌دهد. از قابل توجه‌ترین برهمکنش‌های ترکیب **BS_4** با اسیدهای آمینه آنزیم AChE، را می‌توان به برهمکنش‌های π-π stacking بین گروه‌های آروماتیک اسید آمینه TRP A:86 و گروه ۳- فنیل ترکیب؛ برهمکنش π-π stacking بین گروه‌های آروماتیک اسید آمینه TYR A:337 و گروه ۳- فنیل ترکیب؛ پیوند هیدروژنی بین اسید آمینه TYR A:337 و اتم نیتروژن شماره دو هسته پیرازولی ترکیب؛ پیوند هیدروژنی بین اسید آمینه TYR A:124 و اتم نیتروژن شماره یک هسته پیرازولی ترکیب و همچنین، پیوند Pi-Alkyl بین TRP A:86 و هسته پیرازولی ترکیب ذکر نمود (شکل ۷).



شکل ۷) تصاویر دو بعدی و سه بعدی ترکیب **BS_4** با بیشترین انرژی پیوند، در جایگاه‌های فعال آنزیم‌های AChE و BChE. اینتراکشن‌های قابل ملاحظه لیگاند با اسیدهای آمینه آنزیم‌ها در تصاویر دیده می‌شوند.

Fig 7) Two-, and three-dimensional images of the compound **BS_4** with the highest binding energy in the active sites of AChE and BChE enzymes. Significant interactions of the ligand with the amino acids of the enzymes can be seen in the images.

اینتراکشن‌های قابل ملاحظه لیگاند **BS_4** با اسیدهای آمینه آنزیم BChE، شامل یک پیوند Pi-Sigma بین اسید آمینه ALA A:328 و گروه ۵- فنیل این ترکیب؛ یک پیوند Pi-Sigma دیگر بین اسید آمینه TRP A:82 و گروه متیل هسته پیرازولی ترکیب؛ یک پیوند π-π stacking بین این اسید آمینه و گروه ۳- فنیل ترکیب؛ دو پیوند Pi-Alkyl بین اسید آمینه HIS A:438 و گروه متیل و هسته پیرازولی و نیز یک پیوند Pi-Alkyl دیگر بین هسته پیرازولی و اسید آمینه TRP A:82 بودند که به تمایل قابل‌ملاحظه ترکیب به آنزیم کمک می‌کنند (شکل ۷). قدرت پیوندهای هیدروژنی و π-π بین لیگاند و آنزیم موجب برقراری یک پیوند قوی می‌گردد.

بحث

برخی از خارپوستان زهرآگین، توکسین‌های قوی با کشندگی قابل‌توجهی برای قربانیان خود، تولید و یا انباشته نموده‌اند (۷). در این مطالعه برخی خواص توکسینولوژی و فعالیت‌های بازدارندگی استیل و بوتیریل‌کولین‌استرازهای *in vitro* و *in silico* ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس خلیج‌فارس و نیز متابولیت‌های ثانویه مربوط به آن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات انگشت‌شماری بر روی قدرت سمیت عصاره‌های گوناگون ستاره شکننده در دسترس است که عمدتاً مربوط به ارزیابی سمیت آن‌ها بوده است. آزمون LD_{50}، توسط تروان (Trevan) برای تخمین دوز یک

ماده جهت ایجاد ۵۰ درصد مرگ در یک گونه معین از جانور آزمایشگاهی معرفی گردید. با تست سمیت حاد، می‌توان قدرت سمیت ماده آزمون را تخمین زد. بر اساس مطالعه اریرهی (Erhirhie) و همکاران، تقسیم‌بندی سمیت LD_{50} بر اساس میزان دوز بدین صورت است که مقادیر LD_{50} کمتر از ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در گروه فوق‌العاده سمی؛ بین ۵۰-۵ با سمیت بالا؛ ۵۰۰-۵۰ سمیت متوسط؛ بین ۵۰۰۰-۵۰۰ سمیت کم؛ بین ۱۵۰۰۰-۵۰۰۰ عملاً غیر سمی و مقادیر بیش از ۱۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبتاً بی‌ضرر تلقی می‌گردند (۳۷).

با توجه به این تقسیم‌بندی و میزان LD_{50} ستاره شکننده حدود ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم، می‌توان آن را جزو طبقه‌بندی "خیلی سمی" به شمار آورد. مطالعات بسیار محدودی در این زمینه با اهداف مختلف موجود می‌باشند. مطالعه اثرات سمیت و همولیتیک ترکیبات شبه-ساپونین ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس توسط امینی و همکاران، نشان داد که یک فراکشن ۸۰ درصد اتانولی از بین تمام فراکشن‌ها، دارای ظرفیت لیزکنندگی گلبول‌های قرمز است. میزان HD_{50} این فراکشن، حدود ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تخمین زده شد. همچنین، ارزیابی آزمون MTT نشان داد که ساپونین خام استخراج شده از این ستاره شکننده به‌صورت وابسته به دوز و زمان، موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های HeLa در طی ۲۴ ساعت با IC_{50}=۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در مدت ۴۸ ساعت IC_{50}=۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌گردند (۳۸). همچنین، در بررسی اثرات سمیت عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس بر روی سلول‌های EL4 توسط افضلی و همکاران، نشان داده شد که عصاره دی‌کلرومتانی، قادر به کاهش رشد سلولی در حالت وابسته دوز می‌باشد. غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان IC_{50} در نظر گرفته شد (۳۹).

تقریباً نیمی از داروهای مورد استفاده در بالین، مهارکننده‌های آنزیمی بوده که بسیاری از آن‌ها دارای منشاء طبیعی یا الهام گرفته از طبیعت هستند (۴۰). همچنین، بیشتر ترکیباتی که امروزه به‌عنوان مهارکننده‌های بالینی کولین استراز مورد استفاده قرار می‌گیرند محصولات طبیعی یا مشتقات آن‌ها هستند. بر اساس مطالعه مورای (Murray) و همکاران، بیشتر مهارکننده‌های کولین استرازی به گروه آلکالوئیدهایی از قبیل آلکالوئیدهای ایندولی، ایزوکینولینی، کینولیزیدینی، پیپریدینی و استروئیدی تعلق دارند؛ هر چند، مهارکننده‌های استیل کولین‌استرازی غیرآلکالوئیدی نظیر ترپنوئیدها[58]، فلاونوئیدها[59] و سایر ترکیبات فنلی[60] نیز از منابع طبیعی به دست آمده‌اند (۴۱).

از میان متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال، توکسین‌های حاصل از این زیستمندان دریایی مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند (۴۲). اکثر این ترکیبات دریایی در حال انجام مطالعات پایه یا تحت ارزیابی در مراحل مختلف کارآزمایی‌های بالینی هستند (۴۳).

بالغ بر ۳۵ درصد از کل ۲۸۶۰۹ ترکیب طبیعی دریایی گزارش گردیده تا سال ۲۰۱۶، از اکینودرم‌ها جدا شده‌اند. با این حال، تنوع شیمیایی گزارش شده از ترکیبات طبیعی دریایی از اکینودرم‌ها، در مقایسه با دیگر شاخه‌های دیگر زیاد نمی‌باشند (۴۴). ستارگان شکننده با بیش از ۲۰۰۰ گونه، بزرگ‌ترین گروه اکینودرم‌ها هستند (۴۵). گرچه آن‌ها دارای مکانیسم‌های دفاعی فیزیکی متعددی همچون جابجایی سریع، حذف سریع اندام‌های[61] خود و توانایی پنهان شدن در زیر صخره‌ها و شکاف‌ها می‌باشند، اما برخی از گونه‌ها هنوز به دفاع

[58] Terpenoids
[59] Flavonoids
[60] Phenolic
[61] Extremities

شیمیایی متکی هستند. با این حال، بر اساس پایگاه داده مرین‌لیت[۶۲]، تا به امروز تنها چند مطالعه بر روی اوفیوروئیدها متمرکز شده است.

در مطالعه نازو (Nuzzo) و همکاران، چندین کلاس متابولیت ثانویه نظیر کاروتنوئیدها، گانگلیوزیدها، ایندول‌های برم‌دار، فنیل پروپانوئیدها، چند گروه ترپن‌ها و استروئیدها از ستارگان شکننده جدا شده‌اند (۲۳). در مطالعه حاضر، تعداد ۲۵ ترکیب شیمیایی مختلف، حاصل استخراج آلی نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس و آنالیز GC-MS بود که علاوه بر ترکیبات آلکانی، اسیدهای چرب و مشتقات آن، تعداد نه استروئید و مشتقات آن، هشت آلکالوئید با هسته‌های مختلفی چون پیرازولی، تترازولی، تریازولی، ایندولی و تیازول آمینی و سایر ترکیبات پر اهمیتی چون ترپن‌ها و کارتنوئیدها یافت گردیدند. برای درک بهتر نتایج تجربی این مولکول‌های شناسایی شده، مطالعه داکینگ مولکولی این لیگاندها با آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین‌استراز انجام گردید. از تعداد ۲۵ ترکیب شناسایی شده در ستاره شکننده، تعداد ۷ ترکیب دارای انرژی پیوند بین لیگاند و آنزیم استیل‌کولین استراز، بیش از گالانتامین (۷/۱kcal/mol-) و به‌همین ترتیب، برای بوتیریل‌کولین‌استراز نیز تعداد چهار ترکیب دارای انرژی پیوند بین لیگاند و آنزیم بوتیریل‌کولین‌استراز بیش از گالانتامین (۵/۹kcal/mol–) بودند. بر اساس نتایج انرژی پیوند، سایر ترکیبات نیز دارای انرژی پیوند قابل قبولی با آنزیم‌ها بودند. از این میان، ترکیب **BS_4** دارای بیشترین تمایل برای هر دو آنزیم بود. فعالیت قابل ملاحظه این ترکیب در برابر آنزیم‌های کولین‌استراز را می‌توان وجود پیوندهای مهم هیدروژنی و π-π دانست. وجود این پیوندها به عنوان عناصر کلیدی در ملکول‌ها، منجر به ساختارهای بسیار پایدار می‌گردد (۴۶).

در ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس، یافته‌های داکینگ از منظر تمایل بالاتر به آنزیم بوتیریل‌کولین استراز نسبت به استاندارد گالانتامین، با نتایج تجربی (IC_{50}) آنزیم کاملاً انطباق داشتند. این موضوع، این واقعیت را که فعالیت‌های بیولوژیک ماتریکس‌های نمونه‌های مختلف، ارتباط مستقیمی با ترکیبات شیمیایی موجود در آن‌ها دارد را تأئید می‌نماید. در مطالعه داکینگ، بجز ترکیبات **BS_{23}**، **BS_{17}**، **BS_{14}**، **BS_{12}**، **BS_7**، **BS_6** تعداد ۱۹ ترکیب دیگر دارای فعالیت مهاری بوتیریل‌کولین‌استراز (BChE ،EC 3.1.1.8) قابل قبولی بودند و نشان‌دهنده تمایل بالاتر عصاره و ترکیبات متشکله آن به بوتیریل‌کولین‌استراز است. این آنزیم همچون AChE، قادر به هیدرولیز استیل‌کولین می‌باشد و از نظر توالی اسید آمینه، با استیل‌کولین‌استراز (AChE ،EC 3.1.1.7)، دارای ۵۴ درصد اشتراک است (۴۷). علاوه بر این، بوتیریل‌کولین‌استراز سرمی می‌تواند زنوبیوتیک‌هایی چون ارگانوفسفره‌ها، آفت‌کش‌های کارباماته و کوکائین را سم‌زدایی، داروهایی نظیر بامبوترول[۶۳] و هروئین را فعال (۴۸) و هورمون پپتیدی گرلین که در گرسنگی، تغذیه و استرس نقش دارد را هیدرولیز نماید (۴۹). در حال حاضر، چندین مهارکننده کولین‌استرازی از جمله دونپزیل، گالانتامین و ریواستیگمین برای درمان اختلالات نرودژنراتیو استفاده شده‌اند (۵۰).

با این حال، معدودی مهارکننده‌های بسیار انتخابی و قوی بوتیریل‌کولین‌استراز گزارش شده‌اند. تحت شرایط فیزیولوژیکی، AChE با تنظیم سطح استیل‌کولین، نقش غالب‌تری را نسبت به BChE در انتقال عصبی کولینرژیک ایفاء می‌نماید. برآورد شده است که در بیماران مبتلا به آلزایمر پیشرفته، سطوح AChE به ۵۵ تا

[62] MarineLit

[63] Bambuterol

۶۷ درصد و BChE تا ۱۲۰درصد سطوح نرمال افزایش می‌یابد (۴۸). بوتیریل‌کولین‌استراز، کمبود AChE را با هیدرولیز استیل‌کولین جبران می‌کند. در مطالعه گریگ (Greig) و همکاران، نشان داده شد که مهار انتخابی BChE، سطوح پپتید β-آمیلوئید را در سلول‌های مغز موش و نوروبلاستوما انسانی، بدون کاهش زنده مانی سلولی کاهش می‌دهد. علاوه بر این، مهار انتخابی این آنزیم، موجب افزایش عملکرد و ارتباطات در موش‌های پیر و تقویت دراز مدت مغز موش‌ها گردید (۵۱). بنابراین، کشف مهارکننده‌های بسیار قوی و انتخابی این آنزیم، توسعه دارویی برای پتانسیل درمان آلزایمر را ضمانت می‌کند. بر خلاف AChE، مطالعات محدودی مهارکننده‌های انتخابی بوتیریل‌کولین استرازی را مورد بررسی قرار داده‌اند (۵۲). بر اساس مطالعه گیاکوبینی (Giacobini)، مهارکننده‌های انتخابی BChE، از نظر حفظ شناخت و رفتار پایدار درازمدت در بیماران مبتلا به آلزایمر پیشرفته، نسبت به مهارکننده‌های AChE ممتازتر هستند (۵۳). با این حال، تاکنون هیچ یک از مهارکننده‌های انتخابی بوتیریل‌کولین‌استرازی فعلی برای درمان آلزایمر تأئید نشده‌اند؛ بنابراین، تقاضای زیادی برای کشف مهارکننده‌های انتخابی بوتیریل‌کولین استرازی برای استفاده بالینی بالقوه وجود دارد. بر اساس نتایج داکینگ، ملکول **BS4** بیشترین فعالیت مهاری برای هر دو آنزیم را به صورت همزمان در بین تمام ترکیبات نشان داد. شاید بتوان گفت چنین ترکیباتی که قادر به مهار همزمان هر دو آنزیم باشند، کاندیدای مناسب‌تری برای مطالعات درمانی آلزایمر باشند.

بسیاری از آلکالوئیدها، فعالیت‌های بیولوژیکی قوی را در انسان‌ها از خود نشان داده‌اند. این اثرات را می‌توان تا حدی به ارتباط ساختاری آن‌ها با ترکیبات مهم انتقال دهنده‌های عصبی مانند دوپامین، استیل‌کولین، نورآدرنالین و سروتونین تفسیر نمود. این واقعیت که آلکالوئیدها در شرایط اسیدی محلول در آب و در شرایط خنثی محلول در چربی هستند، ویژگی‌های منحصر به فردی را برای مصارف دارویی به آن‌ها می‌بخشد (۵۴). جامع‌ترین طبقه‌بندی آلکالوئیدها، بر اساس وجود هسته اولیه هتروسیکلیک در ساختار آن‌ها است. در مطالعه حاضر، ترکیبات **BS12**، **BS21** و نیز **BS24** از نمونه ستاره شکننده دارای هسته ایندول آلکالوئیدی بودند. گروه آلکالوئیدهای ایندولی، بزرگ‌ترین و جذاب‌ترین گروه آلکالوئیدی مشتق از تریپتوفان هستند. فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی (۵۵)، از جمله فعالیت‌های آنتی‌کولین استرازی این گروه از آلکالوئیدها در منابع زمینی نشان داده شده است (۵۶). مطالعات مختلفی نیز نشان دهنده فعالیت‌های آنتی‌کولین استرازی این گروه از آلکالوئیدها در منابع دریایی می‌باشند. در مطالعه بهارات (Bharate) و همکاران، نشان داده شد که ترکیب ایندولی پنتاسیکلیک فاسکاپلیسین[۶۴] از اسفنج گونه فاسکاپلیسینوپسیس[۶۵]، مهارکننده قوی eeAChE با IC_{50}=۱/۴۹ میکرومولار می‌باشد. مطالعات کینتیک نشان دادند که فاسکاپلیسین به صورت یک مهار کننده غیر رقابتی در برابر استیل کولین استراز عمل می‌نماید (Ki=۲/۲۸ میلی‌مولار) (۵۷).

در سال ۲۰۰۸، یک آلکالوئید ایندول مونوترپنیک از نوع سارپاگان توسط ویرا (Vieira) و همکاران، جدا گردید که مهارکننده کولین‌استراز بود (۵۸). در مطالعه حاضر، ترکیب سارپاگانی **BS21**، در نمونه ستاره شکننده یافت گردید. انرژی پیوند بالای داکینگ این ترکیب (۸/۲- کیلوکالری بر مول، نسبت به گالانتامین ۷/۱- کیلوکالری بر مول)، برای آنزیم AChE، فعالیت آنتی استیل کولین استرازی آن را پیش‌بینی می‌کند. علاوه بر

[64] Fascaplysin

[65] Fascaplysinopsis

این، در مطالعه بالیعقوبی–بنهامو (Belyagoubi-benhammou) و همکاران، نیز نشان داده شد که این ترکیب سارپاگانی دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد (۵۹).

از دیگر ترکیبات ایندول الکالوئیدی شناسایی شده در نمونه مطالعه حاضر، ترکیب **BS_{12}** بود. این ترکیب، خانواده‌ای از مشتقات پیچیده ایندول آلکالوئید ارگوت می‌باشد که فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع و اثرات سمیت قابل‌ملاحظه‌ای برای آن‌ها گزارش گردیده است (۶۰). این ترکیبات، دارای فعالیت‌های مهارکنندگی قوی کولین‌استرازی هستند. در مطالعه ریدل (Riedel) و همکاران، مشخص گردید که ترکیبات ارگوت الکالوئید ۹، ۱۰– دی هیدروآرگوکریپتین؛ ۹، ۱۰– دی هیدروآرگوتامین و ۱۰، ۹– دی هیدروآرگوکریستین و ترکیب بسیار قوی ارگوتامین به‌ترتیب با Ki برابر ۱۹۸، ۱۴۴، ۱۱۷ و ۱۵ میکرومول دارای فعالیت‌های مهار کنندگی استیل‌کولین‌استرازی هستند (۶۱).

علاوه بر این، آلکالوئیدهای متفرقه دیگری نیز در مطالعه حاضر شناسایی شدند. ترکیب آلکالوئیدی **BS_{22}** از نمونه ستاره شکننده ترکیبی است که تحت عنوان دمکولسین[66] شناخته می‌شود و از آنالوگ‌های کلشی‌سین است که دارای فعالیت‌های بالقوه ضدمیتوزی و ضدنئوپلاستی می‌باشد. ترکیب دمکولسین به محل اتصال کلشی‌سین توبولین متصل می‌شود و از پلیمریزاسیون آن به میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌نماید و موجب توقف چرخه سلولی در متافاز و جلوگیری از تقسیم سلولی می‌گردد (۶۲). بر اساس نتایج داکینگ مولکولی، شاید این ترکیب در فعالیت استیل کولین استرازی نمونه ستاره شکننده دارای نقش مؤثری باشد.

علاوه بر این، ترکیب **BS_{10}** از نمونه ستاره شکننده یک آلکالوئید تریازولی می‌باشد. لی (Li) و همکاران، مشتقات سنتزی ۱،۲،۳– تریازول را در مهار آنزیم‌های کولین استرازی و فعالیت محافظ عصبی را مورد ارزیابی قرار دادند. یکی از مشتقات، دارای فعالیت مهاری قابل قبولی نسبت به بقیه ترکیبات در برابر آنزیم استیل‌کولین استرازی با IC_{50}=۷/۲۳±۰/۱۶ میکرومولار بود. همچنین، این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی موجب محافظت عصبی در برابر سمیت سلولی پروتئین آمیلوئید بتا در سلول‌های SH-SY5Y گردید (۶۳).

در مجموع، به استناد مطالعه دوس سنتو (Dos Santos) و همکاران، که بیان گردید "اکثریت مهارکننده‌های آنتی‌استیل‌کولین استرازی طبیعی متعلق به گروه آلکالوئیدها می‌باشد"(۶۴) و با توجه به نتایج تجربی و مطالعه داکینگ نمونه که نشان دهنده فعالیت مهاری قابل ملاحظه این نمونه علیه آنزیم‌های کولین استرازی، به‌ویژه بوتیریل‌کولین استراز می‌باشد، می‌توان بخشی از فعالیت مهاری این نمونه را به حضور متنوع و فعال ترکیبات آلکالوئیدی نسبت داد. در واقع، یک بار مثبت به زیر واحد "آنیونی" در جایگاه فعال استیل‌کولین استراز متصل می‌شود که در آلکالوئیدها مهیاست. به جرأت می‌توان گفت که در میان ترکیبات طبیعی، آلکالوئیدها به دلیل ساختارهای پیچیده حاوی نیتروژن، امیدوارکننده‌ترین نامزدها برای استفاده در درمان الزایمر هستند (۶۵).

گروه بسیار مهم دیگر از نظر فعالیت‌های زیست پزشکی و فیزیولوژیکی، استروئیدها هستند (۶۶). در مطالعه حاضر، عصاره ستاره شکننده غنی از گروه‌های مختلفی از این ترکیبات بودند. استروئیدها از تری‌ترپن اسکوالن به دست می‌آیند. اسکوالن نیز از ترکیب دو سیستم ترانس فارنسیل[67] ساخته شده است که از سر به سر

[66] Demecolcine

[67] Trans-Farnesyl

متصل شده‌اند (۶۷). نورواستروئیدها را بر اساس ویژگی‌های ساختاری، می‌توان به‌عنوان نورواستروئیدهای پرگنان، همانند آلوپرگنانولون[۶۸] و آلوتتراهیدرودئوکسی کورتیکوسترون[۶۹]، نورواستروئیدهای آندروستانی، مانند آندروستاندیول[۷۰] و اتیوکولانون[۷۱] و نورواستروئیدهای سولفاته، مانند پرگننولون سولفاته و دهیدرواپی‌آندروسترون سولفاته طبقه‌بندی نمود (۶۸). نوروستروئیدها از طریق تعامل با کانال‌های یون انتقال دهنده عصبی، تحریک‌پذیری عصبی را تغییر می‌دهند. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان تعدیل کننده‌های آلوستریک گیرنده‌های انتقال‌دهنده عصبی مانند گیرنده‌های گابا (A)، ان-متیل-دی-آسپارتات[۷۲] و سیگما عمل نمایند. نورواستروئیدها نقش مهمی در توسعه سیستم عصبی و میلین‌سازی، مهار مسمومیت عصبی، ایسکمی دارند (۶۹). ترکیبات استروئیدی موجودات دریایی دارای مجموعه وسیعی از ساختارهای غیرمعمول هستند. در میان آن‌ها، استروئیدهای پرگنانی هستند که با زنجیره جانبی غیرمعمول وینیل مشخص می‌شوند (۷۰).

مطالعات مختلفی نشان‌دهنده فعالیت‌های آنتی‌کولین استرازی قوی ترکیبات استروئیدی هستند. در یک مطالعه، خالد (Khalid) و همکاران، نشان دادند که بیشتر آلکالوئیدهای نوع پرگنان به دست آمده از سارکوکوکا سالیگنا[۷۳] دارای یک نوع مهار غیررقابتی خالص برای هر دو آنزیم کولین‌استراز هستند (۷۱). در مطالعه محبی و همکاران، نشان داده شد که ترکیب آلکالوئیدی نورواستروئیدی آندروتوکسین B جداسازی شده از عروس دریایی کاسیوپیا آندرومدا مهار کننده قوی استیل‌کولین‌استراز با IC_{50}=۲/۴ میکرومولار می‌باشد (۲۸). لانگجای (Langjae) و همکاران، یک آلکالوئید استروئیدی ۴-استوکسی-پلاکینامین B[۷۴] را از یک اسفنج جنس کورتیسیوم[۷۵] جداسازی نمودند. آن‌ها نشان دادند که این ترکیب مهار کننده برگشت‌پذیر استیل‌کولین‌استراز با IC_{50}=۳/۷۵ میکرومولار می‌باشد (۳۰). در یک مطالعه، زهیرالحق (Zaheer-ul-haq) و همکاران، اینتراکشن‌های استیل‌کولین استراز را با ۱۵ استروئید جداشده از سارکوکوکا سالیگنا مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که لیگاندها به حلقه‌های آروماتیک ناحیه ساختار استروئیدی آنزیم از طریق حلقه A شش عضوی هیدروفوبیک پیوند می‌یابند؛ با توجه به مطالعات داکینگ آن‌ها، فعالیت‌های مهارکنندگی استیل-کولین‌استراز لیگاندها، عمدتاً یک خصوصیت غیررقابتی داشتند (۷۲). مهم‌ترین ویژگی استیل‌کولین استراز، یک گورج عمیق و باریک است. جایگاه کاتالیتیک استیل-کولین استراز در این گورج که معروف به تریاد کاتالیتیک، تشکیل شده از His447، Glu334 و Ser203 قرار دارد. این بخش برای فعالیت آنزیمی آن، یعنی هیدرولیز استیل‌کولین به اسید استیک و کولین، بسیار حائز اهمیت است. یک جایگاه ثانویه یا پریفرال متشکل از تعدادی زنجیره جایگاه آروماتیک می‌باشد است که تا فراسوی Tyr337 در رابط جایگاه کاتالیتیک و یا محیطی برای ورود به شکاف گسترش یافته است و به کارایی کاتالیتیک استیل‌کولین‌استراز کمک می‌نماید. این جایگاه شامل Asp74، Tyr72، Tyr124، Trp286، Phe295، Phe297، Tyr337 و Tyr341 می‌باشد. اسید آمینه Asp74 مسئول تشخیص استیل‌کولین است (۵۴).

در مطالعه حاضر ترکیبات **BS**$_{7}$، **BS**$_{13}$، **BS**$_{14}$، **BS**$_{15}$،

[68] Allopregnanolone
[69] Allotetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC)
[70] Androstanediol
[71] Etiocholanone
[72] NMDA
[73] *Sarcococca saligna*
[74] 4-acetoxy-plakinamine B
[75] Corticium

BS_{16}، **BS_{17}**، **BS_{19}**، **BS_{20}** و **BS_{25}** از ستاره شکننده، دارای ساختار استروئیدی و مشتقات آن و از این میان، ترکیبات **BS_7**، **BS_{13}**، **BS_{14}**، **BS_{15}**، **BS_{16}**، **BS_{19}**، **BS_{20}** و **BS_{25}** استرول‌های پلی‌هیدروکسیله بودند. نتایج داکینگ مولکولی **BS_{16}** نشان داد که این ترکیب در مقایسه با استاندارد گالانتامین (۵/۹- کیلوکالری بر مول)، دارای انرژی پیوند قابل مقایسه‌ای در برابر آنزیم بوتیریل‌کولین‌استراز (۶/۳- کیلوکالری بر مول) می‌باشد. بنابراین محتمل است که این ترکیب بتواند در فعالیت بوتیریل‌کولین‌استرازی نمونه ستاره شکننده سهیم باشد. در مطالعات مختلفی نیز ترکیبات استروئیدی با فعالیت‌های زیستی مختلف از کلاس‌های اوفیوریده گزارش گردیده‌اند. در یک مطالعه، ریکیو (Riccio) و همکاران، دو ترکیب سولفاته گلوکوزید استروئیدی لانگیکادوسید B و A[۷۶] را از ستاره شکننده اوفیودرما لانگیکادا[۷۷] از خانواده اوفیودرماتیدا[۷۸] جداسازی نمودند (۷۳). در یک مطالعه مشابه، کومین (Comin) و همکاران، یک ترکیب استروئیدی پلی‌هیدروکسی استرول را از ستاره شکننده استروتوما آگاسیزی[۷۹] جدا نمودند که دارای فعالیت ضدویروسی بود (۷۴). روکاتاگلیاتا (Roccatagliata) و همکاران، یک ترکیب استروئیدی سولفاته را از ستاره شکننده اوفیوپلوکوس جانواری[۸۰] از خانواده همیوریالیده[۸۱] با ویژگی ضدویروسی جدا نمودند (۷۵).

در یک مطالعه مشابه دیگر، امینین (Aminin) و همکاران، یک ترکیب پلی‌هیدروکسی‌استرول سولفاته را از با فعالیت همولیتیک و سیتوتوکسیک از ستاره شکننده اوفیوفولیس آکولاتا از خانواده اوفیوفولیده جداسازی نمودند (۷۶). مطالعه حاضر با مطالعات پیشین برشمرده شده، از نظر غنای ترکیبات پلی‌هیدروکسیله در نمونه‌های ستاره شکننده، همسو است. با توجه به مطالعه خالد (Khalid) و همکاران، ترکیبات استروئیدی برای مهار بوتیریل‌کولین‌استراز انتخابی‌تر عمل می‌کنند که می‌تواند به علت اندازه بزرگ‌تر آن‌ها باشد که در مقایسه با استیل‌کولین‌استراز به راحتی می‌توانند در تنگه آروماتیک بزرگ‌تر بوتیریل کولین‌استراز قرار گیرند. بقایای Phe-330 و Tyr-121 در استیل کولین‌استراز یک گلوگاه را تشکیل می‌دهند که دسترسی این ترکیبات به تنگه را دشوار می‌کند. جنبه مهم دیگر در انتخاب‌پذیری این ترکیبات، می‌تواند تعاملات آبگریز برجسته‌تر در بوتیریل‌کولین‌استراز باشد (۷۱). با توجه به نتایج تجربی فعالیت مهارکنندگی بالای بوتیریل کولین‌استرازی نمونه ستاره شکننده و همچنین تعداد بالای ترکیبات استروئیدی و مشتقات آن در این نمونه می‌توان این گمانه‌زنی را ایجاد نمود که این ترکیبات در فعالیت مهاری آن نقش مهمی داشته باشند. استروئیدهای ساپونینی از ترکیبات شناخته شده گروه اکینودرم‌ها هستند. ساپونین‌ها گروه وسیعی از گلیکوزیدها هستند که به‌طور گسترده در گیاهان زمینی مرتبه بالاتر و در موجودات دریایی پایین‌تر توزیع شده‌اند. آن‌ها شامل گروه متنوعی از ترکیبات حاوی آگلیکون استروئیدی یا تری‌ترپنوئید و یک یا چند زنجیره قند هستند. گستردگی ساپونین‌های استروئیدی، کمتر از ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی است (۷۷). ساپونین‌ها در قلمرو حیوانات فقط در چند گروه موجودات دریایی نظیر اسفنج‌ها (۷۸)، خیارهای دریایی (۷۹) و ستاره‌های دریایی (۸۰) گزارش شده‌اند. اکینودرم‌ها در مقایسه با سایر بی‌مهرگان دریایی بیش از

[76] Longicaudosides A–B
[77] *Ophioderma longicauda*
[78] Ophiodermatidae
[79] *Astrotoma agassizii*
[80] *Ophioplocus januarii*
[81] Hemieuryalidae

۳۵۰ ترکیب ساپونین گزارش شده را در خود جای داده‌اند. ساپونین‌های استروئیدی، عمدتاً در ستارگان دریایی و آگلیکون‌های تری‌ترپنوئیدی، بیشتر در خیارهای دریایی مشاهده شده‌اند (۸۱). قندهای ساپونینی از طریق پیوندهای گلیکوزیدی به محفظه آبگریز (ساپوژنین) متصل می‌شوند. تداخل بین اجزای آگلیکون (نظیر ساپوژنین) و استرول‌های غشای سلولی می‌تواند منجر به یک فرآیند صابونی شدن گردد که ممکن است منجر به لیز سلولی شود (۸۲).

در مطالعه امینی و همکاران، یک ترکیب شبه ساپونین با فعالیت همولیتیک از ستاره شکننده اوفیوکوما ارناسئوس از خانواده اوفیکومیدا جداسازی گردید (۳۸). در مطالعه حاضر، دو ترکیب استروئید ساپونینی **BS_7** و **BS_{13}** در ستاره شکننده شناسایی شدند. ترکیب استروئید ساپونینی **BS_{13}** یا همان سای‌دیوسژنین[82]، یک ساپونین اسپیروستان استروئیدی می‌باشد که پتانسیل‌های بیولوژیکی زیادی برای آن‌ها شمرده شده است. دیوسژنین در صنعت داروسازی به‌عنوان یک پیش‌ساز اصلی در سنتز استروئیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد و یک مولکول زیستی فعال امیدوارکننده با خواص دارویی مهم و متنوع از جمله فعالیت‌های کاهش دهندگی چربی، کاهش قند خون، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد تکثیر می‌باشد؛ به همین دلیل، دیوسژنین یک مولکول بالقوه مورد علاقه در پیشگیری و یا درمان چندین بیماری است (۸۳). هر چند، بر اساس مطالعه داکینگ، این دو ترکیب تمایل چندانی برای پیوند با دو آنزیم نشان ندادند. شاید این ترکیبات ساپونینی، بیشتر در ایجاد دیگر فعالیت‌های بیولوژیک و یا سمیت زهر بعنوان دفاع یا شکار نقش داشته باشند تا فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی. ترپن‌ها ترکیبات خطی یا حلقوی اشباع یا غیراشباع متشکله از واحدهای ایزوپرن هستند. آن‌ها غالباً هیدروکربن هستند. ترپنوئیدها مشتقات ترپن‌ها هستند و بسته به واحدهای کربنی خود به مونوترپن‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها و تتراترپن‌ها تقسیم می‌شوند (۸۴). ترپن‌ها دارای آثار مختلف زیستی از جمله فعالیت‌های ضد التهابی، ضددردی، ضد احتقانی، ضد عفونی کنندگی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی می‌باشند (۸۵). مطالعات مختلفی نشان دهنده فعالیت مهارکنندگی این ترکیبات علیه کولین‌استرازها می‌باشند. در مطالعه ماچادو (Machado) و همکاران، عصاره‌های مختلف از گونه‌های مختلف ماکروجلبک‌های قرمز با بالاترین غلظت مونوترپن‌ها، مهار کننده استیل‌کولین‌استراز بودند (۸۶). در آنالیز نمونه اکینودرم مطالعه حاضر، ترکیب ایندول مونوترپنوئیدی **BS_{21}** شناسایی شد که در مطالعه محاسباتی نیز دارای انرژی پیوند بالایی (۸/۲- کیلوکالری بر مول) نسبت به گالانتامین (۷/۱- کیلوکالری بر مول)، در برابر AChE بود. به‌علاوه، از ترپن‌ها ترکیب معروف تری‌ترپنی اسکوالن (**BS_6**)، نیز در عصاره ستاره شکننده یافت شد. تری‌ترپن‌ها به دو صورت استروئیدی (معمولاً تری‌ترپنوئیدهای تتراسیکلیک و ساپونین‌ها) و پنتاسیکلیک یافت می‌شوند. زمانی که این ترکیبات، به صورت گلیکوزید وجود دارند، ساپونین نامیده می‌شوند. اسکوالن، پیش‌ساز بیولوژیکی ضروری همه تری‌ترپنوئیدها است. گروه تری‌ترپن‌ها دارای طیف گسترده‌ای از اثرات بیولوژیک از قبیل ضدتوموری، ضدالتهابی و ضدترومبوتیک و نیز، تنظیم کنندگی سیستم‌های ایمنی، قلبی و غدد درون‌ریز می‌باشند (۸۷). مطالعه عابد (Abed) و همکاران، بر روی عصاره اتری

[82] Psi-Diosgenin

گاینوتروچس اگزیلاریس[۸۳] و شناسایی ترکیب اسکوالن، نشان داد که این ترکیب دارای فعالیت مهاری قوی AChE می‌باشد (۸۸). در مطالعه دیگری نیز توسط شیجا (Sheeja) و همکاران، اثرات آنتی‌کولین استرازی عصاره‌های مختلف گریوا تلیافولیا[۸۴] حاوی ترکیب اسکوالن نشان داده شد. در مطالعه آن‌ها بیشترین فعالیت بازدارندگی کولین‌استراز، مربوط به عصاره‌های متانولی و آبی به‌ترتیب با مقادیر IC_{50}=۶۰/۹ ± ۱/۱ و IC_{50}=۹۴/۷ ۶±/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای استیل کولین‌استراز و IC_{50}=۵۳/۷±۰/۷ و IC_{50}=۶۳/۰۴±۴/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای بوتیریل‌کولین‌استراز بود (۸۹). با توجه به مطالعات پیشین و نتایج داکینگ مولکولی ترکیب اسکوالن با انرژی پیوند بالا در برابر استیل‌کولین‌استراز آن در مقایسه با استاندارد گالانتامین (به‌ترتیب با مقادیر ۸/۷- و ۷/۱- کیلوکالری بر مول)، این ترکیب می‌تواند در فعالیت ضد استیل‌کولین‌استرازی نمونه نقش داشته باشد. حضور آن در عصاره نمونه، می‌توان سایر اثرات بیولوژیک نیز انتظار داشت.

گروهی از ترپنوئیدها از دسته تتراترپنی نیز در عصاره حاضر یافت گردیدند. کاروتنوئیدها مثالی از تتراترپن‌ها می‌باشند و به دو صورت کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها (کاروتنوئیدهای اکسیژنه) یافت می‌شوند. فعالیت اصلی آن‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۸۷).

در مطالعه لین (Lin) و همکاران، ترکیب کارتنوئیدی فوکوگزانتین[۸۵] از جلبک قهوه‌ای سارگاسوم هورنری[۸۶]، جداسازی گردید که به‌طور مؤثری در برابر اختلالات شناختی ناشی از اسکوپولامین در موش‌ها، دارای اثرات محافظت‌کنندگی بود. این ترکیب، استیل‌کولین‌استراز را با IC_{50}=۸۱/۲ میکرومولار مهار نمود (۹۰). ترکیب گزانتوفیلی **BS_{23}** از نمونه ستاره شکننده مطالعه حاضر شناسایی گردید. هر چند که نتایج داکینگ این ترکیبات فعالیت مهاری قوی آنزیم‌های کولین‌استراز را نشان نداد، لکن بر اساس شواهد موجود در متون می‌توان از اثرات دیگر زیست‌پزشکی مفید آن با استخراج این ترکیبات از ماتریکس‌های خود بهره جست. متداول‌ترین مکانیسم عمل برای گزانتوفیل‌های دریایی، سرکوب مسیرهای التهابی از طریق فعالیت مهار رادیکال علیه گونه‌های واکنش‌دهنده به اکسیژن است (۹۱).

ترکیبات متعدد دیگری از گروه‌های عاملی شیمیایی مختلف در عصاره این جانور دریایی مورد مطالعه یافت گردید. ترکیبات آلکانی **BS_2** و **BS_3** در نمونه ستاره شکننده شناسایی شدند. آلکان‌ها در سال‌های اخیر توجه زیادی را به دلیل خواص بیولوژیکی و شیمیایی به خود جلب نموده‌اند (۹۲). اسیدهای چرب **BS_8** و **BS_{11}** نیز از ستاره شکننده به‌دست آمدند. اثرات مهاری برخی از اسیدهای چرب و مشتقات آن در متون موجود است. احمد (Ahmed) و همکاران، اثر اسید چرب آراشیدونیک اسید بر روی آنزیم استیل‌کولین‌استراز ونوم مار بونگاروس سیندانوس[۸۷] را که حاوی سطح بالایی از فعالیت استیل‌کولین‌استرازی می‌باشد مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که آراشیدونیک اسید مهار کننده قوی و غیررقابتی این آنزیم با IC_{50}=۱/۹ میکرومولار می‌باشد (۹۳).

مطالعات بیشتری برای خالص‌سازی ترکیبات دارای بیشترین فعالیت مهاری آنزیم مورد نیاز است که در پژوهشکده علوم زیست‌پزشکی دانشگاه متبوع در حال انجام است. ترکیب آلکالوئیدی **BS_4** برای هر دو آنزیم دارای بیشترین فعالیت در بین تمام ترکیبات بود. زهر

[83] *Gynotroches axillaris*
[84] *Grewia tiliaefolia*
[85] Fucoxanthin
[86] *Sargassum horneri*
[87] *Bungarus sindanus*

خام این زیست‌مند دریایی و ترکیبات موجود در آن و به‌ویژه ترکیب **BS_4**، می‌تواند یک پتانسیل و نقطه عطفی برای کشف مهارکننده‌های کولین‌استراز برای درمان بیماری آلزایمر باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعات توکسینولوژی، برون‌تنی و درون رایانه‌ای فعالیت‌های آنتی‌کولین‌استرازی زهر خام ستاره شکننده اوفیوکوما ارینا‌سئوس خلیج‌فارس نشان داده شد که زهر از نظر قدرت، بر اساس میزان LD_{50} در گروه "بسیار سمی" قرار دارد. آنالیز GC-MS زهر خام، تعداد ۲۵ متابولیت ثانویه با ساختارهای شیمیایی و زیست‌فعال ارزشمندی چون آلکالوئیدها، ترپن‌ها و استروئیدها را نشان داد. با توجه به نتایج تجربی، نمونه به‌عنوان مهارکننده‌های قابل قبول آنزیم AChE و قوی BChE عمل می‌نماید. مطالعه داکینگ، نتایج تجربی را تأیید نمود. ترکیب پیرازول آلکالوئیدی (۳H) پیرازول، ۳، ۵- دی‌فنیل-۳- متیل، بیشترین تمایل ترکیبی را برای هر دو آنزیم دارا بود. مطالعات بیشتری برای تعیین اینکه آیا این ترکیب می‌تواند کاندیدای درمان بیماری آلزایمر باشد و البته سایر مطالعات ضروری دیگر مربوط به ایمنی و شناسایی کامل ترکیب و نیز مطالعات بر روی ترکیب خالص‌سازی شده، مورد نیاز است.

این پژوهش تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (گرانت شماره ۲۳۵۱۹) انجام شده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

References:

1.Mohebbi GH, Nabipour I, Vazirizadeh A. The Sea, the Future Pharmacy. Iran South Med J 2014; 17(4): 748-788. (Persian) URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-590-en.html

2.Lhullier C, Moritz MIG, Tabalipa EO, et al. Biological activities of marine invertebrates extracts from the northeast Brazilian coast. Braz J Biol 2020; 80(2): 393-404. doi: 10.1590/1519-6984.213678

3.Kong DX, Jiang YY, Zhang HY. Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. Drug Discov Today 2010; 15(21-22): 884-6. doi: 10.1016/j.drudis.2010.09.002

4.Ebrahimi H, Mohebbi GH, Vazirizadeh A, et al. Sea cucumbers, the ocean of bioactive compounds. Iran South Med J 2015; 18(3): 664-679. (Persian) URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-709-en.html

5.Brittle star. Encyclopedia Britannica 2018 (Accessed September 7, 2021, at https://www.britannica.com/animal/brittle-star) URL: https://www.britannica.com/animal/brittle-star.

6.Miller JE, Pawson DL. echinoderm. Encyclopedia Britannica 2020. (Accessed November 2, 2022, at https://www.britannica.com/animal/echinoderm)
URL:https://www.britannica.com/animal/echinoderm

7.Kalinin VI. Echinoderms Metabolites: Structure, Functions, and Biomedical Perspectives. Mar Drugs 2021; 19(3): 125. doi: 10.3390/md19030125

8.Mohebbi GH, Vazirizadeh A, Nabipour I. Sea urchin: toxinology, bioactive compounds and its treatment management. Iran South Med J 2016; 19(4): 704-735. (Persian) URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-823-en.html

9.Kamyab E, Kellermann MY, Kunzmann A, et al. Chemical biodiversity and bioactivities of saponins in Echinodermata with an emphasis on sea cucumbers (Holothuroidea), In: Jungblut S, Liebich V, Bode-Dalby M, editors. YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research,

Our Future 2020, 121-157. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4_7
10.Stöhr S, O'Hara TD, Thuy B. Global diversity of brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). PLoS One 2012; 7(3): e31940. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031940
11.Menzies RJ, George RY, Rowe GT. Abyssal environment and ecology of the world oceans. New York: Wiley, 1973, 488. https://catalogue.nla.gov.au/Record/1954222
12.Blumenbach JF. Specimen archaeologiae telluris terrarvmqve inprimis Hannoveranarvm. Goettingae: Apvd Henricvm Dieterich, 1803, 28. https://www.worldcat.org/title/-specimen-archaeologiae-telluris-terrarvmqve-inprimis-hannoveranarvm/oclc/6716472
13.Wood JG. Animate Creation. In: Holder JB, editor. New York: Selmar Hess, 1898, 319. https://books.google.com/books?id=HO7aAAAAMAAJ&pg=PP11&dq=Animate+Creation&hl=fa&sa=X&ved=2ahUKEwi9Lf6soz7AhUinP0HHXcDDngQ6AF6BAgGEAI#v=onepage&q=Animate%20Creation&f=false
14.Pomory CM. Key to the common shallow-water brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) of the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. Caribb J Sci 2007; 10: 1-43. https://www.researchgate.net/publication/228496999_Key_to_the_common_shallow-water_brittle_stars_Echinodermata_Ophiuroidea_of_the_Gulf_of_Mexico_and_Caribbean_Sea
15.Fish JD, Fish S. A student's guide to the seashore. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2011, 572. https://www.cambridge.org/ir/academic/subjects/life-sciences/marine-biology/students-guide-seashore-3rd-edition?format=PB&isbn=9780521720595
16.Zueva O, Khoury M, Heinzeller T, et al. The complex simplicity of the brittle star nervous system. Front Zool 2018; 15: 1. doi: https://doi.org/10.1186/s12983-017-0247-4
17.LeClair EE, LaBarbera MC. An in vivo Comparative Study of Intersegmental Flexibility in the Ophiuroid Arm. Biol Bull 1997; 193(1): 77-89. doi: 10.2307/1542737
18.Tomholt L, Friesen LJ, Berdichevsky D, et al. The structural origins of brittle star arm kinematics: An integrated tomographic, additive manufacturing, and parametric modeling-based approach. J Struct Biol 2020; 211(1): 107481. doi: 10.1016/j.jsb.2020.107481
19.Yücekutlu AN, Bildaci I. Determination of plant saponins and some of Gypsophila species: a review of the literature. Hacettepe J Biol Chem 2008; 36(2): 129-135. http://www.hjbc.hacettepe.edu.tr/site/assets/files/3121/36_2_129-135.pdf
20.Baharara J, Mahdavi–Shahri N, Shaddel N. The local effect of Persian Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*) alcoholic extract on cutaneous wound healing in Balb/C mouse. J Birjand Univ Med Sci 2014; 21(3): 312-323. https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/emr-176140
21.Man S, Gao W, Zhang Y, et al. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. Fitoterapia 2010; 81(7): 703-714. doi: 10.1016/j.fitote.2010.06.004
22.Gunnarsson JS, Sköld M. Accumulation of polychlorinated biphenyls by the infaunal brittle stars Amphiura filiformis and A. chiajei: effects of eutrophication and selective feeding. Mar Ecol Prog Ser 1999; 186: 173-85. https://www.jstor.org/stable/24853303
23.Nuzzo G, Gomes BA, Amodeo P, et al. Isolation of Chamigrene Sesquiterpenes and Absolute Configuration of Isoobtusadiene from the Brittle Star *Ophionereis reticulata*. J Nat Prod 2017; 80(11): 3049-3053. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00510
24.Levin EV, Kalinovsky AI, Dmitrenok PS. Steroid compounds from the Far East starfish *Pteraster obscurus* and the *ophiura Asteronyx loveni*. Russ J Bioorganic Chem 2007; 33(3): 341–346. https://link.springer.com/article/10.1134/S1068162007030119
25.Andersson L, Bohlin L, Iorizzi M, et al. Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars. Toxicon 1989; 27(2): 179-88. doi: 10.1016/0041-0101(89)90131-1
26.Prabhu K, Bragadeeswaran S. Biological properties of brittle star *Ophiocnemis marmorata* collected from Parangipettai,

Southeast coast of India. J Microbiol Antimicrob 2013; 5(10): 110-118. doi: 10.5897/JMA2013.0270

27.Amini AA, Curwen RW, Klein AK, et al. Physics based snakes, Kalman snakes, and snake grids for feature localization and tracking in medical images 1995; 363-364. https://scholar.google.com/scholar?hl=fa&as_sdt=0%2C5&q=Amini+AA%2C+Curwen+RW%2C+Klein+AK%2C+et+al.+Physics+based+snakes%2C+Kalman+snakes%2C+and+snake+grids+for+feature+localization+and+tracking+in+medical+images+1995%3A+363-364.+&btnG=

28.Mohebbi GH, Nabipour I, Vazirizadeh A, et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of a neurosteroidal alkaloid from the upside-down jellyfish *Cassiopea andromeda* venom. Rev Bras Farmacogn 2018; 28(5): 568–574. doi: https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.06.002

29.Barmak A, Niknam K, Mohebbi GH, et al. Antibacterial studies of hydroxyspiro [indoline-3,9-xanthene] trione against spiro [indoline3,9-xanthene] trione and their use as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. Microb Pathog 2019; 130: 95-99. doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.002

30.Langjae R, Bussarawit S, Yuenyongsawad S, et al. Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge Corticium sp. Steroids 2007; 72(9-10): 682-5. doi: 10.1016/j.steroids.2007.05.005

31.Darabi AH, Nabipour I, Mohebbi GH, et al. Studies on the cholinesterases inhibiting compounds from the Cassiopea andromeda venom. Bioinformation 2020; 16(9): 702-709. doi: 10.6026/97320630016702

32.Spearman-karber R. Alternative methods of Analysis for Quantal Responses. In: Statistical Method in Biological Assay. Finney and Griffin, London 1978; 645. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19810726635

33.Worek F, Mast U, Kiderlen D, et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. Clin Chim Acta 1999; 288(1-2): 73-90. doi: 10.1016/s0009-8981(99)00144-8.

34. Mohebbi GH, Jahangiri A, Hajeb P. Inhibition of acetyl cholinesterase activity farmers exposed to organophosphate pesticides in Bushehr, Iran. AEJTS 2011; 3(3):127-29. doi: http://www.idosi.org/aejts/3(3)11/5.pdf.

35.Moodie LWK, Sepčić K, Turk T, et al. Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. Nat Prod Rep 2019; 36(8): 1053-1092. doi: 10.1039/c9np00010k

36.Ramírez D, Caballero J. "Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data?" Molecules 2018; 23(5): 1038. doi: 10.3390/molecules23051038

37.Erhirhie EO, Ihekwereme CP, Ilodigwe EE. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. Interdiscip Toxicol 2018; 11(1): 5-12. doi: 10.2478/intox-2018-0001

38.Amini E, Nabiuni M, Baharara J, et al. Hemolytic and cytotoxic effects of saponin like compounds isolated from Persian Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*). J Coast Life Med 2014; 2(10): 762-68. doi:10.12980/JCLM.2.2014JCLM-2014-0056

39.Afzali M, Baharara J, Shahrokhabadi K, et al. Effect of the Persian Gulf Brittle Star (*Ophiocoma erinaceus*) Dichloromethane Extract on Induction of Apoptosis on EL4 Cell Line. J Rafsanjan Uni Med Sci 2015; 14(6): 467-480. (Persian) URL: http://journal.rums.ac.ir/article-1-2476-en.html

40.Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochim Biophys Acta 2013; 1830(6): 3670-95. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008

41.Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, et al. Natural AChE Inhibitors from Plants and their contribution to Alzheimer's Disease therapy. Curr Neuropharmacol 2013; 11(4): 388-413. doi: 10.2174/1570159X11311040004

42.Fenical W. Marine Pharmaceuticals: Past, Present, and Future. Oceanogr 2006; 19(2): 110-119. https://tos.org/oceanography/article/marine-pharmaceuticals-past-present-and-future

43.Mohebbi GH, Nabipour I, Vazirizadeh A. Neurotoxic syndromes in marine poisonings a

review. Iran South Med J 2014; 17(3): 451-475. (Persian) URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-558-en.html

44.Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, et al. Marine natural products. Nat Prod Rep 2018; 35(1): 8-53. doi: 10.1039/c7np00052a

45.El Feky SE, Abd El Hafez MSM, Abd El Moneim NA, et al. Cytotoxic and antimicrobial activities of two new sesquiterpenoids from red sea brittle star *Ophiocoma dentata*. Sci Rep 2022; 12: 8209. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-022-12192-7

46.Gokel MR, McKeever M, Meisel JW, et al. Crown ethers having side arms: a diverse and versatile supramolecular chemistry. J Coord Chem 2021; 74(1-3): 14-39. https://doi.org/10.1080/00958972.2021.1878352

47.Taylor P, Radic Z. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1994; 34: 281–320. doi: 10.1146/annurev.pa.34.040194.001433

48.Li S, Li AJ, Travers J, et al. Identification of compounds for Butyrylcholinesterase inhibition. SLAS Discov 2021; 26(10): 1355-1364. https://doi.org/10.1177/24725552211030897

49.Chen VP, Gao Y, Geng L, et al. Plasma butyrylcholinesterase regulates ghrelin to control aggression. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112(7): 2251-6. doi: 10.1073/pnas.1421536112

50.Darvesh S, Walsh R, Kumar R, et al. Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord 2003; 17(2): 117-26. doi: 10.1097/00002093-200304000-00011

51.Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, et al. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(47): 17213-8. doi: 10.1073/pnas.0508575102

52.Kovarik Z, Radić Z, Grgas B, et al. Amino acid residues involved in the interaction of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with the carbamates Ro 02-0683 and bambuterol, and with terbutaline. Biochim Biophys Acta 1999; 1433(1-2): 261-71. doi: 10.1016/s0167-4838(99)00124-7

53.Giacobini E. Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 2000; 920: 321-7. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06942.x

54.Verpoorte R, Van der Heijden R, Schripsema J, et al. Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. J Nat Prod 1993; 56(2): 186-207. doi: 10.1021/np50092a003

55.Dey P, Kundu A, Kumar A, et al. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). Recent Advances in Natural Products Analysis 2020: 505–567. doi: 10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9

56.Liew SY, Khaw KY, Murugaiyah V, et al. Natural indole butyrylcholinesterase inhibitors from Nauclea officinalis. Phytomedicine 2015; 22(1): 45-8. doi: 10.1016/j.phymed.2014.11.003. Epub 2014 Nov 20

57.Bharate SB, Manda S, Joshi P, et al. Total synthesis and anti-cholinesterase activity of marine-derived bis-indole alkaloid fascaplysin. Med Chem Comm 2012; 3: 1098–1103. doi: https://doi.org/10.1039/C2MD20076G

58.Vieira IJ, Medeiros WL, Monnerat CS, et al. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. An Acad Bras Cienc 2008; 80(3): 419-26. doi: 10.1590/s0001-37652008000300003

59.Belyagoubi-Benhammou N, Belyagoubi L, Gismondi A, et al. GC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of alkaloids extracted by polar and apolar solvents from the stems of *Anabasis articulata*. Med Chem Res 2019; 28: 754–767. https://doi.org/10.1007/s00044-019-02332-6

60.Mbundi L, Gallar-Ayala H, Rizwan Khan M, et al. Advances in the analysis of challenging food contaminants: nanoparticles, bisphenols, mycotoxins, and brominated flame retardants. Adv Mol Toxicol 2014; 8: 35-105.

http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63406-1.00002-7
61.Riedel E, Kyriakopoulos I, Nündel M. 9, 10-Dihydroergotalkaloids as inhibitors of acetylcholinesterase. Arzneimittelforschung 1981; 31(9): 1387-8. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6796095/
62.PubChem Compound Summary for CID 220401, Demecolcine. National Center for Biotechnology Information. (Accessed November 28, 2021, at https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Demecolcine) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Demecolcine
63.Li JC, Zhang J, Rodrigues MC, et al. Synthesis and evaluation of novel 1,2,3-triazole-based acetylcholinesterase inhibitors with neuroprotective activity. Bioorg Med Chem Lett 2016; 26(16): 3881-3885. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.07.017
64.Dos Santos TC, Gomes TM, Pinto BAS, et al. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's Disease Therapy. Front Pharmacol 2018; 9: 1192. doi: 10.3389/fphar.2018.01192
65.Konrath EL, Passos Cdos S, Klein LC Jr, et al. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. J Pharm Pharmacol 2013; 65(12): 1701-25. doi: 10.1111/jphp.12090
66.Cole TJ, Short KL, Hooper SB. The science of steroids. Semin Fetal Neonatal Med 2019; 24(3): 170-175. doi: 10.1016/j.siny.2019.05.005
67.St-Onge MP, Lamarche B, Mauger JF, et al. Consumption of a functional oil rich in phytosterols and medium-chain triglyceride oil improves plasma lipid profiles in men. J Nutr 2003; 133(6): 1815-1820. doi: 10.1093/jn/133.6.1815
68.Reddy DS. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. Prog Brain Res 2010; 186: 113-37. doi: 10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7
69.Sultan A, Raza AR. Steroids: a diverse class of secondary metabolites. Med chem 2015; 5: 7. doi: 10.4172/2161-0444.1000279
70.Zhao HY, Shao CL, Li ZY, et al. Bioactive pregnane steroids from a South China Sea gorgonian Carijoa sp. Molecules 2013; 18(3): 3458-3466. doi: 10.3390/molecules18033458
71.Khalid A, Zaheer-ul-Haq, Anjum S, et al. Kinetics and structure-activity relationship studies on pregnane-type steroidal alkaloids that inhibit cholinesterases. Bioorg Med Chem 2004; 12(9): 1995-2003. doi: 10.1016/j.bmc.2004.03.002
72.Zaheer-Ul-Haq ZU, Wellenzohn B, Liedl KR, et al. Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. J Med Chem 2003; 46(23): 5087-90. doi: 10.1021/jm0309194
73.Riccio R, D'Auria MV, Minale L. Two new steroidal glycoside sulfates, Longicaudoside-A and -B, from the mediterranean Ophiuroid *Ophioderma longicaudum*. J Org Chem 1986; 51(4): 533–536. https://doi.org/10.1021/jo00354a025
74.Comin MJ, Maier MS, Roccatagliata AJ, et al. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs. Steroids 1999; 64(5): 335-340. doi: 10.1016/s0039-128x(99)00016-1
75.Roccatagliata AJ, Maier MS, Seldes AM, et al. Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid Ophioplocus januarii. J Nat Prod 1996; 59(9): 887–889. doi: 10.1021/np960171a
76.Aminin DL, Agafonova IG, Fedorov SN. Biological activity of disulfated polyhydroxysteroids from the Pacific brittle star *Ophiopholis aculeata*. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 1995; 112(2): 201-4. doi: 10.1016/0742-8413(95)02012-8
77.Güçlü-Ustündağ O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. Crit Rev Food Sci Nutr 2007; 47(3): 231-58. doi: 10.1080/10408390600698197
78.Kubanek J, Pawlik JR, Eve TM, et al. Triterpene glycosides defend the Caribbean reef sponge *Erylus formosus* from predatory fishes. Mar Ecol Prog Ser 2000; 207: 69-77. doi: 10.3354/meps207069

79.Yamanouchi T. On the poisonous substance contained in Holothurians. Publ Mar Biol Lab 1955; 4(2-3): 183-203. doi: 10.5134/174528
80.Kitagawa I, Kobayashi M. On the structure of the major saponin from the starfish acanthaster planci. Tetrahedron Lett 1977; 18(10): 859-862. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)92775-3
81.Minale L, Riccio R, Zollo F. "Structural studies on chemical constituents of echino-derms". Stud Nat Prod Chem 1995; 15: 43-110. https://doi.org/10.1016/S1572-5995(06)80130-4
82.Bahrami Y, Franco CM. Acetylated Triterpene Glycosides and Their Biological Activity from Holothuroidea Reported in the Past Six Decades. Mar Drugs 2016; 14(8): 147. doi: 10.3390/md14080147
83.Jesus M, Martins AP, Gallardo E, et al. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. J Anal Methods Chem 2016; 2016: 4156293. doi: 10.1155/2016/4156293
84.Mosquera MEG, Jiménez G, Tabernero V, et al. Terpenes and Terpenoids: Building Blocks to Produce Biopolymers. Sustain Chem 2021; *2(3)*: 467-492. https://doi.org/10.3390/sus-chem2030026
85.Masyita A, Sari RM, Astuti AD, et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. Food Chem X 2022; 13: 100217. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100217
86.Machado LP, Carvalho LR, Young MCM, et al. Evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of Brazilian red macroalgae organic extracts. Rev Bras Farmacogn 2015; 25(6): 657-662. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.003
87.Ninkuu V, Zhang L, Yan J, et al. Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. Int J Mol Sci 2021; 22(11): 5710. doi: 10.3390/ijms22115710
88.Abed SA, Sirat HM, Taher M. Tyrosinase inhibition, anti-acetylcholinesterase, and antimicrobial activities of the phytochemicals from *Gynotroches axillaris Blume*. Pak J Pharm Sci 2016; 29(6): 2071-78. https://pub-med.ncbi.nlm.nih.gov/28375126/
89.Sheeja MD, Beema SR, Karutha PS, et al. Cholinesterase inhibitory, anti-amyloidogenic and neuroprotective effect of the medicinal plant *Grewia tiliaefolia* - An in vitro and in silico study. Pharm Biol 2017; 55(1): 381–393. doi: 10.1080/13880209.2016.1241811
90.Lin J, Huang L, Yu J, et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid, reverses scopolamine-induced cognitive impairments in mice and inhibits acetylcholinesterase in Vitro. Mar Drugs 2016; 14(4): 67. doi: 10.3390/md14040067
91.Galasso C, Orefice I, Pellone P, et al. On the neuroprotective role of Astaxanthin: new perspectives? Mar Drugs 2018; 16(8): 247. doi: 10.3390/md16080247
92.Alias A, Zabidi Z, Zakaria N, et al. Biological activity relationship of cyclic and noncyclic alkanes using quantum molecular descriptors. Open J Appl Sci 2021; 11: 966-984. doi: 10.4236/ojapps.2021.118070
93.Ahmed M, Latif N, Khan RA, et al. Inhibitory effect of arachidonic acid on venom acetylcholinesterase. Toxicol Environ Chem 2011; 93(8): 1659-1665. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.017

Original Article

The *in vitro* and *in silico* Anticholinesterase Activities of Brittle Star (*Ophiocoma erinaceus*) crude venoms from the Persian Gulf-Bushehr

H. Dehghani (MSc)[1*], M. Rashedinia (PhD)[1], G.H. Mohebbi (PhD)[2**], A. Vazirizadeh (PhD)[3], A. Maryamabadi (PhD)[2], A. Barmak (PhD)[2]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[2] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[3] Department of Marine Biotechnology, The Persian Gulf Research and Studies Center, The Persian Gulf University, Bushehr, Iran

(Received 15 May, 2022 Accepted 19 Sep, 2022)

Abstract

Background: Brittle stars can produce well-known toxins responsible for various of their biological activities in addition to their physical defense. The purpose of this study was to identify secondary metabolites and assess the anticholinesterase activities of the crude venom of the Persian Gulf *Ophiocoma erinaceous* (brittle star) in vitro and in silico due to the abundance of this marine life on the Persian Gulf coasts and with knowledge of their numerous biological effects.

Materials and Methods: In this study, after the lyophilization of the brittle star sample, an LD_{50} test, a test of cholinesterase inhibitory activities, identification of the secondary metabolites, and their *in-silico* evaluations were performed by, respectively, Spearman-Karber, the Ellman spectroscopic method, Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), and computational docking method.

Results: According to the results, the LD_{50} value of the sample was 6.04±0.13 (mg/kg). The IC_{50} values related to their Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase were 37.925 ±0.055 and 5.388±0.02 (µg/ml), respectively, compared to the galantamine standard. The GC-MS analysis of the sample showed 25 bioactive chemical compositions with different structures, such as alkaloids, terpenes, and steroids. The computational results of the compounds also confirmed the experimental results. Among these, the alkaloidal compound **BS_4**, had the highest affinity for both enzymes.

Conclusion: As for toxicity potency, the brittle star crude venom sample was classified in the highly toxic category. The GC analysis of the crude venom showed various bioactive secondary metabolites with different chemical structures. The experimental and computational results on the anticholinesterase activities of the sample showed that the venom acts as a significant inhibitor of both enzymes. Further studies are required to determine whether the compound **BS_4** could be a candidate for the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: Echinoderm, Anticholinesterase, *Ophiocoma erinaceous*, Brittle Star, Secondary Metabolite, Venom.

©Iran South Med J. All right sreserved

Cite this article as: Dehghani H, Rashedinia M, Mohebbi G.H, Vazirizadeh A, Maryamabadi A, Barmak A. The in vitro and in silico Anticholinesterase Activities of Brittle Star (Ophiocoma erinaceus) crude venoms from the Persian Gulf-Bushehr. Iran South Med J 2022; 25(4): 297-325

[**]*Address for correspondence*: The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. E. mail: Mohebbihsn@yahoo.com
*ORCID: 0000-0002-1619-989x
**ORCID: 0000-0003-3393-702X