Archive of SID

مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.355260.3055

جلد ۳۷، شماره ۵، صفحه ۸۰۸-۷۹۵ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.5.6.5

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) و فعال‌سازی مجدد آنزیم استیل‌کولین‌استراز

معصومه فلاوند[۱]، فرانک هادی[۲]، فریده آذربانی[۳*] و سیف‌اله بهرامی‌کیا[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳*- نویسنده مسئول، دانشیار، بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

پست‌الکترونیک: Azarbani.f@lu.ac.ir / frazarban@gmail.com

۴- استادیار، بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰ | تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

چکیده

وظیفه آنزیم استیل‌کولین‌استراز هیدرولیز استیل‌کولین است. این آنزیم توسط ترکیب‌های ارگانوفسفره حشره‌کش‌ها و گازهای اعصاب به‌طور برگشت‌ناپذیر مهار می‌گردد. این مهار با تجمع استیل‌کولین در سیناپس‌های کولینرژیک، منجر به تحریک بیش از حد و بحران کولینرژیک در شکاف سیناپسی می‌گردد. هدف از این مطالعه فعال‌سازی مجدد آنزیم کولین‌استراز مهارشده توسط عصاره هیدروالکلی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) است. تأثیر عصاره هیدروالکلی گل داوودی بر میزان فعالیت و بازیابی فعالیت آنزیم کولین‌استراز به روش رنگ‌سنجی المن ارزیابی شد. منبع آنزیم در این تحقیق، استیل‌کولین‌استراز گلبول قرمز و بوتیریل‌کولین‌استراز پلاسما بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی، شناسایی گروه‌های عاملی و تعیین ترکیب‌های موجود در عصاره به‌ترتیب با استفاده از روش‌های DPPH، FTIR و GC/MS تعیین گردید. نتایج نشان داد، میزان فعال‌سازی مجدد آنزیم بوتیریل‌کولین‌استراز مهارشده (میزان از دست رفتن فعالیت آنزیم مهارشده = تا حدود ۰/۱۷ ± ۹۱/۹۵٪) در تیمار غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گل داوودی، ۰/۲۴ ± ۴۹/۱۶٪ بدست آمد. در این آزمایش، آنزیم استیل‌کولین‌استراز به‌وسیله پاراکسون تا حدود ۰/۴۵ ± ۳۰/۷۷٪ مهار شد، که عصاره گل داوودی در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این مهار را بازگرداند و باعث از بین رفتن سمّیت پاراکسون گردید. میزان IC_{50} در عصاره هیدروالکلی گل داوودی برای جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH برابر با ۳ ± ۴۸۳/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. از نتایج FTIR و GC/MS نیز چنین برمی‌آید که عصاره این گیاه سرشار از ترکیب‌های فنولی حاوی گروه‌های هیدروکسیل و کربونیل است که احتمالاً همین ترکیب‌ها نقش کلیدی را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه بر عهده دارند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی گل داوودی به‌دلیل دارا بودن ترکیب‌های فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی است و می‌تواند به‌عنوان پادزهر برای سموم ارگانوفسفره نظیر پاراکسون توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: ترکیب‌های ارگانوفسفره، آنزیم استیل‌کولین استراز، بازیابی فعالیت آنزیم، آنتی‌اکسیدان، FTIR.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سموم ارگانوفسفره به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان به‌عنوان حشره‌کش در کشاورزی بکار می‌روند. مسمومیت با این مواد یکی از مشکلات بهداشت جهانی است (Kwong, 2002) و سالانه ۳۰۰ هزار مرگ ناشی از خودکشی با این مواد گزارش شده است (Gunnell *et al*., 2007؛ Eddleston *et al*., 2002). این ترکیب‌ها با فسفریله کردن اسیدآمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم، پیوندی محکم و غیرقابل برگشت با آنزیم برقرار نموده و آن را مهار می‌نماید. ازاین‌رو سموم ارگانوفسفره سبب افزایش میزان استیل‌کولین و بروز مسمومیت ناشی از تجمع بیش از حد آن می‌شوند (Dutta & Meijer, 2003). استیل‌کولین نقش بسیار مهمی به‌عنوان یک ماده هدایت‌کننده در اعصاب کنترل‌کننده عضلات مخطط، صاف، عضله قلبی و غدد ایفاء می‌کند. استیل‌کولین، استراستیک‌اسید و کولین است (Oliver, 1972). استیل‌کولین‌استراز به‌عنوان یک آنزیم اصلی برای تجزیه استیل‌کولین است و دو نوع آن در خون وجود دارد. نوع اصلی، استیل‌کولین استراز (کولین استراز گلبول قرمز) به‌طور عمده در سیناپس شیمیایی و غشای گلبول قرمز یافت می‌شود و نوع دیگر بوتیریل‌کولین استراز (کولین استراز پلاسما) به‌طور عمده در پلاسمای خون وجود دارد (Naderi *et al*., 2015).

گیاهان به علت تنوع زیستی و ساختمان اجزاء، منابعی منحصر به فرد و تجدیدشدنی برای کشف داروهای جدید هستند. در کشورهای صنعتی حدود ۵۰٪ از داروهای تجویز شده از گیاهان مشتق شده است و طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، گیاهان برای حدود ۳/۴ میلیارد نفر به‌عنوان اولین منبع دارویی در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شوند (Benamar *et al*., 2010). طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به‌ویژه گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها روش درمان محسوب می‌شوند و در صنعت داروسازی به‌عنوان مواد اولیه مورد استفاده قرار می‌گرفتند. رویکرد جهانی برای استفاده از گیاهان دارویی و ترکیب‌های آنها در صنایع دارویی، ضرورت انجام تحقیقات پایه‌ای و کاربردی را در این زمینه ایجاد نموده است (Mukherjee *et al*., 2007).

استفاده از گیاهان و متابولیت‌های ثانویه آنها برای مهار آنزیم کولین استراز، به‌دلیل داشتن اثرهای جانبی کمتر و اثرهای بهتر، از مدتها قبل مورد توجه و مطالعه محققان مختلف قرار گرفته است. گل داوودی یا *Chrysanthemum morifolium* Ramat.، متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae)، دارای ۲۰۰ گونه گیاه یک‌ساله، چندساله، علفی و گلخانه‌ای است (Anderson *et al*., 1990). این گل یکی از مهمترین گیاهان زینتی با اهمیت اقتصادی بالاست و رتبه دوم بعد از گل رز را از لحاظ تولید و مصرف به خود اختصاص داده است (DaSilva, 2004). گل داوودی به‌عنوان منبعی از متابولیت‌های ثانویه ارزشمند مانند ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدها و دیگر ترکیب‌های فعال زیستی و اسانس‌های گیاهی مورد توجه داروشناسان قرار گرفته است (Lin & Harnly, 2010). عصاره گل داوودی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در درمان برخی بیماری‌ها ازجمله سرطان مؤثر گزارش شده است (Kim *et al*., 2009). هدف این تحقیق، بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گل داوودی بر روی فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز و بازیابی فعالیت آنزیم مهار شده به‌وسیله ترکیب‌های ارگانوفسفره (پاراکسون) است.

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره هیدروالکلی گل داوودی

گل‌های داوودی *Chrysanthemum morifolium* Ramat. در اواخر پاییز سال ۱۳۹۶ از باغ گیاه‌شناسی خرم‌آباد، استان لرستان جمع‌آوری شدند. گلها پس از شستشو و خشک شدن در سایه، توسط آسیاب پودر گردید. از روش خیس کردن برای انجام عصاره‌گیری استفاده شد. به‌طور خلاصه برای تهیه عصاره هیدروالکلی به ۱۰ گرم پودر گل داوودی، الکل ۸۰٪ اضافه و به‌مدت ۳ روز در تاریکی قرار داده شد؛ بعد از هر ۲۴ ساعت، عصاره با صافی

www.SID.ir

Archive of SID

پارچه‌ای جدا و بقیه تفاله دوباره در الکل ۸۰٪ خیس گردید. در آخر همه عصاره‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش تبخیر در خلأ، توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد. سپس عصاره در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و به‌صورت پودر درآمد. پودر حاصل را تا زمان استفاده در ظروف دربسته و غیرقابل نفوذ به هوا ریخته و در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گل داوودی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه توسط رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش Blois (۱۹۵۸) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH (۶×۱۰^{-۵} مولار) اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در اتاق تاریک، جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و درصد مهار رایکال‌های آزاد DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید. از اسید آسکوربیک (ویتامین C) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده و در پایان درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد} = \frac{A0 - A1}{A0} \times 100$$

در این فرمول A_0 و A_1 به‌ترتیب نمایانگر میزان جذب نوری محلول DPPH بدون حضور عصاره به‌عنوان کنترل منفی و در حضور عصاره می‌باشد. از اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

طیف‌سنجی تبدیل فوریل مادون قرمز FTIR

برای تشخیص نوع ترکیب‌های موجود در عصاره گل داوودی از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز FTIR استفاده شد. مقدار کمی از پودر عصاره را به نسبت ۱ به ۱۰۰ با برمید پتاسیم مخلوط و مقداری از آن را در قالب فلزی مخصوص ریخته و با دستگاه پرس هیدرولیک تحت فشار قرار داده شد تا به‌صورت قرص شفاف درآید. قرص حاصل بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر FTIR مدل شیمادزو 8400s در محدوده عدد موجی ۴۰۰۰-۵۰۰cm با حساسیت ۴ cm^{-1} بررسی شد.

جداسازی و شناسایی اجزاء عصاره‌ها

ترکیب‌های موجود در عصاره گل و برگ گیاه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Shimudzu 17A- GC (Japan Kyoto) مجهز به طیف‌سنج جرمی مدل MS-QP5050 شناسایی شد. جداسازی ترکیب‌ها در ستون موئین سیلیکای گداخته از نوع BP-X5 با قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، طول ۳۰ متر و ضخامت فیلم نازک ۰/۲۵ میکرون انجام گردید. از گاز هلیوم ذکرشده خالص با سرعت جریان داخلی ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان حامل استفاده شد. دمای اولیه ستون از ۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰ درجه بر دقیقه به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس با سرعت ۳ درجه بر دقیقه به ۲۲۰ و در پایان با سرعت ۳۰ درجه بر دقیقه به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید و ۲ دقیقه در این دما ثابت ماند. دمای محل تزریق و آشکارساز به‌ترتیب ۲۸۰ و ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، دمای محفظه یونیزاسیون ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و سیستم تزریق به‌صورت شکاف با نسبت ۱:۵۰ بود. اندیس بازداری کواتس (RI) برای تمام ترکیب‌ها اندازه‌گیری و با شاخص‌های بازداری استاندارد مقایسه شد. با استفاده از اطلاعات مربوط به ترکیب‌های موجود در کتابخانه 9.0 Wiley and NIST. 08 ترکیب‌های شیمیایی گیاه شناسایی گردید (Adams, 2007).

خون‌گیری و جداسازی گلبول قرمز و پلاسما

۴/۵ میلی‌لیتر خون انسان را به آرامی از کنار به لوله فالکون که حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۴٪ است

www.SID.ir

Archive of SID

ریخته و به آرامی مخلوط نموده (برای جلوگیری از انعقاد خون از سیترات سدیم استفاده شد)؛ سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰g سانتریفوژ و محلول حاصل به سه لایه تفکیک گردید. اولین لایه بی رنگ، پلاسما، لایه سفید رنگ دوم حاوی گلبول سفید و لایه سوم شامل گلبول‌های قرمز است. پلاسما را برای آزمون فعالیت آنزیم بوتیریل‌کولین استراز (BchE) برداشته و بعد به گلبول‌های قرمز به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز (AchE)، محلول PBS اضافه و به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰g سانتریفوژ نموده و محلول رویی دور ریخته شد. این عمل را سه بار تکرار نموده و در نهایت ۰/۵ میلی‌لیتر از گلبول‌های قرمز باقیمانده را با آب دوبار تقطیر به حجم ۵ میلی‌لیتر (حجم اولیه خون) رسانده، سپس با بافر فسفات، حجم آن به ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل در اپندورف‌های ۱ میلی‌لیتری در فریز ۲۰- نگهداری گردید.

تأثیر عصاره هیدروالکلی گل داوودی بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز

برای سنجش فعالیت آنزیم از روش رنگ‌سنجی المن (Ellman *et al*., 1961) بر پایه سنجش میزان تیوکولین آزاد شده از واکنش استیل‌کولین استراز با استیل تیوکولین یدید استفاده شد. میزان تیوکولین به‌دلیل واکنش با ۵، ۵- دی تیو- بیس- ۲- نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) کم می‌شود و آنیون زرد رنگ ۵- مرکاپتو- ۲- نیتروبنزوئیک اسید تولید می‌شود؛ به‌عبارت دیگر واکنش گروه سولفوریل تولید شده با معرف المن پایه سنجش بیوشیمیایی است. سرعت ایجاد رنگ به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز ۱ میلی‌لیتر گلبول قرمز فریز شده در هر بار آزمایش با بافر فسفات به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد (گلبول‌ها در نهایت ۶۰۰ برابر رقیق شده است). در ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با ۹۳۰ میکرولیتر بافرفسفات، به اضافه ۳۴ میکرولیتر DTNB ۰/۳ میلی‌مولار که در نهایت ۳۶ میکرولیتر ATCI ۱ میلی‌مولار به آن اضافه نموده در ناحیه ۴۱۲ نانومتر کالیبره گردید. به‌عنوان کنترل منفی ۹۳/۲ میکرولیتر گلبول قرمز به اضافه ۸۳۶/۸ میکرولیتر بافر فسفات، به اضافه ۳۴ میکرولیتر DTNB را در میکروتیوپ آزمون ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و در نهایت ۳۶ میکرولیتر ATCI به محلول اضافه و بلافاصله جذب آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر در بازه زمانی ۳ دقیقه (۳۰ ثانیه یک‌بار) قرائت گردید. در آخر برای سنجش فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره طبق محلول کنترل منفی به جای ۸۳۶/۸ میکرولیتر بافر فسفات، ۷۶۱/۸ میکرولیتر بافر اضافه و به‌محلول ۷۵ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره افزوده شد. ۱۰ دقیقه میکروتیوپ آزمون را در دمای اتاق قرار داده، در نهایت ۳۶ میکرولیتر ATCI به میکروتیوپ آزمون افزوده و بلافاصله جذب آن در ناحیه ۴۱۲ نانومتر در بازه زمانی ۳ دقیقه هر ۳۰ ثانیه یک‌بار قرائت شد. برای سنجش میزان فعال‌سازی دوباره آنزیم استیل‌کولین استراز مهار شده با پاراکسون، در ابتدا فعالیت آنزیم سالم، سپس فعالیت آنزیم مهار شده با پاراکسون و در نهایت فعالیت آنزیم بعد از ترکیب با عصاره اندازه‌گیری شد. در مرحله اول حدود ۱۸/۶۴ میکرولیتر از گلبول قرمز را درون یک خانه از میکروپلیت ریخته و به آن ۱۶۴ میکرولیتر بافر فسفات، ۷ میکرولیتر DTNB ۰/۳ میلی‌مولار اضافه، آنگاه ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد ۷ میکرولیتر استیل‌تیوکولین‌یداید ۱ میلی‌مولار به آن اضافه شد. جذب آن بعد از سه دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر قرائت گردید. در آزمایش بعد برای مهار آنزیم، قبل از اضافه کردن ATCI حدود ۴ میکرولیتر پاراکسون ۱۰ میلی‌مولار اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس استیل تیوکولین یداید اضافه و جذب آنزیم مهار شده بعد از ۳ دقیقه در ناحیه ۴۱۲ نانومتر قرائت گردید. در آخر برای سنجش فعالیت آنزیم مهار شده در حضور عصاره، تمام مراحل آزمایش دوم انجام شد ولی قبل از اضافه کردن سوبسترا ۱۵ میکرولیتر عصاره را به محلول اضافه می‌کنیم و ۱۰ دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID

در دمای اتاق می‌گذاریم. در نهایت به آن ۷ میکرولیتر ATCI افزوده و جذب بعد از ۳ دقیقه در ناحیه ۴۱۲ نانومتر قرائت گردید.

درصد قدرت فعال‌سازی عصاره‌ها براساس فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$$R = (1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i}) \times 100 \quad \text{(درصد فعال سازی)}$$

a_r فعالیت آنزیم سالم، فعالیت آنزیم فعال شده در حضور عصاره و پاراکسون، a_i فعالیت آنزیم مهار شده با پاراکسون

تأثیر عصاره هیدروالکلی گل داوودی بر فعالیت آنزیم بوتیریل‌کولین استراز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بوتیریل‌کولین استراز پلاسما به روش ذکرشده برای سنجش فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز انجام شد. ولی از ۶/۴ میکرولیتر پلاسما که منبع آنزیم بوتیریل‌کولین استراز است به جای ۹۳/۲ میکرولیترگلبول قرمز استفاده گردید. برای سنجش میزان فعال‌سازی دوباره آنزیم بوتیریل‌کولین استراز مهار شده با پاراکسون، فعالیت آنزیم در سه نوبت مشابه سنجش فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز اندازه‌گیری شد. در مرحله اول حدود ۶/۴ میکرولیتر پلاسما را به ۹۲۳/۶ میکرولیتر بافر فسفات، ۳۴ میکرولیتر DTNB اضافه و محلول ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۳۶ میکرولیتر ATCI به آن اضافه و جذب آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر بعد از ۳ دقیقه قرائت گردید. در آزمایش بعد برای مهار آنزیم، قبل از اضافه کردن ATCI حدود ۱۰ میکرولیتر پاراکسون ۳۰ میلی‌مولار اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس ATCI اضافه شد. جذب آنزیم مهار شده بعد از ۳ دقیقه در ناحیه ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. در آخر برای سنجش فعالیت آنزیم مهار شده در حضور عصاره، تمام مراحل آزمایش دوم را انجام داده ولی قبل از اضافه کردن سوبسترا ۷۵ میکرولیتر عصاره به محلول اضافه و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق می‌گذاریم. در نهایت به آن ۳۶ میکرولیتر ATCI اضافه و جذب بعد از ۳ دقیقه در ناحیه ۴۱۲ نانومتر قرائت گردید. درصد قدرت فعال‌سازی عصاره‌ها براساس فرمول درصد فعال‌سازی گفته شده در قسمت آنزیم استیل‌کولین استراز گلبول قرمز محاسبه شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-16 با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تکمیلی Duncan استفاده و سطح معنی‌داری با احتمال $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

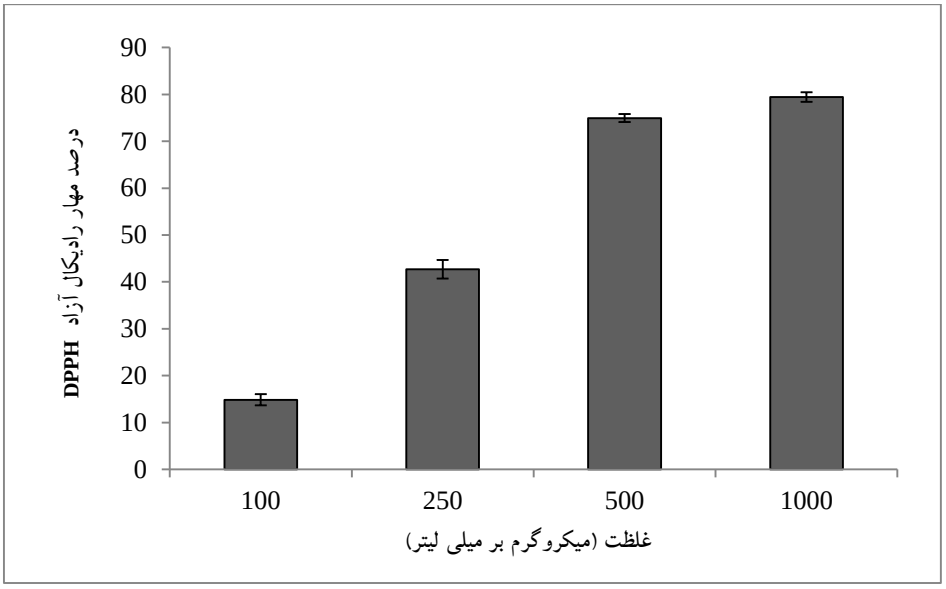
نتایج

در این تحقیق تغییر رنگ و جذب محلول الکلی بنفش رنگ DPPH در حضور عصاره هیدروالکلی گل داوودی ارزیابی و مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت تأثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد دارد و با افزایش غلظت میزان مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. میزان IC_{50} در عصاره هیدروالکلی گل داوودی ۳ ± ۴۸۳/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان IC_{50} ویتامین C به‌عنوان کنترل مثبت ۹/۸۰ ± ۵۸/۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. در شکل ۱ درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره گل داوودی آورده شده است.

همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، پیک‌های اصلی عصاره گل داوودی در محدوده cm^{-1} ۳۳۴۶، ۲۹۲۸، ۱۶۰۹ و ۱۰۶۳ هستند که با ارتعاش کششی O-H الکل‌ها و فنل‌ها یا N-H آمین‌ها، ارتعاش کششی قوی C-C ترکیب‌های آروماتیک و ارتعاش کششی C=O گروه کربونیل مطابقت دارند. از نتایج چنین برمی‌آید که احتمالاً ترکیب‌های فنولیک که حاوی گروه‌های هیدروکسیل و کربونیل هستند در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه نقش داشته باشند.

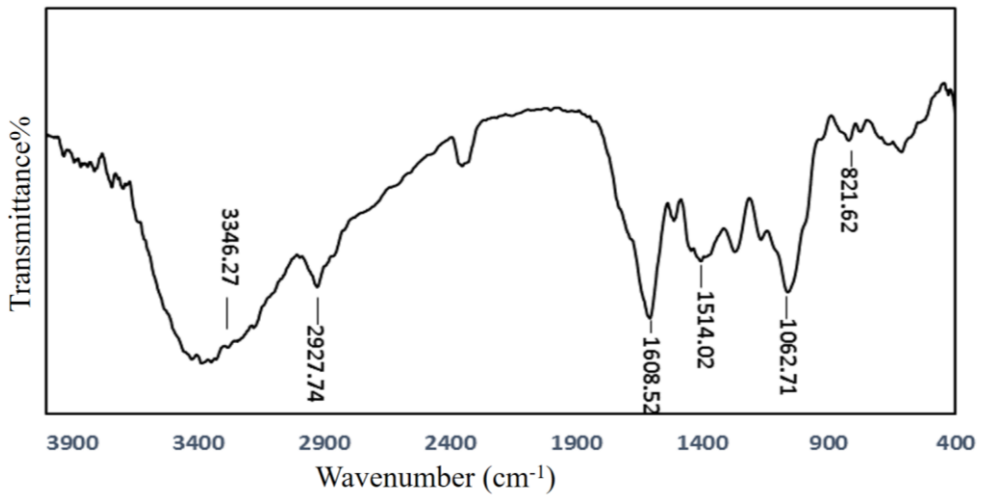
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره گل داوودی

با افزایش غلظت عصاره درصد مهار رادیکال آزاد افزایش یافت.



شکل ۲- طیف FTIR عصاره گل داوودی

برای شناسایی اجزای موجود در عصاره، نمونه‌ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی GC/MS تزریق گردید و مؤلفه‌هایی مانند شاخص بازداری (RI) محاسبه و طیف‌های جرمی ترکیب‌های موجود در عصاره بررسی و تمامی این مؤلفه‌ها با مشخصات ترکیب‌های استاندارد مقایسه گردید و در نهایت ترکیب‌های عصاره شناسایی شد. اجزای شناسایی شده و شاخص بازداری به‌ترتیب در جدول ۱ ذکر شده است. ۳۲ ترکیب از عصاره هیدروالکلی گل داوودی (*Chrysanthemum*) که ۹۲/۰۶٪ ترکیب‌های کل عصاره را تشکیل می‌دهند، شناسایی گردید. ترکیب‌های عمده آن شامل ۳،۵- دی هیدروکسی- ۶- متیل- ۲، ۳ دی هیدرو- ۴- هیدروژن- پیرانون (۲۴/۳۲٪)، ۲- متیل کروتونئیک

www.SID.ir

Archive of SID

اسید (۸٪/۹۲)، ۱- پیرولیدین اتانوآمین (۸٪/۵۶)، تری دکانول (۷٪/۳۰) و تیمول (۵٪/۴۱) می‌باشند. از مجموع ۹۲/۰۶٪ ترکیب‌های شناسایی شده ۵/۳۴٪ ترکیب‌های کتونی، ۱۴/۶۶٪ ترکیب‌های ترپنی (۹/۳۵٪ مونوترپن اکسیژن‌دار، ۲/۵۸٪ مونوترپن هیدروکربنه و ۲/۷۳٪ سزکوئی‌ترپن اکسیژن‌دار) ۷/۹۹٪ ترکیب‌های الکلی، ۴/۱۸٪ ترکیب‌های استری، ۳۵/۳۳٪ ترکیب‌های فنلی، ۱۰/۰۴٪ ترکیب‌های نیتروژن‌دار و ۱۴/۵۲٪ ترکیب‌های دیگر هستند.

جدول ۱- ترکیب‌های تشکیل‌دهنده عصاره هیدروالکلی *Chrysanthemum*

ردیف	ترکیب	شاخص بازداری (**RI**)	درصد (٪)
۱	2-acetoxyethanol	۸۱۷	۳/۱
۲	methylpyrazine	۸۳۷	۰/۴
۳	3-furaldehyde	۸۴۵	۰/۵
۴	2-furanmethanol	۸۸۲	۴/۲
۵	acetoxyacetone	۸۸۸	۲/۹
۶	(e)-2-methylcrotonic acid	۹۱۲	۸/۹
۷	2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one	۹۴۸	۱/۸
۸	4-propylheptane	۹۶۳	½
۹	5-methyl furfural	۹۷۲	۱/۱
۱۰	phenol	۹۹۶	۱/۲
۱۱	p-cymene	۱۰۲۷	۰/۵
۱۲	1-pyrrolidineethanamine	۱۰۳۳	۸/۶
۱۳	3-methylcyclopentane-1,2- dione	۱۰۴۰	۰/۷
۱۴	alpha-amino-gammabutyrolactone	۱۰۷۱	۳/۴
۱۵	nitrocyclohexane	۱۰۸۰	۰/۵
۱۶	2,3-dihydro-5-hydroxy-6- methyl-4H-pyran-4-one	۱۱۰۳	۰/۹
۱۷	4-hydroxydihydro-2(3h)- furanone	۱۱۲۰	۲/۸
۱۸	1,3,4-trimethyl-3- cyclohexenyl-1-carboxaldehyde	۱۱۴۳	۱/۶
۱۹	3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3- dihydro-4h-pyran-4-one	۱۱۶۵	۲۴/۳
۲۰	acetic acid, octyl ester	۱۱۸۸	۰/۸
۲۱	2-methyl-2-decanol	۱۲۰۷	۰/۳
۲۲	cuminic aldehyde	۱۲۲۷	۰/۶
۲۳	thymol	۱۳۰۰	۵/۴
۲۴	piperitenone	۱۳۵۵	۱/۷

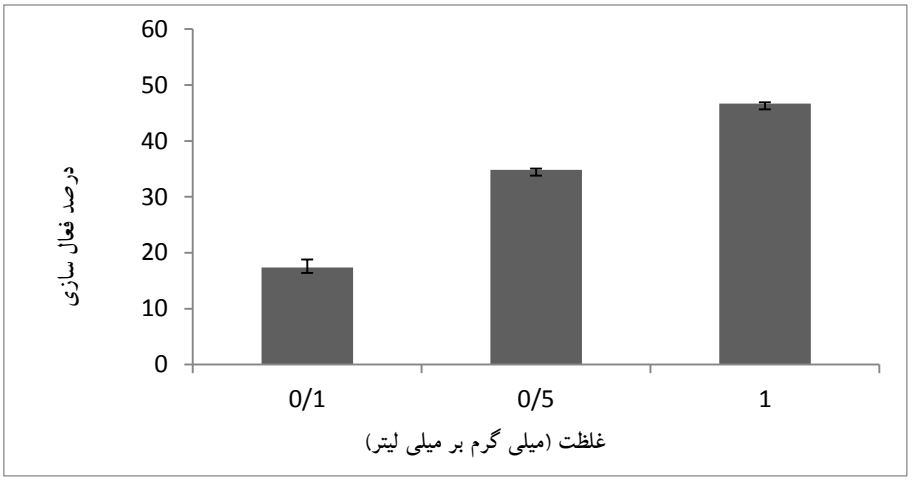
www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۱- ...

ردیف	ترکیب	شاخص بازداری (RI)	درصد (٪)
۲۵	tetradecane	۱۳۹۰	۰/۹
۲۶	pentadecane	۱۴۹۰	۰/۶
۲۷	tridecanol	۱۵۳۲	۷/۳
۲۸	nerolidola	۱۵۵۶	۰/۷
۲۹	junipercamphor	۱۶۷۳	۰/۵
۳۰	2,6,10- trimethylpentadecane	۱۶۸۹	۱/۳
۳۱	lidocaine	۱۸۹۹	۰/۶
۳۲	palmitic acid	۱۹۶۴	۱/۶

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گل داوودی بر فعالیت آنزیم بوتیریل‌کولین استراز در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد، با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* .Ramat) فعالیت آنزیم بیشتر می‌شود.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گل داوودی بر فعالیت آنزیم BchE

با افزایش غلظت عصاره درصد فعال‌سازی آنزیم BchE بیشتر شد.

درصد فعال‌سازی آنزیم با افزایش غلظت عصاره بیشتر شد. در زمان مهار آنزیم بوتیریل‌کولین استراز با پاراکسون بدیهی است که بالاترین فعالیت مربوط به فعالیت آنزیم پلاسماست که با اضافه شدن مهارکننده فعالیت آنزیم تقریباً متوقف (فعالیت آنزیم ۰/۱۷±۹۱/۹۵٪ مهار شد) شد. ارزیابی میزان فعال‌سازی دوباره آنزیم توسط غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر) عصاره گل داوودی نشان داد که فعالیت آنزیم در حضور عصاره گل داوودی افزایش یافته و با افزایش غلظت رابطه مستقیم دارد. در جدول ۲ روند افزایش فعالیت دوباره آنزیم تحت تأثیر

www.SID.ir

Archive of SID

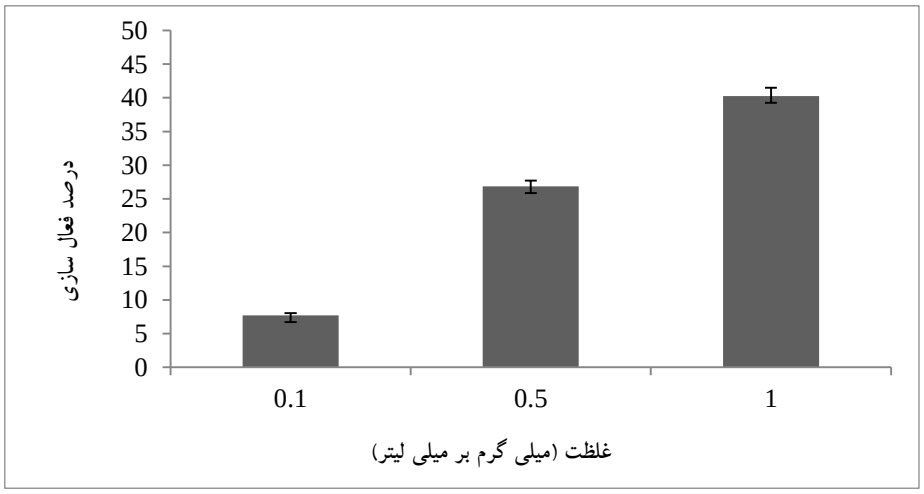
افزایش غلظت عصاره به‌خوبی نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تکمیلی Duncan گل داوودی برای آنزیم سالم، آنزیم مهار شده و آنزیم (مهار شده) تحت تأثیر غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گل داوودی با احتمال $P<0.05$ تفاوت معنی‌دار را نشان داد.

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گل داوودی بر فعالیت آنزیم BchE مهار شده با پاراکسون

غلظت عصاره (mg/ml)	۰/۱	۰/۵	۱
Reactivation%	۶/۹۰d ± ۰/۵۷	۲۹/۴۶c ± ۰/۸۲	۴۹/۱۶b ± ۰/۲۴
مهار آنزیم سالم به‌وسیله پاراکسون (٪)		۹۱/۹۵e ± ۰/۱۷	

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین و با سه تکرار نشان داده شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال $P<0.05$ است.

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گل داوودی بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در شکل ۴ آورده شده است. با اضافه کردن عصاره هیدروالکلی گل داوودی فعالیت آنزیم بیشتر می‌شود که این مسئله نشان‌دهنده رابطه مستقیم فعالیت آنزیم با غلظت عصاره است.



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گل داوودی بر فعالیت آنزیم AchE

با افزایش غلظت عصاره درصد فعال‌سازی آنزیم AchE بیشتر شد.

در زمان مهار آنزیم توسط پاراکسون، همان طور که مشاهده می‌شود بالاترین فعالیت بعد از ۳ دقیقه مربوط به فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز بدون حضور مهارکننده (پاراکسون) است که فعالیت آنزیم را در گلبول قرمز نشان می‌دهد. بعد از اضافه کردن پاراکسون فعالیت آنزیم ۳۰/۷۷±۰/۴۵ درصد کاهش یافت. فعالیت آنزیم پس از اضافه کردن عصاره گل داوودی در غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به دوز افزایش یافت (جدول ۳). نتایج حاصل از تحلیل آماری با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تکمیلی

www.SID.ir

Archive of SID

Duncan گل داوودی برای آنزیم سالم، آنزیم مهارشده و آنزیم (مهارشده) تحت تأثیر غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گل داوودی با احتمال P<0.05 تفاوت معنی‌دار را نشان داد.

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گل داوودی بر فعالیت آنزیم AchE مهار شده با پاراکسون

غلظت عصاره (mg/ml)	۰/۱	۰/۵	۱
Reactivation%	۲۵d ± ۴/۸۲	۸۳/۹۳c ± ۶/۶۳	۱۰۰a
مهار آنزیم سالم بوسیله پاراکسون (٪)	۳۰/۷۷e ± ۰/۴۵		

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین و با سه تکرار نشان داده شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال P< 0/05 است.

بحث

ترکیب‌های ارگانوفسفره در سطح گسترده در سراسر جهان به‌عنوان حشره‌کش در کشاورزی بکار می‌روند. ازاین‌رو مسمومیت با این مواد یکی از مشکلات بهداشت جهانی است (Kwong, 2002). ارگانوفسفره‌ها با فسفریله کردن اسیدآمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم، پیوندی محکم و غیرقابل برگشت با آنزیم ایجاد کرده و آن را مهار و با افزایش سطح استیل‌کولین موجب مسمومیت ناشی از تجمع بیش از حد استیل کولین می‌شوند (Dutta *et al*., 2004). همچنین این ترکیب‌ها در چندین حمله شیمیایی نیروهای عراقی طی جنگ ایران و عراق استفاده شده است. به‌دلیل دسترسی آسان و سمّیت بالای این ترکیب‌ها، میزان بروز مسمومیت‌های تصادفی و خودکشی ناشی از مصرف آنها در ایران و جهان بالاست (Abdollahi *et al*., 2004). محققان در مطالعه‌ای تأثیر مصرف روی خوراکی بر میزان آسیب کبدی ناشی از کلرودیفوس در رت را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که روی سبب حفاظت هپاتوسیت‌های کبدی در برابر مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها می‌شود (Goel & Dhawan, 2001). مواد آنتی‌اکسیدانی زیادی سمّیت اکسیدانی ناشی از ارگانوفسفره‌ها به‌ویژه دیازینون را تعدیل می‌نمایند (Uzun & Kalender, 2011). گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) به‌عنوان یک گیاه دارویی با خواص التیام‌بخشی قوی در طب سنتی چین جایگاه ویژه‌ای دارد و در درمان بیماری‌های چشم، سردرد، سرماخوردگی و غیره بکار می‌رود (Shao *et al*., 2010). این گل به‌عنوان منبعی از متابولیت‌های ثانویه ارزشمند مانند ترکیب‌های فنلی، فلاونوئید و دیگر ترکیب‌های فعال از لحاظ زیستی و اسانس گیاهی مورد توجه داروشناسان است (Lin & Harnly, 2010). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گل داوودی در درمان برخی بیماری‌ها ازجمله سرطان مؤثر است (Kim *et al*., 2009). Lin و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر حفاظت‌کنندگی فلاون‌های کل عصاره گل داوودی را به سبب فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بر جلوگیری از آسیب مغزی ناشی از کم‌خونی در موش تأیید نمودند. همچنین Nisreen (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای وجود مقادیر معنی‌داری از فلاونوئیدها در عصاره متانولی برگ گیاه داوودی و نقش آنها را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قابلیت دارویی این گیاه مورد تأیید قرار داد. در این پژوهش میزان فعال‌سازی دوباره آنزیم مهارشده با پاراکسون تحت تأثیر عصاره هیدروالکلی گل داوودی در سه غلظت مختلف سنجیده شد. میزان فعال‌سازی دوباره آنزیم بوتیریل‌کولین استراز مهار شده (آنزیم تا حدود ۹۱/۹۵±۰/۱۷ فعالیت خود را از دست داد) تحت تأثیر غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گل داوودی ۴۹/۱۶±۰/۲۴٪ ملاحظه شد. در این آزمایش ابتدا آنزیم استیل کولین استراز گلبول قرمز به‌وسیله پاراکسون ۳۰/۷۷±۰/۴۵٪ مهار شد. مهار آنزیم به علت تشکیل پیوند

www.SID.ir

Archive of SID

کووالانسی در جایگاه فعال آنزیم استیل‌کولین استراز با گروه هیدروکسیل اسیدآمینه سرین رخ می‌دهد. پاراکسون همچنین با پروتون‌گذاری در نزدیکی اتم نیتروژن واقع در باقیمانده اسیدآمینه هیستیدین در جایگاه فعال از عملکرد آنزیم جلوگیری می‌کند. عصاره هیدروالکلی گل داوودی در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این مهار را کاملاً بازگرداند و باعث از بین رفتن سمّیت پاراکسون گردید. نتایج حکایت از توانایی بسیار بالای گل داوودی در بازگرداندن اثرهای مهاری پاراکسون دارد. با توجه به بیشتر بودن ترکیب‌های فنلی در عصاره گل داوودی می‌توان گفت عامل فعال‌کننده دوباره آنزیم مهار شده ممکن است ترکیب‌های فنلی باشد. ترکیب‌های فنلی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتوسیانین و ... هستند. این ترکیب‌ها معمولاً در میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، آجیل‌ها، دانه‌ها، ریشه و در سایر قسمت‌های گیاه دیده می‌شوند. این مواد منافع قابل توجهی در زمینه صنایع غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرهای مطلوب زیستی ازجمله خواص آنتی‌اکسیدان دارند (Lakshmanashetty *et al*., 2010). در حال حاضر هیچ‌گونه تحقیقی مبنی بر تأثیر عصاره گل داوودی بر روی آنزیم‌های‌کولین استراز مهار شده با پاراکسون انجام نشده است. در تحقیق انجام شده توسط Sargazi و همکاران (۲۰۱۵) بر روی اثر حفاظتی ویتامین E بر میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز سرمی و اریتروسیت خون رت بالغ، در زمان مسمومیت ناشی از دیازینون انجام شد و مشاهده شد که ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان باعث بهبود مهار آنزیم استیل کولین استراز می‌شود و سمّیت دیازینون را کاهش می‌دهد. Shadnia و همکاران (2007) اثر حفاظتی N- استیل سیستئین و آلفا-توکوفرول را در کاهش اکسیداتیو القاء شده توسط دیازینون خوراکی گزارش نمودند. همچنین در مطالعه دیگری، اثر حفاظتی N- استیل سیستئین در کاهش استرس اکسیداتیو القاء شده توسط ارگانوفسفره‌ها در بافت‌های مختلف حیوانات مشاهده شده است (Izadi *et al*., 2014). در تحقیق Thakur و همکاران (۲۰۰۵) که بر روی ۳۰۰ گونه گیاهی انجام شد ۷۵٪ از این گونه‌ها دارای خاصیت مهارکنندگی و ۳۵٪ دارای خاصیت فعال‌کنندگی بودند. یکی از فعال‌کننده‌ها برگ گندم با رقم T۱۲۳ بود که قادر به بازگردانی فعالیت آنزیم مهارشده با سموم ارگانوفسفره بود. در سال ۲۰۰۹ گروه تحقیقاتی که بر روی ۱۸ ترکیب سینتتیک در سطح *in vitro* انجام دادند، اعلام نمودند که در مقایسه با اکسیم‌های تجاری Obidoxime و Trimedoxime چهار نوع ترکیب با نام‌های K027، K075، K203 و K048 توانایی فعال‌کنندگی دوباره آنزیم استیل کولین استراز مهارشده با پاراکسون را در غلظت ۱۰۰ میکرومولار (۱۰ برابر غلظت اکسیم‌های تجاری نام برده شده در بالا) دارند (Mosilova *et al*., 2009). همچنین استفاده همزمان گالیک اسید و آتروپین در فعال‌سازی دوباره آنزیم کولین استراز در سمّیت ناشی از دیازینون، منجر به تعدیل و بهبود سمّیت و کاهش مهار فعالیت آنزیم‌های کولین استرازی شد (Motafeghi *et al*., 2020). در مطالعه‌ای دیگر توانایی آنتی‌اکسیدانی اسیدگالیک در متوقف کردن مرحله انتشار در فرایند اکسایش، به معنای واکنش سریعتر آن با رادیکال‌های آزاد نسبت به اسیدهای چرب غیر اشباع است؛ به‌نحوی که گزارش شد اسیدگالیک از توانایی بیشتری در مورد مهار رادیکال آزاد برخوردار است (Farahmandfar & Asnaashari, 2018). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تجویز پاراکسون به‌صورت داخل صفاقی در بافت‌های مختلف موش صحرایی بعد از ۴ و ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون s- ترانسفراز و کاهش میزان گلوتاتیون و افزایش پراکسیداسیون لیپید و در نهایت استرس اکسیداتیو می‌شود (Malmir & Jafari, 2014 ؛Ghani *et al*., 2008). مطالعه Jafari و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که تجویز دیازینون و پاراکسون سبب کاهش فعالیت آنزیم کولین استراز می‌گردد (Jafari *et al*., 2012a). در مطالعه دیگری تجویز دیازینون و پاراکسون موجب کاهش گلوتاتیون در بافت‌های مختلف شد (Khazaie *et al*., 2015؛ Jafari *et al*., 2012b).

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که عصاره هیدروالکلی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا بوده و می‌تواند سبب کاهش اثرهای استرس اکسیداتیو ناشی از ترکیب‌های ارگانوفسفره شود. همچنین موجب فعال‌سازی دوباره آنزیم استیل کولین استراز مهار شده به‌وسیله پاراکسون می‌گردد.

سپاسگزاری

از دست‌اندرکاران دانشگاه لرستان که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S. and Shadnia, S., 2004. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in *Saliva* and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 137(1): 29-34.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. Allured Publ., Carol Stream, IL, 804p.
- Anderson, N.O., Ascher, P.D., Widmer, R.E. and Luby, J.J., 1990. Rapid generation cycling of *Chrysanthemum* using laboratory seed development and embryo rescue techniques. Journal of American Society of Horticultural Sciences, 115(2): 329-336.
- Benamar, H., Rached, W., Derdour, A. and Marouf, A., 2010. Screening of algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. Journal of Biological Sciences, 10: 1-9.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181(4617): 1199-1200.
- DaSilva, J.A., 2004. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 79(1): 1-18.
- Dutta, H.M. and Meijer, H.J.M., 2003. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, Lepomis macrochirus: a microscopic analysis. Environmental Pollution, 125(3): 355-360.
- Eddleston, M., Szinicz, L., Eyer, P. and Buckley, N., 2002. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. Qjm: Monthly journal of the Association of Physicians, 95(5): 275-283.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V. and Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7(2): 88-95.
- Farahmandfar, R. and Asnaashari, M., 2018. Assessment of antioxidant activity and kinetic oxidative parameters of syringic acid and gallic acid insunflower oil. Journal of Food Science and Technology, 15(83): 1-14.
- Ghani, E., Mohammadi, M., Jafari, M., Khoshbaten, A. and Asgari, A., 2008. Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon. Kowsar Medical Journal, 13(1): 1-8.
- Goel, A. and Dhawan, D.K., 2001. Zinc supplementation prevents liver injury in chlorpyrifos-treated rats. Biological trace element research, 82(1-3): 185.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R. and Konradsen, F., 2007. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. BMC Public Health, 7(1): 1-15.
- Izadi, F., Jafari, M., Bahdoran, H., Asgari, A., Divsalar, A. and Salehi, M., 2014. The role of N-acetyl cysteine on reduction of diazinon-induced oxidative stress in rat liver and kidney. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 12(11): 895-906.
- Jafari, M., Salehi, M., Ahmadi, S., Asgari, A., Abasnezhad, M. and Hajigholamali, M., 2012a. The role of oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats. Toxicology Mechanisms and Methods, 22(8): 638-647.
- Jafari, M., Salehi, M., Asgari, A., Ahmadi, S., Abbasnezhad, M., Hajihoosani, R. and Hajigholamali, M., 2012b. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. Environmental Toxicology and Pharmacology, 34(3): 876-887.
- Khazaie, S., Jafari, M., Heydari, J. and Salem, F., 2015. Investigating response of spleen and erythrocytes antioxidant defense system on the effects of n-acetyl cysteine against Paraoxon toxicity in rat. The Journal of Urmia University of Medical Sciences, 26(3): 176-184.
- Kim, I.S., Koppula, S., Park, P.J., Kim, E.H., Kim, C.G., Choi, W.S. and Choi, D.K., 2009. *Chrysanthemum morifolium* Ramat (CM) extract protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP^+-induced cytotoxicity. Journal of Ethnopharmacology, 126(3): 447-454.
- Kwong, T.C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. Therapeutic Drug Monitoring, 24(1): 144-149.
- Lakshmanashetty, R.H., Nagaraj, V.B., Hiremath, M.G. and Kumar, V., 2010. In vitro antioxidant activity of *Vitex negundo* L. leaf extracts. Chiang

www.SID.ir

Archive of SID

Chrysanthemum as antioxidants and therapeutic agents. International Human Research Journal, online at www.ihrj.org, ISSN, 2347-7067.
- Oliver, C., 1972. Pharmacology of the Peripheral Autonomic Nervous System. Year book Medicalpublishers, 132p.
- Sargazi, Z., Nikravesh, M.R., Jalali, M., Sadeghnia, H.R. and Rahimi Anbarkeh, F., 2015. The protective effect of vitamin E on serum and erythrocytes cholinesterase levels in poisoning of diazinon, in adult female rats. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 7(4): 801-812.
- Shadnia, S., Dasgar, M., Taghikhani, S., Mohammadirad, A., Khorasani, R. and Abdollahi, M., 2007. Protective effects of α-tocopherol and n-acetyl-cysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. Toxicology Mechanisms and Methods, 17(2): 109-115.
- Shao, Q.S., Guo, Q.S., Deng, Y.M. and Guo, H.P., 2010. A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. Biochemical Systematics and Ecology, 38(6): 1160-1169.
- Thakur, S.S., Garcia, G.E., Leader, H.N., Moorad-Doctor, D., Gupta, R., Gordon, R.K. and Doctor, B.P., 2005. Detoxification of Chemical Warfare Agents by the Plant Cholinergic System. Walter reed army inst of Research Silver spring, 166p.
- Uzun, F.G. and Kalender, Y., 2011. Protective effect of vitamins c and e on malathion-induced nephrotoxicity in male rats. Gazi University Journal of Science, 24(2): 193-201.
Mai Journal of Science, 37(3): 489-497.
- Lin, G.H., Lin, L., Liang, H.W., Ma, X., Wang, J.Y., Wu, L.P. and Xia, Q., 2010. Antioxidant action of a *Chrysanthemum morifolium* extract protects rat brain against ischemia and reperfusion injury. Journal of Medicinal Food, 13(2): 306-311.
- Lin, L.Z. and Harnly, J.M., 2010. Identification of the phenolic components of *Chrysanthemum* flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). Food Chemistry, 120(1): 319-326.
- Malmir, S. and Jafari, M., 2014. Comparison of the effects of diazinon and paraoxon on the antioxidant system of rat lung. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 19(2): 124-133.
- Mosilova, L., Kuca, K., Jung, Y.S. and Jun, D., 2009. In vitro oxime- inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Clinical Toxicology, 47(6): 545-550.
- Motafeghi, F.S., Ebrahimzadeh, M.A., Karbalaei, P. and Mohammadi, H., 2020. Effect of gallic acid on reactivation of acetylcholinesterase and batyrylcholinesterase inhibited by diazinon in vitro and in vivo. Journal of Mazandaran University Medical Science, 30(189): 1-13.
- Mukherjee, P., Kumar, V., Mal, M. and Houghton, P., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine, 14: 289-300.
- Naderi, G., Hajhossini, R., Abasi, M. and Mehrabian, A., 2015. Inhibitory effects of ethanolic extract of Cyperus rotandus on acetylcholinesrerase activity. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 20(5): 102-109.
- Nisreen, H., 2015. Flavonoid in flower and leaf of

www.SID.ir

Archive of SID

Antioxidant activity of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. hydroalcoholic extract and reactivation of acetylcholinesterase enzyme

M. Falavand[1], F. Hadi[2], F. Azarbani[3*] and S. Bahramikia[2]

1- M.Sc. student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3*- Corresponding authors, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
E-mail: frazarban@gmail.com; Azarbani.f@lu.ac.ir

Received: September 2021 Revised: October 2021 Accepted: October 2021

Abstract

The acetylcholinesterase (AChE) function is to hydrolyze the acetylcholine (ACh). This enzyme is irreversibly inhibited by the organophosphate compounds of insecticides and nerve gases. This inhibition by the ACh accumulation in the cholinergic synapses leads to the overstimulation and cholinergic crisis in the synaptic cleft. This study was aimed at reactivating the inhibited cholinesterase (ChE) by the *Chrysanthemum morifolium* Ramat. hydroalcoholic extract. The effects of *Ch. morifolium* hydroalcoholic extract were evaluated on the activity and ChE reactivation by the Elman staining method. The erythrocyte AChE and plasma butyrylcholinesterase (BChE) were the enzyme sources in this study. The antioxidant activity, identification of functional groups, and determination of compounds in the extract were determined by DPPH, FTIR, and GC/MS methods, respectively. The results showed that the reactivation rate of inhibited BChE (the amount of losing activity in the enzyme inhibited = up to 91.95% ± 0.17) was obtained 49.16% ± 0.24 in the 1 $mg.ml^{-1}$ of chrysanthemum extract treatment. In this experiment, the AChE enzyme was inhibited up to 30.77% ± 0.45 by paraoxon, which the 1 $mg.ml^{-1}$ of chrysanthemum extract restored it and eliminated the paraoxon toxicity. The IC_{50} in the chrysanthemum hydroalcoholic extract for scavenging the DPPH free radicals was calculated 483.67 ± 3 $\mu g.ml^{-1}$. The results of FTIR and GC/MS also showed that the extract of this plant is rich in the phenolic compounds containing the hydroxyl and carbonyl groups, which probably play a key role in the antioxidant activity of this plant extract. The findings of this study showed that the chrysanthemum hydroalcoholic extract had very high antioxidant properties due to its phenolic compounds and could be recommended as an antidote to the organophosphate toxins such as paraoxon.

Keywords: Organophosphate compounds, acetylcholinesterase enzyme, enzyme activity recovery, antioxidant, FTIR.

www.SID.ir