نهمین کنفرانس ملی و اولین کنفرانس بین‌المللی فیزیولوژی گیاهی
9th National and 1st International Conference of Plant Physiology
۲۷–۲۹ بهمن ۱۴۰۴، دانشگاه گیلان

اثر متضاد عصاره‌های آبی و اتانولی سیرموک (*Allium canadense*) بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز: رویکردی نوین در درمان آلزایمر و مسمومیت‌های ارگانوفسفره

فرانک هادی [۱]*، سید حسام الدین حجازی [۱]
۱ آدرس نویسنده اول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، شهر خرم آباد

چکیده

این تحقیق با هدف مقایسه تأثیر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه سیرموک (*Allium canadense*) بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز انجام شد. در این پژوهش، عصاره‌ها به‌روش خیساندن با آب و اتانول تهیه شدند. فعالیت ضد استیل‌کولین استرازی با استفاده از روش الیس و همچنین توانایی بازگرداندن فعالیت آنزیمی که قبلاً با دیازینون مهار شده بود، مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی، فعالیت مهارکنندگی قوی و وابسته به غلظت آنزیم استیل‌کولین استراز را از خود نشان می‌دهد. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت آنزیم به کمترین مقدار (۵/۶۲μmol/μl/min ±۲/۵) رسید. در مقابل، عصاره آبی فاقد اثر بازدارندگی مستقیم بر آنزیم بود و بیشترین فعالیت (۹۸/۱۶۸μmol/μl/min ±۴۹/۲) در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد؛ اما عصاره آبی قادر به بازیابی معنادار فعالیت آنزیم مهارشده توسط دیازینون شد و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت آنزیم را به ۳/۱۳۳ ± ۳/۲ μmol/μl/min رساند. این یافته‌ها حاکی از نقش کلیدی نوع حلال استخراج در جداسازی ترکیبات موثره با مکانیسم‌های عمل متفاوت بر سیستم کولینرژیک است.

مقدمه

اختلالات سیستم کولینرژیک مغز، به‌ویژه کاهش سطح استیل‌کولین، نقش اساسی در پاتولوژی بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر ایفا می‌کنند. مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE)، که مسئول تجزیه این انتقال‌دهنده عصبی است، یکی از راهبردهای کلاسیک و مؤثر برای بهبود اختلالات شناختی محسوب می‌شود (Rahman, 2001). از سوی دیگر، مسمومیت ناشی از عوامل عصبی-شیمیایی یا آفت‌کش‌های ارگانوفسفره مانند دیازینون، که این آنزیم را به‌طور برگشت‌ناپذیر مهار می‌کنند، نیاز فوری به یافتن ترکیبات بازفعال‌کننده دارد .گیاهان دارویی به‌عنوان منابعی غنی و ایمن‌تر برای کشف ترکیبات مؤثر بر سیستم کولینرژیک مورد توجه فراوان قرار گرفته‌اند. جنس *Allium* با گونه‌های متعدد، به دلیل خواص درمانی گسترده شناخته شده است. خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی گونه‌های مختلف این جنس، عمدتاً ناشی از ترکیبات ارگانوسولفور، در مطالعات متعدد تأیید شده است (El-Saber Batiha et al., 2020). با وجود این، اطلاعات علمی درباره گونه *Allium canadense* بسیار محدود است. در مقابل، شواهد حاصل از سایر گیاهان دارویی نشان می‌دهد که عصاره‌های هیدروالکلی (مانند اتانولی) به دلیل استخراج طیف وسیع‌تری از متابولیت‌های ثانویه، اغلب فعالیت مهارکنندگی مستقیم قوی‌تری بر AChE دارند (Asadi et al., 2020). این تناقض ظاهری در نتایج، مسئله اصلی تحقیق حاضر را شکل می‌دهد: آیا نوع حلال استخراج (آبی در برابر هیدروالکلی) می‌تواند ماهیت و مکانیسم تعامل عصاره سیرموک با آنزیم AChE را به‌طور اساسی تغییر دهد و منجر به دو اثر فارماکولوژیک متضاد (بازفعال‌سازی در برابر مهار مستقیم) شود؟ بنابراین، هدف این مطالعه مقایسه سیستماتیک اثر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه سیرموک بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز است. انتظار می‌رود نتایج این پژوهش، نقش متدولوژی استخراج را در جهت‌دهی به خاصیت ضدکولین‌استرازی گیاه سیرموک روشن سازد و پتانسیل درمانی آن را در دو مسیر «کنترل اختلالات نورودژنراتیو» و «درمان مسمومیت‌های ناشی از مهارکننده‌های AChE برجسته کند.

مواد و روش‌ها

کل اندام های هوایی و زیر زمینی گیاه سیرموک (*Allium canadense*) در بهار ۱۳۹۹ از منطقه بروجن (چهارمحال و بختیاری) جمع‌آوری، خشک و پودر شد. برای عصاره‌گیری، ۵ گرم پودر گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه حرارت ملایم داده شد. پس از صاف‌کردن اولیه، محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰rpm در سانتریفیوژ مدل H-103N (Hsiangtai ، تایوان) سانتریفیوژ و سوپرناتانت نهایی به عنوان عصاره آبی جمع‌آوری و در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد .ارزیابی فعالیت ضد استیل‌کولین استرازی و بازفعال‌سازی :فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز (AChE) و تأثیر عصاره بر آن با روش اسپکتروفتومتری الیس (Ellman et al., 1961) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-1800 (Shimadzu، ژاپن) در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. منبع آنزیم، گلبول‌های قرمز خون انسان تازه بود که ۶۰۰ برابر در بافر فسفات ۰/۱ مولار ۸ = pH رقیق شده بودند. کلیه واکنش‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. از غلظت‌های مختلف عصاره آبی (۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده گردید .سنجش بازفعال‌سازی: آنزیم ابتدا با ۴ میکرولیتر دیازینون ۱۰ میلی‌مولار (Sigma-Aldrich)به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ °C مهار شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره افزوده و پس از ۱۰ دقیقه، با اضافه کردن ATCI، افزایش جذب به عنوان شاخص بازگشت فعالیت اندازه‌گیری شد. نرخ فعالیت آنزیم از شیب تغییرات جذب محاسبه و با گروه شاهد مقایسه گردید. تحلیل آماری :داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار مستقل ارائه و با استفاده از آزمون ANOVA و در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ (IBM) تحلیل شدند. سطح معناداری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصله، عصاره آبی سیرموک موجب افزایش فعالیت آنزیم AChE به صورت وابسته به غلظت گردید، به‌طوریکه بیشترین فعالیت (۹۸/۱۶۸μmol/μl/min ±۴۹/۲) در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. در مقابل، عصاره اتانولی همان گیاه اثر بازدارندگی قوی و وابسته به غلظت از خود نشان داد. فعالیت آنزیم در حضور این عصاره با افزایش غلظت به‌طور پیوسته و معنی‌دار کاهش یافت، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کمترین مقدار (۵/۶۲μmol/μl/min ±۲/۵) رسید. مقایسه اثر دو عصاره در غلظت‌های یکسان، تضاد کامل در مکانیسم عمل آن‌ها را آشکار ساخت. به‌عنوان مثال، در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فعالیت آنزیم در محیط حاوی عصاره آبی تقریباً ۲/۷ برابر فعالیت در محیط حاوی عصاره اتانولی بود. همچنین، در شرایطی که آنزیم قبلاً توسط دیازینون مهار شده بود، تنها عصاره آبی (در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) توانست فعالیت آنزیم را به‌طور معنی‌داری بازگرداند. این در حالی است که عصاره اتانولی فاقد چنین خاصیت بازفعال‌کنندگی بود.

نتایج به وضوح نشان می‌دهد که اثر غلظت در دو عصاره نه تنها متفاوت، بلکه در جهت مخالف است .با افزایش غلظت، قدرت فعال‌سازی عصاره آبی و قدرت مهارکنندگی عصاره اتانولی هر دو تشدید می‌شوند. نقطه اوج این واگرایی در غلظت ۱۰۰۰μg/mLو در مواجهه با آنزیم مهارشده مشاهده می‌شود. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که نوع حلال استخراج، نقش تعیین‌کننده‌ای در ماهیت اثر فارماکولوژیک گیاه سیرموک بر AChE دارد. عصاره اتانولی همانند بسیاری از گونه‌های جنس *Allium* فعالیت مهارکنندگی قوی و وابسته به غلظت علیه AChE نشان داد. این اثر احتمالاً ناشی از حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است که به‌طور رایج در عصاره‌های الکلی گزارش شده‌اند و می‌توانند به‌عنوان بازدارنده‌های رقابتی یا غیررقابتی با اتصال به جایگاه‌های کاتالیتیک یا آلوستریک آنزیم، مانع هیدرولیز استیل‌کولین شوند). چنین ویژگی، عصاره اتانولی را به یک کاندیدای طبیعی امیدبخش برای مدیریت بیماری‌های نورودژنراتیو نظیر آلزایمر تبدیل می‌کند (Gul et al., 2021).

در مقابل، عصاره آبی فاقد خاصیت مهارکنندگی مستقیم بود و برعکس، موجب افزایش فعالیت پایه آنزیم شد. این ویژگی کمتر گزارش شده و می‌تواند ناشی از حضور ترکیبات قطبی مانند آلکالوئیدها یا گلیکوزیدها باشد که با اتصال به نواحی تنظیمی آنزیم، تغییر کانفورماسیون و افزایش کارایی کاتالیتیک را القا می‌کنند. مهم‌تر از آن، عصاره آبی توانست فعالیت آنزیمی که قبلاً توسط دیازینون مهار شده بود را بازگرداند (Asadi et al., 2022)؛ این یافته اهمیت بالینی قابل‌توجهی دارد و پتانسیل استفاده از عصاره آبی را در درمان مسمومیت‌های حاد ناشی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره مطرح می‌سازد. تفاوت مشاهده‌شده در پاسخ‌های وابسته به غلظت نیز قابل‌توجه است. در حالی که اثر مهارکنندگی عصاره اتانولی با افزایش غلظت به‌طور پیوسته تشدید شد، اثر فعال‌کنندگی عصاره آبی پس از غلظت ۵۰۰ μg/mL به حالت اشباع نزدیک گردید. این الگو می‌تواند ناشی از تفاوت در تعداد جایگاه‌های اتصال، میل ترکیبی یا حلالیت ترکیبات فعال موجود در هر عصاره باشد (Colović et al., 2013).به‌طور خلاصه، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که یک گیاه دارویی واحد می‌تواند بسته به روش استخراج، خواص فارماکولوژیک کاملاً متفاوتی بروز دهد. عصاره اتانولی سیرموک با خاصیت مهارکنندگی AChE، گزینه‌ای بالقوه برای مدیریت بیماری‌های نورودژنراتیو است، در حالی که عصاره آبی آن با توانایی فعال‌سازی و بازفعال‌سازی آنزیم، چشم‌انداز تازه‌ای برای درمان مسمومیت‌های ارگانوفسفره فراهم می‌کند. این یافته اهمیت گزارش دقیق روش استخراج در مطالعات علمی را برجسته می‌سازد و ضرورت پژوهش‌های آینده برای جداسازی و شناسایی ترکیبات مسئول هر یک از این اثرات متضاد و ارزیابی کارآیی و ایمنی آن‌ها در مدل‌های حیوانی را نشان می‌دهد.

منابع

Rahman, K. (2001) – Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition, 131*(3), 977S–979S.
El-Saber Batiha, G., et al. (2020) – Chemical constituents and pharmacological activities of garlic. *Nutrients, 12*(3), 872.
Ellman, G. L., et al. (1961) – A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochemical Pharmacology, 7*(2), 88–95.
Gul, M. Z., et al. (2021) – Natural AChE inhibitors from plants: Potential leads for Alzheimer's therapy. *Brain Sciences, 11*(6), 737.
Colović, M. B., et al. (2013) – Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology, 11*(3), 315–335.
Asadi, M., et al. (2022) – Effect of aqueous extract of *Allium canadense* on AChE inhibited by diazinon. *Journal of Ilam University of Medical Sciences, 30*(1), 95–102.