بسم الله الرحمن الرحيم

١٢٧٤٧٠

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده داروسازی کرمان

مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس

عنوان:

بررسی برون تنی ودرون تنی اثرات مهارکنندگی استیل کولین استراز ، آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی ۸ گیاه دارویی

توسط:

محمد اسماعیل شفازند

به راهنمایی:

دکتر فریبا شریفی فر

دکتر محمدحسن مصحفی

دکتر مهدی انصاری

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک
۱۳۸۸ /۹/ - ۴

تابستان ۸۸ شماره ۵۳۶

۱۲۷۴۷۰

بارالها:

بر آستان شکوه و قدرتت پیشانی بندگی بر خاک می نهم : با تو می گویم سبکبار و آسوده با تو می گویم

که با دوست گفتن شرط وفاست و وحشت از جان راندن نشان صفاست آن چه یار اندارم

به دیگران چون راز بگویم بر آستان امن تو به آواز می گویم

پس مرا آن تمنا عطا کن که از تو فقط تو را بخواهم بس.

تقدیم به مادر بزرگ عزیزم که همواره مدیون زحمات او خواهم بود

تقدیم به پدرم اسطوره صبر و صلابت و استقامت، که اگر صبوری را از او آموخته باشم مرا به جهانی کفایت

کند.

تقدیم به مادرم گلواژه ایمان و ایثار قدیسی که چشمانم تاب مهربانی و بزرگی او را ندارد.

تقدیم به دو گوهر نفیس زندگی ام خواهران عزیزم سارا و سانازشفازند که در این مدت یار و یاور من بوده اند.

با تقدیر و تشکر فراوان از:

اساتید عزیز سرکار خانم دکتر فریبا شریفی فر- جناب آقای محمد حسن مصحفی و جناب آقای دکتر مهدی انصاری که در تمام مراحل این تحقیق مرا یاری نمودند.

با سپاس فراوان از جناب آقای دکتر عباس پرداختی که در تمام مراحل تحصیل مرا یاری نمودند.

و با سپاس از دوست عزیزم جناب آقای دکتر احسان مهاجری که با بزرگواری در تمام مراحل این تحقیق مرا یاری نمود.

و به یاد دوستان عزیزم: فرهود، علی، مهدی، فرهاد، قاسم.

خلاصه فارسی

مقدمه: مهار آنزیم استیل کولین استراز(AChE)، آنزیم کلیدی در تجزیه استیل کولین، به راستا ۸ گیاه دارویی از نظر خاصیت مهارکنندگی این آنزیم و و فعالیت آنتی اکسیدان و سیتوتوکسیسیتی مورد مطالعه قرار گرفته اند.

روش ها: ۸ گیاه دارویی میوه زیتون، مازو، دانه شنبلیله، میوه رازیانه، دانه سویا، اندام هوایی مریم گلی لاله زاری، ریشه شیرین بیان و دانه کنجد را بعد از تهیه و تأیید نام علمی با روش ماسراسیون با استفاده از اتانول ۸۰٪ عصاره گیری گردید. اثر مهار کنندگی AChE ، عصاره های تغلیظ شده در شرایط خلأ، در غلظت های مختلف با روش بیواتوگرافی و اسپکتروفوتومتری مورد سنجش قرار گرفت. از دو روش مهار بیرنگ کنندگی بتاکاروتن و مهار رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) برای تعیین وجود فعالیت آنتی اکسیدان گیاه استفاده گردید. برای تعیین سمیت سلولی گیاهان از روش لارو میگوی آب شور استفاده گردید.

نتایج : نتایج این تحقیق نشان می دهد که از بین گیاهان مورد مطالعه گیاه مریم گلی لاله زاری و، سویا و شیرین بیان بیشترین اثر مهاری را روی AChE نشان داده اند . IC_{50} گیاه مریم گلی لاله زاری در این مطالعه برابر ۱/٦٥ mg/mL در مقایسه با IC_{50} گالانتامین (۰/۰۰۲ mg/mL) به دست آمد. بیشترین مهار رادیکال DPPH مربوط به مازو ، شیرین بیان و مریم گلی لاله زاری با IC_{50} برابر با ۰/۰۰۲، ۰/۱٦ و ۰/۸۵ mg/mL بوده است. در مهار اکسیداسیون بتاکاروتن بیشترین فعالیت به ترتیب مربوط به مریم گلی لاله زاری ، رازیانه و شیرین بیان بوده است. ارتباط مستقیم بین فعالیت آنتی اکسیدان و مهار AChE این گیاهان به دست نیامد. کمترین سمیت سلولی مربوط به زیتون، کنجد و سویا بوده است. گیاه مریم گلی لاله زاری دارای IC_{50}برابر با ۸۱/٦ µg/ mL بوده است.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که گیاه مریم گلی لاله زاری، سویا و شیرین بیان دارای بیشترین فعالیت مهارکنندگی AChE و آنتی اکسیدان می باشند. کمترین سمیت سلولی مربوط به سویا می باشد. با توجه به اثرمهاری بیش از ۷۰٪ گیاه مریم گلی لاله زاری روی AChE ،

خلاصه فارسی

جداسازی فراکسیون های گیاه و انجام مطالعات درون تنی فراکسیون های مختلف این گیاه بر روی مهار AChE توصیه می گردد.

کلید واژه: مهار استیل کولین استراز- آلزایمر- مریم گلی لاله زاری

Introduction: Inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the key enzyme in the breakdown of acetylcholine, is considered as a promising strategy for the treatment of neurological disorders such as Alzheimer's disease. In the present study the inhibitory effect on AChE, antioxidant and cytotoxicity of 8 medicinal plants have been evaluated.

Methods: olive fruit, Mazo, Fenugreek seeds, Fennel fruits, Soya seeds, aerial parts of *Salvia rhytida*, root of Licorice and Sesame seeds were extracted with 80% ethanol using maceration method and dried in vaccuume. Different concentrations of each plant extract have been evaluated for inhibition of AChE in TLC and spectrophotometry methods. Antioxidant activities of the extracts were studied using beta carotene bleaching and DPPH inhibition assays. The extracts also were evaluated for cytotoxicity in Brine shrimp lethality (BSL) assay.

Results & discussion: *S. rhytida*, soya and licorice have shown the most inhibition of AChE respectively in both tests. In these experiments, the IC_{50} of *S. rhytida* (1.65mg/mL) was comparable with galantamine (0.002 mg/mL). The most DPPH radical scavenging activity has been shown by mazo, licorice and *S. rhytida* with IC_{50} of 0.002, 0.16 and 0.85 mg/mL. In beta carotene bleaching method, *S. rhytida*, fennel and licorice have inhibited the beat carotene oxidation. No direct correlation was found between AChE inhibitory and antioxidant activity. The least cytotoxicity was shown by olive, sesame and soya. IC_{50} of *S. rhytida* was estimated about 81.6µg/mL.

Conclusion: In general S. rhytida, soya and licorice have shown the most AChE inhibitory and antioxidant activity, which among them, soya has shown the least cytotoxiciy. Regarding the high percent of AChE inhibitory (70%) of *S. rhytida*, it suggests to separate the active fractions from this plant and do more *in vivo* studies of these fractions.

Key words: Acetylcholinesterase inhibition, *Salvia rhytida*, alzhiemer

خلاصه فارسی ..... I.

خلاصه انگلیسی III

فهرست ..... IV.

فصل اول : مقدمه

۱-۱- پیش گفتار و هدف ۲

۱-۲ - استیل کولین استراز ۳

۱-۳- استیل کولین ٤

۱-۳-۱ سنتز استیل کولین ٥

۱-۳-۲ ذخیره استیل کولین در وزیکول ها ٦

۱-۳-۳ آزاد سازی استیل کولین ٦

۱-۳-٤ اتصال به گیرنده ٦

۱-۳-٥ تجزیه استیل کولین ٦

۱-۳-٦ بازگشت مجدد کولین به چرخه تولید استیل کولین ٦

۱-٤- مشخصات گیاه شناسی ۷

۱-٤-۱ مریم گلی لاله زاری ۷

۱-٤-۱-۱ نامهای گیاه ۷

۱-٤-۱-۲ ریخت شناسی ۷

۱-٤-۱-۳ آثار فارماکولوژیکی ۸

۱-٤-۲ کنجد ۸

۱-٤-۲-۱ نامهای گیاه ۸

۱-٤-۲-۲ ریخت شناسی ۹
۱-٤-۲-۳ اندام دارویی ۹
۱-٤-۲-٤ دامنه انتشار ۹
۱-٤-۲-٥ مواد متشکله ۱۰
۱-٤-۲-٦ موارد استعمال ۱۰
۱-٤-۲-۷ موارد استفاده در پزشکی گذشته ۱۰
۱-٤-۲-۸ آثار فارماکولوژیکی ۱۰
۱-٤-۳ رازیانه ۱۱
۱-٤-۳-۱ نامهای گیاه ۱۱
۱-٤-۳-۲ ریخت شناسی ۱۲
۱-٤-۳-۳ اندام دارویی ۱۲
۱-٤-۳-٤ دامنه انتشار ۱۲
۱-٤-۳-٥ مواد متشکله ۱۳
۱-٤-۳-٦ موارد استعمال ۱۳
۱-٤-٤ زیتون ۱۳
۱-٤-٤-۱ نامهای گیاه ۱۳
۱-٤-٤-۲ ریخت شناسی ۱٤
۱-٤-٤-۳ مشخصات ۱٤
۱-٤-٤-٤ ترکیب شیمیایی ۱٤
۱-٤-٤-٥ موارد استعمال ۱٥

۱-٤-٥ شنبلیله ۱۵
۱-٤-٥-۱ نامهای گیاه..... ۱۵
۱-٤-٥-۲ ریخت شناسی..... ۱٦
۱-٤-٥-۳ اندام دارویی ۱٦
۱-٤-٥-٤ دامنه انتشار..... ۱٦
۱-٤-٥-٥ مواد متشکله ۱٦
۱-٤-٥-٦ موارد استعمال..... ۱۷
۱-٤-٦ شیرین بیان ۱۷
۱-٤-٦-۱ نامهای گیاه..... ۱۷
۱-٤-٦-۲ ریخت شناسی..... ۱۸
۱-٤-٦-۳ اندام دارویی ۱۸
۱-٤-٦-٤ دامنه انتشار..... ۱۸
۱-٤-٦-٥ مواد متشکله ۱۹
۱-٤-٦-٦ موارد استعمال..... ۱۹
۱-٤-۷ سویا..... ۱۹
۱-٤-۷-۱ نامهای گیاه..... ۱۹
۱-٤-۷-۲ ریخت شناسی..... ۲۰
۱-٤-۷-۳ ترکیبات شیمیایی..... ۲۰
۱-٤-۷-٤ خواص درمانی..... ۲۱
۱-٤-۸ مازو ۲۱
۱-٤-۸-۱ ریخت شناسی..... ۲۱

۱-٤-۸-۲ ترکیبات شیمیایی..... ۲۲

۱-٤-۸-۳ موارد استعمال..... ۲۲

۱-٤-۸-٤ موارد استعمال در پزشکی سنتی ۲۲

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- مواد مورد استفاده ۲٤

۲-۲- دستگاه های مورد استفاده..... ۲۵

۲-۳- تهیه نمونه گیاهی..... ۲٦

۲-٤- عصاره گیری ۲٦

۲-۵- غربالگری فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استراز ۲٦

۲-۵-۱- تین لایر کروماتوگرافی ۲۷

۲-۵-۲- تعیین مقدار زیستی مهارکنندگی AChE ۲۷

۲-٦-تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی ۲۸

۲-٦-۱- تست مهار DPPH..... ۲۸

۲-٦-۲- تست غربالگری انتی اکسیدان با روش بیرنگ کنندگی بتاکاروتن ۲۹

۲-۷- آزمون سیتوتوکسیتی به روش سمیت میگوی آب شور..... ۳۰

۲-۷-۱- مزایای استفاده از این ارگانیسم ۳۰

۲-۷-۲- تهیه کیست های A. salina..... ۳۱

۲-۷-۳- کشت آرتمیا..... ۳۱

۲-۷-٤- جداسازی ناپلی ها ۳۱

۲-۷-۵-انجام آزمایشات سیتوتوکسیک ۳۲

۲ -۸- آنالیز آماری نتایج ۳۲

فصل سوم : نتایج

نتایج ۳۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

بحث و نتیجه گیری ٥٤

منابع

منابع ٦٠

فصل اول : مقدمه

۱ – ۱- پیش گفتار و هدف

بیماری آلزایمر یک اختلال نورولوژیک دژنراتیو پیشرونده می باشد که منجر به ایجاداختلال در حافظه و رفتار می گردد. پیشروی این بیماری با علائمی مانند عدم توانایی در گفتار(aphasia) ، عدم توانایی در استفاده از ابزار(apraxia) و عدم توانایی در شناسایی و تشخیص محرکهای حسی (agnosia) همراه می باشد. نمای اصلی آلزایمر وجود پلاکهای بتاآمیلوئید خارج سلولی و ساختارهای پروتئینی رشته ای در داخل جسم سلولی نرونها می باشد(۱). این اختلال شایع بیشتر جمعیت سالمند را در بر می گیرد. در این بیماری علاوه برعلائم نوروپاتولوژیک و پلاکهای نرونی، از نظر نوروشیمیایی همراه با نقص در انتقال کولینرژیک است که بخصوص نرونهای کولینرژیک را در basal forebraine تحت تأثیر قرار می دهند. اطلاعات اپیدمیولوژیک افزایش قابل توجهی را در میزان شیوع بیماری در دو دهه اخیر نشان می دهد(۲). بیشتر استراتژیهای درمانی بر اساس تقویت سیستم کولینرژیک است و این فرضیه را تقویت می کند که مشکلات و نارسایی های حافظه در بیمارانی که از این اختلال رنج می برند ناشی از نقص و اشکال در عملکرد سیستم کولینرژیک در مغز می باشد. بنابراین یکی از روشهای درمان این بیماری ، افزایش سطح استیل کولین (Ach) در مغز با استفاده از مهارکننده های استیل کولین استراز(AcetylCholinesterase Inhibitors, AChI) می باشد(۳و٤). ساختمان شیمیایی فیزوستیگمین به عنوان الگوی تولید ریواستیگمین مورد استفاده قرار گرفته است که یک مهار کننده استیل کولین استراز (AcetylCholinEsterase, AChE)، بوده و مجوز مصرف را در کشور انگلیس برای درمان علامتی آلزایمر دریافت کرده است. ریواستیگمین AChE را در نواحی قشری و هیپوکامپ مغز که ارتباط با توانایی شناختی دارد مهار می کند. در آمریکا تعداد زیادی از این دسته ترکیبات برای درمان آلزایمر مورد تحقیق قرار گرفته اند، اما فقط ترکیباتی مانند tacrine, donepezil, rivastigmine, galanthamine توسط FDA برای درمان آلزایمر تایید شده اند (۵). این داروها در درمان اختلالات شناختی و از دست رفتن حافظه مورد استفاده قرار می گیرند، اما در عین حال دارای عوارض جانبی مانند اختلالات گوارشی و مشکلات زیست دستیابی هستند (٦)، لذا تحقیق در این زمینه جهت دستیابی به ترکیبات مؤثرتر و در عین حال کم عارضه تر مورد توجه می باشد.از سویی مشخص شده است استرسهای اکسیداتیو باعث تسریع روند آسیبهای مغزی می گردند. بافت مغز سرشار از اسیدهای چرب غیر اشباع به خصوص در

موقعیتها وتعدادکربن 22:6 , 20:4 می باشد که بسیار مستعد به پراکسیداسیون می باشد. بنابراین بنظر می رسد که فعالیت ترکیبات آنتی اکسیدان نیز نقش مؤثری در پیشگیری از روند آسیبهای بافت مغزی داشته باشد(۷ ، ۸ و۹).

هدف از این مطالعه ، انجام تحقیق در خصوص گیاهان دارویی می باشد که احتمالاً می توانند با مهار استیل کولین استراز و داشتن اثرات آنتی اکسیدان برای درمان علامتی آلزایمر و یا سایر اختلالات شناختی ناشی از اشکال در عملکرد سیستم کولینرژیک مؤثر باشند. انتخاب گیاهان مورد استفاده در این تحقیق بر مبانی مختلفی انجام شده است .تعدادی از این گیاهان در منابع سنتی و یا طب محلی ایران به عنوان تقویت حافظه توصیه شده اند، تعدادی به دلیل ماهیت ترکیبات شیمیایی که دارند انتخاب شده اند و درنهایت تعداد دیگری از این گیاهان به دلیل گزارشاتی که از گونه های دیگر آنها به عنوان مهارکننده استیل کولین استراز وجود دارد در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته اند. گیاهان مورد استفاده عبارتند از :

۱- دانه سویا *Glycine soja L.* از خانواده Fabaceae

۲- دانه کنجد *Sesamum indicum* L. از خانواده Pedaliaceae

۳- میوه رازیانه *Foeniculum vulgare* L. از خانواده Apiaceae

٤- ریشه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* L. از خانواده Fabaceae

٥- دانه شنبلیله *Trigonella foenum- graecum* L. از خانواده Fabaceae

٦- میوه زیتون *Olea europea* L. از خانواده Oleaceae

۷- مازو *Quercus sp.* از خانواده Fagaceae

۸- اندام هوایی مریم گلی لاله زاری *Salvia rhytida* Benth. از خانواده Lamiaceae

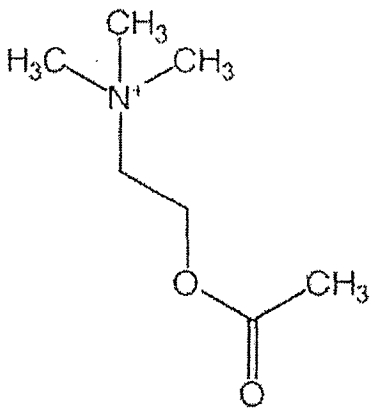
۱-۲- استیل کولین استراز:

نقش اصلی AChE ، خاتمه انتقال ایمپالس های عصبی در سیناپس های کولینرژیک است که با هیدرولیز سریع استیل کولین اتفاق می افتد. مهار AChE یکی از استراتژیهای درمانی در درمان آلزایمر،آتاکسیا ومیاستنی گراو می باشد (۱۰). مطالعات نشان می دهد که تعدادی از گیاهان و ترکیبات طبیعی قادر به

مهار AChE و در نتیجه درمان ضایعات ناشی از کمبود فعالیت سیستم کولینرژیک می باشند. گیاهان *Bacopa monniera* و *Ginkgo biloba* که در طب سنتی چین و هندوستان برای بهبود حافظه مورد استفاده قرار می گیرند دارای اثر مهاری روی AChE بوده اند (۱۱).یکی از داروهای کره ای که برای افزایش قدرت حافظه بکار می رود و حاوی دو عصاره گیاهی *Acorus calamus* و *Epimedium koreanum* بوده دارای اثر مهار کنندگی روی آنزیم AChE می باشد (۱۲). عصاره گیاه *Salvia officinalis* نیز دارای اثر مهارکنندگی قابل توجهی روی AChE می باشد(۱۳). گالانتامین یکی از آلکالوئیدهای آماریلیداسه می باشد که از گیاه *Galanthus nivalis* به دست می آید و یکی از مهارکننده های انتخابی AChE می باشد. و در درمان آلزایمر و سایر اختلالات عصبی بکار می رود (١٤و٥) . آلکالوئید Huperzin A که از دسته آلکالوئیدهای کینالوزیدین می باشد، از Huperzia sarrata که یک نوع خزه می باشد به دست می آید و در چین برای درمان آلزایمر و میاستنی گراو بکار می رود.این آلکالوئید یک مهار کننده قوی، انتخابی و برگشت پذیر AChE است و اختلالات شناختی را در رات های بالغ و پیر بهبود می بخشد. تعداد زیادی از اسانسها و ترکیبات مونوترپنه آنها بر روی AChE اثر مهاری نشان داده اند. برای مثال اسانس گیاهان *Rosmarinus officinalis* و *Melissa officinalis* دارای اثر مهاری روی AChE اریتروسیت ها بوده اند (١٥و١٦). تعداد زیادی از گیاهان هندوستان، پرتغال، تایلند و دانمارک از نظر اثر مهارکنندگی روی AChE بررسی شده اند (١٧و١٨و١٩و ٢٠).

۱-۳- استیل کولین

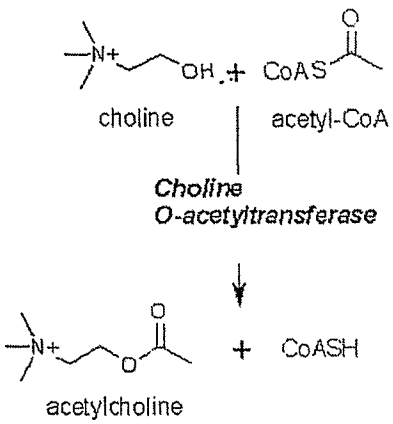
استیل کولین انتقال پیام های عصبی از خلال گانگلیون های اتونوم را در هر دو سیستم عصبی سمپاتیک و پاراسمپاتیک بر عهده دارد.علاوه براین،استیل کولین واسطه عصبی در بخش مرکزی غده آدرنال است.انتقال پیام از اعصاب پس عقده ای اتونوم به ارگان های هدف در سیستم اعصاب پاراسمپاتیک نیز با آزاد سازی استیل کولین صورت می گیرد.در سیستم عصبی سوماتیک نیز انتقال پیام در محل اتصال عصب به عضله کولینرژیک است.(٢١ و ٢٢)



شکل ۱-۱. ساختار شیمیایی استیل کولین

۱-۳-۱سنتز استیل کولین

کولین توسط سیستم ناقلی که مسوولیت هم انتقالی سدیم با کولین را عهده دار است از مایع خارج سلولی به سیتوپلاسم نورون کولینرژیک انتقال می یابد.در سیتوزول،کولین استیل ترانسفراز واکنش کولین با استیل کوا را که به منظور ایجاد استیل کولین انجام می شود کاتالیز می کند(۲۱ و ۲۲).



شکل ۱-۲. سنتز استیل کولین از کولین و استیل کوا

۱-۳-۲ ذخیره استیل کولین در وزیکول ها

استیل کولین با یک فرایند انتقال فعال که با جریان رو به خارج پروتون همراه است در وزیکول ها ذخیره میشود.

۱-۳-۳ آزادسازی استیل کولین

وقتی پتانسیل عملی که در نتیجه فعال شدن کانال های سدیم حساس به ولتاژ ایجاد میشود به یک پایانه عصبی برسد، کانال های کلسیمی حساس به ولتاژ باز می شوند و در نتیجه غلظت کلسیم داخل سلولی افزایش پیدا می کند.افزایش میزان کلسیم منجر به یکی شدن غشای وزیکول های سیناپسی با غشای سلولی و وارد شدن استیل کولین به داخل فضای سیناپسی می شود(۲۱ و۲۲)

۱-۳-٤ اتصال به گیرنده

استیل کولین آزاد شده ازوزیکول های سیناپسی در فضای سیناپسی منتشر می شود و به تمام گیرنده های پس سیناپسی موجود بر سلول های هدف یا گیرنده های پیش سیناپسی موجود بر غشای نورونی که استیل کولین آزاد کرده اند، متصل می گردد.اتصال به گیرنده منجر به پاسخ بیولوژیکی داخل سلولی، نظیر آغاز شدن یک ایمپالس عصبی در فیبر پس عقده ای یا فعال شدن آنزیم های اختصاصی در سلول های هدف می شود. (۲۱ و۲۲)

۱-۳-۵ تجزیه استیل کولین

استیل کولین که در فضای سیناپسی نقش یک مولکول پیام رسان را دارد و به فاصله اندکی پس از ترشح ازبین می رود؛ بدین صورت که استیل کولین استراز، آن را در شکاف سیناپسی به دو مولکول کولین و استات می شکند.

۱-۳-٦ بازگشت مجدد کولین به چرخه تولید استیل کولین

ممکن است کولین توسط یک سیستم هم انتقالی کولین با سدیم، که دارای میل ترکیبی بالایی است، دوباره وارد نورون گردد.آنگاه در آنجا استیله می شود و تا پتانسیل عمل بعدی ذخیره می گردد.(۲۱ و۲۲)