بررسی و تعیین میزان مهارکنندگی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز توسط عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاهان *Alcea kurdica* (Schlecht) Alef و *Astragaluse glumaceus* Bioss.

رامین محمدی[۱]، محمدعلی زارعی[۲*]، سیروس قبادی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲- استادیار، گروه علوم‌زیستی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
*آدرس مکاتبه: سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی،
تلفن: ۰۹۱۸۸۷۱۰۶۳۲، نمابر: ۳۳۶۲۲۷۰۲ (۰۸۷)
پست الکترونیک: mazarei@uok.ac.ir، zarei2@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۱ **تاریخ تصویب:** ۹۴/۶/۲۱

چکیده

مقدمه: امروزه یکی از روش‌ها جهت مهار پیشرفت بیماری آلزایمر تجویز داروهای مهارکننده آنزیم استیل‌کولین‌استراز می‌باشد. دستیابی به داروهایی با اثرات بهتر و عوارض جانبی کمتر بخصوص با منشاء گیاهی هدف بسیاری از محققین می‌باشد.

هدف: هدف از این پژوهش بررسی و به دست آوردن میزان خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین‌استراز توسط عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاهان غربالگری شده *Alcea kurdica* و *Astragaluse glumaceus* بود.

روش بررسی: عصاره متانولی اندام‌های مختلف (گل، ساقه، برگ) دو گیاه *Alcea kurdica* و *Astragaluse glumaceus* به منظور بررسی فعالیت مهاری آنها بر روی استیل‌کولین‌استراز، به روش المن در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد سنجش قرار گرفتند. در این مطالعه از آنزیم استیل‌کولین‌استراز مارماهی الکتریکی استفاده شد و گالانتامین محلول در متانول به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. همه سنجش‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

نتایج: مطابق نتایج این مطالعه عصاره متانولی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای اندام گل *Alcea kurdica* (۶۳/۴۵ درصد مهار) و برای اندام برگ *Astragaluse glumaceus* (۵۳/۵۸ درصد مهار) دارای اثرات قابل توجهی بودند. و میزان IC_{50} آنها به ترتیب ۰/۱۱۴ و ۰/۲۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مطابق نتایج مطالعات سینتیک مهار آنزیمی، نوع مهار برای عصاره اندام گل *Alcea kurdica* مهار رقابتی، و برای عصاره اندام برگ *Astragaluse glumaceus* از نوع مهار ترکیبی (رقابتی- غیررقابتی) بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره متانولی این دو اندام، حاوی عوامل مهارکننده بالقوه مؤثری باشد و تلاش برای جداسازی آنها موضوع مناسبی برای پژوهش‌هایی آینده با هدف دست‌یابی به مهارکننده‌های دارای کاربرد دارویی باشد.

گل‌واژگان: *Alcea kurdica*، *Astragaluse glumaceus*، آلزایمر، استیل‌کولین‌استراز، گالانتامین، مهار آنزیمی

مقدمه

اختلالات عصبی مانند بیماری آلزایمر، یکی از رایج‌ترین انواع بیماری‌ها در افراد سالخورده است که در نتیجه آن راه‌های بیوشیمیایی مختلفی دچار اختلال خواهند شد [۱]. ویژگی آلزایمر بوسیله اختلال در حافظه، جنون، اختلال شناختی، رفتار غیرعادی و اختلال در فعالیت‌های روزانه زندگی مشخص شده است. این بیماری، بخصوص در کشورهای توسعه یافته که سن جمعیت رو به افزایش است، به یک مشکل عمده تبدیل شده است [۲].

داروهایی که در حال حاضر برای درمان آلزایمر تأیید شده‌اند، از طریق افزایش سطح استیل‌کولین در مغز عمل می‌کنند. استیل‌کولین یک انتقال‌دهنده عصبی در سیناپس‌ها است که بعد از آزاد شدن به فضایی سیناپسی، در اثر واکنشی که بوسیله آنزیم استیل‌کولین‌استراز کاتالیز می‌شود، به کولین و گروه استیل هیدرولیز خواهد شد [۳]. درمان اولیه و حالت متوسط آلزایمر، اکثراً بر اساس استفاده از مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین‌استراز، از جمله دونپزیل (Donepezil) سنتزی و گالانتامین (Galanthamine) استخراج شده از گیاه *Galanthus nivalis* و موارد مشابه می‌باشد. با این حال این داروها دارای اشکالاتی ازجمله اثرات جانبی مرکزی و محیطی شدید، مانند اختلات دستگاه گوارشی، بی‌خوابی، خستگی، افسردگی، مسمومیت کبدی، اسهال و تهوع، سرگیجه، مشکلات در ارتباط با جذب داروها می‌باشند [۴]. اثرات جانبی شدید داروهایی که در حال حاضر برای درمان آلزایمر به کار می‌روند، محققان را به یافتن مهارکننده‌هایی استیل‌کولین‌استراز با منشاء طبیعی، که تأثیر بیشتر و اثرات جانبی کمتری داشته باشد، علاقمند ساخته است.

گیاهان به علت تنوع زیستی و ساختمان اجزایشان، منابع منحصر به فرد و تجدید شدنی برای کشف داروهای جدید هستند. در کشورهای صنعتی حدود ۵۰ درصد از داروهای تجویز شده از گیاهان مشتق شده است و طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، گیاهان برای حدود ۳/۴ میلیارد نفر به عنوان اولین منبع دارویی در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود [۵].

به طور سنتی گیاهان برای افزایش حافظه و کم کردن علائم مرتبط با بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. دو گیاه *Bacopa monniera* و *Ginkgo biloba* شناخته شده‌ترین افزایش‌دهنده‌های حافظه در طب‌های سنتی چینی و هندی هستند. اثر مهاری وابسته به مقدار عصاره این گیاهان بر روی فعالیت استیل کولین استراز نشان داده شده است [۶]. در آزمایش‌هایی که بر روی گونه‌های مختلف جنس نعناع انجام شده است، بیشترین فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز مربوط به گونه *Mentha arvensis* بوده، که جزء فعال آن لینارین (Linarin) نام دارد [۷]. تاکنون تحقیقات انجام شده بر روی گیاهان در مناطق مختلف جهان منجر به معرفی مهارکننده‌های جدیدی شده است. بنابراین، تحقیق در مورد گیاهانی که به صورت انتخابی باعث مهار استیل‌کولین‌استراز می‌شوند اهمیت زیادی دارد، زیرا می‌تواند منجر به شناسایی مهارکننده‌های جدید و قوی‌تر و در عین حال با اثرات جانبی کمتر شود [۸].

فلور گیاهی استان کردستان بسیار غنی است و بسیاری از گونه‌های گیاهی این منطقه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف به کار می‌رود. طی تحقیقی بر روی یکصد گونه گیاهی کردستان، عصاره متانولی گیاهان به جهت خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین‌استراز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره متانولی چندین گونه گیاهی از جمله *Astragalus glumaceus* و *Alcea kurdica* و *Euphorbia macroclada* خاصیت مهارکنندگی بالای ۶۰ درصد را برای این آنزیم از خود نشان می‌دهند [۹].

با توجه به اینکه در پژوهش‌هایی پیشین، ترکیب تام عصاره‌های مختلف شیمیایی اندام‌ها و بخش‌های گیاهان برای خاصیت مهارکنندگی استیل‌کولین‌استراز بررسی شده است، ضروری است برای به دست آوردن عصاره خالص‌تر با خاصیت مهارکنندگی قوی‌تر، اندام‌ها و بخش‌های مختلف گیاهان از نظر توانایی خاصیت مهارکنندگی مورد بررسی قرار گیرند، تا اجزای فعال با خاصیت مهارکنندگی این آنزیم برای استفاده‌های درمانی مؤثرتر و کم‌خطرتر شناسایی و جداسازی شوند.

هدف از مطالعه حاضر بررسی اندام‌ها و بخش‌های مختلف هوایی گیاهان آلسه‌آکردیکا (نام فارسی: ختمی) (*Alcea kurdica*) و آستراگالوس‌گلوماسئوس (نام فارسی: گون) (*Astragaluse glumaceus*) از نظر توانایی

مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین‌استراز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE) از مارماهی الکتریکی (نوع VI-S)، استیل‌تیوکولین یدید (ATCI)، دی‌تیوبیس‌نیتروبنزوئیک‌اسید (DTNB)، تریس-هیدروکلریک، تریس- بازی (Tris-Base)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، گالانتامین هیدروبرومایدِ، از شرکت سیگما- آلدریچ (Sigma-Aldrich) و متانول و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شده‌اند.

جمع‌آوری گیاهان

اندام‌های هوایی دو گیاه آستراگالوس‌گلوماسئوس، آلسهآ کردیکا، از مناطق اطراف شهر سنندج توسط آقای مهندس معروفی کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات کشاورزی استان کردستان ارسال شده‌اند. پس از شناسایی و رده‌بندی، در همان مرکز توسط کارشناس مربوطه بخش‌ها و اندام‌های مختلف (شامل گل، برگ و ساقه) به طور کامل جداسازی شده و بلافاصله به محل نگهداری آزمایشگاه گروه علوم زیستی منتقل شدند. گیاهان جمع‌آوری شده در سایه و دمای محیط آزمایشگاه خشک شدند. قبل از تهیه پودر از نمونه‌ها، آنها از لحاظ نظافت و عدم آلودگی به خاک و یا سایر گیاهان بررسی شدند. سپس بوسیله قیچی باغبانی به قطعات کوچکی خرد شده و بوسیله آسیاب خانگی مولینکس به صورت پودر نرم درآمدند. پودرهای به دست آمده پس از توزین در ظروف درب‌دار پلاستیکی تا زمان عصاره‌گیری، در دمای اتاق نگهداری شدند.

تهیه عصاره متانولی

حدود ۱۰ گرم پودر گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص به مدت ۲۴ ساعت (در ظروف تیره و به دور از نور) خیسانده و سپس توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد. مایع صاف شده با استفاده از دستگاه روتاری اواپریتور در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و پس از تخلیه از مخزن دستگاه، جهت خشک شدن کامل، روی شیشه ساعت به قطر ۱۵ سانتی‌متر، پخش شده و در زیر هود شیمیایی و در دمای محیط قرار گرفت. عصاره‌های خشک شده از روی سطح شیشه ساعت جمع‌آوری و در میکروتیوب تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش مهار فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز

در این مطالعه جهت سنجش قدرت مهارکنندگی عصاره‌ها بر روی فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز، از روش اصلاح شده‌ی المن توسط اینکانیان و همکارانش با مختصر تغییراتی استفاده شد [۱۰]. همه عصاره‌ها در چهار غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تست شدند و از گالانتامین در غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵ ، ۴ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این مطالعه از دو سیستم بافری متفاوت استفاده شده است؛ بافر A: تریس- هیدروکلریک ۵۰ میلی‌مولار، pH برابر با ۸ حاوی ۰/۱ درصد آلبومین سرم-گاوی و بافر B: تریس- هیدروکلریک ۵۰ میلی‌مولار pH برابر با ۸ حاوی NaCl ۰/۱ مولار و $MgCl_2.6H_2O$ ۰/۰۲ مولار.

سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۲۵۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر به ترتیب زیر انجام شد. ۵۰ میکرولیتر از بافر A، ۲۵ میکرولیتر از عصاره محلول در متانول، ۲۵ میکرولیتر از آنزیم استیل‌کولین-استراز (۰/۲۲ U/mL محلول در بافر A) و ۱۲۵ میکرولیتر از DTNB ۳ میلی‌مولار (محلول در بافر B)، وارد چاهک شده، به منظور مخلوط شدن کامل این اجزاء با هم میکروپلیت را درون دستگاه قرارداده، به مدت ۵ ثانیه مخلوط شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، برای شروع واکنش ۲۵ میکرولیتر سوبسترا (۱۵ mM, ATCI) به مخلوط فوق اضافه شد. آنگاه میکروپلیت درون دستگاه میکروپلیت‌ریدر قرار گرفته و پس از ۲ ثانیه هم زدن، جذب آن ۱۰ مرتبه با فواصل یک دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. سنجش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. چاهک بلانک حاوی

اجزای کامل چاهک تست غیر از آنزیم بوده (به جای آنزیم ۲۵ میکرولیتر بافر A) و در واقع جذب عوامل مزاحم سنجیده شده و از جذب چاهک تست تفریق می‌شود. همه این تدابیر باعث شد که جذب نهایی فقط در نتیجه فعالیت آنزیم باشد. همچنین برای سنجش‌های هر روز، کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد. در چاهک کنترل مثبت به جای عصاره از گالانتامین و در چاهک کنترل منفی به جای عصاره از بافر A استفاده شد.

تحلیل داده‌ها

پس از پایان سنجش، جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظرش کسر شده و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از جذب چاهک تست، جذب نهایی محاسبه شد. سرعت واکنش بر اساس شیب نمودار جذب علیه زمان محاسبه شد. با استفاده از معادله (۱) درصد مهار آنزیم استیل-کولین‌استراز بوسیله عصاره به دست آمد. درصد مهار برای سه تکرار هر عصاره محاسبه و در پایان میانگین گرفته شده و انحراف استاندارد محاسبه شد. تمام این مراحل با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام شده است.

$$\text{مهار}\% = \frac{\text{شیب نمودار عصاره} - \text{شیب نمودار کنترل منفی}}{\text{شیب نمودار کنترل منفی}} \quad \text{معادله (۱)}$$

تمام مراحل گفته شده برای چهار غلظت عصاره انجام شده و میانگین درصد مهار به دست آمد. از طریق رسم نمودار درصد مهار بر علیه غلظت نهایی عصاره، IC_{50} که بیان‌کننده مقدار غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد مهار می‌دهد، تعیین شد.

آنالیز سِنتیکی

به منظور تعیین نوع مهار اعمال شده توسط عصاره‌های دارای بیشترین درصد مهار، نمودار معکوس مضاعف سِنتیکی لینویور- برک [۱۱]. بر اساس واکنش آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده و بدون حضور عصاره (کنترل) در چهار غلظت متفاوت سوبسترا، رسم شد. غلظت‌های تهیه شده سوبسترا بر اساس ضرایب نمودار لینویور- برک انتخاب، و در چهار غلظت ۱، ۱/۳۳، ۲ و ۵ میلی‌مولار تهیه شد. برای کنترل و هر یک از غلظت‌های مهارکننده Vmax و Km تعیین، بنابراین Ki و KI با استفاده از منحنی‌های ثانویه در غلظت‌های مختلف مهارکننده به دست آمد.

نتایج

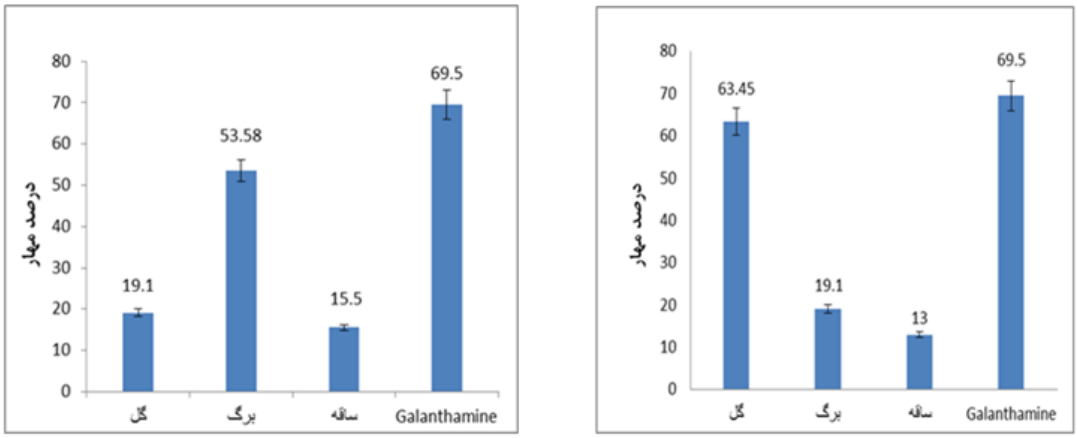
درصد مهار و IC_{50}

نتایج حاصل از بررسی اثر مهارکنندگی عصاره متانولی اندم‌های این گیاهان نشان داد که در گیاه آلسه‌آکردیکا (*Alcea kurdica*) بیشترین درصد مهار مربوط به اندام گل (شکل شماره ۱، الف) در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در گیاه آستراگالوس‌گلوماسئوس (*Astragaluse glumaceus*) بیشترین درصد مهار مربوط به اندام برگ (شکل شماره ۱، ب) در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

میزان IC_{50} در غلظت نهایی مهارکننده‌ها در محیط واکنش برای گالانتامین و همچنین برای سایر عصاره‌های متانولی در جدول شماره ۱ آورده شده است. مطابق آن میزان IC_{50} به دست آمده برای عصاره متانولی اندام گل در گیاه آلسه‌آکردیکا و اندام برگ در گیاه آستراگالوس‌گلوماسئوس نسبتاً پایین و لذا قابل توجه است.

بررسی سِنتیکی آنزیم استیل کولین استراز

نتایج مطالعه سِنتیکی دو عصاره متانولی اندام‌های دارای درصد مهار بالای گیاهان فوق نشان داد که عصاره اندام گل در آلسه‌آکردیکا مطابق الگوی مهار رقابتی (شکل شماره ۲، الف) و اندام برگ در آستراگالوس‌گلوماسئوس مطابق الگوی مهار ترکیبی (Mixed inhibition) (رقابتی – غیررقابتی) (شکل شماره ۲، ب) اثر می‌کنند. جهت مقایسه، گالانتامین که در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌گرم به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت، به صورت رقابتی باعث مهار استیل‌کولین-استراز شد.

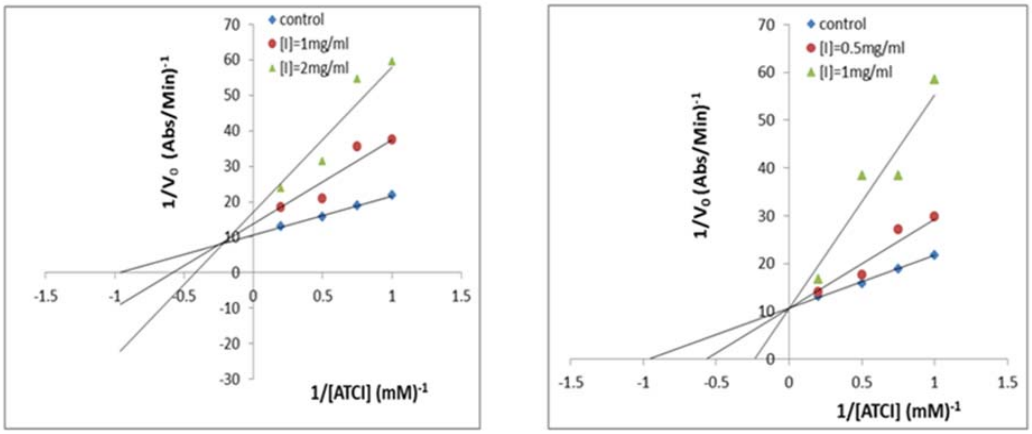


(الف) (ب)

شکل شماره ۱- درصد مهار اندام‌های مختلف برای (الف) *Alcea kurdica*، (ب) *Astragaluse glumaceus* در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و گالانتامین در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت و مقایسه آمده است.

جدول شماره ۱- میزان $IC_{۵۰}$ عصاره متانولی اندام‌های گیاهان (غلظت نهایی در محیط واکنش) در مقایسه با گالانتامین

نام علمی گیاه	خانواده	نوع اندام	میزان $IC_{۵۰}$ (mg/ml)
Alcea kurdica	Malvaceae	گل	۰/۱۱۴۰
		برگ	۲۴۳/۱۱
		ساقه	۲۳۷۲۹۱/۱
Astragalus glumaceus	Fabaceae	گل	۲۶۳/۳
		برگ	۰/۲۱۶۰
		ساقه	۱۷/۱۷۹
Galanthamine	-	-	۰/۰۰۰۴



(الف) (ب)

شکل شماره ۲- نمودارهای مضاعف معکوس، برای (الف) عصاره متانولی گل در *Alcea kurdica* و (ب) عصاره متانولی برگ در *Astragaluse glumaceus*، (KI > Ki)، در غلظت‌های ۱، ۱/۳۳، ۲ و ۵ میلی‌مولار از سوبسترا (ATCI)، غلظت‌های عصاره‌ها در داخل شکل آمده است.

جدول شماره ۲- مقادیر پارامترهای سینتیکی برای کنترل و عصاره اندام گل برای ***Alcea kurdica*** (مهار رقابتی)

غلظت (mg/ml)	Km (mM)	Km app (mM)	Vmax app (Δ Abs/Min)	Vmax app (Δ Abs/Min)	Ki (mg/ml)
۰/۵	۱/۰۴۱	۱/۷۵۴	۰/۰۹۳	۰/۰۹۳	۰/۲۳
۱	۱/۰۴۱	۴/۳۴۷	۰/۰۹۳	۰/۰۹۴	

جدول شماره ۳- مقادیر پارامترهای سینتیکی برای کنترل و عصاره اندام برگ برای *Astragalus glumaceus* (مهار ترکیبی)

غلظت (mg/ml)	Km (mM)	Km app (mM)	Vmax app (Δ Abs/Min)	Vmax app (Δ Abs/Min)	Ki (mg/ml)	KI (mg/ml)
۱	۱/۰۴۱	۱/۷۵۴	۰/۰۹۳	۰/۰۷۳	۰/۶۸	۳/۲۸
۲	۱/۰۴۱	۲/۴۳۹	۰/۰۹۳	۰/۰۵۸		

جداول شماره ۲ و ۳ نشان‌دهنده پارامترهای سِنتیکی محاسبه شده مربوط به مهار، به ترتیب توسط عصاره‌های گل برای *Alcea kurdica* و برگ برای *Astragaluse glumaceus* می‌باشند. جهت تعیین مقدار ثابت مهارکنندگی (Ki)، نمودار ثانویه رسم شد.

مطابق ثابت‌های مهاری به دست آمده در جدول شماره ۳، از آنجا که KI بزرگتر از Ki می‌باشد، بنابراین مهار ترکیبی به صورت رقابتی – غیررقابتی است.

بحث

جهت یافتن عصاره خالص‌تر و در نتیجه مؤثرترِ گیاهان، پژوهش‌های مختلفی بر روی اندام‌های آنها از نظر خاصیت مهارکنندگی فعالیت استیل‌کولین‌استراز انجام شده است. طی تحقیقی در جهت یافتن مهارکننده‌های جدید استیل کولین-استراز، گیاهان دارویی آفریقای جنوبی مورد بررسی قرار گرفتند، با استفاده از عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی توانایی مهاری آنها اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که عصاره متانولی ریشه گونه *Zanthoxylum davyi* دارای بیشترین درصد مهارکنندگی است [۱۲]. ادهمی و همکاران فعالیت مهاری عصاره‌های دی‌کلرومتان و متانولی برخی گیاهان دارویی ایران را به منظور یافتن مهارکننده‌های جدید استیل‌کولین‌استراز مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره دانه گیاه *Peganum harmala* یک مهارکننده قوی (۷۶/۵ درصد مهار) استیل‌کولین‌استراز می‌باشد [۱۳]. وِزلاکی و همکاران، اثر مهاری عصاره هگزانی اندام‌های ریشه و میوه در گونه *Angelica archangelica* L. بر آنزیم استیل‌کولین‌استراز را بررسی نمودند، نتایج نشان داد که اندام ریشه دارای اثر مهاری ضعیفی بر فعالیت آنزیم می‌باشد [۱۴]. همچنین نتایج پژوهشی بر روی گونه‌هایی مختلف گیاهان دارویی پرتغال، نشان داد که در گیاه *Hypericum undulatum* و *Lavandula angustifolia* اندام گل، در گیاه *Laurus nobilis* اندام برگ و در گیاه *Malva silvestris* دو اندام برگ و گل مهار قابل توجهی از خود نشان می‌دهند [۱۵]. غلامحسینیان و همکاران عصاره متانولی تعدادی از گیاهان ایران را به جهت فعالیت مهاری استیل‌کولین‌استراز مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که ریشه دو گونه *Levisticum officinale* و *Berberis integrima* به صورت غیررقابتی، ریزوم در گونه *Rheum ribes* به صورت رقابتی باعث مهار و دارای بیشترین درصد مهارکنندگی بودند [۱۶].

در امتداد مطالعات فوق، نتایج این پژوهش نشان داد که در گیاه آلسه‌آکردیکا در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین درصد مهار مربوط به اندام گل (۰/۸۷ ± ۶۳/۴۵ درصد) با $IC_{۵۰}$ (۰/۱۱۴ mg/ml) می‌باشد. این گیاه از خانواده پنیرک (Malvaceae) بوده و از گیاهان یک ساله است. گونه‌هایی مختلف این خانواده در اروپا و آسیا یافت می‌شوند [۱۷]. گونه آلسه‌آکردیکا در غرب ایران و استان کردستان پراکندگی فراوانی دارد. استفاده درمانی از گیاهان جنس *Alcea* (ختمی) از زمان‌هایی قدیم بین مردم معمول بوده است. ختمی دارای اثرات نرم‌کننده و آرام‌کننده و رفع تحریکات جلدی بوده و

برای درمان التهاب، سرفه‌هایی شدید، برونشیت، آنژین، سنگ کلیه، یبوست و دل‌پیچه کاربرد دارد. از جمله ترکیبات مهم شناخته شده در ختمی، فلاونوئیدها از گروه پلی‌فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها، موسین‌ها، و آنتوسیانین‌ها می‌باشند، این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستنند [۱۸]. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنولی فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی دارند [۲۱، ۲۰، ۱۹]. گل گیاه آلسهآ کردیکا برای درمان سرفه‌های شدید و التهاب کاربرد دارد [۲۲]. بنابراین با توجه به اینکه این گیاه دارای فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنولی است می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است فلانوئیدها و مشتقات آنها به عنوان مهارکننده عمل کنند. با توجه به درصد بالایی مهار عصاره اندام گل در این گیاه و میزان $IC_{۵۰}$ آن در مقایسه با گالانتامین (۰/۰۰۰۴ mg/ml =$IC_{۵۰}$)، می‌توان نتیجه گرفت که مهارکنندگی عصاره اندام مورد مطالعه با در نظر گرفتن اینکه برای این مهار از عصاره خام گل استفاده شده، که عملاً مقدار جزء فعال خیلی کم است، نسبت به آنزیم استیل‌کولین‌استراز مناسب بوده و می‌تواند زمینه پژوهش‌هایی بعدی باشد.

در عصاره گیاه آستراگالوس گلوماسئوس و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیشترین درصد مهار مربوط به اندام برگ (۱/۰۸۷ ± ۵۳/۸۵ درصد) با $IC_{۵۰}$ (۰/۲۱۶ mg/ml) می‌باشد. این گیاه از خانواده فاباسه (Fabaceae) بوده و گل دادن آن یک‌ساله است. گونه‌های این خانواده در آسیا و اروپا بخصوص در کشور دانماراک دارای پراکندگی وسیعی می‌باشد. همچنین این خانواده در غرب ایران و استان کردستان پراکندگی بالایی دارد [۲۳]. اثر درمانی ریشه و قسمت‌های هوایی گونه‌هایی این خانواده برای بیماری‌های دیابت، زخم معده، هپاتیت و رماتیسم گزارش شده است [۲۴]. از جمله ترکیبات مهم شناخته شده در گونه‌های این خانواده فلانوئیدها، آمینواسیدهای غیرپروتئینی، ساپونین، آلکالوئیدها، ترکیبات نیتروژنی، موسیلاژها و استرول‌ها می‌باشند [۲۵]. بنابراین با توجه به اینکه آلکالوئیدهایی مانند گالانتامین، ریواستیگمین (Rivastigmine)، فیزوستیگمین (Physostigmine)، دارای خاصیت مهاری استیل‌کولین‌استراز هستند [۲۶]. ممکن است آلکالوئیدهای موجود در این گونه نیز باعث بروز خاصیت مهاری شوند. همچنین نتایج تحقیقی برای تعیین میزان ترکیبات فنولی در اندام‌های مختلف گون، نشان داد که برگ آنها دارای محتوایی فنولی بالاتری نسبت به ریشه و دانه‌های آنهاست [۲۷]. بنابراین با توجه به خاصیت آنتی‌کولین‌استرازی فنول‌ها، و همچنین بر اساس نتایج مطالعه حاضر که بیشترین درصد مربوط به اندام برگ به دست آمد، احتمال وجود ارتباط قوی میان ترکیبات فنولی و فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین‌استراز وجود دارد. میزان $IC_{۵۰}$ به دست آمده، برای اندام برگ این گونه در مقایسه با گالانتامین ($IC_{۵۰}$= ۰/۰۰۰۴ mg/ml) بالاست، اما باید این نکته را در نظر گرفت که گالانتامین به صورت خالص مورد استفاده قرار گرفته است، و برای مطالعه این گونه‌ها از عصاره خام اندام استفاده شده، که مقدار جزء فعال خیلی کم است. همچنین وجود همه عوامل مداخله‌گر از جمله وجود فاکتورهای بی‌رنگ‌کننده ماده رنگی تولید شده طی واکنش و فاکتورهای فعال‌کننده در عصاره، باعث کاهش درصد مهار و در نتیجه افزایش مقدار $IC_{۵۰}$ می‌شود.

در تعیین نوع مهار، عصاره‌های گیاهی می‌توانند تقریباً رفتار سِنتیکی مشابه با ترکیبات منفرد را داشته باشد [۲۸]. مطابق نتایج، در عصاره اندام گل گیاه آلسه آ کردیکا که به صورت رقابتی باعث مهار می‌شود به نظر می‌رسد که ساختار شیمیایی جزء فعال ممکن است شبیه سوبسترای (ATCI) استیل‌کولین‌استراز یا مهارکننده‌هایی رقابتی آن مثل گالانتامین - باشد که به جایگاه فعال اتصال می‌یابند و باعث افزایش Km می‌شوند و در عصاره اندام برگ گیاه آستراگالوس‌گلوماسئوس که به صورت مهارترکیبی (رقابتی- غیررقابتی) باعث مهار آنزیم شده است، دراین نوع مهار، مهارکننده‌ها می‌تواند به جایگاه آنیونی پیرامونی ((Peripheral anionic site (PAS) آنزیم متصل و از طریق تغییرات آلوستریکی باعث مهار آنزیم شوند. بنابراین رفتار سِنتیکی عصاره‌های فوق می‌تواند در شناسایی اجزای فعال و خالص‌سازی آنها کمک نموده و مبنای مطالعات بعدی باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج کلی نشان می‌دهد که عصاره متانولی گل در گیاه *Alcea kurdica* و برگ در گیاه *Astragaluse glumaceus* دارای خاصیت مهارکنندگی فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز هستند. همچنین از مطالعه سِنتیکی می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها ممکن است دارای ترکیباتی با عملکرد یا ساختمان شبیه تاکرین (Tacrine) و گالانتامین باشند. لذا جداسازی و خالص‌سازی، اجزای فعال در این عصاره‌ها و تأثیر آنها بر روی استیل‌کولین‌استراز و مطالعه *in vivo* اثرات عصاره‌های فوق می‌تواند موضوع پژوهش‌های آینده باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله محققین این مطالعه از دکتر فردین فتحی مسئول مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان به خاطر تامین آب مقطر Mili Q و از آقای مهندس حسین معروفی به دلیل کمک‌های کارشناسی در شناسایی و جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Amessis-Ouchemoukh N, Madania K and Faleb PLV. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 2014; 53: 6 - 15.

2. Orhan I, Sener B, Choudhary MI and Khalid A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 91: 57 - 60.

3. Heinrich M and Teoh HL. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 92: 147 - 62.

4. Wszelaki N, Kuciun A and Kiss AK. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharm.* 2010; 60: 119 - 28.

5. Benamar H, Rached W, Derdour A and Marouf A. Screening of algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Biol. Sci.* 2010; 10: 1 - 9.

6. Mukherjee P, Kumar V, Mal M and Houghton P. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *J. Phy. Med.* 2007; 14: 289 - 300.

7. Oinonen P, Jokela J, Hatakka A and Vuorela P. Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia* 2006; 77: 429 - 34.

8. Nino J, Hernandez J, Correa Y and Mosquera O. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2006; 101: 783 - 95.

9. Azadbakht P and Zarei MA. Screening of plants of Kurdistan Province for acetylcholinesterase inhibitory activity. M. Sc. Thesis, University of Kurdistan. 2013.

10. Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T and Thongnoi W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 89: 261 - 64.

11. Palmer T. Understanding Enzymes, 3nd ed. London press. New York: Prentice Hall/ Ellis Horwood. 1991, pp: 139 - 11.

12. Adewusi EA and Steenkamp V. *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian. Pac. J. Tropi. Med.* 2011; 4: 829 - 35.

13. Adhami H, Farsam H and Krenn L. Screening of medicinal plants from Iranian Traditional Medicine for acetylcholinesterase inhibiton. *Phytother. Res.* 2011; 25: 1148 - 52.

14. Wszelaki N, Paradowska K, Jamroz MK, Granica S and Kiss AK. Bioactivity-guided fractionation for the butyrylcholinesterase inhibitory activity of furanocoumarins from *Angelica archangelica* L. roots and fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 2011; 59: 9186 - 93.

15. Ferreira A, Proenca C, Serralheiro MLM and Araujo MEM. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 108: 31 - 37.

16. Gholamhoseinian A, Moradi MN and Sharifi-far F. Screening the methanol extracts of some Iranian plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Res. Pharm. Sci.* 2009; 4: 105 - 12.

17. Batooli H. Medicinal industrial and aromatic plants of Kashan. National Symposium of Medicinal Plants. Kashan Research Center of agriculture, Natural Sources. 2002, pp: 88 - 9.

18. Fahimi Z, Cheraghi J, Pilehvarian AA, Sayehmiri K and Khosravi A. Effects of *Alcea angulata* Root Alcoholic Extract on Blood Lipid of Male Rabbit. *Sci. J. Ilam Uni. Med. Sci.* 2011; 2: 23 - 32.

19. Hostettmann K, Borloz A, Urbain A and Marston A. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Curr. Org. Chem.* 2006; 10: 825 - 47.

20. Fawole OA, Amoo SO, Ndhlala AR, Light ME, Finnie JF and Van Staden J. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical prop-erties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 2010; 127: 235 - 41.

21. Hernandez MF, Fale PLV, Araujo MEM and Serralheiro MLM. Acetyl-cholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several Hypericum species. *Food. Chem.* 2010; 120: 1076 - 82.

22. Bouayed J, Piri K, Rammal H, Dicko A, Desor F, Younos C and Soulimani R. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food. Chem.* 2007; 104: 364 - 8.

23. Sanandaji S and Mozaffarian V. Studies of Flora in Saral area: Kurdistan – Iran. *Taxonomy and Biosystematics* 2010; 3: 60 - 84.

24. Polat R, Cakilcioglu U and Satıl F. Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl—Turkey). *J. Ethnopharmacol.* 2013; 148: 951 - 63.

25. Ebrahimzadeh H, Niknam V and Maassoumi AA. The sterols of *Astragalus* species from Iran: GLC separation and quantification. *Biochem. Syst. Ecol.* 2001; 9: 393 - 404.

26. Mukherjee P, Kumar V, Mal M, and Houghton P. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 2007; 14: 289 - 300.

27. Niknam V and Ebrahimzadeh H. Phenolics content in *Astrgalus* species. *Pak. J. Bot.* 2002; 34: 283 - 9.

28. Crowch CM and Okello EJ, Kinetics of acetylcholinesterase inhibitory activities by aqueous extracts of *Acacia nilotica* (L.) and *Rhamnus prinoides* (L'Hér.). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2009; 3: 469 - 75.