



## مطالعه فعالیت‌های آنتی‌کولین استرازی در شرایط *in vitro* و

## *in silico* زهر خام ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس

### خلیج فارس - بوشهر

حمیده دهقانی<sup>۱</sup> (MSc)\*، مرضیه راشدی‌نیا (PhD)<sup>۱</sup>، غلامحسین محبی (PhD)<sup>۲\*</sup>، امیر وزیری‌زاده (PhD)<sup>۳</sup>،

عمار مریم‌آبادی (PhD)<sup>۲</sup>، علیرضا برمک (PhD)<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز- ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

<sup>۳</sup> گروه زیست‌شناسی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، 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 خلیج فارس 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 اکیوندوم اوفیوکوما اریناسئوس خلیج فارس انجام گردید.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، پس از لیوفیلیزاسیون نمونه ستاره شکننده، آزمون‌های LD<sub>50</sub>، فعالیت‌های مهارکنندگی کولین استرازی، شناسایی متابولیت‌های ثانویه و ارزیابی درون‌رایانه‌ای آن‌ها به ترتیب با روش‌های اسپیرمن-کاربر، اسپکتروسکوپی ال‌من، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) و روش محاسباتی داکینگ انجام گردیدند.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج، میزان LD<sub>50</sub> نمونه ۶/۰۴±۰/۱۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. مقادیر IC<sub>50</sub> مربوط به آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز آن‌ها به ترتیب ۳۷/۹۲۵±۰/۰۵۵ و نیز ۵/۳۸۸±۰/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با استاندارد گالاتامین به دست آمدند. آنالیز GC-MS نمونه تعداد ۲۵ ترکیب شیمیایی زیست‌فعال با ساختارهای مختلف نظیر آلکالوئیدها، تری‌ن‌ها و استروئیدها را نشان داد. نتایج محاسباتی ترکیبات نیز، نتایج تجربی را تأیید نمودند. از این میان، ترکیب آلکالوئیدی BS<sub>4</sub> 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 کولین استرازی نمونه نشان داد که زهر، به‌عنوان مهارکننده قابل ملاحظه آنزیم‌ها عمل می‌نماید. مطالعات بیشتری برای تعیین اینکه آیا ترکیب BS<sub>4</sub> می‌تواند کاندیدای درمان بیماری آلزایمر باشد، مورد نیاز است.

**واژگان کلیدی:** اکیوندوم، آنتی‌کولین استراز، اوفیوکوما اریناسئوس، ستاره شکننده، متابولیت ثانویه، ونوم

\*\* بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، 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). ارگانسیم‌های 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<sup>۱</sup> هستند که از لغات یونانی باستان اکینوس<sup>۲</sup> به معنی "خاردار" و درما<sup>۳</sup> (پوست) و با هم به‌معنای "پوست خاردار" گرفته شده است. این شاخه، شامل حدود ۷۰۰۰ گونه زنده است که آن‌ها را پس از کروتات‌ها، به دومین گروه بزرگ دوتروستوم‌ها<sup>۴</sup> تبدیل نموده است (۵).

اکینودرم‌ها معمولاً با تقارن پنج شعاعی مشخص می‌گردند و به شش دسته کرینویده<sup>۵</sup> (نیلوفرهای دریایی و ستاره‌های پر<sup>۶</sup>)، هولوتورویده<sup>۷</sup> (خیارهای دریایی)، آستروویده<sup>۸</sup> (ستاره‌های دریایی)، کونستریسیکلویده<sup>۹</sup> (بابونه‌های دریایی)، اکینویده<sup>۱۰</sup> (توتیاهای دریایی) و اوفیورویده<sup>۱۱</sup> (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 این حال، 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، ضدالتهایی، تعدیل‌کنندگی ایمنی، ایکتوتوکسیسیستی گرفته تا جذب شکارچیان یا همزیست‌ها را از خود نشان می‌دهند (۹).

اوفیورویده یا ستاره‌های شکننده، ستاره‌های سبکی<sup>۱۲</sup> (اوریلیدها<sup>۱۳</sup> بازوهای شاخه‌ای) و ستاره‌های ماری<sup>۱۴</sup> (اوریلیدهای 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 اوفیورویده از واژه‌های یونانی اوفیس<sup>۱۵</sup> به معنی مار و اورا<sup>۱۶</sup> 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<sup>۱۷</sup>، ۱۷۵۸) یا گرگونوسفالوس<sup>۱۸</sup> کنونی و (آستریاس اوفیورا لینائوس<sup>۱۹</sup>، ۱۷۵۸) یا اوفیورای کنونی آغاز و در مقاله‌ای در سیستم نیچر<sup>۲۰</sup> منتشر گردید (۱۰). از نیمه

<sup>11</sup> Ophiuroidea

<sup>12</sup> Basket Stars

<sup>13</sup> Euryalids

<sup>14</sup> Snake Stars

<sup>15</sup> Ophis

<sup>16</sup> Oura

<sup>17</sup> *Asterias caput-Medusae Linnaeus*

<sup>18</sup> *Gorgonocephalus*

<sup>19</sup> *Asterias ophiura Linnaeus*

<sup>20</sup> *Systema Naturae*

<sup>1</sup> Echinodermata

<sup>2</sup> Echinus

<sup>3</sup> Derma

<sup>4</sup> Deuterostomes

<sup>5</sup> Crinoidea

<sup>6</sup> Feather stars

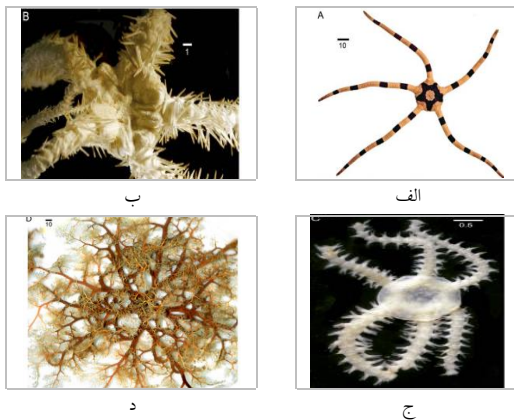
<sup>7</sup> Holothuroidea

<sup>8</sup> Asteroidea

<sup>9</sup> Concentricycloidea

<sup>10</sup> Echinoidea

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 سبلی، بازوها به یک یا چند شاخه تقسیم می‌شوند (شکل ۱).



شکل ۱) اوفیولپیس سوپربا<sup>۲۹</sup> یک شکل معمولی پنج بازویی با بازوهای ساده (الف)؛ اوفیاکانتا انوپلا وترنا<sup>۳۰</sup> شکلی با بازوهای خارهای دندانه‌دار بلند و خارهای روی دیسک (ب)؛ اوفیاکتیس تایلری<sup>۳۱</sup> شکل شش بازویی (ج)؛ یوراله اسپرا<sup>۳۲</sup> یک ستاره سبلی 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<sup>۳۴</sup> و پشتی<sup>۳۵</sup> و یا به ترتیب شکمی<sup>۳۶</sup> و

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<sup>۲۱</sup> بود که در سال ۱۸۱۸ به‌طور تصادفی توسط سر جان راس<sup>۲۲</sup> در اعماق خلیج بافین<sup>۲۳</sup> شناسایی شد (۱۱). اولین فسیل اوفیوروئیده مربوط به آستریس اسکوتلاتوس بلومنباخ<sup>۲۴</sup>، ۱۸۰۴ یا اسپیدوریلا<sup>۲۵</sup> کنونی، در اوایل سال ۱۸۰۴ از تریاسه میانی گوتینگن آلمان یافت گردید (۱۲). بر اساس توصیف وود<sup>۲۶</sup> (۱۸۹۸)، "ستاره‌های شکننده، موجودات بی‌قرار و کنجکاو هستند که برای دهم‌تاییه در یک حالت باقی نمی‌مانند و دائماً بازوهای بلند خود را به‌سان مارهایی بر سر مدوزا می‌پیچانند"<sup>۲۷</sup> (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 بورس<sup>۲۷</sup> در ناحیه بین بازویی، نوع و شکل پاپیلا<sup>۲۸</sup>، 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<sup>۲۹</sup> 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).

<sup>29</sup> Podial Scales

<sup>30</sup> *Ophiolepis superba*

<sup>31</sup> *Ophiacantha enopla Veterna*

<sup>32</sup> *Ophiactis tyleri*

<sup>33</sup> *Euryale aspera*

<sup>34</sup> Oral

<sup>35</sup> Aboral

<sup>36</sup> Ventral

<sup>21</sup> *Gorgonocephalus Caputmedusae*

<sup>22</sup> Sir John Ross

<sup>23</sup> Baffin Bay

<sup>24</sup> *Asterites scutellatus Blumenbach*

<sup>25</sup> *Aspiduriella*

<sup>26</sup> Wood

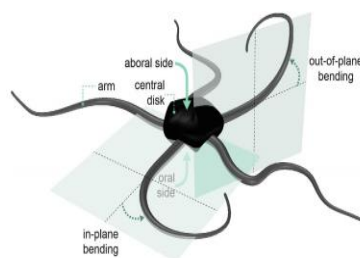
<sup>27</sup> Bursa

<sup>28</sup> Papillae

شناسایی ساپونین استفاده می‌گردد (۲۱). همچنین ستاره شکننده، حاوی ترکیبات آلی آگریز 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 سولفات (۲۴)، از ستارگان شکننده جدا شده‌اند. نشان داده شده است که اثرات ضدویروسی ستاره شکننده، به دلیل متابولیت‌های زیست‌فعال استروئیدی، 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<sup>۳۸</sup> دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی، همولیتیک و سیتوتوکسیک هستند (۲۶)، همچنین مشخص گردیده است که پلی‌هیدروکسی استروئیدهای دی‌سولفات ستاره شکننده اوفیوفولیس آکولئات<sup>۳۹</sup> 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 استیل کولین استراز (AChEI)، نظیر دونپزیل، گالاتامین 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 کولین استراز از

پشتی<sup>۳۷</sup> 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 به صورت 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، ضدپاتوزنی، ضدتوموری و ضددیابتی داشته و در ستاره شکننده به‌وفور یافت می‌شوند (۱۹ و ۲۰). این ترکیبات به دلیل فعالیت سطحی خود، قادر به ایجاد اختلال در غشای سلولی و تشکیل گروه‌هایی با کلاسترول غشای سلول می‌باشند؛ از این عمل لیتیک بر روی غشای گلبول‌های قرمز برای

<sup>39</sup> *Ophiopholis aculeate*

<sup>37</sup> Dorsal

<sup>38</sup> *Ophiochenmis marmorata*

مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (۱۴۰۰.۷۵۱). IR.SUMS.REC انجام گردید.

تعداد ۳۰ نمونه زنده ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس توسط غواصان پژوهشکده زیست پزشکی دریایی خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به‌وسیله تور صیادی، از بندر صیادی جفره ماهینی خلیج فارس- 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 خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، 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<sup>۴۳</sup>، انگلستان). نمونه‌های لیوفیلیزه در ویال‌های سر بسته تا مرحله کوتاه آنالیز در ۲۰°C- نگهداری گردیدند (شکل ۳) (۲۸).

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 مهارتی 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<sup>۴۰</sup> خلیج فارس 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<sup>۴۱</sup>، آلمان) و سیگما (دایسنهافن<sup>۴۲</sup>، آلمان) تهیه گردیدند.

### نمونه‌گیری و آماده‌سازی اولیه نمونه

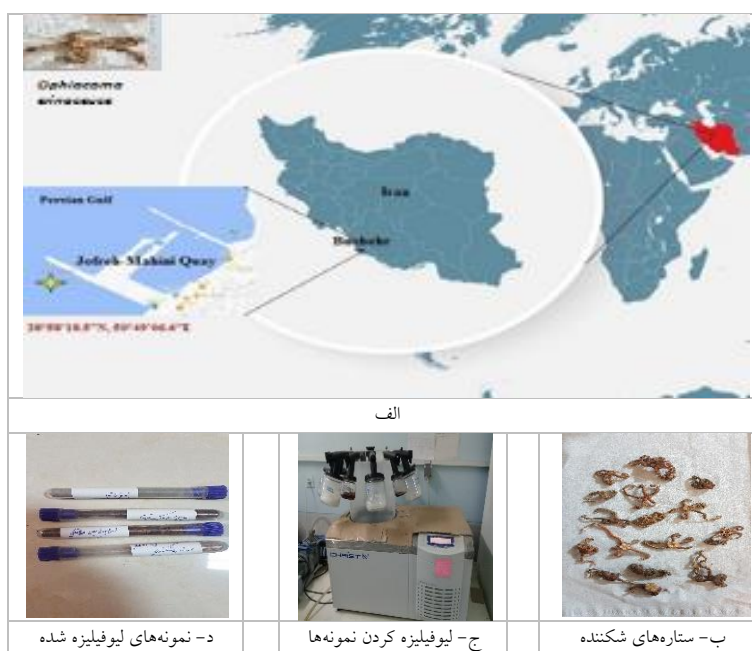
این مطالعه، توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز- ایران، تأیید و به صورت مشترک با دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام گردید. کلیه تست‌های حیوانی، مطابق با دستورالعمل ملی اخلاقی برای تحقیقات حیوانی در ایران (۲۰۰۵)، تحت مجوز پروژه مورد تأیید کمیته

<sup>43</sup> Christ

<sup>40</sup> *Ophiocoma erinaceus*

<sup>41</sup> Darmstadt

<sup>42</sup> Deisenhofen



شکل ۳) محل نمونه‌گیری ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس. بندر صیادی جفره ماهینی بوشهر- خلیج فارس (28°58'18.5"N, 50°49'06.6"E) (الف)؛ نمونه‌های ستاره‌های شکننده (ب)؛ لیوفیلیزه کردن نمونه‌ها (ج)؛ نمونه‌های لیوفیلیزه شده (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<sub>50</sub> به روش اسپیرمن-کاربر<sup>۴۴</sup>، سنجش میزان مهار فعالیت آنزیم‌های کولین‌استراز به روش اصلاح شده اسپکتروسکوپی المن<sup>۴۵</sup>، تعیین ترکیبات شیمیایی فرار (متابولیت‌های ثانویه) به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی<sup>۴۶</sup>، 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<sub>50</sub>

به منظور تعیین LD<sub>50</sub> نمونه لیوفیلیزه ستاره شکننده

اوفیوکوما اریناسئوس، 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 ۱۸۰±۲ گرمی (هر گروه چهار حیوان)، به‌صورت داخل وریدی انجام گردید تا LD<sub>50</sub> در زمان

<sup>46</sup> GC-MS

<sup>44</sup> Spearman-Kärber

<sup>45</sup> Ellman

میلی گرم از DTNB به ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات اضافه و توسط همزن مغناطیسی بهم زده شد. سپس به قسمت‌های ۵ میلی لیتری تقسیم و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری گردیدند. محلول‌های استیل تیوکولین یدید با غلظت  $28/3$  میلی مولار و بوتیریل تیوکولین یدید با غلظت  $63/2$  میلی مولار، به‌طور جداگانه به‌ترتیب با اضافه نمودن  $82/24$  میلی گرم از استیل تیوکولین یدید به  $10$  میلی لیتر آب مقطر و  $200/47$  میلی گرم از بوتیریل تیوکولین در  $10$  میلی لیتر آب مقطر ساخته شدند و در میکروتیوب به قسمت‌های یک میلی لیتری تقسیم و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند. فعالیت استیل کولین استراز در حضور مهار کننده انتخابی بوتیریل کولین استراز یعنی اتوپروپازین اندازه‌گیری گردید تا فعالیت آنزیم مذکور در تعیین میزان فعالیت AChE مزاحمتی ایجاد ننماید. اتوپروپازین با غلظت  $6$  میلی مولار با  $20/94$  میلی گرم اتوپروپازین در  $10$  میلی لیتر اسیدکلریدریک  $12$  میلی مولار به آهستگی حل و به قسمت‌های مساوی  $500$  میکرولیتری تقسیم و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری گردیدند.

جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز، برای هر نمونه دو کووت در نظر گرفته شد؛ یکی جهت اندازه‌گیری آنزیم و دیگری برای بلانک آماده گردیدند. ابتدا، مقادیر دو میلی لیتر بافر فسفات،  $0/1$  میلی لیتر معرف DTNB،  $0/01$  میلی لیتر معرف اتوپروپازین - به‌عنوان مهار کننده انتخابی آنزیم BChE - و نیز  $200$  میکرولیتر آنزیم AChE به کووت اندازه‌گیری آنزیم افزوده شدند. پس از آن، به مدت  $10$  دقیقه در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به تعادل نگهداری و بلافاصله پس از پایان زمان انکوباسیون، به کووت محتوی آنزیم، مقدار  $0/05$  میلی لیتر سوبسترای استیل تیوکولین یدید افزوده شد. جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز، ابتدا به کووت

$24$  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 بوتیریل کولین استراز**  
نمونه پودر لیوفیلیزه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس برای توانایی مهار فعالیت استیل و بوتیریل - کولین استراز ( Electrophorus C2888- electricus AChE, type V, 1000 unit/ mg protein, Sigma- Aldrich)، با توجه به روش کینیتیک اصلاح شده المن توسط وورک (Worek) و همکاران (۳۳) انجام گردید. استیل تیوکولین یدید<sup>۴۷</sup> و بوتیریل تیوکولین یدید<sup>۴۸</sup>، به‌ترتیب به عنوان سوبسترا برای بررسی فعالیت استیل و بوتیریل کولین استراز، مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت‌های کولین استراز در نمونه در حضور مهار کننده انتخابی گالاتامین، تعیین شد. اساس این روش اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به عنوان محصول کاتالیز آنزیمی بر روی استیل تیوکولین یدید 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 میلی گرم بر میلی لیتر از نمونه در آب مقطر تهیه شد. برای تهیه بافر فسفات با غلظت  $0/1$  مولار و  $\text{pH}: 7.4$ ، ابتدا مقدار  $17/8$  گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  در یک لیتر آب مقطر (محلول A) و سپس مقدار  $2/72$  گرم از  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  در  $200$  میلی لیتر آب مقطر (محلول B) حل گردیدند و سپس در دمای اتاق، محلول آماده شده B آنقدر به محلول A اضافه گردید تا  $\text{pH}$  محلول به  $7/4$  برسد. محلول بافر فسفات به‌دست آمده، صاف شد. برای تهیه واکنش‌گر المن با غلظت  $10$  میلی مولار، میزان  $396/3$

۵۰ درصدی هیدرولیز سوبسترا (IC<sub>50</sub>) می‌گردند با آنالیز رگرسیون خطی بین درصدهای مهارى 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 اریناسئوس، با ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال‌های متانول: استونیتریل: اتیل‌استات (۲:۲:۱) به مدت ۴ ساعت با سرعت ۴ 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: ۰/۲۵ 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 دکتور به ترتیب ۲۵۰°C و ۲۴۰°C و نیز، دماهای منبع یون و چهار قطبی به ترتیب ۲۲۰°C و ۱۵۰°C بودند. از گاز هلیوم 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

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 گالاتامین (۶۰ میکرولیتر)، به‌عنوان استاندارد مهارکننده فعالیت آنزیم استفاده گردید. فعالیت هر یک از آنزیم‌ها میکرومول بر لیتر بر دقیقه ( $\mu\text{mol/l/min}$ ) با استفاده از رابطه (i) و درصد مهارى آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز با استفاده از رابطه (ii) محاسبه گردیدند:

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

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



توسط نرم‌افزار کمستیشن<sup>۵۴</sup> انجام گرفت.

### یافته‌ها

#### تعیین میزان LD<sub>50</sub>

میزان LD<sub>50</sub> نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس به‌صورت تجویز داخل وریدی در موش صحرائی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی  $180 \pm 2$  گرم در یک دوره مشاهده ۲۴ ساعته، معادل  $6/04 \pm 0/130$  میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش بود.

#### فعالیت‌های مهارى استیل و بوتیریل کولین استراز

داده‌های تجربی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی المن نشان داد که زهر خام ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس به‌عنوان مهارکننده‌های قابل قبول استیل کولین استراز و قوی بوتیریل کولین استراز عمل می‌کند. بر اساس نتایج، میانگین درصد‌های مهارى (I%) نمونه زهر خام ستاره شکننده مربوط به آنزیم استیل کولین استراز در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  برابر  $15/899 \pm 0/057$  و برای استاندارد گالاتامین  $43/514 \pm 0/130$  درصد بودند. بر اساس آنالیز آماری، میزان میانگین درصد مهارى (I%) آنزیم AChE نمونه زهر خام در مقایسه با استاندارد گالاتامین دارای تفاوت معناداری بود ( $p < 0/001$ ). علاوه بر این، مقادیر درصد مهارى (I%) مربوط به آنزیم بوتیریل کولین استراز نمونه ستاره شکننده  $66/223 \pm 0/02$  و این مقدار مهارى برای استاندارد گالاتامین به میزان  $53/005 \pm 0/029$  درصد بود. میزان درصد مهارى (I%) آنزیم BChE نمونه نسبت به استاندارد گالاتامین دارای تفاوت معناداری بود ( $p < 0/001$ ).

بر اساس نتایج، مقادیر IC<sub>50</sub> مربوط به آنزیم استیل کولین استرازی نمونه،  $37/925 \pm 0/055$  میکروگرم بر

کتابخانه‌های وایلی<sup>۴۹</sup> و ان آی اس تی آدامز<sup>۵۰</sup> دستگاه انجام گردیدند. از پابکم<sup>۵۱</sup> نیز جهت تأیید 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 آنتی‌کولین استرازی 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 گالاتامین (به‌عنوان استاندارد مهارکننده استیل کولین استراز)، ابتدا ساختار آن‌ها با نرم افزار گوس‌ویو ۵.0 (340 Quinipiac St Bldg 40 Wallingford, CT 06492 USA) تهیه و ساختار لیگاندها با استفاده از روش DFT و مجموعه پایه b31yp/6-311g و بهینه‌سازی شد. ساختارهای حاصله جهت مطالعات داکینگ در برابر استیل کولین استراز (PDB Code:4BDT) و بوتیریل کولین استراز (PDB Code:4TPK) توسط نرم‌افزار اوتوداک وینا<sup>۵۳</sup> مورد استفاده قرار گرفتند (۳۱).

#### تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام و داده‌های هر گروه بر اساس میانگین ( $\pm SD$ )، 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 ( $p < 0/05$ ) استفاده گردیدند. مدیریت دستگاه GC-MS

<sup>52</sup> Gauss view

<sup>53</sup> Autodok Vina Software

<sup>54</sup> GC/MSD ChemStation

<sup>49</sup> Willy

<sup>50</sup> NIST Adams

<sup>51</sup> PubChem

بوتیریل کولین 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 اریناسئوس

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

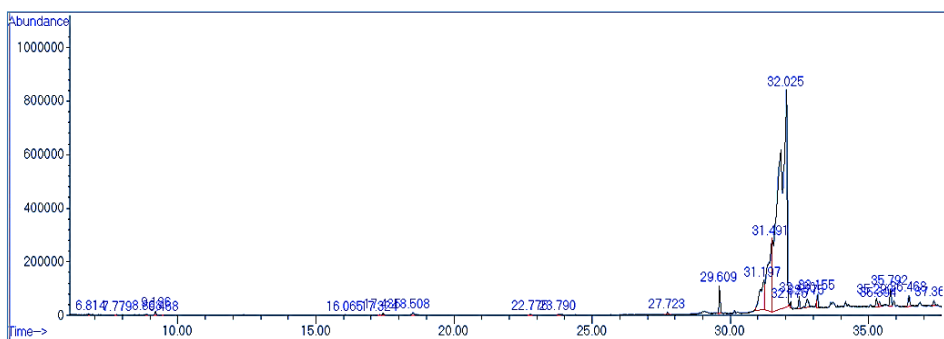
میلی‌لیتر بود. علاوه بر این، مقدار  $IC_{50}$  مربوط به بوتیریل کولین استراز آن  $۵/۳۸۸ \pm ۰/۰۲۰$  میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. جهت مقایسه، مقادیر  $IC_{50}$  مربوط به استاندارد گالانتامین برای آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز به ترتیب  $۹/۳۰۷ \pm ۰/۱۲۶$  و  $۹/۳۶۷ \pm ۰/۰۳۱$  میکروگرم بر 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 ( $p < ۰/۰۰۱$ ). بر اساس نتایج، نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس دارای میزان  $IC_{50}$  پایین‌تر و میزان فعالیت مهارى بالاتری علیه

جدول ۱) ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در عصاره اتیل استات: استونیتریل: متانولی (۲:۲:۱) نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس 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 <sub>1</sub>	1-Pentanamine, N-nitro-	نیترامین	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	۱۳۲/۱۶	۰/۰۱۸	۶/۸۱۴
BS <sub>2</sub>	2-Bromononane	آلکان برومینه	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> Br	۲۰۷/۱۵	۰/۰۲۳	۷/۷۷۹
BS <sub>3</sub>	Decane,2,4,6-trimethyl-	آلکان	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	۱۸۴/۳۶	۰/۰۳۲	۸/۸۶۸
BS <sub>4</sub>	(3H) Pyrazole,3,5-diphenyl-3-methyl-	آلکالوئید	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	۲۳۴/۲۹	۰/۲۰۸	۹/۱۸۶
BS <sub>5</sub>	1H-Tetrazol-5-amine	آلکالوئید	CH <sub>3</sub> N <sub>5</sub>	۸۵/۰۷	۰/۰۱۰	۹/۴۶۸
BS <sub>6</sub>	Squalene	تری‌ترین	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	۴۱۰/۷	۰/۰۳۱	۱۶/۰۶۵
BS <sub>7</sub>	Anosmagenin	ساپونین استروئیدی؛ پلی‌هیدروکسی- استروئید	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	۴۴۶/۶۱	۰/۰۳۳	۱۷/۳۲۴
BS <sub>8</sub>	n-Hexadecanoic acid	اسید چرب	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۲۵۶/۴۲	۰/۱۴۴	۱۷/۴۳۵
BS <sub>9</sub>	Ethaneperoxoic acid,1-cyano-1-[2-(phenyl-1,3-dioxolan-2-yl) ethyl] penthyl ester	کتال	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	۳۴۷/۴	۰/۱۸۹	۱۸/۵۰۸
BS <sub>10</sub>	3H-1,2,4-Triazole-3-thione,2,4-dihydro-2,4,5-trimethyl-	آلکالوئید	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> S	۱۴۳/۲۱	۰/۰۶۱	۲۲/۷۷۵
BS <sub>11</sub>	Octadecanoic acid	اسید چرب	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	۲۸۴/۵	۰/۰۷۸	۲۳/۷۹۰
BS <sub>12</sub>	Ergotaman-3',6',18-trione,12'-hydroxy-2'-methyl-5'-(2-methylpropyl)-, (5' à)-	آلکالوئید ارگوت	C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	۵۴۷/۶	۰/۲۰۰	۲۲/۷۲۳
BS <sub>13</sub>	Pseudoosarsapogenin-5,20-dien	ساپونین استروئیدی؛ پلی‌هیدروکسی- استروئید	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	۴۱۴/۶	۱/۱۵۰	۲۹/۶۰۹
BS <sub>14</sub>	Spirost-8-en-11-one, 3-hydroxy-, (3à, 5à, 14à, 20à,22à, 25R)-	استرول اسپیروست؛ پلی‌هیدروکسی استروئید	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	۴۲۸/۶	۵/۶۶۷	۳۱/۱۹۷
BS <sub>15</sub>	Pregnane-3,11,20,21-tetrol, cyclic 20,21- (butylboronate), (3à, 5à,11à, 20R)-	پلی‌هیدروکسی استروئید؛ استرول پرگنان	C <sub>25</sub> H <sub>43</sub> BO <sub>4</sub>	۴۱۸/۴	۱۲/۹۳۳	۳۱/۴۹۱
BS <sub>16</sub>	Megestrol Acetate	پلی‌هیدروکسی استرول	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	۳۸۴/۵	۷۳/۶۷۹	۳۲/۰۲۵
BS <sub>17</sub>	Ergosta-5,22-dien-3-ol, acetate, (3à, 22E)-	استرول	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	۴۴۰/۷	۰/۲۳۳	۳۲/۱۷۵
BS <sub>18</sub>	5-(P-Aminophenyl) -4-(p-toyl) -2-thiazolamine	آلکالوئید	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> S	۲۸۱/۴	۰/۴۶۰	۳۲/۴۸۰
BS <sub>19</sub>	5-Pregnen-3à, 9à-diol-20-one 3-acetate	پلی‌هیدروکسی استرول	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	۳۷۴/۵	۰/۸۷۸	۳۲/۷۷۵
BS <sub>20</sub>	Cholesta-3,5-diene	استرول	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub>	۳۶۸/۶	۰/۶۵۴	۳۳/۱۵۵
BS <sub>21</sub>	Sarpagan-17-ol,16-[(acetyloxy)methyl]-, acetate (ester)	ایندول آلکالوئید	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	۴۰۸/۵	۰/۵۸۰	۳۵/۲۹۰
BS <sub>22</sub>	Demecolcine	آلکالوئید	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	۳۷۱/۴	۰/۳۳۹	۳۵/۳۹۴
BS <sub>23</sub>	psi...psi.-Carotene, 1,1',2,2'-tetrahydro-1,1'-dimethoxy-	گزانتوفیل	C <sub>42</sub> H <sub>64</sub> O <sub>2</sub>	۶۰۱/۰	۱/۱۳۰	۳۵/۷۹۲
BS <sub>24</sub>	à-Hydroxy quebrachamine	ایندول آلکالوئید	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O	۲۹۸/۴	۰/۹۰۱	۳۶/۴۶۸
BS <sub>25</sub>	Cholic acid	پلی‌هیدروکسی استرول	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	۴۰۸/۶	۰/۳۷۸	۳۷/۳۶۸

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.

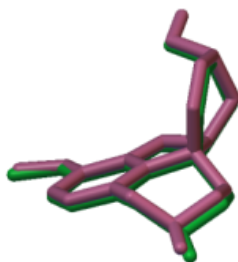
از بین ۲۵ ترکیب شیمیایی نمونه ستاره شکننده (BS<sub>1</sub>-BS<sub>25</sub>)، علاوه بر ترکیبات آلکانی، اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها، تعداد قابل ملاحظه‌ای شامل نه استروئید و مشتقات آن، هشت آلکالوئید با هسته‌های مختلف پیرازولی، تترازولی، تریازولی، ایندولی و تiazولی و سایر ترکیبات پر اهمیتی چون ترپن‌ها و



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

جزر میانگین مربعات (RMSD)<sup>۵۵</sup> 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 گالاتنامین 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)

### نتایج داکینگ مولکولی

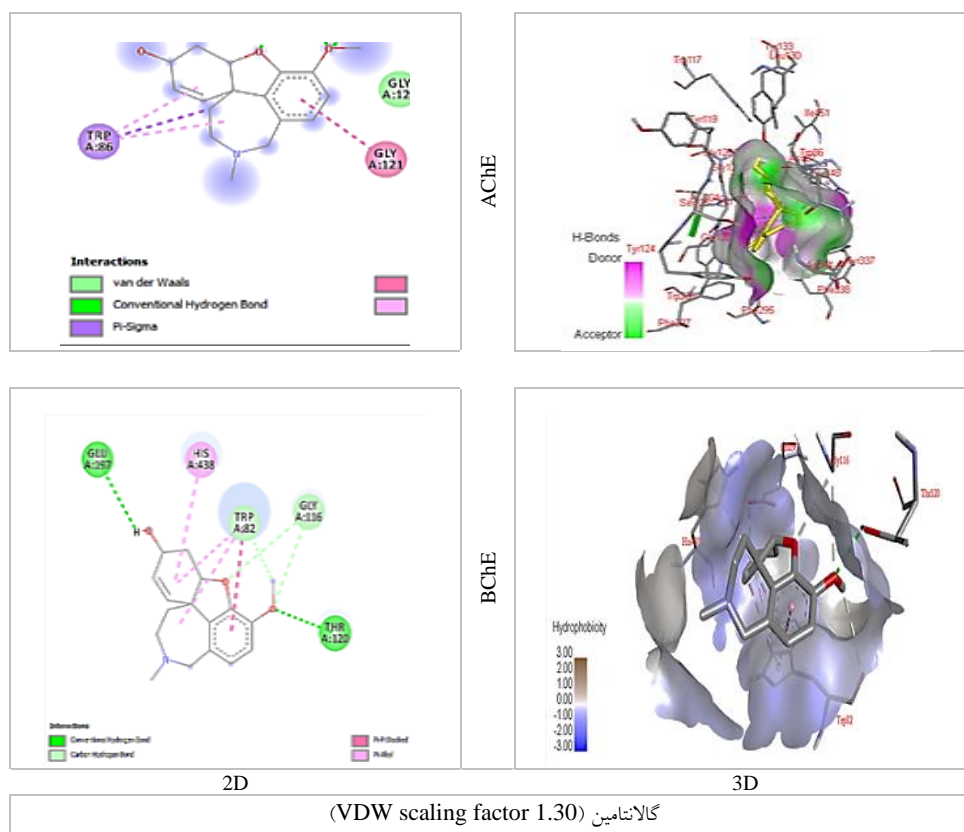
هر دو روش تجربی و محاسباتی، نقش‌های کلیدی را در کشف و توسعه داروهای ایفاء می‌نمایند. داکینگ مولکول‌های زیستی با ساختارهای شناخته شده، حتی با شواهد تجربی محدود، به سرعت به یک ابزار استاندارد برای توسعه زیست‌شناسی ساختاری و کشف داروهای تبدیل شده است (۳۶). از این رو، برای درک بهتر نتایج تجربی، داکینگ مولکولی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

جهت اعتبارسنجی روش داکینگ مولکولی، لیگاند گالاتنامین از ساختار آنزیم حذف گردید و پس از انجام داکینگ، با ساختار کریستالی آنزیم اولیه به همراه لیگاند گالاتنامین 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

<sup>55</sup> Root Mean Square Deviation

آنزیم آورده شده است.

در شکل (۶)، مولکول گالانتامین در جایگاه فعال آنزیم‌های AChE و BChE همراه با بقایای لیگاند



شکل ۶) تصاویر دو بعدی و سه بعدی داکینگ مولکولی 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

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 سلکتیویته 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.

نتایج تمایل<sup>۵۶</sup> و انتخاب‌گری<sup>۵۷</sup> 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 بوتیریل کولین استراز 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

<sup>57</sup> Selectivity

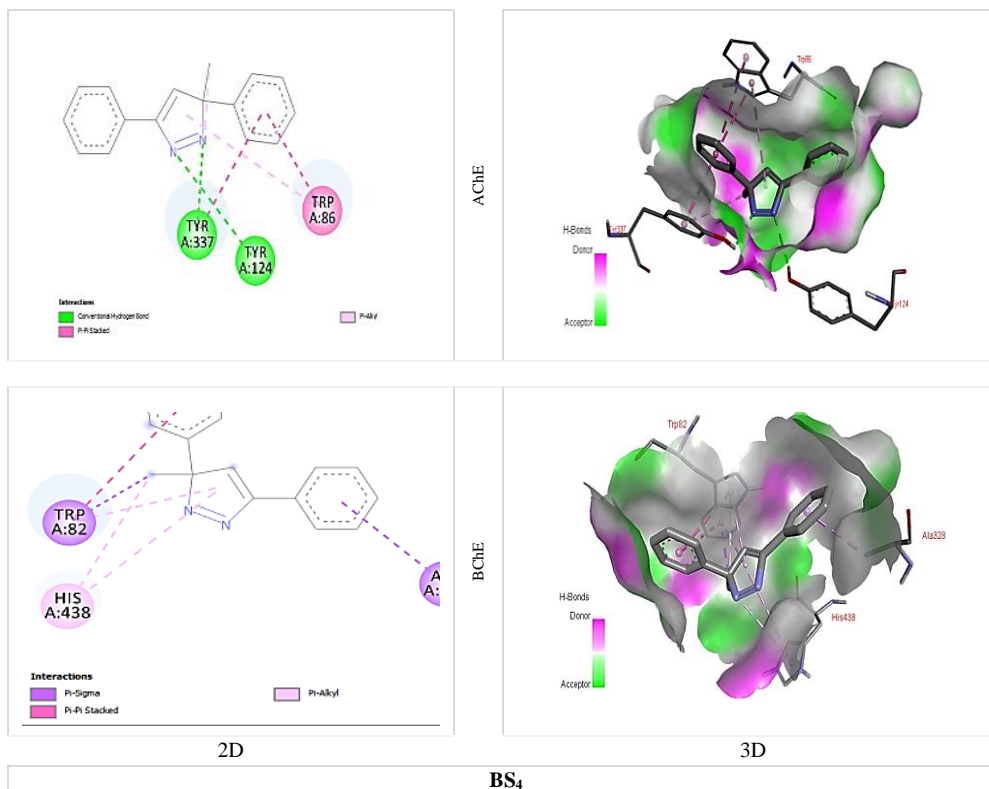
<sup>56</sup> Affinity

شده در نمونه ستاره شکننده، تعداد هفت ترکیب دارای انرژی پیوند بالاتری نسبت به گالاتامین (۷/۱- کیلوکالری بر مول) بودند. بیشترین میزان تمایل، مربوط به ترکیب **BS<sub>4</sub>** (۱۰/۱- کیلوکالری بر مول) بود. به استثنای ترکیب **BS<sub>23</sub>** (۶/۲ کیلوکالری بر مول)، سایر ترکیبات با وجود انرژی پیوند کمتر از گالاتامین دارای افینیتیه قابل قبولی بودند. علاوه بر این، در مورد آنزیم BChE، تعداد چهار ترکیب دارای تمایل بیشتری نسبت به گالاتامین به عنوان استاندارد (۵/۹- کیلوکالری بر مول)، بودند. به طور مشابه، بیشترین میزان تمایل به آنزیم BChE نیز مربوط به ترکیب **BS<sub>4</sub>** (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<sub>4</sub>** با اسیدهای آمینه آنزیم AChE، را می‌توان به برهمکنش‌های  $\pi$ - $\pi$  stacking بین گروه‌های آروماتیک اسید آمینه TRP A:86 و گروه ۳- فنیل ترکیب؛ برهمکنش  $\pi$ - $\pi$  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).

جدول (۲) نتایج مربوط به تمایل ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) و انتخاب‌گری حاصل از روش داکینگ برای گالاتامین و ترکیبات حاصل از آنالیز GC-MS نمونه ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس در برابر آنزیم‌های AChE و BChE				
ترکیب	تمایل ( $\text{kcal/mol}$ ) <sup>*</sup>			
	انتخاب‌گری		انتخاب‌گری	
	BChE	AChE	BChE	AChE
BS <sub>1</sub>	۱/۱۰۶	۰/۹۰۳	-۴/۷	-۵/۲
BS <sub>2</sub>	۱/۲۲۹	۰/۸۱۳	-۴/۸	-۵/۹
BS <sub>3</sub>	۱/۲۳۰	۰/۸۱۲	-۵/۲	-۶/۴
BS <sub>4</sub>	۱/۲۳۱	۰/۸۱۱	-۸/۲	-۱۰/۱
BS <sub>5</sub>	۱/۱۸۴	۰/۸۴۴	-۳/۸	-۴/۵
BS <sub>6</sub>	-۹/۶۶	-۰/۱۰۳	۰/۹	-۸/۷
BS <sub>7</sub>	-۰/۲۴۵	-۴/۰۷۵	۲۱/۶	-۵/۳
BS <sub>8</sub>	۱/۱۸۱	۰/۸۴۶	-۵/۵	-۶/۵
BS <sub>9</sub>	۱/۱۷۵	۰/۸۵۰	-۷/۴	-۸/۷
BS <sub>10</sub>	۱/۱۷۷	۰/۸۴۹	-۴/۵	-۵/۳
BS <sub>11</sub>	۱/۲۳۶	۰/۸۰۸	-۵/۵	-۶/۸
BS <sub>12</sub>	-۰/۰۷۸	-۱۲/۷۱۴	۸/۹	-۰/۷
BS <sub>13</sub>	۳/۶۶۶	۰/۲۷۲	-۰/۶	-۲/۲
BS <sub>14</sub>	-۰/۳۷۳	-۲/۶۷۹	۱۴/۲	-۵/۳
BS <sub>15</sub>	۱/۰۳۵	۰/۹۶۶	-۵/۷	-۵/۹
BS <sub>16</sub>	۰/۹۳۶	۱/۰۶۷	-۶/۳	-۵/۹
BS <sub>17</sub>	-۱/۵۷۱	-۰/۶۳۶	۱/۴	-۲/۲
BS <sub>18</sub>	۱/۷۲۴	۰/۵۸	-۵/۸	-۱۰/۰
BS <sub>19</sub>	۱/۰۳۵	۰/۹۶۵	-۵/۶	-۵/۸
BS <sub>20</sub>	۱/۱۴	۰/۸۷۷	-۵/۰	-۵/۷
BS <sub>21</sub>	۱/۵۴۷	۰/۶۴۳	-۵/۳	-۸/۲
BS <sub>22</sub>	۱/۷	۰/۵۸۸	-۵/۰	-۸/۵
BS <sub>23</sub>	۰/۰۵۴	۱۸/۲۰۹	۱۱۲/۹	۶/۲
BS <sub>24</sub>	۱/۱۹۴	۰/۸۳۷	-۶/۷	-۸/۰
BS <sub>25</sub>	۱/۱۱۱	۰/۹	-۳/۶	-۴/۰
گالاتامین	۱/۲۰۳	۰/۸۳۰	-۵/۹	-۷/۱

\*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



شکل ۷) تصاویر دو بعدی و سه بعدی ترکیب **BS4** 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 **BS4** 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.

### بحث

برخی از خارپوستان زهرآگین، توکسین‌های قوی با کشندگی قابل توجهی برای قربانیان خود، تولید و یا انباشته نموده‌اند (۷). در این مطالعه برخی خواص توکسینولوژی و فعالیت‌های بازدارندگی استیل و بوتیریل کولین استرازهای *in vitro* و *in silico* ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس خلیج فارس 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

اینتراکشن‌های قابل ملاحظه لیگاند **BS4** 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  $\pi-\pi$  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 قابل ملاحظه ترکیب به آنزیم کمک می‌کند (شکل ۷). قدرت پیوندهای هیدروژنی و  $\pi-\pi$  بین لیگاند و آنزیم موجب برقراری یک پیوند قوی می‌گردد.

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، ایزوکیونولینی، کینولیزیدینی، پیریدینی و استروئیدی تعلق دارند؛ هر چند، مهارکننده‌های استیل کولین استرازی غیرآلکالوئیدی نظیر ترپنوئیدها<sup>۵۸</sup>، فلاونوئیدها<sup>۵۹</sup> و سایر ترکیبات فنلی<sup>۶۰</sup> 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 اکتینودرم‌ها جدا شده‌اند. با این حال، تنوع شیمیایی گزارش شده از ترکیبات طبیعی دریایی از اکتینودرم‌ها، در مقایسه با دیگر شاخه‌های دیگر زیاد نمی‌باشند (۴۴). ستارگان شکننده با بیش از ۲۰۰۰ گونه، بزرگ‌ترین گروه اکتینودرم‌ها هستند (۴۵). گرچه آن‌ها دارای مکانیسم‌های دفاعی فیزیکی متعددی همچون جابجایی سریع، حذف سریع اندام‌های<sup>۶۱</sup> خود و توانایی پنهان شدن در زیر صخره‌ها و شکاف‌ها می‌باشند، اما برخی از گونه‌ها هنوز به دفاع

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 ۵-۵۰ با سمیت بالا؛ ۵۰-۵۰۰ سمیت متوسط؛ بین ۵۰۰-۵۰۰۰ 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-سپونین 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 اسپونین خام استخراج شده از این ستاره شکننده به‌صورت وابسته به دوز و زمان، موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های HeLa در طی ۲۴ ساعت با  $IC_{50}=25$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و در مدت ۴۸ ساعت  $IC_{50}=12/5$  میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌گردند (۳۸). همچنین، در بررسی اثرات سمیت عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده اوفیوکوما اریناسئوس بر روی سلول‌های EL4 توسط افصلی و همکاران، نشان داده شد که عصاره دی‌کلرومتانی، قادر به کاهش رشد سلولی در حالت وابسته

<sup>60</sup> Phenolic

<sup>61</sup> Extremities

<sup>58</sup> Terpenoids

<sup>59</sup> Flavonoids

شیمیایی متکی هستند. با این حال، بر اساس پایگاه داده مرین لیت<sup>۶۲</sup>، تا به امروز تنها چند مطالعه بر روی اوفیورونیدها متمرکز شده است.

در مطالعه نازو (Nuzzo) و همکاران، چندین کلاس متابولیت ثانویه نظیر کاروتنوئیدها، گانگلیوزیدها، ایندول‌های برم‌دار، فیل پروپانوییدها، 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، ترازولی، تریازولی، ایندولی و تیزول آمینی و سایر ترکیبات پراهمیتی 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 کولین استراز انجام گردید. از تعداد ۲۵ ترکیب شناسایی شده در ستاره شکننده، تعداد ۷ ترکیب دارای انرژی پیوند بین لیگاند و آنزیم استیل کولین استراز، بیش از گالاتامین (-۷/۱ kcal/mol) و به همین ترتیب، برای بوتیریل کولین استراز نیز تعداد چهار ترکیب دارای انرژی پیوند بین لیگاند و آنزیم بوتیریل کولین استراز بیش از گالاتامین (-۵/۹ kcal/mol) بودند. بر اساس نتایج انرژی پیوند، سایر ترکیبات نیز دارای انرژی پیوند قابل قبولی با آنزیم‌ها بودند. از این میان، ترکیب **BS4** دارای بیشترین تمایل برای هر دو آنزیم بود. فعالیت قابل ملاحظه این ترکیب در برابر آنزیم‌های کولین استراز را می‌توان وجود پیوندهای مهم هیدروژنی و  $\pi-\pi$  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 بوتیریل کولین استراز نسبت به استاندارد گالاتامین، 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 تأیید می‌نماید. در مطالعه داکینگ، بجز ترکیبات **BS12**، **BS14**، **BS17**، **BS23**، **BS6**، **BS7** تعداد ۱۹ ترکیب دیگر دارای فعالیت مهاری بوتیریل کولین استراز (EC 3.1.1.8، BChE) قابل قبولی بودند و نشان‌دهنده تمایل بالاتر عصاره و ترکیبات متشکله آن به بوتیریل کولین استراز است. این آنزیم همچون AChE، قادر به هیدرولیز استیل کولین می‌باشد و از نظر توالی اسید آمینه، با استیل کولین استراز (EC 3.1.1.7، AChE)، دارای ۵۴ درصد اشتراک است (۴۷). علاوه بر این، بوتیریل کولین استراز سرمی می‌تواند زنبویوتیک‌هایی چون ارگانوفسفره‌ها، آفت‌کش‌های کارباماته و کوکائین را سم‌زدایی، داروهایی نظیر بامبوتروپ<sup>۶۳</sup> 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 کولین استرازی از جمله دونپزیل، گالاتامین و ریواستیگمین برای درمان اختلالات نروژنراتیو استفاده شده‌اند (۵۰).

با این حال، معدودی مهارکننده‌های بسیار انتخابی و قوی بوتیریل کولین استراز گزارش شده‌اند. تحت شرایط فیزیولوژیکی، AChE با تنظیم سطح استیل کولین، 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

<sup>63</sup> Bambuterol

<sup>62</sup> MarineLit



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 **BS<sub>12</sub>**، **BS<sub>21</sub>** و نیز **BS<sub>24</sub>** 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 پتاسیکلیک فاسکاپلیسین<sup>۶۴</sup> از سفنج گونه فاسکاپلیسینوپسیس<sup>۶۵</sup>، مهارکننده قوی eeAChE با  $IC_{50}=1/49$  میکرومولار می‌باشد. مطالعات کیتیک نشان دادند که فاسکاپلیسین به صورت یک مهارکننده غیر رقابتی در برابر استیل‌کولین استراز عمل می‌نماید ( $Ki=2/28$  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 **BS<sub>21</sub>** در نمونه ستاره شکننده یافت گردید. انرژی پیوند بالای داکینگ این ترکیب (۷/۲- کیلوکالری بر مول، نسبت به گلانتامین ۷/۱- کیلوکالری بر مول)، برای آنزیم AChE، فعالیت آنتی استیل‌کولین استرازی آن را پیش‌بینی می‌کند. علاوه بر

۶۷ درصد و BChE تا ۱۲۰ درصد 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  $\beta$ -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 بوتیریل‌کولین استرازی فعلی برای درمان آلزایمر تأیید نشده‌اند؛ بنابراین، تقاضای زیادی برای کشف مهارکننده‌های انتخابی بوتیریل‌کولین استرازی برای استفاده بالینی بالقوه وجود دارد. بر اساس نتایج داکینگ، ملکول **BS<sub>4</sub>** 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

<sup>65</sup> Fascaplysinopsin

<sup>64</sup> Fascaplysin

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

از دیگر ترکیبات ایندول الکلوئیدی شناسایی شده در نمونه مطالعه حاضر، ترکیب **BS12** بود. این ترکیب، خانواده‌ای از مشتقات پیچیده ایندول الکلوئید ارگوت می‌باشد که فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع و اثرات سمیت قابل ملاحظه‌ای 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 الکلوئید ۹، ۱۰- دی هیدروآرگوکریپتین؛ ۹، ۱۰- دی هیدروآرگوتامین و ۱۰، ۹- دی هیدروآرگوتامین به ترتیب با **Ki** برابر ۱۹۸، ۱۴۴، ۱۱۷ و ۱۵ میکرومول دارای فعالیت‌های مهارکنندگی استیل کولین‌استرازی هستند (۶۱).

علاوه بر این، الکلوئیدهای متفرقه دیگری نیز در مطالعه حاضر شناسایی شدند. ترکیب الکلوئیدی **BS22** از نمونه ستاره شکننده ترکیبی است که تحت عنوان دمکولسین<sup>۶۶</sup> شناخته می‌شود و از آنالوگ‌های کلشی سین است که دارای فعالیت‌های بالقوه ضد میتوزی و ضدنئوپلاستی می‌باشد. ترکیب دمکولسین به محل اتصال کلشی سین 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 کولین‌استرازی نمونه ستاره شکننده دارای نقش مؤثری باشد. علاوه بر این، ترکیب **BS10** از نمونه ستاره شکننده یک

الکلوئید تریازولی می‌باشد. لی (Li) و همکاران، مشتقات سنتزی ۱،۲،۳- تریازول را در مهار آنزیم‌های کولین‌استرازی و فعالیت محافظ عصبی را مورد ارزیابی قرار دادند. یکی از مشتقات، دارای فعالیت مهارتی قابل قبولی نسبت به بقیه ترکیبات در برابر آنزیم استیل کولین‌استرازی با  $IC_{50} = 7/23 \pm 0/16$  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 آنتی‌استیل کولین‌استرازی طبیعی متعلق به گروه الکلوئیدها می‌باشد" (۶۴) و با توجه به نتایج تجربی و مطالعه داکینگ نمونه که نشان دهنده فعالیت مهارتی قابل ملاحظه این نمونه علیه آنزیم‌های کولین‌استرازی، به‌ویژه بوتیریل کولین‌استراز می‌باشد، می‌توان بخشی از فعالیت مهارتی این نمونه را به حضور متنوع و فعال ترکیبات الکلوئیدی نسبت داد. در واقع، یک بار مثبت به زیر واحد "آنیونی" در جایگاه فعال استیل کولین‌استراز متصل می‌شود که در الکلوئیدها مهیاست. به جرأت می‌توان گفت که در میان ترکیبات طبیعی، الکلوئیدها به دلیل ساختارهای پیچیده حاوی نیتروژن، امیدوارکننده‌ترین نامزدها برای استفاده در درمان الزایمر هستند (۶۵).

گروه بسیار مهم دیگر از نظر فعالیت‌های زیست‌پزشکی و فیزیولوژیکی، استروئیدها هستند (۶۶). در مطالعه حاضر، عصاره ستاره شکننده غنی از گروه‌های مختلفی از این ترکیبات بودند. استروئیدها از تری‌ترین اسکوالن به دست می‌آیند. اسکوالن نیز از ترکیب دو سیستم ترانس فارنسیل<sup>۶۷</sup> ساخته شده است که از سر به سر

<sup>67</sup> Trans-Farnesyl

<sup>66</sup> Demecolcine

می‌باشد (۲۸). لانگجای (Langjae) و همکاران، یک آلکالوئید استروئیدی ۴-استوکسی-پلاکینامین <sup>۷۴</sup>B را از یک اسفنج جنس کورتیسوم <sup>۷۵</sup> جداسازی نمودند. آن‌ها نشان دادند که این ترکیب مهار کننده برگشت‌پذیر استیل‌کولین‌استراز با  $IC_{50}=3/75$  میکرومولار می‌باشد (۳۰). در یک مطالعه، زهیرالحق (Zaheer-ul-haq) و همکاران، اینتراکشن‌های استیل‌کولین‌استراز را با ۱۵ استروئید جدا شده 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 استیل‌کولین‌استراز، یک گورج عمیق و باریک است. جایگاه کاتالیتیک استیل-کولین‌استراز 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، Tyr341، Trp286، Phe295، Phe297 و Tyr337 می‌باشد. اسید آمینه Asp74 مسئول تشخیص استیل‌کولین است (۵۴).

در مطالعه حاضر ترکیبات BS<sub>7</sub>، BS<sub>13</sub>، BS<sub>14</sub>، BS<sub>15</sub>

متصل شده‌اند (۶۷). نورواستروئیدها را بر اساس ویژگی‌های ساختاری، می‌توان به‌عنوان نورواستروئیدهای پرگنان، همانند آلوپرگنانولون<sup>۶۸</sup> و آلوتتراهیدرودئوکسی کورتیکوسترون<sup>۶۹</sup>، نورواستروئیدهای آندروستانی، مانند آندروستاندیول<sup>۷۰</sup> و اتیوکولانون<sup>۷۱</sup> و نورواستروئیدهای سولفات، مانند پرگننولون سولفات و دهیدرواپی‌آندروسترون سولفات طبقه‌بندی نمود (۶۸). نورواستروئیدها از طریق تعامل با کانال‌های یون انتقال دهنده عصبی، تحریک‌پذیری عصبی را تغییر می‌دهند. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان تعدیل‌کننده‌های آلوستریک گیرنده‌های انتقال‌دهنده عصبی مانند گیرنده‌های گابا (A)، ان-متیل-دی-آسپاراتات<sup>۷۲</sup> 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<sup>۷۳</sup> دارای یک نوع مهار غیررقابتی خالص برای هر دو آنزیم استراز 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  $IC_{50}=2/4$  میکرومولار

<sup>72</sup> NMDA

<sup>73</sup> *Sarcococca saligna*

<sup>74</sup> 4-acetoxy-plakinamine B

<sup>75</sup> Corticium

<sup>68</sup> Allopregnanolone

<sup>69</sup> Allotetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC)

<sup>70</sup> Androstanediol

<sup>71</sup> Etiocholanone

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 می‌تواند در تنگه آروماتیک بزرگ‌تر بوتیریل‌کولین‌استراز قرار گیرد. بقایای Phe-330 و Tyr-121 در استیل‌کولین‌استراز 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 بوتیریل‌کولین‌استرازی 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 اکتینودرم‌ها 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. اکتینودرم‌ها در مقایسه با سایر بی‌مهرگان دریایی بیش از

BS16, BS17, BS19, BS20 و BS25 از ستاره شکننده، دارای ساختار استروئیدی و مشتقات آن و از این میان، ترکیبات BS7, BS13, BS14, BS15, BS16, BS19, BS20 و BS25 استرول‌های پلی‌هیدروکسیله بودند. نتایج داکینگ مولکولی BS16 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 سهمیم باشد. در مطالعات مختلفی نیز ترکیبات استروئیدی با فعالیت‌های زیستی مختلف از کلاس‌های اوفیوریده گزارش گردیده‌اند. در یک مطالعه، ریکو (Riccio) و همکاران، دو ترکیب سولفات گلوکوزید استروئیدی لانگیکادوسید B و A<sup>۷۶</sup> را از ستاره شکننده اوفیودرما لانگیکادا<sup>۷۷</sup> از خانواده اوفیودرماتیدا<sup>۷۸</sup> جداسازی نمودند (۷۳). در یک مطالعه مشابه، کومین (Comin) و همکاران، یک ترکیب استروئیدی پلی‌هیدروکسی استرول را از ستاره شکننده استروتوما آگاسیزی<sup>۷۹</sup> جدا نمودند که دارای فعالیت ضدویروسی بود (۷۴). روکاتاگلیاتا (Roccatagliata) و همکاران، یک ترکیب استروئیدی سولفات را از ستاره شکننده اوفیوپلوکوس جانواری<sup>۸۰</sup> از خانواده همیورالیده<sup>۸۱</sup> با ویژگی ضدویروسی جدا نمودند (۷۵). در یک مطالعه مشابه دیگر، امینین (Aminin) و همکاران، یک ترکیب پلی‌هیدروکسی استرول سولفات را از فعالیت همولیتیک و سیتوتوکسیک از ستاره شکننده اوفیوفولیس آکولاتا از خانواده اوفیوفولیده جداسازی نمودند (۷۶). مطالعه حاضر با مطالعات پیشین برشمرده

<sup>79</sup> *Astrotoma agassizii*

<sup>80</sup> *Ophioplocus janarii*

<sup>81</sup> Hemieuryalidae

<sup>76</sup> Longicaudosides A–B

<sup>77</sup> *Ophioderma longicauda*

<sup>78</sup> Ophi dermatidae

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 عفونی‌کنندگی، 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 ماکرو جلبک‌های قرمز با بالاترین غلظت مونوترپن‌ها، مهارکننده استیل‌کولین‌استراز بودند (۸۶). در آنالیز نمونه اکینودرم مطالعه حاضر، ترکیب ایندول مونوترپنوئیدی **BS<sub>21</sub>** شناسایی شد که در مطالعه محاسباتی نیز دارای انرژی پیوند بالایی (۸/۲- کیلوکالری بر مول) نسبت به گالاتامین (۷/۱- کیلوکالری بر مول)، در برابر AChE بود. به‌علاوه، از ترپن‌ها ترکیب معروف تری‌ترپنی اسکوالن (**BS<sub>6</sub>**)، 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، تنظیم‌کنندگی سیستم‌های ایمنی، قلبی و غدد درون‌ریز می‌باشند (۸۷). مطالعه عابد (Abed) و همکاران، بر روی عصاره اتری

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 اریناسئوس از خانواده اوفیکومیدا جداسازی گردید (۳۸). در مطالعه حاضر، دو ترکیب استروئید ساپونینی **BS<sub>7</sub>** و **BS<sub>13</sub>** در ستاره شکننده شناسایی شدند. ترکیب استروئید ساپونینی **BS<sub>13</sub>** یا همان سای‌دیوسژنین<sup>۸۲</sup>، 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 کاهش‌دهندگی 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

گزانوفیلی **BS23** 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 گزانوفیل‌های دریایی، سرکوب مسیرهای انتهایی 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<sub>2</sub>** و **BS<sub>3</sub>** 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<sub>8</sub>** و **BS<sub>11</sub>** نیز از ستاره شکننده به دست 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 استیل کولین‌استراز ونوم مار بونگاروس سیندانوس<sup>۸۷</sup> را که حاوی سطح بالایی از فعالیت استیل کولین‌استراز می‌باشد مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که آراشیدونیک اسید مهار کننده قوی و غیررقابتی این آنزیم با  $IC_{50}=1/9$  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<sub>4</sub>** برای هر دو آنزیم دارای بیشترین فعالیت در بین تمام ترکیبات بود. زهر

گاینوتروچس اگزیلاریس<sup>۸۳</sup> 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 آنتی‌کولین‌استرازی عصاره‌های مختلف گریوا تلبافولیا<sup>۸۴</sup> حاوی ترکیب اسکوالن نشان داده شد. در مطالعه آن‌ها بیشترین فعالیت بازدارندگی کولین‌استراز، مربوط به عصاره‌های متانولی و آبی به ترتیب با مقادیر  $1/1 \pm 60/9=IC_{50}$  و  $6 \pm 94/7=IC_{50}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر برای استیل کولین‌استراز و  $53/7 \pm 0/7=IC_{50}$  و  $63/04 \pm 4/4=IC_{50}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر برای بوتیریل کولین‌استراز بود (۸۹). با توجه به مطالعات پیشین و نتایج داکینگ مولکولی ترکیب اسکوالن با انرژی پیوند بالا در برابر استیل کولین‌استراز آن در مقایسه با استاندارد گالانتامین (به ترتیب با مقادیر  $8/7-$  و  $7/1-$  کیلوکالری بر مول)، این ترکیب می‌تواند در فعالیت ضد استیل کولین‌استرازی 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 گزانوفیل‌ها (کاروتنوئیدهای اکسیژنه) یافت می‌شوند. فعالیت اصلی آن‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۸۷).

در مطالعه لین (Lin) و همکاران، ترکیب کارتنوئیدی فوکوگزانتین<sup>۸۵</sup> از جلبک قهوه‌ای سارگاسوم هورنری<sup>۸۶</sup>، جداسازی گردید که به‌طور مؤثری در برابر اختلالات شناختی ناشی از اسکوپولامین در موش‌ها، دارای اثرات محافظت‌کنندگی بود. این ترکیب، استیل کولین‌استراز را با  $IC_{50}=81/2$  میکرومولار مهار نمود (۹۰). ترکیب

<sup>86</sup> *Sargassum horneri*

<sup>87</sup> *Bungarus sindanus*

<sup>83</sup> *Gynotroches axillaris*

<sup>84</sup> *Grewia tiliaefolia*

<sup>85</sup> Fucoxanthin

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 (گزارش 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](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=HO7aAA\\_AAMAAJ&pg=PP11&dq=Animate+Creation&hl=fa&sa=X&ved=2ahUKEwi9Lf6soz7AhUinP0HHXcDDngQ6AF6BAgGEAI#v=onepage&q=Animate%20Creation&f=false](https://books.google.com/books?id=HO7aAA_AAMAAJ&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](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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107481)
19. Yücekutlu AN, Bildacı 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](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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00510)
24. Levin EV, Kalinovskiy 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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=](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 [indoline-3,9-xanthene] trione and their use as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. *Microb Pathog* 2019; 130: 95-99. doi: [10.1016/j.micpath.2019.03.002](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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 faspaplysin. 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](https://doi.org/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://pub-med.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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)92775-3)
81. Minale L, Riccio R, Zollo F. "Structural studies on chemical constituents of echinoderms". *Stud Nat Prod Chem* 1995; 15: 43-110. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(06\)80130-4](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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1155/2016/4156293)
84. Mosquera MEG, Jiménez G, Taberner 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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://pubmed.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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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. Deghani (MSc)<sup>1\*</sup>, M. Rashedinia (PhD)<sup>1</sup>, G.H. Mohebbi (PhD)<sup>2\*\*</sup>,  
A. Vazirizadeh (PhD)<sup>3</sup>, A. Maryamabadi (PhD)<sup>2</sup>, A. Barmak (PhD)<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

<sup>3</sup> 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 erinaceus* (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<sub>50</sub> test, a test of cholinesterase inhibitory activities, identification of the secondary metabolites, and their *in-silico* evaluations were performed by, respectively, Spearman-Kärber, the Ellman spectroscopic method, Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), and computational docking method.

**Results:** According to the results, the LD<sub>50</sub> value of the sample was 6.04±0.13 (mg/kg). The IC<sub>50</sub> 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<sub>4</sub>**, 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<sub>4</sub>** could be a candidate for the treatment of Alzheimer's disease.

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

©Iran South Med J. All right reserved

Cite this article as: Deghani 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

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>