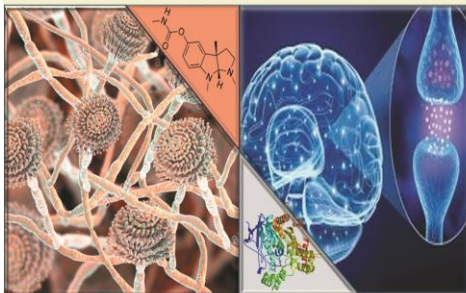




وزارت علوم، تحقیقات و فناوری  
دانشگاه تحصیلات تکمیلی علمی و فناوری پیشرفته

## بررسی فعالیت آنتی کولین استرازی متابولیت‌های ثانویه چندگونه قارچ اسپرژیلوس

فاطمه پیشگوی



دکتر صفالطی (استاد راهنما)  
دکتر ابراهیم صدقاتی (استاد مشاور)

بررسی فعالیت آنتی کولین استرازی متابولیت‌های ثانویه چندگونه قارچ اسپرژیلوس

فاطمه پیشگوی

شماره پرونده: ۱۳۹۸



Ministry of Science  
Research and Technology  
Graduate University of Advanced Technology

## The investigation of anticholinesterase activity of secondary metabolites from several species of *Aspergillus* fungus

Fateme Pishgouii

### Highlights

- The family of ChE inhibitors (AChE and BuChE) have the largest share of drugs used to treat Alzheimer's disease.
- Among the target *Aspergillus* species, the ethyl acetate extracts of *flavus* and *tubingensis* possessed the highest ability to inhibit AChE and BuChE, respectively.
- GC/MS analysis of A1 and A5 indicated that alkaloids account for a high percentage of the total composition of the extracts.
- Alkaloid Compounds with anti-ChE activity have already been identified, so it can be suggested that all or a significant part of the anti-ChE activity of these extracts is related to alkaloids.

Dr. Safa Lotfi (Supervisor)

Dr. Ebrahim Sedaghati (Advisor)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

پژوهشکده علوم محیطی

گروه بیوتکنولوژی

---

---

بررسی فعالیت آنتی کولین استرازی متابولیت‌های ثانویه چندگونه

قارچ اسپرژیلوس

---

---

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

فاطمه پیشگوی

استاد راهنما

دکتر صفا لطفی

استاد مشاور

دکتر ابراهیم صداقتی

شهریورماه ۱۳۹۹



وزارت علوم تحقیقات و فناوری  
دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته  
پژوهشکده علوم محیطی  
گروه بیوتکنولوژی

خانم فاطمه پیشکوی به شماره دانشجویی ۰۹۶۱۰۰۲۶۶، پایان نامه خود را با عنوان (( بررسی فعالیت آنٹی کولین استرازی متابولیت‌های ثانویه چندگونه قارچ اسپرژیلوس)) در تاریخ ۱۳۹۹/۰۶/۱۸، به منظور یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد ارائه و اعضا هیات داوران آن را با درجه عالی و نمره عالی تایید نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می نمایند.

اعضاء	رتبه علمی	نام و نام خانوادگی	اعضاء هیات داوران
	استادیار	دکتر صفا لطفی	۱- استاد راهنمای اول
			۲- استاد راهنمای دوم
	استادیار	دکتر ابراهیم صداقتی	۳- استاد مشاور اول
			۴- استاد مشاور دوم
	استادیار	دکتر مجتبی مرتضوی	۵- استاد داور
	استادیار	دکتر ناهید عسکری	۶- استاد داور
	استادیار	دکتر آزاده حبیبی	۸- نماینده دانشکده/پژوهشکده

حق چاپ محفوظ و متعلق به دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته می باشد.



وزارت علوم تحقیقات و فناوری

دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

### تعهدنامه اصالت اثر و رعایت حقوق مادی و معنوی

اینجانب فاطمه پیشگوی تعهد می نماید که:

- ۱- مطالب مندرج در این پایان نامه، حاصل کار پژوهشی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این نوشته از آن استفاده شده است، ارجاع گردیده است.
- ۲- این پایان نامه از نظر محتوایی همانند جویی شده و دارای حداقل درصد همانندی مورد تأیید دانشگاه می باشد و پیش از این برای احراز هیچ مدرکی ارائه نشده است.
- ۳- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشد.
- ۴- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی و مطابق با ضوابط دانشگاه انجام شود.
- ۵- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی حاصل از نتایج پایان نامه با هماهنگی استاد راهنما، از طریق حوزه پژوهشی و مطابق با ضوابط دانشگاه انجام گیرد.

نام و نام خانوادگی دانشجو:

فاطمه پیشگوی

امضا

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته می باشد.

تقدیم به:

خدایی که آفرید

جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را.

و به کسانی که عشقشان را در وجودم دمید.

## چکیده

تجویز مهارکننده‌های آنزیم‌های کولین‌استراز (آنتی‌کولین‌استرازاها) به‌منظور کاهش علائم اختلالات تحلیل برنده اعصاب نظیر بیماری آلزایمر بسیار رایج می‌باشد. امروزه دستیابی به داروهایی با اثرات بهتر و عوارض جانبی کمتر بخصوص با منشأ طبیعی، هدف بسیاری از تحقیقات علمی در سراسر جهان می‌باشد. در این پایان‌نامه، از ۹ گونه قارچ آسپرژیلوس استفاده شده است. با توجه به اینکه چهار جدایه از گونه *Aspergillus tubingensis* و یک جدایه از بقیه گونه‌ها مورد بررسی قرار گرفته است در مجموع مطالعات بر روی ۱۲ نمونه قارچ انجام شده است. در این پژوهش، توانایی عصاره اتیل‌استاتی این ۱۲ نمونه، در مهار دو آنزیم کولین-استراز، استیل کولین‌استراز (AChE) و بوتیریل کولین‌استراز (BuChE)، با روش المن مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر  $IC_{50}$  عصاره‌های قارچی برای AChE و BuChE به ترتیب بین ۱۷۳۷-۴۶ و ۳۴۶۷-۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. نمونه A۱ (*Aspergillus flavus*) و A۱۲ (*Eurotium Heterothallic*) به ترتیب بیشترین و کمترین توانایی را در مهار AChE از خود نشان دادند. پایین‌ترین فعالیت آنتی‌بوتیریل کولین‌استرازی نیز مربوط به نمونه A۱۲ بود و نمونه A۵ که یکی از جدایه‌های گونه *Aspergillus tubingensis* است از بیشترین فعالیت در این زمینه برخوردار بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و محتوای فنلی کل آن‌ها نیز به ترتیب با روش DPPH و فولین سیوکالتو سنجیده شد. مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از این دو مطالعه نشان داد که فقط برای برخی از نمونه‌ها، نتایج این دو آزمایش در ارتباط مستقیم می‌باشد. در نهایت، شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده دو نمونه A۱ و A۵ با استفاده از روش GC/MS نشان داد که آلکالوئیدها، درصد بالایی از ترکیبات کلی عصاره‌ها را به خود اختصاص می‌دهند. با توجه به اینکه قبلاً نیز آلکالوئیدهایی با فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی شناسایی شده‌اند می‌توان پیشنهاد نمود که همه یا بخش مهمی از فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی این دو نمونه مربوط به همین آلکالوئیدها می‌باشد. البته مطالعات بسیار بیشتری به‌منظور ابراز نظر قطعی در این زمینه لازم است.

**کلیدواژه:** آنتی‌کولین‌استرازاها، بیماری آلزایمر، قارچ آسپرژیلوس، GC/MS، آلکالوئید.

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
<b>فصل اول: مقدمه</b> .....	۱
۱-۱- معرفی قارچ آسپرژیلوس.....	۲
۲-۱- معرفی متابولیت‌های ثانویه.....	۳
۱-۲-۱- تنظیم تولید متابولیت‌های ثانویه.....	۷
۲-۲-۱- قابلیت دارویی متابولیت‌های ثانویه.....	۸
۳-۱- معرفی آنزیم‌های کولین‌استراز.....	۱۰
۱-۳-۱- بیماری‌های مرتبط با آنزیم‌های کولین‌استراز.....	۱۳
۲-۳-۱- مهارکننده‌های آنزیم‌های کولین‌استراز و اهمیت درمانی آنها.....	۱۵
۴-۱- آنتی کولین‌استرازهای مشتق شده از قارچ‌ها.....	۱۷
۵-۱- هدف از پژوهش.....	۱۹
<b>فصل دوم: مواد و روش‌ها</b> .....	۲۰
۱-۲- مواد.....	۲۱
۱-۱-۲- قارچ‌های استفاده‌شده در این بررسی.....	۲۱
۲-۱-۲- مواد و ابزار مورد استفاده جهت کشت و عصاره‌گیری.....	۲۱
۳-۱-۲- مواد و ابزار مورد استفاده در سنجش قدرت مهار آنزیمی.....	۲۱
۴-۱-۲- مواد مورد استفاده در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی.....	۲۲
۵-۱-۲- مواد مورد استفاده جهت تعیین مقدار فنل کل.....	۲۲
۶-۱-۲- مواد مورد استفاده جهت تجزیه و آنالیز متابولیت‌ها.....	۲۲
۲-۲- محلول‌ها و محیط کشت.....	۲۳
۱-۲-۲- محیط کشت مایع PDB.....	۲۳
۲-۲-۲- محیط کشت جامد PDA.....	۲۳



۲۳	۳-۲-۲- بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار.....
۲۴	۴-۲-۲- محلول بافر Tris-HCl با pH=۷/۵.....
۲۴	۵-۲-۲- محلول BSA با غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر.....
۲۴	۶-۲-۲- آنزیم استیل کولین استراز ۴ واحد بر میلی لیتر.....
۲۴	۷-۲-۲- محلول سوبسترای ۲۰ میلی مولار استیل تیوکولین بدید.....
۲۴	۸-۲-۲- محلول ۱۰ میلی مولار DTNB (معرف المن).....
۲۵	۹-۲-۲- محلول آنزیمی بوتیریل کولین استراز ۴ واحد بر میلی لیتر.....
۲۵	۱۰-۲-۲- محلول سوبسترای بوتیریل تیوکولین ۲۰ میلی مولار.....
۲۵	۱۱-۲-۲- محلول DPPH ۰/۰۸ میلی گرم بر میلی لیتر.....
۲۵	۱۲-۲-۲- محلول کربنات سدیم ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر.....
۲۵	۳-۲- روش ها.....
۲۵	۱-۳-۲- کشت گونه های قارچی.....
۲۶	۲-۳-۲- جدا کردن هیف قارچ ها.....
۲۷	۳-۳-۲- استخراج متابولیت ها از هر نمونه.....
۲۷	۴-۳-۲- تغلیظ متابولیت ها.....
۲۸	۵-۳-۲- بررسی فعالیت آنتی کولین استرازی.....
۳۱	۶-۳-۲- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش DPPH.....
۳۲	۷-۳-۲- تعیین مقدار IC <sub>50</sub> در مهار DPPH.....
۳۲	۸-۳-۲- تعیین مقدار فنل کل.....
۳۳	۹-۳-۲- آنالیز عصاره ها.....
۳۵	۱-۹-۳-۲- آماده سازی نمونه جهت انجام کروماتوگرافی.....
۳۵	۲-۹-۳-۲- تفکیک به کمک GC-MS.....
۳۶	فصل سوم: نتایج.....

۳۷	۳-۱- کشت نمونه‌ها.....
۳۷	۳-۲- نتایج عصاره گیری .....
۳۸	۳-۳- نتایج حاصل از آزمون ال‌من .....
۴۱	۳-۴- نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها.....
۴۲	۳-۵- مقادیر حاصل از سنجش فنل کل.....
۴۴	۳-۶- نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی.....
۵۴	فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری.....
۶۵	فصل پنجم: منابع .....

## فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱ پیکر قارچ آسپرژیلوس .....	۳
شکل ۲-۱ مسیرهای سنتز متابولیت‌های ثانویه .....	۶
شکل ۳-۱ تنظیم بیوسنتز متابولیت‌ها در پاسخ به سیگنال‌های مختلف محیطی .....	۸
شکل ۴-۱ ساختار سه‌بعدی آنزیم استیل‌کولین‌استراز طبیعی .....	۱۰
شکل ۵-۱ ساختار سه‌بعدی آنزیم بوتیریل‌کولین‌استراز انسانی بیان‌شده در باکتری .....	۱۰
شکل ۶-۱ عملکرد آنزیم استیل‌کولین‌استراز .....	۱۱
شکل ۱-۲ نمونه قارچ آسپرژیلوس رشد یافته در محیط کشت جامد PDA .....	۲۶
شکل ۲-۲ کشت گونه‌ها در محیط کشت مایع .....	۲۶
شکل ۳-۲ جداسازی هیف از مایع تلقیح قارچ‌ها .....	۲۶
شکل ۴-۲ استخراج متابولیت‌ها توسط اتیل‌استات .....	۲۷
شکل ۵-۲ دستگاه روتاری جهت تغلیظ عصاره‌های اتیل‌استاتی .....	۲۸
شکل ۶-۲ مکانیسم شیمیایی روش المن .....	۲۹
شکل ۷-۲ دستگاه GC-MS جهت شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره‌ها .....	۳۴
شکل ۱-۳ وضعیت کشت گونه‌های قارچی بعد از ۳۰ روز .....	۳۷
شکل ۲-۳ نتیجه عصاره خشک‌شده برخی گونه‌ها .....	۳۸
شکل ۳-۳ نمودار آسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد تست DPPH .....	۴۲
شکل ۴-۳ فنل کل عصاره‌ها به‌صورت میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره .....	۴۳
شکل ۵-۳ نمودار جذب گالیک‌اسید، به‌عنوان استاندارد مقدار فنل .....	۴۳
شکل ۶-۳ دیاگرام حاصل از تفکیک عصاره اتیل‌استاتی نمونه A۱ .....	۴۴
شکل ۷-۳ دیاگرام حاصل از تفکیک عصاره اتیل‌استاتی نمونه A۵ .....	۴۵

## فهرست جداول

صفحه	عنوان
۳.....	جدول ۱-۱ رده‌بندی قارچ اسپرژیلوس.....
۲۱.....	جدول ۱-۲ لیست گونه‌های قارچی استفاده‌شده در این پژوهش.....
۳۸.....	جدول ۱-۳ رنگ عصاره هر یک از نمونه‌ها.....
۳۹.....	جدول ۲-۳ درصد‌های مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز در هر غلظت عصاره‌ها.....
۳۹.....	جدول ۳-۳ درصد‌های مهار آنزیم بوتیریل‌کولین‌استراز در هر غلظت عصاره‌ها.....
۴۰.....	جدول ۴-۳ IC <sub>50</sub> هر نمونه قارچی در مهار آنزیم‌های کولین‌استرازی.....
۴۱.....	جدول ۵-۳ IC <sub>50</sub> نئوستیگمین به‌عنوان استاندارد تست المن.....
۴۱.....	جدول ۶-۳ توانایی عصاره هر نمونه در مهار رادیکال DPPH.....
۴۲.....	جدول ۷-۳ IC <sub>50</sub> آسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد در مهار رادیکال آزاد.....
۴۵.....	جدول ۸-۳ اجزای شناسایی‌شده عصاره اتیل‌استاتی قارچ A۱.....
۴۹.....	جدول ۹-۳ اجزای شناسایی‌شده عصاره اتیل‌استاتی قارچ A۵.....

# فصل اول

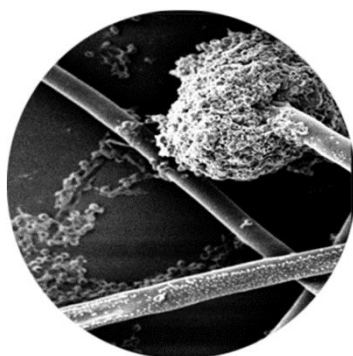
## مقدمه

## ۱-۱- معرفی قارچ آسپرژیلوس<sup>۱</sup>

جنس آسپرژیلوس برای اولین بار توسط میشلی در سال ۱۷۲۹ به عنوان قارچ‌های فاقد تولیدمثل جنسی توصیف شد [۱]. قارچ‌های جنس آسپرژیلوس از دسته قارچ‌های آسکومیستی (جدول ۱-۱) هستند. پیکر آسکومیست‌ها به‌غیر از مخمرها از هیف (نخینه) های دارای دیواره‌ی عرضی تشکیل شده است؛ و تولیدمثل غیرجنسی آن‌ها با تولید هاگ در نوک نخینه‌های تخصص‌یافته می‌باشد که با پراکنش هاگ‌ها و رشد آن‌ها میسلیم‌های جدیدی تشکیل می‌شود (شکل ۱-۱) [۲]. این یوکاریوتها متشکل از چند صد گونه قارچ بسیار هوازی هستند که تقریباً در تمام محیط‌ها یافت می‌شوند. بسیاری از گونه‌های آسپرژیلوس الیگوتروفی را نشان می‌دهند؛ یعنی، قادر به رشد در محیط‌های خالی از مواد مغذی یا محیط‌هایی هستند که کاملاً فاقد مواد مغذی کلیدی هستند [۲، ۳]. جنس آسپرژیلوس قارچ‌های ساپروفیتی و انگلی و فاقد کلروفیل بوده در نتیجه فتوسنتز نمی‌کنند و هتروتروف هستند و اغلب از محیط‌های مختلف مانند خاک، بافت‌های مختلف گیاهان (به‌صورت اندوفیت) و محیط‌های آبی جدا شده‌اند بنابراین تغذیه آن‌ها از طریق هضم بیرونی مواد آلی محیط و جذب صورت می‌گیرد [۲، ۴]. در حالی که چندین گونه از نظر اتیولوژیکی (سبب‌شناسی)، دارویی و تجاری از اهمیت بالایی برخوردار هستند برخی گونه‌ها می‌توانند باعث ایجاد بیماری در انسان و حیوانات شوند و همچنین می‌توانند به‌عنوان عوامل بیماری‌زای گیاهی عمل کنند. علاوه بر تولید تعداد زیادی آنزیم خارج سلولی مفید و اسیدهای آلی، این قارچ‌ها همچنین متابولیت‌های ثانویه مهمی در بیوتکنولوژی تولید می‌کنند [۳]. بیش از ۵۰۰ گونه در این جنس وجود دارد که توالی ژنوم برای حدود ۲۰۰ مورد در دسترس است. این ۲۰۰ گونه دارای بیش از ۲۵۰۰ زیرگونه می‌باشند [۵].

---

<sup>۱</sup> Aspergillus



شکل ۱-۱ پیکر قارچ آسپرژیلوس [۶].

جدول ۱-۱ رده‌بندی قارچ آسپرژیلوس [۶].

Taxonomy	
Eukaryota	دامنه
Fungi	سلسله
Dikarya	زیر فرمان رو
Ascomycota	دسته
Pezizomycotina	زیر دسته
Eurotiomycetes	رده
Eurotiomycetidae	زیر رده
Eurotiales	راسته
Aspergillaceae	خانواده
Aspergillus	جنس

### ۱-۲- معرفی متابولیت‌های ثانویه<sup>۱</sup>

طبق تعاریف کلاسیک، متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی هستند که مستقیماً در مراحل رشد و نمو یا تولیدمثل یک ارگانیسم زنده شرکت نمی‌کنند و برخلاف متابولیت‌های اولیه، عدم حضور متابولیت‌های ثانویه به مرگ فوری یاخته منجر نمی‌شود، اما ممکن است در درازمدت

<sup>۱</sup>Secondary Metabolites (SMs)

سبب اختلال در بقای موجود زنده، باروری یا ویژگی‌های ظاهری آن گردد یا ممکن است هیچ تغییر مشهودی را سبب نشود. این ترکیبات غالباً نقش مهمی را در سیستم دفاعی در مقابل گیاهخواری، حشرات و دفاع بین‌گونه‌ای بازی می‌کنند. بیشتر مواد موجود در تولیدات طبیعی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند. این متابولیت‌های با وزن مولکولی کم، اغلب دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی قوی هستند [۷]. از جمله متابولیت‌های ثانویه می‌توان به ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌کتیدها و پپتیدهای حلقوی اشاره کرد. انسان از متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان دارو، طعم‌دهنده‌های غذایی و مواد مخدر استفاده می‌کند [۸].

از دیدگاه شیمیایی، متابولیت‌های ثانویه در یک انتهای دامنه متابولیت‌ها قرار دارند و به‌عنوان محصول مسیرهایی طبقه‌بندی می‌شوند که از متابولیت‌های اولیه برای تشکیل مولکول‌های پیچیده‌تر استفاده می‌کنند که از مسیرهای ترکیبی ناشی می‌شوند (شکل ۱-۲) [۹، ۱۰].

منشأ متابولیت‌های ثانویه به‌احتمال زیاد هم‌زمان با منشأ مولکول‌های بیولوژیکی خود تکرار<sup>۱</sup> است [۱۱، ۱۲]. به‌راحتی می‌توان تصور کرد که چگونه اسیدهای آمینه ساده با یکدیگر و سایر مولکول‌های آلی برای تشکیل مولکول‌های جدید واکنش نشان داده‌اند. هنگامی که این متابولیت‌های ثانویه اثرات مثبتی بر روی فرآیندهای ماکرومولکولی و درنهایت بر تکثیر سلول داشتند، به‌عنوان یک فرآیند جدید سلولی حفظ شدند [۱۰].

تعاریف کلاسیک متابولیت‌های ثانویه این تصور را شکل می‌دهد که این ترکیبات برای رشد یا بقای ارگانیسم تولیدکننده ضروری نیستند. متابولیسم اولیه در اکثر ارگانیسم‌ها مشترک است در حالیکه یک ویژگی کلی متابولیت‌های ثانویه توزیع فیلوژنتیک جهت‌دار آن‌ها با توجه به عوامل متعددی است که باعث انقراض و تنوع در ژن‌های رمزگذاری کننده و خوشه‌های ژن در آن‌ها شده است [۱۰، ۱۳-۱۵]. آنچه مشخص است این است که اهمیت آن‌ها برای ارگانیسم‌هایی که آن‌ها را تولید می‌کنند به دلیل میزان کم و عملکردهای ناشناخته آن‌ها

---

<sup>1</sup>Self-replicating biological molecules



دست‌کم گرفته می‌شود. استدلال شده است که متابولیت‌های ثانویه و سایر مولکول‌های فعال زیستی کوچک، آن‌قدر برای ارگانسیم‌هایی که آن‌ها را تولید می‌کنند حیاتی هستند که باید به‌عنوان ستون چهارم به همراه DNA، RNA و پروتئین‌ها «اصول اصلی زیست‌شناسی» را تشکیل دهند [۱۰، ۱۶].

مرز بین متابولیسم ثانویه و اولیه می‌تواند مبهم باشد و گاهی اوقات متابولیت‌های اولیه ممکن است مانند متابولیت‌های ثانویه رفتار کنند [۱۰، ۱۷-۱۹]. بسته به ضروریات و عملکردهای آن‌ها، متابولیت‌های ثانویه می‌توانند مولکول‌های ساده‌ای باشند که مستقیماً از متابولیت‌های اولیه مانند الکل‌ها، قندها و اسیدهای آلی حاصل می‌شوند [۱۰].

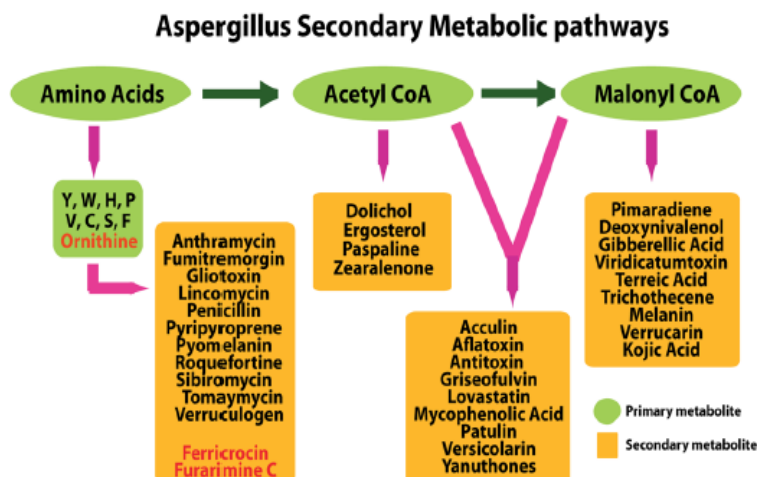
غربالگری عصاره‌های میکروبی، یک روش تأیید شده برای شناسایی مولکول‌های زیستی فعال جدید برای کشف مواد دارویی بوده و هست [۲۰]. قارچ‌های رشته‌ای به دلیل توانایی خود در تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه شناخته شده هستند. این مولکول‌ها اکثراً در سیستم‌های دفاعی قارچ و سازگاری با محیط‌زیست درگیر هستند [۲۱]. قارچ‌ها بسته به نیازشان، سنتز متابولیت‌های ثانویه خود را تعدیل می‌کنند. این اصل که معمولاً OSMAC<sup>1</sup> نامیده می‌شود؛ بدین معنی است که، هر تغییر کوچکی در شرایط رشد قارچ، می‌تواند متابولیسم ثانویه آن را به‌طور کامل تغییر دهد [۲۲].

قارچ‌های اندوفیت و متابولیت‌های آن‌ها می‌توانند مقاومت گیاه میزبان را در برابر گیاهخواران افزایش داده و باعث بروز مسمومیت در دام‌هایی شوند که از این گیاهان تغذیه می‌نمایند [۱۰، ۲۳]. شکل‌گیری این ترکیبات که به‌طور سنتی متابولیت‌های ثانویه خوانده می‌شوند، در طی تکامل به‌عنوان یک مزیت برای ارگانسیم تولیدکننده تثبیت شده است [۲۴]. قارچ‌ها می‌توانند متابولیت‌های ثانویه خود را از سلول‌ها به محیط بیرون آزاد کنند و یا درون عناصر ساختاری سلول‌های خود ذخیره کنند. بر اساس اینکه به نظر می‌رسد کنترل عملکرد زیستی آن‌ها به محیط خارجی سلول معطوف است اصطلاح

---

<sup>1</sup> One Strain Many Compounds

«اکسترولیتها»<sup>۱</sup> برای این ترکیبات پیشنهاد می‌شود [۲۵] اما به دلیل عملکردها و مکان‌های بیوسنتز سلولی و به جهت پیوستگی با متابولیت‌های اولیه، ترجیح می‌دهیم اصطلاح کلاسیک «متابولیت ثانویه» را به کارگیریم [۱۰].



شکل ۱-۲ قارچ‌های جنس آسپرژیلوس، منابع طبیعی غنی از چندین متابولیت فعال ثانویه هستند. قارچ‌ها از محصولات نهایی و واسطه‌های مسیرهای اصلی متابولیک برای سنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌کنند [۵]. می‌توان ادعا کرد که بخش عمده‌ای از موفقیت زیست‌محیطی قارچ‌های رشته‌ای در تصاحب تقریباً همه زیستگاه‌های این سیاره، مدیون وابستگی قارچ‌ها به متابولیت‌های ثانویه برای تسخیر زیستگاه‌های متنوع می‌باشد و تداوم وجود آن‌ها نشانگر این واقعیت است که بیشتر گونه‌ها انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه را ایجاد می‌کنند که بیان آن‌ها با چرخه زندگی و شرایط محیطی هماهنگ شده است [۲۲].

بخش قابل توجهی از ژنوم قارچ‌ها به رمزگذاری و تنظیم تولید این محصولات اختصاص دارد. متابولیت‌های ثانویه قارچی با بیشترین تأثیر منفی، شامل سموم مؤثر بر پستانداران است که معمولاً به‌عنوان میکوتوکسین‌ها<sup>۲</sup> شناخته می‌شوند. تاکنون حدود ۱۰۰۰ ترکیب قارچی این برچسب را به خود اختصاص داده‌اند که بیشتر آن‌ها به گروه آفلاتوکسین‌ها، تریکوتسن‌ها،

<sup>۱</sup> Extrolites

<sup>۲</sup> Mycotoxins

فومونیزین‌ها، اوکراتوکسین‌ها، سیتوکالازین‌ها و ترکیبات مختلف ایندول‌ترین تعلق دارند [۱۰، ۲۶، ۲۷]. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند ژن‌های خوشه‌ای<sup>۱</sup> قارچی می‌توانند پروتئین‌های کمکی را برای جلوگیری از خود سمیت<sup>۲</sup> در برابر متابولیت‌های خود، رمزگذاری کنند [۱۰، ۲۸، ۲۹].

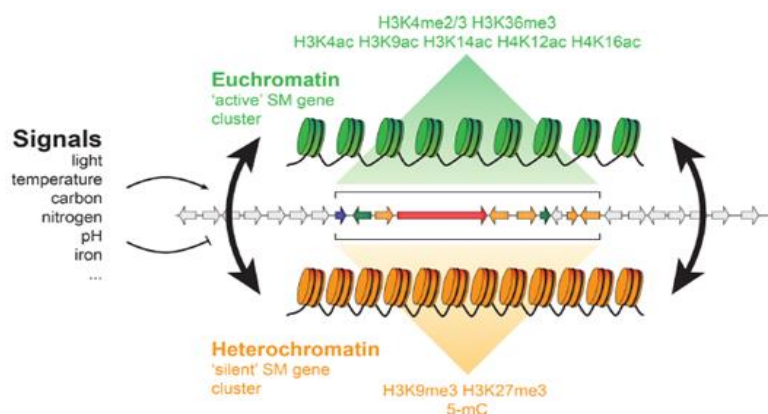
#### ۱-۲-۱- تنظیم تولید متابولیت‌های ثانویه

بیوسنتز متابولیت ثانویه در پاسخ به بسیاری از محرک‌های محیطی، از جمله تغییر در منابع نیتروژن و کربن، pH، دما، نور و همچنین حضور موجودات دیگر تغییر می‌کند [۳۰] پاسخ‌ها به این محرک‌ها اغلب به تنظیم‌کننده‌های رونویسی متکی هستند که بر بیان تعداد زیادی از ژن‌های هدف تأثیرگذار هستند (شکل ۱-۳) [۳۰، ۳۱]. در آزمایشگاه، ژن‌هایی که آنزیم‌های کاتالیزوری اولیه برای سنتز متابولیت ثانویه را رمزگذاری می‌کنند، غالباً می‌توانند با اختلال در ژن خاموش شوند که رشد رویشی و اسپورزایی را متأثر می‌کند؛ بنابراین، متابولوم قارچی باید تا حد ممکن در شرایط کشت نزدیک به شرایط محیط رشد طبیعی آن مورد مطالعه قرار گیرد [۱۰، ۱۳-۱۵]. پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، بیوانفورماتیک و ژنومیک مقایسه‌ای نشان می‌دهد که ژن‌های خاص کد کننده متابولیت‌های ثانویه قارچی، خوشه‌ای هستند که می‌تواند بیش از ۱۰۰۰۰ بازداشته باشند و اغلب در نزدیکی تلومرها قرار گرفته‌اند [۷]. اکثر خوشه‌ها، حاوی یک یا چند ژن بیوسنتز کننده مرکزی هستند که آنزیم‌های چند زیر واحدی بسیار بزرگ سنتز کننده متابولیت‌های ثانویه را رمزگذاری می‌کنند [۳۲].

---

<sup>1</sup> Cluster genes

<sup>2</sup> Self-toxicity



شکل ۱-۳ در پاسخ به سیگنال‌های مختلف محیطی، کروماتین می‌تواند از حالت هتروکرومین به حالت فعال یوکروماتین تبدیل شود و از این طریق، امکان فعال شدن بیوسنتز متابولیت ثانویه را فراهم می‌کند [۳۱]. ژن‌های خوشه‌ای متابولیت‌های ثانویه، محصول انتخاب صفات پیچیده در طی میلیون‌ها سال تکامل هستند. مکانیسم‌هایی که به تنوع بخشیدن به محصولات نهایی کمک می‌کنند شامل تکثیر ژن‌ها، ادغام و آمیزش، جابجایی، اضافه و یا حذف شدن ژن‌های اضافی و در برخی موارد انتقال موازی ژن<sup>۱</sup> می‌باشند [۱۰، ۳۳، ۳۴]

#### ۱-۲-۲- قابلیت دارویی متابولیت‌های ثانویه

بسیاری از داروهای مهم از محصولات طبیعی و مطالعه شیمی قارچ کشف شده‌اند. محصولات طبیعی همچنان از مهم‌ترین عوامل درمانی و پزشکی بوده و از اهمیت ویژه‌ای در درمان بیماری‌هایی از جمله سرطان، مالاریا، کاهش کلسترول خون، عفونت‌های باکتریایی و قارچی، بیماری‌های عصبی و قلبی-عروقی و بیماری‌های خود ایمنی برخوردار بوده‌اند [۱۰، ۳۵]. بسیاری از مواد شیمیایی کشاورزی نیز به صورت طبیعی تولید می‌شوند [۱۰، ۳۶]. به ویژه قارچ‌ها که منابع غنی از متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی محسوب می‌شوند [۳۷] و نقش بسیار مهمی را در ارتقای سلامت انسان و حیوان ایفا نموده‌اند. بهترین نمونه‌های شناخته‌شده، آنتی‌بیوتیک‌های  $\beta$ -لاکتام هستند که شامل پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها هستند. به دلیل

<sup>۱</sup> Horizontal gene transfer (HGT)

اثربخشی آن‌ها در برابر عفونت‌های باکتریایی، تأثیر شگرفی بر سلامت جهانی داشته‌اند. علاوه بر این، موفقیت پنی‌سیلین‌ها به‌طور مؤثری باعث پیشرفت‌های مهمی در میکروبیولوژی، شیمی و بیوشیمی شده و از بسیاری جهات در ایجاد صنعت مدرن داروسازی نقش داشته است. بسیاری از متابولیت‌های قارچی دیگر نیز با فعالیت‌های ارزشمند شناخته شده‌اند [۱۰].

ذکر این نکته نیز حائز اهمیت است که متابولیت‌های قارچی علاوه بر قابلیت‌های دارویی می‌توانند دارای ترکیباتی از جمله آلكالوئیدهای سمی، مایکوتوکسین‌ها و آفلاتوکسین‌ها نیز باشند که برای سلامت انسان و حیوان خطرآفرین هستند [۳۸]. همچنین قادرند به دنبال استنشاق اسپورهای قارچی، عفونت موضعی در ریه، سینوس‌ها و سایر نقاط بدن ایجاد کنند. این نوع عفونت‌ها آسپرژیلوزیس<sup>۱</sup> خوانده می‌شوند [۳۹]؛ بنابراین مطالعه بر روی گونه‌های مختلف قارچی نیازمند رعایت نکات ایمنی حین انجام کار، برای جلوگیری از ایجاد بیماری می‌باشد.

از زمان کشف پنی‌سیلین به‌عنوان اولین آنتی‌بیوتیک با منشأ قارچی که برای سلامتی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد، ترکیبات طبیعی در بخش‌های مختلف صنعتی مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. امروزه ۴۲٪ از ترکیبات سازگار با سلامت انسان از ترکیبات قارچی مشتق شده‌اند [۴۰] و بیش از ۳۰٪ از داروهایی که در سراسر جهان به فروش می‌رسند دارای ترکیباتی از منابع طبیعی می‌باشند [۴۱، ۴۲].

از آنجاکه برخی متابولیت‌های ثانویه محصول مسیرهایی هستند که در شرایط یا مرحله خاصی از زندگی بیان می‌شوند؛ بنابراین برخی از محصولات به‌راحتی در محیط کشت تولید می‌شوند، درحالی‌که ممکن است برخی مسیره‌های دیگر در محیط کشت مصنوعی خاموش بمانند. متابولیسم ثانویه در آزمایشگاه به این بستگی دارد که آیا محرک وابسته به بافت خاص یا مرحله زندگی می‌تواند به‌صورت مصنوعی القا شود؛ و اینکه آیا این مسیره‌ها در شرایط محیطی و تغذیه‌ای آزمایشگاهی بیان می‌شوند. تاریخ طولانی فناوری تخمیر ثابت کرده است

---

<sup>1</sup> Aspergillosis

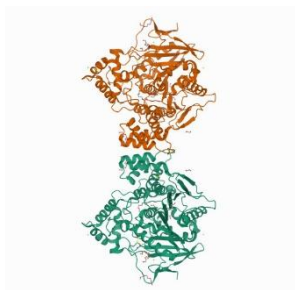
که سویه‌های رو به رشد، تحت رژیم‌های مختلف مواد مغذی و محیطی می‌توانند به‌طور اساسی ترکیبات متابولیت‌ها را تغییر دهند [۱۰, ۴۳, ۴۴]. این تجربه‌ها، عوامل مهمی در تعیین عملکرد طبیعی متابولیت‌های ثانویه و همچنین کشف کاربردهای جدید آن‌ها در پزشکی و کشاورزی بوده است [۱۰].

### ۳-۱- معرفی آنزیم‌های کولین‌استراز

آنزیم استیل کولین‌استراز (AChE) <sup>۱</sup> (شکل ۱-۴) و آنزیم بوتیریل کولین‌استراز (BuChE) <sup>۲</sup> (شکل ۱-۵) به‌عنوان آنزیم‌های سرین هیدرولاز، به‌طور گسترده‌ای در سرتاسر سلسله جانوری بیان شده‌اند [۴۵].



شکل ۱-۴ ساختار سه‌بعدی آنزیم استیل کولین‌استراز طبیعی [۴۶].



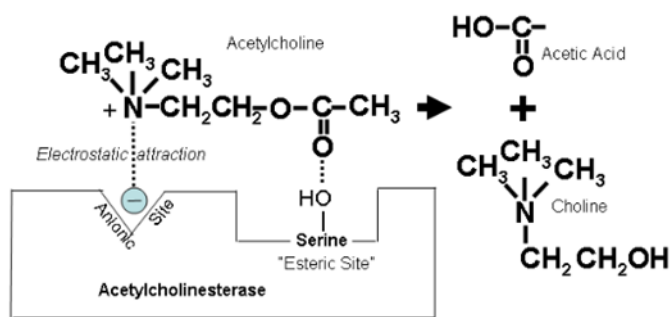
شکل ۱-۵ ساختار سه‌بعدی آنزیم بوتیریل کولین‌استراز انسانی بیان شده در باکتری [۴۷].

باوجود اینکه ژن کد کننده این دو آنزیم بر روی دو کروموزوم متفاوت شماره هفت برای استیل کولین‌استراز و شماره سه برای بوتیریل کولین‌استراز قرار دارد، تقریباً ۵۰٪ همسانی در

<sup>۱</sup> Acetylcholinesterase Enzyme

<sup>۲</sup> ButyrylCholinesterase Enzyme

توالی‌شان دارند و از ساختارهای سوم و چهارم نسبتاً مشابهی برخوردار هستند. هر دو دارای یک سه‌گانه کاتالیزوری متشکل از سه اسید آمینه (سرین، گلوتامات و هیستیدین) هستند که در عمق یک شکاف در ساختار سوم آن‌ها واقع شده است [۴۸-۵۰]. AChE یکی از آنزیم‌های کارآمد در بدن است و توافق گسترده‌ای وجود دارد که AChE مهم‌ترین آنزیم در تنظیم انتقال عصبی مسیره‌های کولینرژیک مهره‌داران است که شامل ارتباطات عصبی و عصب-عضله می‌باشد. AChE این نقش را در همه پستانداران با هیدرولیز و غیرفعال کردن استیل کولین<sup>۱</sup>، در عرض چند ثانیه یا میلی‌ثانیه پس از آزاد شدن از یک نورون کولینرژیک پیش سیناپسی، انجام می‌دهد (شکل ۶-۱) [۵۰-۵۲].



شکل ۶-۱ هیدرولیز انتقال دهنده عصبی استیل کولین، توسط آنزیم استیل کولین استراز، منجر به تولید کولین و استیک اسید و در نتیجه غیرفعال شدن این انتقال دهنده عصبی می‌شود [۵۳].

در حالی که نقش فیزیولوژیکی آنزیم AChE بیشتر به‌عنوان مهم‌ترین سرین هیدرولاز درگیر در انتقال و خاتمه تکانه عصبی کولینرژیک در سیستم عصبی مرکزی (CNS) شناخته شده است [۵۴]، بوتیریل کولین استراز به‌طور عمده در کبد یافت می‌شود اما در روده، قلب، کلیه و ریه نیز میزان فعالیت بالایی دارد. به‌خوبی شناخته شده است که BuChE پلاسما نقش سم‌زدایی را در برابر مهارکننده‌های سمی ارگانوفسفات و کربامات (به‌عنوان سموم دفع آفات و سلاح‌های شیمیایی) ایفا می‌کند و از مهار AChE توسط این ترکیبات سمی جلوگیری می‌کند. به‌غیر از پلاسما، آنزیم BuChE به‌طور گسترده در CNS نیز توزیع شده است که نشان‌دهنده درگیری آن

<sup>1</sup> Acetylcholine

در عملکرد عصبی است. در واقع، مطالعات روی AChE معیوب و بافت مغز انسان نشان داد که BuChE ممکن است نقش مهمی در هیدرولیز استیل کولین در هنگام کاهش سطح AChE بازی کند [۵۵-۵۷]. با این حال، با وجود تشابه ساختاری، تفاوت‌هایی در مرحله محدودکننده سرعت اعلام شده است: در BuChE مرحله محدودکننده سرعت واکنش، فرایند آسیلاسیون سوپسترا است در حالی که برای AChE، این مرحله به دآسیله شدن سوپسترا اختصاص دارد [۵۸]. علاوه بر این، کمتر بودن Km آنزیم AChE نسبت به BuChE باعث مهار AChE در غلظت بالای سوپسترا می‌شود [۵۷].

آنزیم BuChE دامنه پذیرش سوپسترای بسیار وسیع‌تری را نسبت به AChE دارا می‌باشد. به‌عنوان مثال قادر است استیل کولین و سوپسترای غیر فیزیولوژیکی بوتیریل کولین (BCh) را در خود جای داده و هیدرولیز کند در حالی که AChE تنها استیل کولین را هیدرولیز می‌کند. از نظر جایگیری، آنزیم AChE در هیپوکامپ و در نواحی حرکتی، پروموتور و نئوکورتیکال قشر مغز انسان بیان می‌شود، در حالی که آنزیم BuChE، در سطوح پایین‌تر از AChE، در هیپوکامپ و نئوکورتکس تمپورال بیان می‌گردد [۵۶].

اگرچه از شناسایی نقش AChE در تنظیم سیگنالینگ کولینرژیک مدت‌زمان زیادی گذشته است اما تا چندین دهه عملکرد فیزیولوژیکی واقعی برای BuChE تعریف نشده بود. همچنین، در حالی که بیان BuChE در بسیاری از بافت‌ها از AChE بیشتر است، اما به‌صورت طبیعی در غلظت‌های بسیار کمتری در مغز، عضله اسکلتی و اعصاب محیطی وجود دارد [۵۹].

جمعیت‌های انسانی وجود دارند که به‌طور کامل، فاقد ژن عملکردی BuChE می‌باشند، اما از هر لحاظ، یک فنوتیپ طبیعی را نشان می‌دهند. تنها تفاوت فیزیولوژیکی آن‌ها نسبت به نوع وحشی آن است که قرارگیری در معرض استرهای فعال زیستی موجود در مواد غذایی یا شل کننده‌های عضلانی استری برای این افراد خطر زیادی را در پی دارند [۵۰، ۶۰، ۶۱]؛ بنابراین در نظر گرفته شد که BuChE جدا از بکار رفتن به‌عنوان «پشتیبان» برای AChE در رابطه با انتقال عصبی و همچنین به‌عنوان یک محافظت‌کننده زیستی در برابر استرهای فعال زیستی



موجود در مواد غذایی، فاقد عملکرد مهمی است. با این حال، عملکرد سم‌زدایی BuChE را می‌توان به‌عنوان یک ویژگی در نظر گرفت که باعث می‌شود انسان و سایر گونه‌ها بتوانند مواد مغذی را از گیاهان به دست آورند که بسیاری از آن‌ها می‌توانند در صورت عدم هیدرولیز شدن استرهای درون‌زاد آن‌ها، سمی باشند [۵۰].

### ۱-۳-۱- بیماری‌های مرتبط با آنزیم‌های کولین‌استراز

چندین بیماری تحلیل برنده اعصاب از جمله آلزایمر، میاستنی گراویس و آب‌سیاه (گلوکوم) با نقص عملکرد دستگاه کولینرژیک همراه هستند. دلایل اصلی این شرایط مربوط به تخریب نورونی، خود ایمنی و انسداد انتقال عصبی-عضلانی است. برای کاهش علائم مرتبط با برخی از این شرایط، داروهای ارزشمندی به‌عنوان مهارکننده‌های کولین‌استراز به اثبات رسیده‌اند که می‌توانند تا حدودی علائم ناشی از این نقص‌های عصبی را با افزایش سطح استیل کولین بهبود بخشند [۶۲].

میاستنی گراویس نوعی فلج ماهیچه‌ای است که علت آن فعالیت ایمنی علیه پروتئین‌های گیرنده استیل کولین در محل سیناپس عصبی-عضلانی است. مهارکننده‌های AChE که قادر به عبور از سد خونی مغزی نیستند به‌عنوان درمان‌های کلینیکی مرتبط با میاستنی گراویس شامل به کار می‌روند. همچنین مهارکننده‌های کولین‌استراز می‌توانند در درمان گلوکوم که یک عامل جهانی منجر شونده به نابینایی است نیز مفید باشند [۶۳]. به‌طور کلی، افزایش فشار حاصل از تجمع مایع داخل چشم منجر به تخریب سلول‌های عصبی نوری و سلول‌های گانگلیونی شبکیه می‌شود. استراتژی‌های کاهش فشار داخل چشم به‌عنوان رویکردهایی برای درمان اکثر اشکال گلوکوم به اثبات رسیده‌اند [۶۴] تجویز یک مهارکننده کولین‌استراز، می‌تواند انقباض عضله مژگانی را تسهیل کرده و فشار داخل چشم را کاهش دهد [۶۵].

بیماری آلزایمر (AD)<sup>۱</sup> عامل اصلی زوال عقل که بیش از ۸۰ درصد موارد زوال عقل در افراد مسن را شامل می‌شود. علیرغم تأثیر آن بر جامعه سالخورده، عوامل اصلی ایجادکننده و ارتباط آن‌ها با یکدیگر هنوز به درستی درک نشده است. این امر باعث می‌شود که درمان AD به یکی از چالش‌های مهم این قرن تبدیل شود. تجمع پپتید آمیلوئید- $\beta^2$  که ماده اصلی تشکیل‌دهنده پلاک‌های پیر سالی خارج سلولی می‌باشد و همچنین هایپرفسپوریلایسیون پروتئین تاو<sup>۳</sup> که منجر به شکل‌گیری لایه‌های نوروفیبریل درون سلولی (NFTs) می‌شوند، از اصلی‌ترین و اولین علائم پاتولوژی بیماری آلزایمر، به شمار می‌روند [۵۷، ۶۶]. به نظر می‌رسد استیل کولین استراز تولید فیبریل  $A\beta$  را نیز تشدید می‌کند. دخالت آنزیم استیل کولین استراز در این فرایند به دلیل وجود یک جایگاه پیونددهنده به نام جایگاه آنیونی محیطی<sup>۴</sup> (PAS) می‌باشد که در ورودی شکاف جایگاه فعال آنزیم واقع شده است. نشان داده شده است که اتصال پروتئین پیش ساز آمیلوئید بتا به PAS منجر به تسریع تجمع  $A\beta$  می‌شود؛ بنابراین مهارکننده‌های این آنزیم نیز می‌توانند سبب مهار این تجمع شوند [۶۷]. اهمیت و عملکرد PAS در AChE کاملاً مشخص است، درحالی‌که فقط مطالعات محدودی برای توصیف نقش PAS در آنزیم BuChE انجام شده است [۶۸].

نقش BuChE در بیماری آلزایمر بسیار بحث‌برانگیز است. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، این آنزیم در درجه اول در کبد برای انتشار به گردش خون سیستمیک تولید می‌شود و نقش اصلی این آنزیم، غیرفعال کردن انواع مختلف استرهای فعال زیستی موجود در غذاهایی با منشأ گیاهی است که در غیر این صورت ممکن است سمی باشند؛ اما مکان دوم تولید آنزیم BuChE در مغز است که در آنجا در غیرفعال کردن استیل کولین نقش دارد و از این طریق در تنظیم مسیرهای عصبی کلیدی شرکت می‌کند. همچون AChE، BuChE هم در تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی مرتبط با نورون‌های در حال تخریب در آلزایمر مؤثرند. این ویژگی‌ها بسیاری از

---

<sup>1</sup> Alzheimer's disease

<sup>2</sup> Beta Amyloid

<sup>3</sup> Tau Proteins

<sup>4</sup> Peripheral Anionic Site

متخصصان مغز و اعصاب را متقاعد کرده است که BChE نقش مهمی در بیماری‌زایی آلزایمر داشته و یا حتی می‌تواند یک محرک اصلی باشد. این دیدگاه منجر به انجام آزمایش‌های بالینی با استفاده از مهارکننده‌های انتخابی BuChE مانند سیمسرین<sup>۱</sup> شد که نشان داد قادر است توانایی یادگیری را افزایش داده و بر سرکوب رسوب آمیلوئید اثرگذار باشد. علاوه بر این، یافته‌های بالینی اخیر نشان داده‌اند که مهارکننده‌های انتخابی BuChE ممکن است از مهارکننده‌های استیل‌کولین‌استراز در موارد شدید AD مؤثرتر باشند، متأسفانه هیچ‌یک از مهارکننده‌های انتخابی BuChE آزمایش‌شده قادر به کند کردن روند مرگ عصبی و از دست رفتن توانایی‌های شناختی غیرقابل‌برگشت نبودند؛ به عبارت دیگر، این داروها در واقع می‌توانند به‌عنوان تسکین‌دهنده بیماری مفید باشند، اما اصلاح‌کننده بیماری نیستند [۵۰].

#### ۱-۳-۲- مهارکننده‌های آنزیم‌های کولین‌استراز و اهمیت درمانی آن‌ها

همان‌طور که گفته شد؛ هرچند مهارکننده‌های کولین‌استراز برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها کاربرد دارند، اما ممکن است باعث بروز سمیت هم بشوند. تعداد قابل‌توجهی از میکروارگانسیم‌ها، گیاهان و قارچ‌ها ترکیبات با خاصیت آنتی‌کولین‌استرازی را تولید می‌کنند [۶۹-۷۱].

هر شرایطی که فعالیت گیرنده‌های استیل‌کولین در سیناپس‌های کولینرژیک را کاهش دهد، می‌تواند توسط یک مهارکننده کولین‌استراز تا حدی یا کاملاً تسکین و کنترل شود. چنین شرایطی شامل اختلالات عصبی عضلانی، اختلال عملکرد سیستم خودمختار و بیماری آلزایمر می‌باشد. در همگی این شرایط، نقص فعالیت گیرنده کولینرژیک وجود دارد که با مهار AChE قابل‌ترمیم است. البته همان‌طور که گفته شد مهار بیش‌ازحد AChE در این بیماران می‌تواند به‌جای درمان، به سمیت غیرانتخابی منجر شود. مقادیر ناکافی BChE نمی‌تواند به‌طور کارآمد استرهای موجود در غذا و داروهای مبتنی بر استر را تجزیه و پاک‌سازی کند، در نتیجه به‌طور بالقوه منجر به سمیت در بدن می‌شود [۵۰].

---

<sup>۱</sup> Cymserine

مهارکننده‌های استیل‌کولین‌استراز موادی هستند که اثر اصلی آن‌ها جلوگیری از هیدرولیز انتقال‌دهنده عصبی استیل‌کولین است. داروهای مورد تأیید سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) که به‌عنوان مهارکننده‌های کولین‌استراز در درمان آلزایمر استفاده می‌شوند، شامل موارد زیر است: گالانتامین<sup>۱</sup>، تاکرین<sup>۲</sup>، ریواستیگمین<sup>۳</sup>، دونپزیل<sup>۴</sup>. تاکرین مشتق آکریدین اولین مهارکننده کولین‌استراز است که توسط FDA در سال ۱۹۹۳ برای درمان بیماری آلزایمر مورد تأیید قرار گرفت؛ اما به دلیل نیمه‌عمر کوتاه و همچنین شواهدی مبنی بر ایجاد سمیت کبدی، تجویز آن متوقف و در سال ۲۰۱۲ از بازار خارج شد [۶۲]. مطالعات اخیر در مورد اثر مهارکننده‌های کولین‌استراز در بیماری آلزایمر نشان داد که هر سه داروی دونپزیل، ریواستیگمین و گالانتامین اثرات قابل‌توجهی از جمله افزایش شناخت و بهبود پیامدهای رفتاری را ایجاد می‌کنند، درحالی‌که هیچ‌کدام منجر به بروز سمیت جدی نمی‌شوند [۷۲]. ریواستیگمین که در سال ۲۰۰۰ توسط FDA به تصویب رسید یک مشتق مصنوعی از فیزوستیگمین<sup>۵</sup> است [۷۳] فیزوستیگمین به‌خودی‌خود یک مهارکننده قوی AChE است اما به دلیل اشکال در توانایی تحمل آن که عوارض جانبی زیادی را دارا می‌باشد، برای درمان بیماری آلزایمر مناسب نیست. یکی دیگر از داروهای مصنوعی که برای درمان بیماری آلزایمر استفاده می‌شود دونپزیل است که در سال ۱۹۹۶ مورد تأیید قرار گرفت [۷۴]. دونپزیل کلاس جدیدی از مهارکننده‌های کولین‌استراز را نشان می‌دهد که در مقایسه با درمان‌های قبلی بیماری آلزایمر، فعالیت طولانی‌تر و انتخابی‌تر را نشان می‌دهد و عوارض جانبی آن به‌آسانی کنترل می‌شوند.

از نظر شیمیایی، دونپزیل به‌عنوان یک مشتق پپیریدین<sup>۶</sup> طبقه‌بندی می‌شود و مهارکننده‌ای برگشت‌پذیر غیررقابتی و توانمند در مهار AChE است که قدرت مهاری ضعیفی در برابر

---

<sup>1</sup> Galantamine

<sup>2</sup> Tacrine

<sup>3</sup> Rivastigmine

<sup>4</sup> Donepezil

<sup>5</sup> Physostigmine

<sup>6</sup> Piperidine

BChE دارد. گالانتامین یکی دیگر از مهارکننده‌های کولین استراز مورد تأیید است که عمدتاً در برابر AChE فعال است و در معالجه بیماری آلزایمر استفاده می‌شود [۷۵]. اگرچه در اصل از منابع طبیعی جدا شده است، اما اکنون به صورت صنعتی تولید می‌شود. گالانتامین مهارکننده رقابتی برای AChE و همچنین یک مدولاتور آلوستریک گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین است. علاوه بر درمان بیماری آلزایمر، مهارکننده‌های AChE برای درمان فرم‌های دیگری از زوال عقل و اختلالات CNS نیز به کار می‌روند [۷۶]. نئوستیگمین نیز مشتق فیزوستیگمین می‌باشد که قادر به عبور مؤثر از سد خونی مغزی نیستند. در عوض از این داروها می‌توان برای هدف‌گیری انتخابی سیستم عصبی محیطی، به‌عنوان شل‌کننده‌های عضلانی و برای درمان میاستنی‌گراویس استفاده کرد [۶۲].

همان‌طور که گفته شد، متأسفانه استفاده از این داروها برکند شدن روند پیشرفت بیماری آلزایمر تأثیر چندانی ندارد. گزارش شده است که گالانتامین با کاهش درصد مرگ همراه است، در حالی که بانک‌های اطلاعاتی فارماکیوگیلانسی در هر دو ایالات متحده و کانادا افزایش نسبت احتمال مرگ با ریواستیگمین را گزارش نموده‌اند [۷۷]؛ بنابراین، در حالی که مهارکننده‌های فعلی کولین استراز مزایای درمانی جزئی دارند، جستجو برای مهارکننده‌های مؤثرتر یا چندمنظوره که بر روی آنزیم‌های کولین استراز و سایر اهداف ماکرو مولکولی عمل می‌کنند، ادامه دارد [۵۰، ۷۸-۸۰].

#### ۱-۴- آنتی کولین استرازهای مشتق شده از قارچ‌ها

مطالعات انجام‌شده در گذشته، بر روی یکسری از گونه‌های قارچی باهدف شناسایی ترکیبات دارویی با منشأ طبیعی نشان می‌دهند که متابولیت‌های ثانویه قارچی می‌توانند مهارکننده‌های توانمندی برای آنزیم‌های کولین استراز باشند. به‌طور مثال، بیرولوکینون<sup>۱</sup> استخراج‌شده از قارچ کلادونیا ماسیلنتا<sup>۲</sup> فعالیت آنتی کولین استرازی از خود نشان داده است. از آنجایی که بیشتر

<sup>۱</sup> Biruloquinone

<sup>۲</sup> Cladonia macilenta

متابولیت‌های ثانویه این قارچ از ترکیبات فنولیک بوده و دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند، این فرض وجود دارد که مهارکننده‌ی استیل کولین استراز در عصاره‌ی این‌گونه می‌تواند علاوه بر کاهش نشانه‌های آلزایمر، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای حفاظت نوروها از اکسیژن فعال و تخریب نورونی باشد. نتایج کار آن‌ها نشان داد که بیرولوکینون نه تنها نشانه‌های بیماری آلزایمر را با بهبود بخشیدن شناخت و ادراک اصلاح می‌کند، بلکه می‌تواند علائم را با حفاظت نوروهای آسیب‌دیده، کند یا متوقف کند؛ بنابراین این ترکیب پتانسیل زیادی به‌عنوان یک عامل ضد آلزایمر از خود نشان داد [۸۱]. مجموعه‌ای از مروتروپنوئیدهای جدید به نام اسپروورسین<sup>۱</sup> A-G از قارچ اسپرژیلوس ورسیکالر<sup>۲</sup> دریای جنوبی چین جدا شد. آزمایش اولیه در برابر AChE انسانی انجام و همگی فعالیت مهاری را نشان دادند. قوی‌ترین فعالیت مربوط به اسپروورسین G نشان داده شد [۶۲]. همچنین مطالعاتی که بر روی اسپرژیلوس ترئوس انجام گرفته است نشانگر فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی متابولیت‌های ثانویه این‌گونه نیز می‌باشد. ترکیبات مروتروپنوئیدی از قبیل ترئولاکتون‌ها<sup>۳</sup>، آریزوگاسین‌ها<sup>۴</sup> و تری‌ترم‌های<sup>۵</sup> استخراج‌شده از قارچ اسپرژیلوس ترئوس، مانند ایزوترئولاکتون A<sup>۶</sup> [۸۲] و D، territrem B و E فعالیت مهارکنندگی قابل‌توجهی در برابر AChE با مقادیر کم IC<sub>50</sub> در محدوده‌های میکرومولار و نانومولار از خود نشان دادند [۶۲]. همچنین آنالیز عصاره اتیل‌استاتی قارچ اسپرژیلوس ترئوس منجر به شناسایی ترکیب آکالوئیدی جدید ۱۶- $\alpha$ -هیدرو کسی ۵-N- استیل آردیمین<sup>۷</sup> با فرمول شیمیایی (C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) شد. که این ترکیب با منشأ طبیعی نیز فعالیت مهاری زیادی در برابر آنزیم استیل‌کولین‌استراز از خود نشان داده است [۸۳]. بنابراین

- 
- <sup>1</sup> Asperversin
  - <sup>2</sup> Aspergillus versicolor
  - <sup>3</sup> Terreulactones
  - <sup>4</sup> Arisugacins
  - <sup>5</sup> Territrems
  - <sup>6</sup> Isoterreulactone A
  - <sup>7</sup> 16 $\alpha$ -hydroxy-5 N-acetylardeemin

ترکیبات تولیدشده توسط گونه‌های مختلف قارچی در شرایط رشد متفاوت، می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌های مناسبی جهت مهار آنزیم‌های کولین‌استرازی پیشنهاد شوند.

#### ۱-۵- هدف از پژوهش

بررسی این موضوع که آیا متابولیت‌های ثانویه تولید و ترشح‌شده در مایع تلقیح<sup>۱</sup> متعلق به این ۱۲ نمونه قارچ اسپرژیلوس می‌توانند مهارکننده‌های توانمندی برای آنزیم‌های کولین‌استرازی باشند و از آن‌ها به‌منظور طراحی داروهای جدید برای آلزایمر استفاده نمود و همچنین تعیین ترکیب شیمیایی عصاره قارچ‌هایی که بیشترین فعالیت آنتی کولین‌استراز را از خود نشان می‌دهند.

---

<sup>۱</sup> Fermentation Broth

# فصل دوم

## مواد و روش‌ها



## ۲-۱- مواد

### ۲-۱-۱- قارچ‌های استفاده‌شده در این بررسی

قارچ‌های مورد استفاده در این مطالعه، توسط آقای دکتر ابراهیم صداقتی (مشاور پایان‌نامه مذکور) عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان تأمین شدند (جدول ۲-۱). هریک از این نمونه‌ها از محیط‌هایی مانند خاک، درخت و پوست پسته جدا شده‌اند.

جدول ۲-۱ لیست گونه‌های قارچی استفاده‌شده در این پژوهش.

<i>A1-Aspergillus flavus</i>	<i>A5-Aspergillus tubingensis*</i>	<i>A9-Aspergillus carbonarius</i>
<i>A2-Aspergillus Japonicus</i>	<i>A6-Aspergillus tubingensis</i>	<i>A10- Eurotium heterocaryoticum</i>
<i>A3- Chaetosartorya chrysella</i>	<i>A7-Aspergillus tubingensis</i>	<i>A11-Aspergillus Tamarii</i>
<i>A4-Aspergillus niger</i>	<i>A8-Aspergillus tubingensis</i>	<i>A12- Eurotium Heterothallic</i>

\* از چهار جدایه مختلف قارچ *Aspergillus tubingensis* استفاده‌شده است.

### ۲-۱-۲- مواد و ابزار مورد استفاده جهت کشت و عصاره‌گیری

محیط کشت جامد (PDA)<sup>۱</sup> و مایع پتیتو دکستروز<sup>۲</sup> (PDB)، ارلن، کاغذ صافی واتمن از شرکت واتمن انگلستان، اتیل‌استات تهیه‌شده از شرکت مرک آلمان، دستگاه تبخیرکننده حلال<sup>۳</sup>، آون تحت خلأ.

### ۲-۱-۳- مواد و ابزار مورد استفاده در سنجش قدرت مهار آنزیمی

متانول تهیه‌شده از شرکت مرک، آنزیم استیل‌کولین‌استراز از شرکت سیگما، استیل تیوکولین یدید از شرکت Solarbio به‌عنوان سوبسترای آنزیم استیل‌کولین‌استراز، DTNB<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> Potato Dextrose Agar

<sup>۲</sup> Potato Dextrose Broth

<sup>۳</sup> Rotary evaporator

<sup>۴</sup> 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌کولین‌استراز، آنزیم بوتیریل کولین‌استراز از شرکت سیگما، بیکربنات سدیم<sup>۱</sup>، بوتیریل تیوکولین از شرکت سیگما به‌عنوان سوبسترای آنزیم بوتیریل کولین‌استراز، نئوستیگمین خریداری شده از شرکت سیگما، بی‌کربنات سدیم از شرکت مرک، BSA (آلبومین سرم گاوی)، K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> و KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> جهت تهیه بافر فسفات پتاسیم از شرکت مرک، محلول تریس هیدروکلریک اسید (Tris-HCL) خریداری شده از شرکت مرک، پلیت ۹۶ خانه ته صاف، دستگاه میکروپلیت ریدر (الایزا ریدر) ELX-808 ساخت کمپانی بایوتک آمریکا<sup>۲</sup>.

۴-۱-۲- مواد مورد استفاده در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)<sup>۳</sup> و آسکوربیک اسید از شرکت سیگما.

۵-۱-۲- مواد مورد استفاده جهت تعیین مقدار فنل کل

گالیک‌اسید، کربنات سدیم<sup>۴</sup> و معرف فولین N ۰/۲ از شرکت مرک.

۶-۱-۲- مواد مورد استفاده جهت تجزیه و آنالیز متابولیت‌ها

دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی (GC Agilent 7890, MS Agilent 5975) ساخت کشور آمریکا موجود در دانشگاه علوم پزشکی کرمان، BSTFA + 1% TMCS<sup>۵</sup>، پیریدین.

---

<sup>1</sup> NaHCO<sub>3</sub>

<sup>2</sup> Biotek microplate reader ELX-808

<sup>3</sup> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

<sup>4</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

<sup>5</sup> N, O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane

## ۲-۲- محلول‌ها و محیط کشت

### ۱-۲-۲- محیط کشت مایع PDB

به ۲۵۰ گرم سیب‌زمینی تازه پوست‌کنده که چهار قسمت شده‌اند (البته قطعه‌ها نباید خیلی کوچک برش داده شوند) یک لیتر آب افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده و کاملاً پخته شدند سپس عصاره آن را به وسیله پارچه‌ای می‌گیریم به طوری که زلال باشد و هیچ نشاسته‌ای در آن وارد نشود (سیب‌زمینی نباید له بشود). به هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از این عصاره مقدار ۳ گرم بلور گلوکز (به‌عنوان منبع کربن موردنیاز قارچ) افزوده و با آب مقطر به حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

### ۲-۲-۲- محیط کشت جامد PDA

به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB حاصل از مراحل فوق، ۲ گرم آگار افزوده شد و بعد از استریل شدن توسط اتوکلاو، داخل پتری‌دیش‌ها ریخته و بعد از سرد شدن آماده کشت شدند.

### ۳-۲-۲- بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار

جهت تهیه محلول  $K_2HPO_4$  با غلظت ۰/۱ مولار، مقدار  $1/7414$  گرم از این پودر با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جهت تهیه محلول  $KH_2PO_4$  با غلظت ۰/۱ مولار،  $0/68045$  گرم از این پودر با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. همان‌طور که از فرمول شیمیایی محلول  $KH_2PO_4$  مشخص است، این محلول نسبت به محلول  $K_2HPO_4$  از pH پایین‌تری برخوردار می‌باشد که دستگاه pH سنج، pH تقریباً برابر با ۶ را برای این محلول و pH تقریباً برابر با ۹ را برای  $K_2HPO_4$  نشان می‌دهد. از این دو محلول جهت ساخت بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH های ۷، ۷/۵ و ۸ استفاده شد. بدین ترتیب که از محلول  $KH_2PO_4$  به‌منظور رساندن pH محلول  $K_2HPO_4$  به محدوده موردنظر استفاده گردید.

۴-۲-۲- محلول بافر Tris-HCl با pH=۷/۵

مقدار ۰/۰۱۵۷ گرم پودر تریس هیدروکلریک اسید در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس توسط محلول NaOH مقدار pH آن به ۷/۵ رسانده شد.

۵-۲-۲- محلول BSA با غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

برای تهیه محلول BSA با غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۸ میلی‌گرم از پودر BSA با محلول تریس هیدروکلریک اسید با pH= ۷/۵ به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول‌ها پس از آماده‌سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۶-۲-۲- آنزیم استیل‌کولین‌استراز ۴ واحد بر میلی‌لیتر

بدین منظور، ۱ میلی‌گرم آنزیم استیل‌کولین‌استراز (معادل با ۳۰۳ واحد بر میلی‌لیتر) را با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH= ۷/۵) حاوی BSA، طی چند مرحله رقیق‌سازی به محلول آنزیم استیل‌کولین‌استراز ۴ واحد بر میلی‌لیتر تبدیل شد. در نهایت محلول آنزیمی در حجم‌های کوچک تقسیم‌بندی و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۷-۲-۲- محلول سوبسترای ۲۰ میلی‌مولار استیل‌تیوکولین‌یدید

به‌منظور تهیه محلول ۲۰ میلی‌مولار استیل‌تیوکولین‌یدید به‌عنوان سوبسترای آنزیم استیل‌کولین‌استراز، ۵/۸ میلی‌گرم استیل‌تیوکولین‌یدید توسط ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۸ pH= به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد.

۸-۲-۲- محلول ۱۰ میلی‌مولار DTNB (معرف‌المن)

برای تهیه محلول ۱۰ میلی‌مولار DTNB، ۷/۸۲ میلی‌گرم DTNB و ۳ میلی‌گرم بی‌کربنات سدیم توسط بافر فسفات ۷ pH= به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد.

۲-۲-۹- محلول آنزیمی بوتیریل کولین استراز ۴ واحد بر میلی لیتر

تهیه محلول آنزیمی بوتیریل کولین استراز ۴ واحد بر میلی لیتر، با رقیق سازی ۱ میلی گرم آنزیم (معادل ۱۴۰ واحد بر میلی لیتر) توسط بافر فسفات (pH= ۷/۵) حاوی BSA، طی چند مرحله انجام شد. سپس محلول آنزیمی به حجم های کوچک تقسیم بندی و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۲-۱۰- محلول سوبسترای بوتیریل تیوکولین ۲۰ میلی مولار

برای تهیه محلول ۲۰ میلی مولار بوتیریل تیوکولین به عنوان سوبسترای آنزیم بوتیریل کولین استراز، ۱۲/۷ میلی گرم از پودر این سوبسترا توسط بافر فسفات ۸ pH به حجم ۲ میلی لیتر رسانده شد.

۲-۲-۱۱- محلول DPPH ۰/۰۸ میلی گرم بر میلی لیتر

به منظور تهیه محلول DPPH، ۲ میلی گرم پودر DPPH توسط متانول حل و به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. این محلول درون ظرف تیره جهت محافظت در برابر نور و در یخچال نگهداری شد.

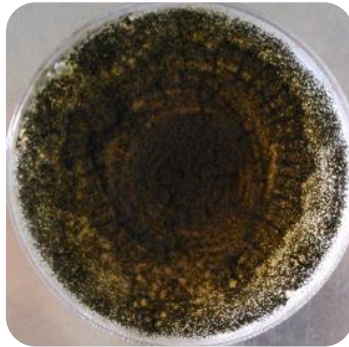
۲-۲-۱۲- محلول کربنات سدیم ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر

۷/۵ میلی گرم از ماده کربنات سدیم توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

۲-۳-۳- روش ها

۲-۳-۱- کشت گونه های قارچی

انتقال پلاک های قارچ از پتری دیش های حاوی محیط PDA (شکل ۲-۱) به ارلن های حاوی محیط کشت PDB استریل شده توسط لوپ در محیط استریل هود لامینار انجام و رشد به مدت ۳۰ روز در انکوباتور با دمای ۳۰°C صورت گرفت (شکل ۲-۲).



شکل ۱-۲ نمونه قارچ آسپرژیلوس رشد یافته در پتری دیش حاوی محیط کشت جامد PDA.



شکل ۲-۲ کشت گونه‌ها در محیط کشت مایع به منظور رشد، تولید و ترشح متابولیت‌ها.

### ۲-۳-۲- جدا کردن هیف قارچ‌ها

پس از گذشت ۳۰ روز از رشد قارچ‌ها در محیط PDB، عمل فیلتراسیون مایع تلقیح قارچ‌ها جهت جداسازی کلنی و هیف قارچ‌ها توسط کاغذ صافی واتمن انجام شد (شکل ۲-۳) و سپس مایع تلقیح برای استفاده جهت استخراج متابولیت‌ها نگهداری شد.



شکل ۲-۳ انجام فیلتراسیون جهت جداسازی هیف از مایع تلقیح قارچ‌ها.

### ۲-۳-۳- استخراج متابولیت‌ها از هر نمونه

نمونه‌های فیلتر شده دومرتبه توسط اتیل‌استات جهت استخراج متابولیت‌ها شسته شدند [۸۴]. بدین منظور؛ به میزان برابر با حجم نمونه، اتیل‌استات افزوده و توسط شیکر به مدت یک ساعت هم زده شدند و سپس به مدت یک ساعت به حالت سکون قرار داده شدند و در نهایت دو فاز مایع تشکیل شد، فاز بالا که شامل اتیل‌استات و متابولیت‌های حل‌شده در آن هستند (شکل ۲-۴) را به درون ارلن دیگری ریخته و فاز زیرین دوباره به مقدار برابر با اتیل‌استات شسته شد. مایع رویی برداشته و به مایع اتیل‌استاتی جداشده از مرحله قبل افزوده شد.



شکل ۲-۴ شستشوی محیط کشت مایع فیلتر شده توسط اتیل‌استات به منظور استخراج متابولیت‌ها.

### ۲-۳-۴- تغلیظ متابولیت‌ها

روش‌های مختلفی برای تغلیظ و جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده یک محلول وجود دارد که یکی از این روش‌ها فرایند تقطیر می‌باشد. در روش تقطیر جدا کردن اجزای یک مخلوط، از روی اختلاف نقطه‌جوش آن‌ها انجام می‌گیرد. تقطیر، معمول‌ترین روشی است که برای خالص‌سازی مایعات به کار می‌رود. در این عمل حلال به کمک حرارت تبخیر می‌شود و بخار مربوطه در ظرف جداگانه‌ای متراکم و محصول تقطیر به دست می‌آید. چنانچه مواد موجود در مایع اولیه فرار نباشند، در باقیمانده تقطیر به جا می‌مانند؛ بنابراین در این مطالعه نیز عصاره‌های اتیل‌استاتی حاوی متابولیت‌های استخراج‌شده با این روش به کمک دستگاه روتاری در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و مکش  $200\text{ Torr}$  تغلیظ شدند (شکل ۲-۵) و اتیل‌استات فرار جدا شد؛ در نهایت عصاره‌های تغلیظ شده

به حجم حدود ۱ میلی‌لیتر باقی ماندند. سپس این عصاره‌ها توسط دستگاه آون تحت خلأ خشک شدند (شکل ۳-۲). نمونه‌ها در  $20^{\circ}\text{C}$  تا زمان انجام تست‌ها نگهداری شدند.



شکل ۲-۵ دستگاه روتاری جهت تغلیظ عصاره‌های اتیل‌استاتی.

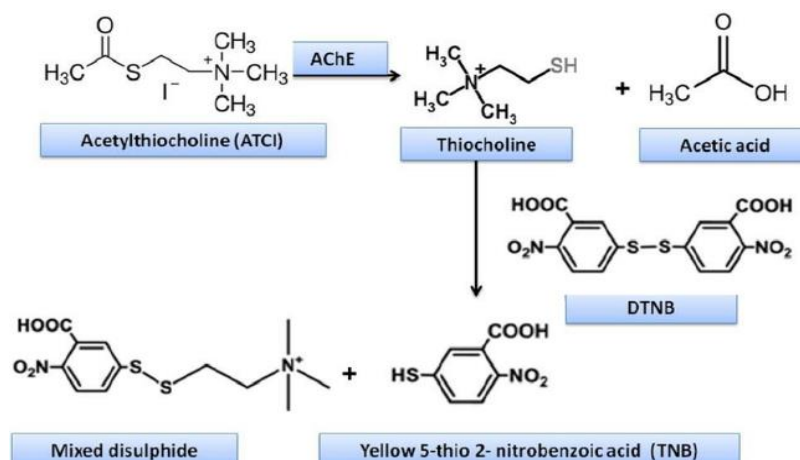
### ۲-۳-۵- بررسی فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی

در این پایان‌نامه فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی عصاره‌های قارچی با استفاده از دو آنزیم استیل و بوتیریل کولین‌استراز توسط روش ال‌من<sup>۱</sup> و همکاران بررسی شد [۸۵, ۸۶]. در این روش از DTNB به‌عنوان معرف واکنش و به ترتیب از استیل تیوکولین و بوتیریل تیوکولین به‌عنوان سوبسترای این دو آنزیم کولین‌استراز استفاده می‌شود. در نتیجه هیدرولیز سوبسترا توسط آنزیم‌های کولین‌استراز، تیوکولین تولید می‌شود که واکنش گروه تیول این ترکیب با معرف ال‌من (DTNB) موجب شکسته شدن پیوند دی‌سولفیدریل DTNB و ایجاد آنیون زردرنگ  $\text{TNB}^{2-}$  در pH خنثی و یا بازی می‌شود که در محدوده ۴۰۵-۴۲۰ نانومتر جذب دارد [۸۶] (شکل ۲-۶)؛ بنابراین با اندازه‌گیری جذب یون  $\text{TNB}^{2-}$  در این محدوده، می‌توان فعالیت آنزیم کولین‌استراز را تعیین نمود [۸۶, ۸۷].

<sup>۱</sup> Elman Method

<sup>۲</sup> 5 -thio-2-nitrobenzoic acid anion





شکل ۲-۶ مکانیسم شیمیایی روش المن [۸۸].

همان طور که در مباحث بالا اشاره شد فعالیت آنی استیل و بوتیریل کولین استرازی نمونه‌های قارچی با استفاده از روش المن انجام شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه، به صورت  $IC_{50}$ <sup>۱</sup> بیان گردید (جدول ۳-۴).  $IC_{50}$  در واقع غلظتی از نمونه است که توانایی مهار فعالیت آنزیمی را به میزان ۵۰ درصد دارد. همه تست‌های آنزیمی در پلیت‌های ۹۶ خانه انجام شدند و از متانول به منظور حل کردن نمونه‌ها استفاده شد.

به منظور تعیین  $IC_{50}$  عصاره‌ها برای دو آنزیم AChE و BuChE، فعالیت آنزیمی در غیاب و حضور شش غلظت مختلف (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) هر عصاره اندازه‌گیری شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و از مهارکننده شناخته شده آنزیم‌های کولین استراز، نئوستیگمین، به عنوان ترکیب استاندارد استفاده شد. حجم کل هر تست آنزیمی ۲۰۰  $\mu$ l در نظر گرفته شد.

مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (PH=۸)، آنزیم (AChE و یا BuChE) با غلظت نهایی ۰/۱ واحد بر میلی‌لیتر و DTNB با غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار بود. عصاره‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس

<sup>۱</sup> The half maximal inhibitory concentration

سوبسترا (استیل تیوکولین یدید و یا بوتیریل تیوکولین یدید) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به مخلوط واکنش افزوده شد و جذب نمونه‌ها بعد از ۱۰ دقیقه در ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Elx808 Biotek Instruments) کنترل شده توسط نرم‌افزار Gen5 خوانده شد.

یک نمونه حاوی همه اجزای واکنش به‌استثنای آنزیم به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. سرعت فعالیت آنزیم در نبود و حضور غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$R = \Delta OD / \text{min } \epsilon l$$

$$\epsilon l = 14140 \times 0.5 = 7070$$

R نشان‌دهنده سرعت فعالیت آنزیم با واحد مولار بر دقیقه،  $\Delta OD$  برابر است با تغییرات جذب،  $\epsilon$  ضریب خاموشی  $\text{TNB}^{2-}$  که برابر است با ۱۴۱۴۰ بر مولار بر سانتی‌متر ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) و L طول مسیر عبور نور می‌باشد که برابر است با قطر چاهک با مقدار ۰/۵ سانتی‌متر.

به‌منظور تعیین درصد مهار فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف هر عصاره، سرعت فعالیت آنزیم در نبود عصاره (نمونه کنترل)، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و درصد مهار برای هر یک از غلظت‌ها محاسبه شد (جدول ۲-۳ و ۳-۳). سپس درصد مهار فعالیت آنزیمی نسبت به تغییرات لگاریتم غلظت (نمودار دوز-پاسخ) برای هر عصاره ترسیم و مقدار  $IC_{50}$  برای هر نمونه با استفاده از معادله خطی ( $Y = aX \pm b$ ) حاصل از نمودار تعیین شد. بدین ترتیب که مقدار Y، ۵۰ در نظر گرفته شد و مقدار X که همان لگاریتم  $IC_{50}$  است محاسبه گردید. در نهایت ۱۰ به توان این عدد رسید و مقدار  $IC_{50}$  به دست آورده شد. هر چه این عدد کمتر باشد نشان‌دهنده قدرت مهاری بیشتر نمونه است. در این تست از داروی تائید شده نئوستیگمین به‌عنوان استاندارد استفاده شد (جدول ۳-۵).

## ۲-۳-۶- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH

به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قارچی از روش DPPH استفاده شد. این روش که یکی از محبوب‌ترین و اغلب متداول‌ترین روش در بین سنجش‌های آنتی‌اکسیدانی است روشی ساده، کارآمد، نسبتاً ارزان و سریع محسوب می‌شود [۸۹].

روش DPPH توسط Blois ایجاد [۹۰] و توسط Brand-Williams [۹۱] اصلاح شد تا فرم فعلی مورد استفاده تولید شود. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که دارای رنگ بنفش تیره و جذب قوی در حدود ۵۱۷ نانومتر است. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در محیط، با دادن یک الکترون یا یک اتم هیدروژن به رادیکال DPPH باعث احیا و تبدیل DPPH به یک محصول مولکولی پایدارتر تبدیل می‌شوند. این امر با تغییر رنگ رادیکال DPPH از رنگ بنفش به رنگ زرد کم‌رنگ که فرم کاهش‌یافته DPPH است همراه می‌باشد و در نهایت فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات با طیف‌سنجی این تغییر رنگ امکان‌پذیر می‌باشد و در نهایت نتایج به صورت  $IC_{50}$  (غلظتی از آنتی‌اکسیدان که باعث پاک‌سازی ۵۰٪ DPPH می‌شود) بیان می‌شوند [۸۹]. تعیین فعالیت نمونه‌ها در مهار رادیکال آزاد بر اساس این روش انجام شد.

مقدار ۷۵۰  $\mu$ l از محلول DPPH به ۲۵۰  $\mu$ l نمونه حل شده در متانول با غلظت ۲۰۰  $\mu$ g/ml افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شدند. سپس جذب آن در طول موج ۵۱۷nm اندازه‌گیری شد. این سنجش در شش غلظت (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲ و ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برای هر غلظت سه تکرار انجام شد. در این تست، از متانول و محلول DPPH به عنوان نمونه شاهد و از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد (شکل ۳-۳) و (جدول ۳-۷).

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH که نشانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها است توسط فرمول زیر محاسبه شد. در این فرمول،  $A_{blank}$  نشان‌دهنده مقدار جذب شاهد و  $A_{sample}$  نشان‌دهنده مقدار جذب نمونه مورد نظر می‌باشند.

$$[(A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank}] * 100$$

به منظور تعیین غلظتی از نمونه که توانایی مهار رادیکال DPPH را به میزان ۵۰٪ دارد (IC<sub>50</sub>)، نمودار درصد مهار DPPH نسبت به لگاریتم غلظت برای هر نمونه رسم و با استفاده از معادله خط به دست آمده (Y = aX ± b)، IC<sub>50</sub> محاسبه گردید. بدین ترتیب که Y را برابر با ۵۰ قرار داده و مقدار X که همان لگاریتم IC<sub>50</sub> است محاسبه شد. در نهایت ۱۰ به توان این عدد رسید و IC<sub>50</sub> به دست آمد.

### ۲-۳-۷- تعیین مقدار IC<sub>50</sub> در مهار DPPH

از معادله Y = aX ± b حاصل از جایگذاری درصدهای قدرت آنتی‌اکسیدانی در نمودار، استفاده شد. بدین جهت Y محاسبه کرده و سپس با به دست آوردن ln(x)، مقدار IC<sub>50</sub> تعیین می‌شود (جدول ۳-۶).

### ۲-۳-۸- تعیین مقدار فنل کل

روش فولین سیوکالتو<sup>۱</sup> (FC) یک روش تحلیلی برای تعیین پلی فنل‌های کل در مواد بیولوژیکی است. بسیاری از داده‌های کمی بر اساس روش FC گزارش شده‌اند. ترکیبات فنلی موجب کاهش Mo<sup>6+</sup> موجود در معرف فولین سیوکالتو<sup>۲</sup> (FCR) که به رنگ زرد است به Mo<sup>5+</sup> (رنگ آبی) می‌شوند. این امر در محدوده طول موج ۵۵۰ تا ۷۵۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. مخلوط FCR و ترکیبات فنلی در اسید پایدار است اما در محلول قلیایی ناپایدار است؛ بنابراین، کربنات سدیم که برای تهیه یک محیط قلیایی استفاده می‌شود، برای واکنش بسیار مهم است. روش FC روشی راحت و ساده است. روش FC نیازی به تجهیزات خاصی ندارد و می‌تواند در توصیف و استانداردسازی نمونه‌های گیاه‌شناسی مفید باشد. یک مزیت عمده روش FC این است که پاسخ مشابهی در برابر مواد مختلف فنلیک موجود در نمونه دارد و آن را برای

<sup>1</sup> Folin-Ciocalteu

<sup>2</sup> Folin-Ciocalteu Reagent

اندازه‌گیری دقیق ترکیبات فنلی کل مناسب می‌کند [۹۲]. به‌منظور تعیین ترکیبات فنلی کل نمونه‌ها به روش زیر عمل شد:

ابتدا  $100\ \mu\text{l}$  معرف فولین  $0/2$  نرمال،  $10\ \mu\text{l}$  نمونه محلول در متانول با غلظت  $200\ \mu\text{g/ml}$  و  $590\ \mu\text{l}$  آب مقطر باهم مخلوط شدند. بعد از یک دقیقه،  $300\ \mu\text{l}$  کربنات سدیم به این مخلوط اضافه گردید و پس از آنکه نمونه به مدت  $30$  دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد، مقدار جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج  $735$  نانومتر ثبت شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. از مخلوط  $600\ \mu\text{l}$  آب مقطر،  $100\ \mu\text{l}$  فولین و  $300\ \mu\text{l}$  کربنات سدیم به‌عنوان نمونه شاهد این تست استفاده شد.

از گالیک‌اسید به‌عنوان استاندارد جهت تعیین مقدار فنل کل نمونه‌ها استفاده شد، بدین ترتیب که تمامی عملیات بالا بر روی شش غلظت مختلف گالیک‌اسید ( $15$ ،  $10$ ،  $7/5$ ،  $5$ ،  $2/5$  و  $0/62$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) انجام شد و سپس تغییرات جذب نسبت به غلظت (نمودار استاندارد) توسط نرم‌افزار اکسل رسم و بر اساس معادله خط حاصل (شکل  $3-5$ )، مقدار فنل کل برحسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره برای هر نمونه تعیین شد (شکل  $3-4$ ).

## ۲-۳-۹- آنالیز عصاره‌ها

کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) روشی برای آنالیز ترکیبات آلی فرار و نیمه فرار است. دستگاه GC/MS از تلفیق دو دستگاه کروماتوگرافی گازی و اسپکترومتری جرمی تهیه شده است. بخش GC جهت جداسازی و اندازه‌گیری مواد فرار در حد مقادیر ناچیز با استفاده از ستون باریک با کنترل دمایی استفاده می‌شود. این دستگاه گاز کروماتوگرافی، مستقیماً به طیف‌سنج جرمی متصل می‌گردد؛ و بخش MS به‌عنوان آشکارساز جرمی جهت شناسایی ترکیبات جدا شده به کار می‌رود. طیف‌سنج جرمی به علت حساسیت زیاد، تکنیک بسیار مناسبی برای به دست آوردن اطلاعات در مورد مقادیر ناچیز موادی که در دستگاه کروماتوگرافی جداسازی آن‌ها صورت می‌گیرد، می‌باشد.

بنابراین، این دو تکنیک در کنار هم روش مناسبی برای تعیین اجزای محلول‌هایی مثل عصاره‌ها می‌باشند. این روش برای هر جزئی که توسط کروماتوگرافی گازی جدا شده باشد، حتی در حد نانوگرم می‌توان طیفی را به دست آورد و از طریق تعیین هر یک از این طیف‌ها به مواد متشکله پی برد.



شکل ۲-۷ دستگاه GC-MS مورد استفاده جهت شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره‌ها

نقطه‌ضعف اصلی GC-MS این است که ترکیبات قطبی یا فرار ضعیف نیاز به یک مرحله مشتق شدن دارند که تهیه نمونه را پیچیده می‌کند. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره قارچی ترکیبات غیر فرار با گروه‌های قطبی هستند و به‌طور کلی برای تجزیه و تحلیل GC-MS مناسب نیستند زیرا در درجه حرارت بالا هنگام تبخیر در انژکتور دستگاه GC بسیار مستعد تجزیه هستند. به‌منظور کاهش خطر تجزیه، قبل از انجام GC-MS، متابولیت‌های با گروه‌های عاملی قطبی باید به سایر موادی که به‌آسانی تشخیص داده می‌شوند (مشتق شدن) تبدیل شوند. اگرچه اندازه‌گیری توسط GC-MS می‌تواند برای برخی از ترکیبات قطبی بدون مشتق سازی نمونه‌ها امکان‌پذیر باشد، این روش به‌منظور کاهش قطبیت گروه‌های عملکردی، تسهیل جدایی سازی توسط کروماتوگرافی گازی و افزایش حساسیت توصیه می‌شود. مشتق سازی ترکیبات برای GC-MS با استفاده از یک معرف انجام می‌شود که با هیدروژن فعال واکنش می‌دهد [۹۳].

## ۲-۳-۹-۱- آماده‌سازی نمونه جهت انجام کروماتوگرافی

مشق سازی برای غربالگری متابولیت‌های تولیدشده قبل از GC-MS یک مرحله مقدماتی اساسی است که باعث کاهش قطبیت و افزایش نوسانات و هم‌زمان پایداری حرارتی متابولیت‌ها می‌شود. مشتق شدن چندجزیی بر اساس یکی از واکنش‌های سیلیلاسیون، آلکیلاسیون یا آسیلاسیون است و طیف گسترده‌ای از معرف‌ها با خواص مختلف در دسترس هستند. مطالعات جامع، برتری عوامل سیلیلاسیون را نشان می‌دهد که جایگزین پروتون‌های متصل به هترواتم‌ها در گروه‌های عاملی (OH، -NH، -SH و غیره) می‌شوند [۹۳]. بدین منظور، حدود یک میلی‌گرم از عصاره اتیل‌استاتی کاملاً خشک‌شده را با ۴۰ میکرولیتر 1% TMCS + BSTFA و ۳۰ میکرولیتر پیریدین ترکیب کرده و به مدت یک ساعت در بن ماری دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و هر ۱۰ دقیقه تکان داده شد، سپس جهت انجام GC-MS ارائه شد.

## ۲-۳-۹-۲- تفکیک به کمک GC-MS

اجزای فعال بیولوژیکی عصاره اتیل‌استاتی به‌دست‌آمده از سویه‌ها از طریق دستگاه کروماتوگرافی گازی\_طیف‌سنج جرمی (MS Agilent 5975, GC Agilent 7890) دارای ستون HP-5 موردبررسی قرار گرفت. میزان جریان گاز حامل هلیوم ۱ ml/min و دما در ۵۰°C به مدت ۱ دقیقه حفظ شد. سپس افزایش دما از ۳۰۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵°C/min انجام شد. دمای درگاه انژکتور در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و خط انتقال در ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گستره جرمی در محدوده ۴۵-۶۰۰ M/Z ثبت شد [۹۴]. طیف‌های حاصل از آنالیز اجزا موجود در این عصاره‌ها ثبت (شکل ۳-۶ و ۳-۷) سپس جهت شناسایی با طیف‌های استاندارد موجود در کتابخانه Wiley و NIST تطابق داده شدند (جدول ۳-۸ و ۳-۹).

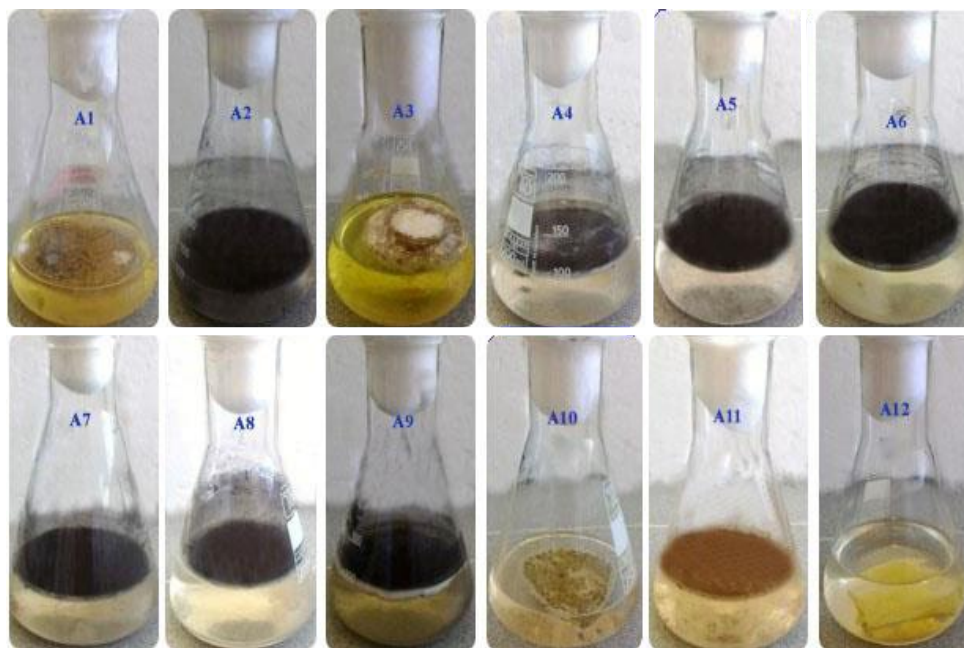
**فصل سوم**

**نتایج**



### ۳-۱- کشت نمونه‌ها

همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد به‌منظور استخراج و بررسی متابولیت‌های تولیدشده توسط این گونه‌های آسپرژیلوس، قارچ‌های رشد یافته در پتری دیش‌های محیط کشت جامد به ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع استریل منتقل شدند و به مدت ۳۰ روز در انکوباتور به‌منظور رشد، تولید و ترشح متابولیت‌ها نگهداری شدند.



شکل ۳-۱ وضعیت کشت گونه‌های قارچی بعد از ۳۰ روز.

### ۳-۲- نتایج عصاره‌گیری

عصاره‌گیری طبق مراحل بیان‌شده در بخش قبل انجام شد. این گونه‌ها پس از انجام مراحل استخراج توسط اتیل‌استات، تغلیظ و خشک شدن عصاره‌ای را برجای گذاشتند که هرکدام دارای رنگ‌های متفاوت قهوه‌ای، سبز و زرد بودند.

جدول ۱-۳ رنگ عصاره هر یک از نمونه‌ها.

رنگ عصاره	کد نمونه	رنگ عصاره	کد نمونه	رنگ عصاره	کد نمونه
زرد	A9	قهوه‌ای تیره	A5	قهوه‌ای روشن-صورتی	A1
قرمز-قهوه‌ای	A10	قهوه‌ای روشن	A6	قهوه‌ای روشن	A2
قهوه‌ای-زرد	A11	قهوه‌ای	A7	سبز	A3
قهوه‌ای روشن	A12	قهوه‌ای روشن	A8	قهوه‌ای روشن	A4



شکل ۲-۳ نتیجه عصاره خشک شده برخی گونه‌ها.

### ۳-۳- نتایج حاصل از آزمون ال‌من

سنجش فعالیت دو آنزیم استیل و بوتیریل کولین‌استراز طبق روش ال‌من توصیف شده در قسمت قبل انجام شد. داده‌های حاصل در جدول‌های ۲-۳ و ۳-۳ ثبت شده‌اند که شامل درصد مهارکنندگی شش غلظت متابولیت‌های استخراج شده در جهت مهار این آنزیم‌ها است. همچنین  $IC_{50}$  مربوط به هریک از عصاره‌ها در جهت مهار هریک از آنزیم‌های کولین‌استراز، در جدول ۳-۳-۴ نشان داده شده‌اند.

جدول ۲-۳ درصدهای مهار آنزیم استیل کولین استراز در هر غلظت عصاره‌ها را نشان می‌دهد.

غلظت ( $\mu\text{g/ml}$ )						گونه
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	
۹۳/۷۷	۸۳	۷۴/۴۶	۶۵/۰۲	۵۲/۰۲	۴۴/۹۹	A ۱
۹۱/۷۶	۸۰/۷۸	۷۴/۹	۵۹/۳۷	۵۰/۶۲	۳۷/۶۴	A ۲
۹۷/۲۲	۸۱/۴۸	۷۵/۹۲	۵۹/۲۵	۴۴/۸۱	۲۶/۲۳	A ۳
۱۰۰	۹۲/۶	۶۶/۸۴	۵۵/۰۱	۳۶/۱۵	۲۷/۹۵	A ۴
۹۵/۱۱	۸۳/۱۲	۷۶/۵۱	۵۷/۰۲	۴۸/۶۸	۳۰/۵۴	A ۵
۹۷/۵۳	۸۷/۷۷	۶۳/۲۳	۵۰/۹	۴۲/۳۱	۲۲/۸۸	A ۶
۹۹/۷۹	۸۲/۷۸	۵۴/۲۱	۴۰/۲	۲۹/۹۹	۲۱/۶۸	A ۷
۹۶/۳۸	۶۶/۸۹	۵۵/۵۵	۴۴/۵۹	۳۳/۷۸	۲۵/۷	A ۸
۹۵/۲۶	۶۷/۸۱	۵۰/۴۷	۳۴/۵	۲۷/۰۱	۱۶/۸۸	A ۹
۸۷/۹۲	۷۱/۰۹	۶۲/۰۳	۵۶/۸۵	۴۸/۸	۲۶/۷۹	A ۱۰
۶۵/۳۵	۵۴/۹۲	۴۱/۳	۳۰/۲۵	۱۸/۹۹	۱۲/۳۷	A ۱۱
۴۴/۶۷	۳۷/۰۵	۳۳/۵۸	۲۹/۳۵	۲۲/۰۱	۱۱/۸۹	A ۱۲

جدول ۳-۳ نشان‌دهنده درصدهای مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز در هر غلظت عصاره‌ها است.

غلظت ( $\mu\text{g/ml}$ )						گونه
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	
۷۴/۴۹	۶۰/۸۴	۵۲/۶۹	۴۴/۷۸	۳۵/۶۶	۲۳/۱۴	A ۱
۷۷/۳۸	۶۰/۸۵	۴۸/۹	۳۹/۳	۳۲/۰۱	۲۴/۵۲	A ۲
۹۵/۰۵	۷۵/۴۷	۶۰/۳۲	۴۷/۷	۳۲/۹	۲۳/۷۳	A ۳
۹۴/۱	۸۲/۵	۶۵/۶۲	۴۶/۱۸	۳۴/۷	۲۳/۱۲	A ۴
۹۵/۱۱	۸۳/۱۲	۷۶/۵۱	۵۷/۰۲	۴۸/۶۸	۳۰/۵۴	A ۵
۹۶/۷۷	۸۳/۲۳	۶۴/۳۹	۴۴/۴۶	۳۰/۳۴	۱۷/۰۸	A ۶
۷۰/۹۱	۵۹/۰۲	۵۴/۰۵	۴۱	۳۵/۰۴	۲۴/۰۶	A ۷

غلظت (µg/ml)						گونه
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	
۹۷/۰۷	۷۹/۱۲	۶۵/۲۳	۴۰/۳۹	۲۴/۵۷	۱۰/۹۴	A ۱
۸۹/۳۵	۷۵/۲۳	۶۰/۲۹	۴۷/۸۶	۲۹/۹۹	۱۵/۰۱	A ۹
۶۸/۰۲	۶۱/۳	۴۹/۰۱	۴۲/۰۷	۳۵/۰۲	۳۱/۰۲	A ۱۰
۶۴/۹۸	۵۵/۶۲	۷۳/۷۱	۳۸/۵۶	۳۱/۰۲۸	۲۰/۳۳	A ۱۱
۳۸/۱۵	۳۲/۲	۲۴/۸۹	۱۶/۹۶	۱۱/۰۱	۶/۴	A ۱۲

جدول ۳-۴ نشان دهنده مقادیر IC<sub>50</sub> مربوط به هرگونه قارچی در مهار آنزیم‌های کولین استرازی است.

BuChE IC <sub>50</sub> (µg/ml)	AChE IC <sub>50</sub> (µg/ml)	نام گونه‌ها
۱۹۴/۹۸±۰/۲۵	۴۶/۷۷±۰/۰۹	A ۱
۲۱۳/۷۹±۰/۳	۶۳/۰۹±۰/۱	A ۲
۱۳۱/۸۲±۰/۲۲	۸۵/۱۱±۰/۱۲	A ۳
۱۲۳/۱۱±۰/۱۸	۹۷/۷۲±۰/۱۳	A ۴
۷۵/۸۵±۰/۱۱	۱۹۰/۵۴±۰/۲	A ۵
۱۳۴/۸۹±۰/۱۵	۱۰۴/۷۱±۰/۱۲	A ۶
۲۱۳/۷۹±۰/۲۹	۱۴۱/۲۵±۰/۱۶	A ۷
۱۵۴/۸۸±۰/۱۸	۱۴۴/۵۴±۰/۱۷	A ۸
۱۵۱/۳۵±۰/۲	۱۸۶/۲۰±۰/۲۷	A ۹
۲۱۳/۷۹±۰/۳۱	۹۷/۲۲±۰/۰۹	A ۱۰
۳۲۳/۵۹±۰/۳۵	۳۸۹/۰۴±۰/۳۴	A ۱۱
۳۴۶۷/۳۶۹±۱/۹۵	۱۷۳۷/۸۰۱±۲/۶۵	A ۱۲

مقادیر با سه تکرار ± S.D. بیان شده‌اند.

جدول ۳-۵ حاوی IC<sub>50</sub> داروی نفوستیگمین در جهت مهار کولین استرازاها به عنوان استاندارد این تست.

BuChE IC <sub>50</sub> (ng/ml)	AChE IC <sub>50</sub> (ng/ml)	استاندارد
۴۴/۵۵±۰/۰۴۸	۲۲/۶۲±۰/۰۳۱	نفوستیگمین

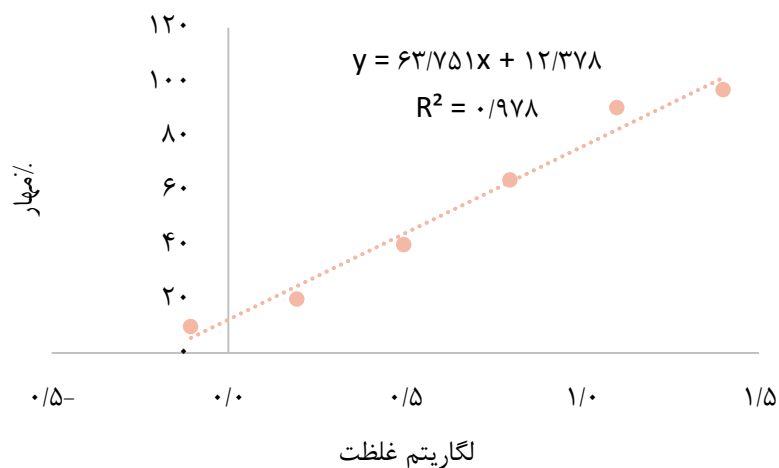
### ۳-۴- نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها

جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات موجود در این عصاره‌ها از روش مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده شد و میزان IC<sub>50</sub> عصاره‌ها با IC<sub>50</sub> آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد جهت مهار رادیکال آزاد DPPH ثبت و مورد مقایسه قرار گرفته شد.

جدول ۳-۶ نشان دهنده قدرت متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از هرگونه در مهار رادیکال DPPH می‌باشد.

DPPH IC <sub>50</sub> (μg/ml)	گونه‌ها
۲۶۳/۰۲±۰/۸۱	A ۱
۷۰/۷۹±۰/۲۴	A ۲
۱۷/۷۸±۰/۰۵	A ۳
۲۸۱/۸۳۸±۰/۹	A ۴
۱۰۰۰±۱/۰۹	A ۵
۱۷۳/۷۸±۰/۵	A ۶
۸۳۱۷۸/۳۸±۲/۲۵	A ۷
۱۶/۵۹±۰/۰۴	A ۸
۳۴۶/۷۳±۰/۳۸	A ۹
۱۰۲۳/۲۹±۱/۹۸	A ۱۰
۹۵۴/۹۹±۱/۵	A ۱۱
۱۶۵۹/۵۸±۱/۸	A ۱۲

### نمودار استاندارد آسکوربیک اسید



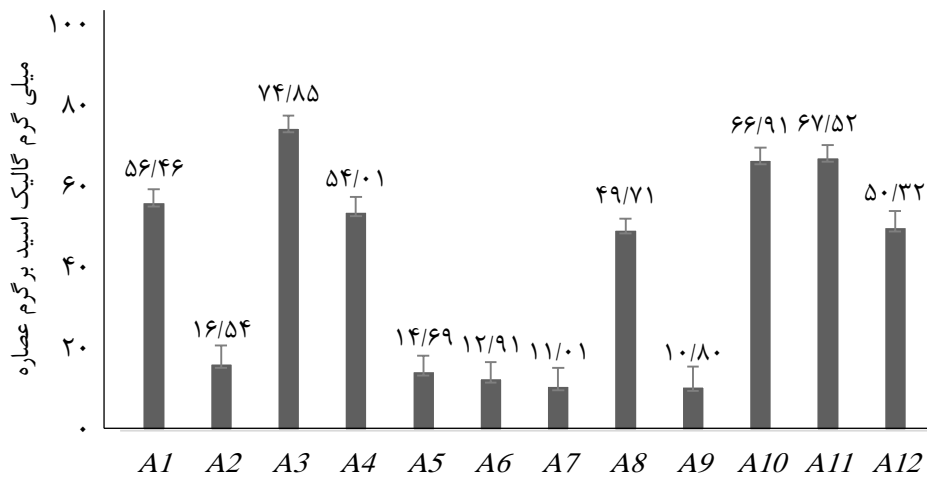
شکل ۳-۳ نمودار آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد تست مهار رادیکال آزاد DPPH.

جدول ۳-۷ مقدار  $IC_{50}$  آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد جهت مهار رادیکال آزاد را نشان می‌دهد.

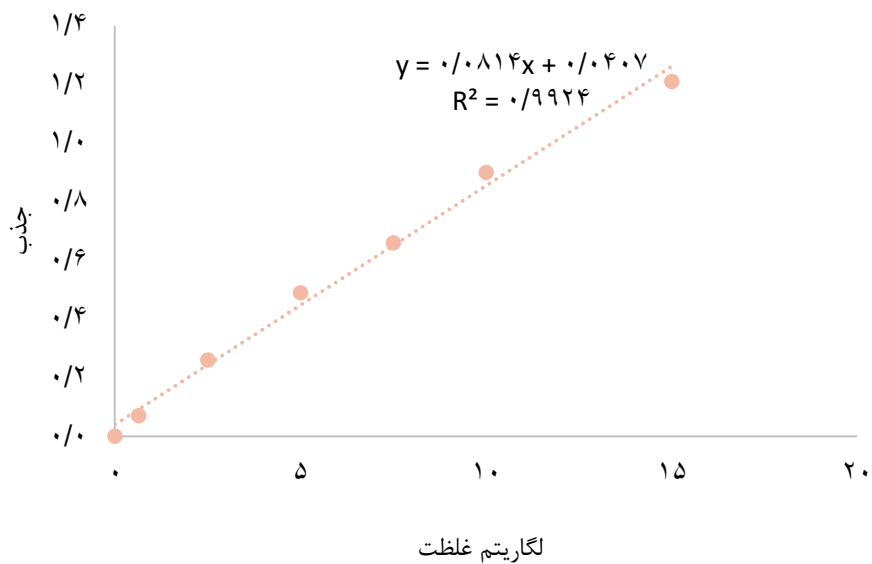
DPPH $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	استاندارد
$3/890451 \pm 0/028$	آسکوربیک اسید

### ۳-۵- مقادیر حاصل از سنجش فنل کل

همان‌طور که در فصل قبل نیز توضیح داده شد، جهت بررسی میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌های استخراج‌شده از روش فولین سیوکالتو استفاده و میزان فنل کل به صورت مقدار میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر گرم عصاره تعیین شد. در این روش از گالیک‌اسید به عنوان استاندارد استفاده شد.



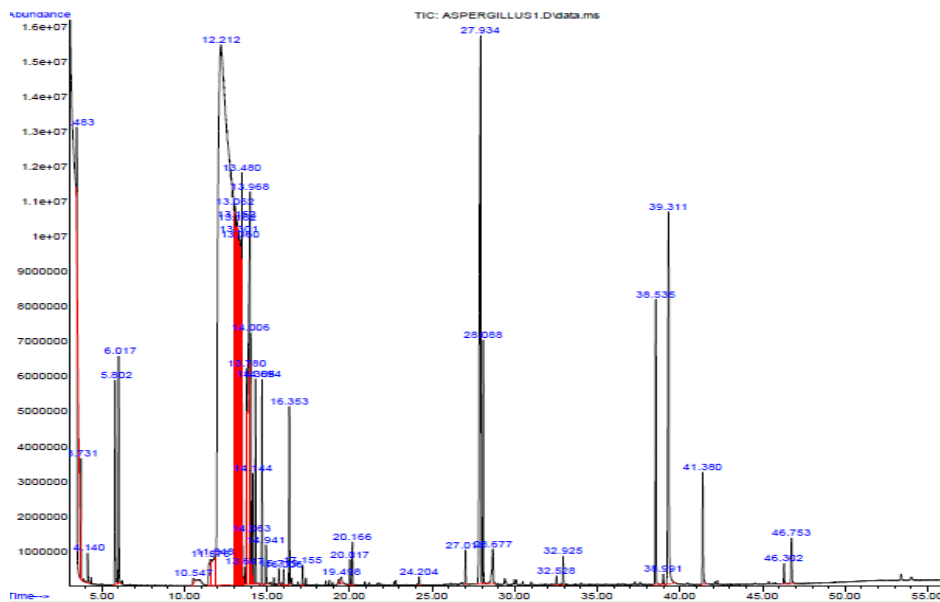
شکل ۳-۴ مقدار فنل کل عصاره‌های فارچی که به صورت میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شده است.



شکل ۳-۵ نمودار جذب گالیک اسید، به عنوان استاندارد مقدار فنل.

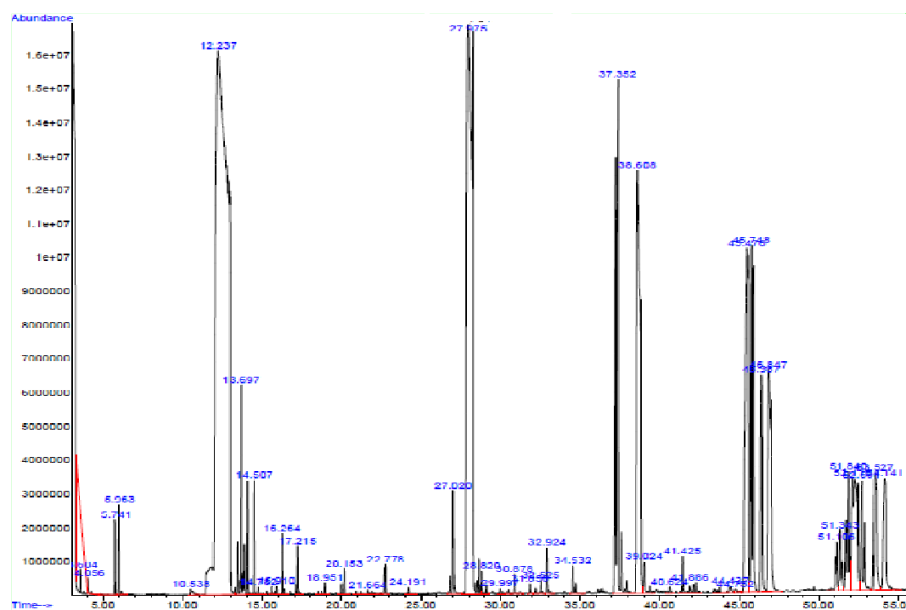
### ۳-۶- نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی

همان‌طور که گفته شد، استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی روشی کارآمد جهت شناسایی و آنالیز کمی ترکیبات موجود در عصاره‌های طبیعی می‌باشد. عصاره استخراج‌شده از دو قارچ A1 و A5 پس از انجام مراحل آماده‌سازی توضیح داده‌شده در فصل قبل، به دستگاه GC-MS تزریق و مورد شناسایی قرار گرفتند. ابتدا طیف جرمی ترکیبات موجود در عصاره‌های قارچی ثبت و با طیف‌های استاندارد موجود در نرم‌افزار کتابخانه‌های Wiley و NIST مقایسه شدند.



شکل ۳-۶ دیگرام حاصل از تفکیک عصاره اتیل استاتی نمونه A1.

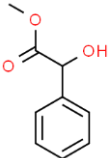
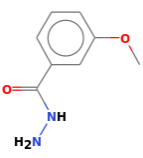
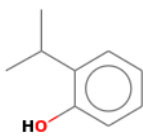
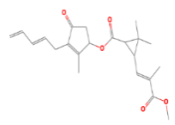
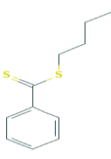
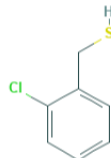
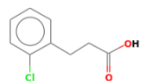


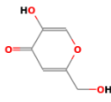
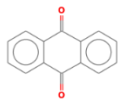
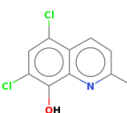
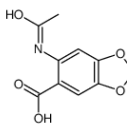
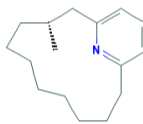
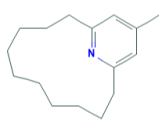
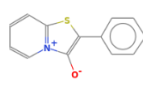
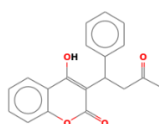


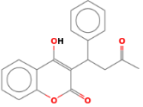
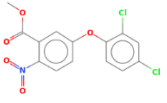
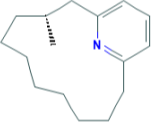
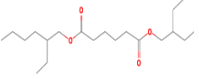
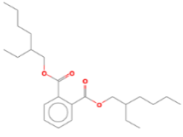
شکل ۳-۷ دیاگرام حاصل از تفکیک عصاره اتیل استاتی نمونه A۵.

جدول ۳-۸ اجزای شناسایی شده موجود در عصاره اتیل استاتی قارچ A۱ توسط دستگاه GC-MS.

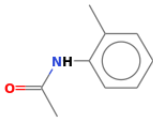
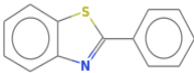
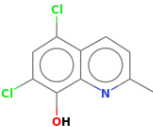
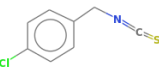
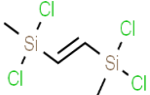
شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
۱۶	۱۳/۶۴۷	4-Aminobutyramide, N-methyl-N-[4-(1-pyrrolidinyl)-2-butyrynyl]-	۰/۰۵۷	
۱۷	۱۳/۷۸۰	2-Ethylphenol	۱/۲۲۴	

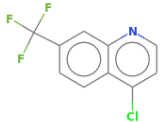
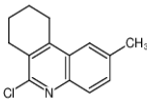

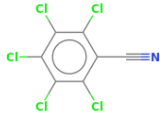
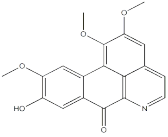
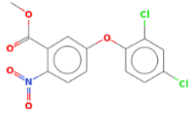
شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
۱۸	۱۳/۹۶۸	Methyl mandelate	۵/۷۱۰	
۱۹	۱۴/۰۰۶	m-Anisic hydrazide	۱/۱۰۱	
۲۰	۱۴/۰۶۳	Phenol, 2-(1-methylethyl)-	۰/۱۷۵	
۲۳	۱۴/۶۹۲	Cyclopropaneacrylic acid, 3-carboxy-alpha.,2,2-trimethyl-, dimethyl ester, trans-(+)-	۰/۸۵۰	
۲۴	۱۴/۹۴۱	Benzenecarbodithioic acid, butyl ester	۰/۱۶۳	
۲۵	۱۵/۷۱۹	2-Chlorobenzyl mercaptan	۰/۰۵۸	
۲۶	۱۶/۰۰۶	3-(2-Chlorophenyl) propionic acid	۰/۰۷۰	

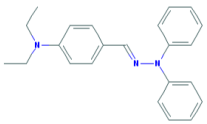
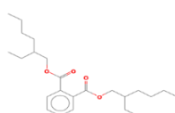
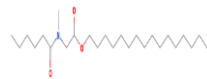
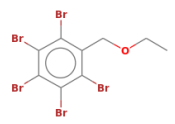
شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
۲۹	۱۹/۴۹۸	4H-Pyran-4-one, 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)- (Kojic acid)	۰/۱۶	
۳۰	۲۲/۷۸	9,10-Anthraquinone	۰/۱۶	
۳۱	۲۰/۱۶۶	Chlorquinaldol	۰/۱۸۱	
۳۲	۲۴/۲۰۴	1,3-Benzodioxole-5-carboxylic acid, 6-acetamino-	۰/۰۳۸	
۳۳	۲۷/۰۱۳	Muscopyridine	۰/۱۵۷	
۳۴	۲۷/۹۳۴	14-Methyl-16-Aza-Bicyclo[10.3.1]Hexadeca-1(15),12(16),13-Triene	۶/۴۳۳	
۳۵	۲۸/۰۸۶	Thiazolo[3,2-a]pyridinium, 3-hydroxy-2-phenyl-, hydroxide, inner salt	۱/۲۶۲	
۳۷	۳۲/۵۲۸	Warfarin	۰/۰۴۸	

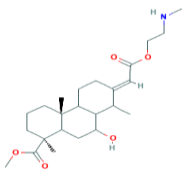
شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
۳۸	۳۲/۹۲۵	Warfarin	۰/۱۲۷	
۳۹	۳۸/۵۳۵	BifenoX	۱/۶۴۶	
۴۰	۳۸/۹۹۱	Muscopiridine	۰/۰۶۲	
۴۱	۳۹/۳۱۱	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	۳/۴۳۷	
۴۲	۴۱/۳۷۵	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	۰/۱۶۵۰	
۴۳	۴۶/۳۰۰	4-(4-Methoxyphenyl)butylamine, N-pentafluoropropionyl	۰/۱۰۲	-
۴۴	۴۶/۷۵۵	Phenol, 2-[5-(3-iodo-5-nitrophenyl)-[1,3,4]oxadiazol-2-yl]-	۰/۳۵۷	-

جدول ۳-۹ اجزای شناسایی شده موجود در عصاره اتیل استاتی قارچ A5 توسط دستگاه GC-MS

شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
۷	۱۳/۶۹۵	m-Anisic hydrazide	۱/۰۳۰	-
۸	۱۴/۵۰۵	Acetamide, N-(2-methylphenyl)-	۰/۶۷۷	
۹	۱۴/۷۸۲	4-Nitro-1,3-phenylenediamine, N3-tert-butyl dimethylsilyl-	۰/۰۲۹	-
۱۰	۱۵/۹۱۰	Ethanone, 2-(1-methylethoxy)-1,2-diphenyl-	۰/۰۵۸	-
۱۲	۱۷/۲۱۵	acetamide, N-(2,6-dihydroxyphenyl)	۰/۱۸۶	-
۱۳	۱۸/۹۵۱	Benzothiazole, 2-phenyl-	۰/۰۵۰	
۱۴	۲۰/۱۵۳	Chlorquinaldol	۰/۱۰۸	
۱۵	۲۲/۶۶۴	Benzene, 1-chloro-4-(isothiocyanatomethyl)-	۰/۰۶۶	
۱۶	۲۲/۷۷۸	trans-1,2-Bis(methyldichlorosilyl)ethylene	۰/۱۶۷	
۱۷	۲۴/۱۹۱	1,3-Benzodioxole-5-carboxylic acid, 6-acetamino-	۰/۰۲۷	-

شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
۱۸	۲۷/۰۱۹	4-Chloro-7-(trifluoromethyl)quinoline	۰/۵۳۵	
۱۹	۲۷/۹۷۵	Phenanthridine 6-chloro-2-methyl-7,8,9,10-tetrahydro-	۱۶/۴۹۱	
۲۰	۲۸/۸۲	Benzenamine, 2,3,5,6-tetrachloro-	۰/۱۱۴	
۲۱	۲۹/۹۹	Benzonitrile, pentachloro-	۰/۰۳۹	
۲۲	۳۰/۸۷۸	Benzene, 1,3-dichloro-5-(1,1-dimethylethyl)-2-methoxy-	۰/۰۹۸	-
۲۳	۳۱/۸۵۷	Ehtyl 4-[p-chloroanilino]-5,6-diamino-2-pyridinecarbamate	۰/۰۴	-
۲۴	۳۲/۵۲۷	7H-Dibenzo[de,g]quinolin-7-one, 9-hydroxy-1,2,10-trimethoxy-	۰/۰۸۱	
۲۵	۳۲/۹۲۴	Nickel(II), [bis(salicylidene)acetamidrazonato(2-)]	۰/۱۷۲	-
۲۶	۳۴/۵۳۲	Bifenox	۰/۱۷۱	
۲۷	۳۷/۳۵۳	1,4-benzenediamine, 2,6-dichloro-N4-[4-	۶/۴۰۰	-

شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
		(dimethylamino)phenyl]-		
۲۸	۳۸/۶۰۵	Terephthalic acid	۹/۲۹۰	
۲۹	۳۹/۰۲۶	benzaldehyde, 2,4-dibromo-3-hydroxy-6-nitro-	۰/۲۴۰	-
۳۰	۴۰/۶۲۳	1H-Indole,1-ethyl-5-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-	۰/۰۵۴	-
۳۱	۴۱/۴۲۸	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	۰/۱۶۷	
۳۲	۴۱/۸۸۸	9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-triene-3,24,25-triol, (3.beta.,5Z,7E)-	۰/۱۶	-
۳۳	۴۴/۴۳۵	hexadecanesulfonamide, N-(2-aminoethyl)-	۰/۱۴۶	-
۳۴	۴۴/۷۵۰	Sarcosine, n-hexanoyl-, hexadecyl ester	۰/۰۶	
۳۵	۴۵/۴۷۹	2-Pyrazoline, 5-hydroxy-3-(4-pyridinyl)-5-trifluoromethyl-1-(2,4,6-trimethylphenoxyacetyl)-	۶/۱۶۲	-
۳۶	۴۵/۷۴۷	2,3,4,5,6-Pentabromobenzyl alcohol, ethyl ether	۴/۴۲۹	

شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
۳۷	۴۶/۳۸۸	Propanamide, 3,3-diphenyl-N-(3,4-dimethylphenyl)-	۲/۰۷۳	-
۳۸	۴۶/۸۴۵	Phenol, 2-[5-(3-iodo-5-nitrophenyl)-[1,3,4]oxadiazol-2-yl]-	۴/۲۷۲	-
۳۹	۵۱/۱۰۹	H-Cholesta-2,5-dieno[3,2-' <sup>1</sup> b]indole, 1'-methyl-	۰/۴۳۵	-
۴۰	۵۱/۳۴۲	5,7-Bis[(trimethylsilyl)oxy]-3-{4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}-4H-chromen-4-one	۰/۴۶۸	-
۴۱	۵۱/۸۳۸	2-(4-Bromobenzoyl)-3-benzyl-4-phenyl-5-morpholino-thiophene	۱/۴۸۹	-
۴۲	۵۲/۱۱۷	2-(4-Bromobenzoyl)-3-benzyl-4-phenyl-5-morpholino-thiophene	۳/۷۲۹	-
۴۳	۵۲/۶۵۹	2,2,3,3,4,4,4-Heptafluoro-N-(2-methyl-4-(o-tolyldiazenyl)phenyl)butanamide	۱/۲۲۷	
۴۴	۵۳/۵۲۸	naphth[1,8-de]-1,3-oxazine-6-sulfonyl chloride, 9-[2-(2-methoxyphenyl) diazenyl]-2-methyl-	۱/۹۰۲	-
۴۵	۵۴/۱۴۰	naphth[1,8-de]-1,3-oxazine-6-sulfonyl chloride, 9-[2-(2-	۱/۷۹۰	-



شماره پیک	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده	درصد غلظت از کل	ساختار
		methoxyphenyl)diazenyl]-2-methyl-		

# فصل چهارم

## بحث و نتیجه گیری

مهم‌ترین استراتژی درمانی برای اختلالات شناختی ناشی از بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نظیر آلزایمر، بهبود سیستم کولینرژیک در مغز می‌باشد، زیرا مهم‌ترین نوروترنسمیتری که در این اختلالات تغییر می‌کند استیل کولین (ACh) است که سطح آن به میزان زیادی در کورتکس و هیپوکمپ مغز کاهش می‌یابد [۹۵]. همان‌طور که گفته شد، آنزیم استیل کولین استراز (AChE) می‌تواند سبب افزایش پایداری پلاک آمیلوئیدبتا شده و سمیت عصبی آن را افزایش دهد. نتایج مطالعات علمی نشان می‌دهد که مهارکننده‌های استیل کولین استراز می‌توانند از مداخله استیل کولین استراز در تشکیل و تثبیت پلاک آمیلوئیدبتا جلوگیری کنند [۶۷]. پس با توجه به آنچه ذکر شد و با توجه به روند افزایشی شیوع بیماری‌های تحلیل برنده عصبی در بین سالمندان مهم‌ترین راهکار درمان، افزایش اثرات کولینرژیک در این مناطق سیستم عصبی می‌باشد که بدین منظور از مهارکننده‌های آنزیم‌های کولین استراز و ترکیبات آنتی‌اکسیدان که از تخریب نورون‌های کولینرژیک جلوگیری می‌کنند می‌توان به‌عنوان هدف درمانی استفاده کرد [۹۷-۹۵].

در این پژوهش، از ۹ گونه قارچ آسپرژیلوس به‌منظور انجام مطالعات استفاده شده است. با توجه به اینکه چهار جدایه از گونه *Aspergillus tubingensis* و یک جدایه از بقیه گونه‌ها مورد بررسی قرار گرفته است در مجموع ۱۲ نمونه قارچ در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفته است. اسامی این ۱۲ نمونه به‌منظور سهولت، به‌صورت کد (A1 تا A12) شماره‌گذاری شده است.

هدف اصلی این پژوهش، بررسی فعالیت آنتی‌کولین استرازی متابولیت‌های ثانویه این چندگونه قارچ آسپرژیلوس بود. بدین منظور توانایی عصاره اتیل استاتی این ۱۲ نمونه، در مهار دو آنزیم کولین استراز، استیل کولین استراز (ACh) و بوتیریل کولین استراز (BuChE)، با استفاده از روش المن مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به‌صورت  $IC_{50}$  بیان شد.  $IC_{50}$  در واقع غلظتی از نمونه است که توانایی مهار فعالیت آنزیمی را به میزان ۵۰ درصد دارا می‌باشد؛ بنابراین  $IC_{50}$  پایین‌تر، نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌کولین استرازی بالاتر و بالعکس می‌باشد. در این مطالعه، از

مهارکننده شناخته شده آنزیم‌های کولین‌استراز (نئوستیگمین)، به‌عنوان ترکیب استاندارد استفاده گردید.  $IC_{50}$  نئوستیگمین برای AChE و BuChE به ترتیب ۲۲/۶۲ و ۴۰/۵۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. درحالی‌که مقادیر  $IC_{50}$  عصاره‌های قارچی برای AChE و BuChE به ترتیب بین ۱۷۳۷-۴۶ و ۳۴۶۷-۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود (جدول ۳-۴). با توجه به اینکه عصاره‌های قارچی متشکل از چندین ترکیب مختلف هستند که فقط یک و یا تعدادی معدودی از این ترکیبات، فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی دارند کاملاً منطقی به نظر می‌رسد که  $IC_{50}$  این عصاره‌ها نسبت به ترکیب استاندارد به‌صورت قابل‌ملاحظه‌ای پایین‌تر باشد. بررسی دقیق‌تر نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که نمونه A۱ (*Aspergillus flavus*) و A۱۲ (*Eurotium Heterothallic*) به ترتیب بیشترین و کمترین توانایی را در مهار AChE از خود نشان داده‌اند. پایین‌ترین فعالیت آنتی‌بوتیریل‌کولین‌استرازی نیز مربوط به نمونه A۱۲ می‌باشد. این در حالی است که نمونه A۵ که یکی از جدایه‌های گونه *Aspergillus tubingensis* است از بیشترین فعالیت در این زمینه برخوردار می‌باشد. مقایسه مقادیر  $IC_{50}$  عصاره‌ها نشان می‌دهد که نمونه A۱۲ نسبت به بقیه نمونه‌ها به‌طور چشمگیری فعالیت بسیار کمی در مهار آنزیم‌های کولین‌استراز از خود نشان می‌دهد.

در اختلالاتی مانند AD، فعالیت AChE با پیشرفت بیماری به ۳۳-۴۵ درصد از مقدار طبیعی کاهش می‌یابد درحالی‌که فعالیت BuChE در مناطق خاصی از مغز تا ۴۰-۹۰ درصد افزایش می‌یابد. این تغییر شدید نسبت AChE به BuChE باعث تغییر در نقش معمول حمایتی BuChE در هیدرولیز استیل‌کولین می‌شود. این شرایط نشان می‌دهد که مهار BuChE می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی مناسب برای درمان AD باشد. علاوه بر این، هنگامی‌که موش‌های تراریخته با افزایش بیان پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید تحت درمان با مهارکننده‌های انتخابی و قوی BuChE قرار گرفتند، منجر به کاهش سطح پپتید  $A\beta$  در مغز و کاهش پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید- $\beta$  داخل و خارج سلولی شد. علاوه بر این، مهارکننده‌های قوی و هدفمند BuChE همچنین منجر به بهبود عملکرد شناختی در مطالعات حیوانی شده

است؛ بنابراین مهارکننده‌های بوتیریل کولین استراز در مرحله پیشرفته بیماری نیز قابلیت استفاده دارند؛ اما مهارکننده‌های ACHE تنها در مراحل ابتدایی این اختلال می‌توانند مؤثر باشند [۹۸].

تا به امروز چند ترکیب با فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی از نمونه‌های قارچی جداسازی و شناسایی شده است. بر اساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت متابولیت ثانویه مروترپنوئیدی به نام ایزوترئولاکتون A از قارچ اسپرژیلوس ترئوس با فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی شناسایی شد. طبق این مطالعه ایزوترئولاکتون A، استیل کولین‌استراز را در حالت وابسته به دوز با  $IC_{50}$   $2/5\mu M$  مهار کرد. با این حال، ایزوترئولاکتون A، بوتیریل کولین‌استراز را حتی در  $500$  میکرومول هم مهار نمی‌کند؛ بنابراین، ایزوترئولاکتون A قدرتی بیش از  $250$  برابر فعالیت مهاری در برابر آنزیم استیل کولین‌استراز در مقایسه با آنزیم بوتیریل کولین‌استراز نشان داد درحالی‌که تاکرین، به‌عنوان یک کنترل مثبت، فعالیت مهاری قوی‌تر در برابر آنزیم بوتیریل کولین‌استراز با  $IC_{50}$  برابر با  $0/01$  میکرومولار نسبت به آنزیم استیل کولین‌استراز با  $IC_{50}$  برابر با  $0/09$  میکرومولار در این سیستم سنجش نشان داد. با تجزیه و تحلیل نمودار لینیور-برک، ایزوترئولاکتون A مهار غیررقابتی با استیل کولین را نشان داد [۸۲].

پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ بر روی قارچ کلادونیا ماسیلنتا انجام گرفت نشان داد که یک ترکیب فنلی متعلق به این قارچ به نام بیرولوکینون می‌تواند اثر آنتی‌کولین‌استرازی داشته باشد. مهار بیرولوکینون بر روی آنزیم استیل کولین‌استراز وابسته به دوز بود. درصد مهار با افزایش غلظت بیرولوکینون از  $0$  تا  $100$  میکروگرم بر میلی‌لیتر به سرعت افزایش یافت. غلظت موردنیاز برای مهار  $50\%$  فعالیت آنزیمی، برابر با  $27/1$  میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در مقایسه با سایر مهارکننده‌های آنزیم استیل کولین‌استراز، بیرولوکینون قدرت کمتری نسبت به تاکرین که در معالجه اختلالات عصبی مورد استفاده قرار گرفته است، نشان داد؛ و قدرت بسیار کمتری نسبت به دونپزیل که داروی ضد آلزایمر است، دارد؛ اما فعالیت آن قابل قیاس با مهارکننده‌های دیگر جدا شده از عصاره‌های طبیعی می‌باشد. از آنجایی که بیشتر متابولیت‌های ثانویه این قارچ از

ترکیبات فنولیک بوده و دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند، آن‌ها فرض کردند که مهارکننده‌ی استیل کولین استراز در عصاره‌ی این‌گونه می‌تواند علاوه بر کاهش نشانه‌های آلزایمر، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای حفاظت نورون‌ها از اکسیژن فعال و تخریب نورونی باشد. نتایج کار آن‌ها نشان داد که بیرولوکینون نه‌تنها نشانه‌های بیماری آلزایمر را با بهبود بخشیدن شناخت و ادراک اصلاح می‌کند، بلکه می‌تواند علائم را با حفاظت نورون‌های آسیب‌دیده، کند یا متوقف کند؛ بنابراین این ترکیب پتانسیل زیادی به‌عنوان یک عامل ضد آلزایمر از خود نشان داد [۸۱].

اکسیداسیون یک واکنش شیمیایی است که هیدروژن یا الکترون‌ها را از یک ماده به ماده اکسیدکننده منتقل می‌کند، واکنش‌های اکسیداسیون می‌توانند رادیکال‌های آزاد تولید کنند. رادیکال‌های آزاد تشکیل‌شده می‌توانند باعث ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در مولکول‌های زیستی شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها سیستم‌های زیستی را در برابر آسیب رادیکال آزاد محافظت می‌کنند. مقادیر ناکافی آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا و برون‌زا می‌تواند باعث استرس اکسیداتیو، عدم تعادل اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و در نتیجه آسیب یا مرگ سلولی شود. استرس اکسیداتیو در بیماری‌های متنوعی نظیر انواع مختلف سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و بیماری آلزایمر نقش بسزایی دارد. یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های متابولیت‌های ثانویه، فنل‌ها هستند. ترکیبات فنلی در دفاع از طریق پاک‌سازی یا جلوگیری از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) برای جلوگیری از آسیب مولکولی و سایر عوامل آسیب‌زا، بکار می‌روند [۸۹، ۹۷].

علاوه بر بررسی فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی عصاره‌های اتیل‌استاتی نمونه‌های قارچی، توانایی آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها نیز با استفاده از روش DPPH مورد مطالعه قرار گرفت. بدین ترتیب که توانایی نمونه‌ها در مهار رادیکال آزاد DPPH به‌عنوان معیاری از میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی در نظر گرفته شد و نتایج به‌دست‌آمده به‌صورت  $IC_{50}$  بیان گردید. در این آزمایش، از آسکوربیک اسید به‌عنوان ترکیب استاندارد استفاده شد. نتایج این بخش در جدول ۳-۶ نمایش

داده شده است. همان‌طور که به‌خوبی مشخص است نمونه‌های A۸ (یکی از جدایه‌های قارچ *Aspergillus tubingensis* و A۳ (*Chaetosartorya chrysella*) بیشترین توانایی را در مهار رادیکال آزاد DPPH از خود نشان می‌دهند و  $IC_{50}$  آن‌ها به ترتیب برابر با ۱۶/۵۹ و ۱۷/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که در مقایسه با  $IC_{50}$  آسکوربیک اسید (۳/۸۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از توانایی آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی برخوردار هستند. نمونه A۷ که یکی دیگر از جدایه‌های *Aspergillus tubingensis* می‌باشد کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشد. در واقع مقدار  $IC_{50}$  این نمونه نسبت به ترکیب استاندارد به حدی بالا است (۸۳/۱۷۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که می‌توان گفت فاقد فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

مطالعه دیگری که بر روی عصاره‌های اتیل‌استاتی انجام گرفت سنجش مقدار فنل کل با روش فولین-سیوکالتو بود. همان‌طور که در شکل ۳-۵ به‌خوبی دیده می‌شود مقادیر فنل کل نمونه‌ها بین ۱۰/۸ تا ۷۴/۸۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره متغیر است. بیشترین میزان فنل کل مربوط به نمونه A۳ می‌باشد که در آزمون DPPH فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نیز از خود نشان داد. با توجه به اینکه ترکیبات فنلی در بسیاری از موارد مسئول ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های طبیعی می‌باشند [۱۰۰، ۱۰۱] به نظر می‌رسد با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، همین ترکیبات، مسئول ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار خوب این قارچ می‌باشند. از آنجاکه رنگ عصاره این قارچ نسبت به بقیه نمونه‌های قارچی بررسی شده متفاوت بود و رنگ سبز آن نشان‌دهنده حضور ترکیبات فلاونوئیدی و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیاد در آن می‌باشد.

نمونه A۷ که در تست DPPH فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار ناچیزی را از خود نشان داده بود از میزان فنل کل پایینی نیز برخوردار است (۱۱/۰۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره). همچنین نمونه A۹ (*Aspergillus carbonarius*) نسبت به بقیه نمونه‌ها از کمترین فنل کل برخوردار است (۱۰/۸ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره). درحالی‌که این‌گونه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسطی را از خود نشان داده بود. در واقع مقایسه مقادیر فنل کل و نتایج تست

DPPH نشان می‌دهد که در برخی از نمونه‌ها ارتباط مستقیمی بین نتایج این دو آزمایش مشاهده نمی‌شود. به‌عنوان مثال، طبق بررسی‌هایی که تاکنون بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های طبیعی از قبیل گیاهی و قارچی انجام شده است، c-ترپنین<sup>۱</sup> نمونه کاملاً شناخته‌شده غیر فنلی از یک اسانس گیاهی است که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی می‌باشد، این مونوترپن قادر به خاتمه سریع‌تر زنجیره اکسیداتیو به دلیل تولید رادیکال‌های هیدروپراکسیل (HOO<sub>2</sub>) می‌باشد که ثابت سرعت خاتمه بسیار سریعی دارند [۱۰۲]. ترکیبات غیر فنلی ترپنوئیدی دیگری همچون لیمونن<sup>۲</sup>، لینالول<sup>۳</sup> و سیترال<sup>۴</sup> موجود در اسانس‌های گیاهی نیز با خاصیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری همراه بوده‌اند [۱۰۲] و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های غیر فنلی مانند اوریک‌اسید، بیلی‌روبین و تیول‌ها که از طریق مکانیسم‌های مختلف با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهند [۱۰۳]. به‌طور کلی مطالعات این نکته را نشان داده‌اند که همیشه ارتباطی مستقیم میان مقدار ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها وجود ندارد و می‌تواند به ترکیبات دیگر هم مرتبط باشد [۱۰۴, ۱۰۵].

همان‌طور که به‌طور گسترده توضیح داده شده است، تعدادی از مهارکننده‌های AChE و BChE از منابع طبیعی مختلف جدا شده‌اند. قابل توجه است که اکثر ترکیبات تنها فعالیت آزمایشگاهی را نشان داده‌اند. در بین این محصولات طبیعی، آلکالوئیدها به دلیل ساختارهای پیچیده حاوی نیتروژن، امیدوارکننده‌ترین کاندیدها برای استفاده در درمان AD هستند. همانند فیزوستیگمین که آلکالوئیدی استخراج شده از دانه یک گیاه به نام لوبیای کالابار بومی آفریقای گرمسیری می‌باشد و اولین دارو در بین مهارکننده‌های AChE بود [۹۸]. همچنین سیمسین که آلکالوئیدی مشتق شده از فیزوستیگمین بوده و به‌عنوان یک بازدارنده کولین استراز برگشت‌پذیر با قدرت مهار چند برابری برای آنزیم بوتیریل کولین استراز پلاسما نسبت به

---

<sup>1</sup> c-terpinene

<sup>2</sup> Limonene

<sup>3</sup> linalool

<sup>4</sup> citral



آنزیم استیل کولین استراز شناخته شده و عمل می کند [۹۸]. هوپرزین A<sup>۱</sup> نیز ترکیبی با فعالیت آنتی کولین استرازی متعلق به گروه، آلكالوئیدها است که برای اولین بار از گیاه لیکوپود چینی هوپرزی سراتا<sup>۲</sup> جدا شد [۶۹]. همچنین از عصاره اتیل استاتی یک سویه از قارچ آسپرژیلوس ترئوس، ترکیب آلكالوئیدی جدید، α۱۶-هیدروکسی-N۵- استیل آردیمین با فرمول شیمیایی (C28H28N4O4) جداسازی شد؛ که فعالیت مهار آنزیم استیل کولین استراز با مقدار IC<sub>50</sub> برابر با ۵۸/۳ میکرومولار از خود نشان داد، در حالی که مقدار IC<sub>50</sub> مربوط به تاکرین به عنوان کنترل مثبت ۳۷/۹ میکرومولار تعیین شد [۸۳].

در مرحله نهایی پژوهش تصمیم بر آن شد که اجزای تشکیل دهنده عصاره اتیل استاتی دو نمونه قارچی A۱ (*Aspergillus flavus*) و A۵ (*Aspergillus tubingensis*) که به ترتیب بالاترین فعالیت آنتی استیل و بوتیریل کولین استرازی را از خود نشان داده بودند با استفاده از روش GC/MS مورد شناسایی قرار گیرد. جزییات انجام این روش در بخش مواد و روشها ذکر شده است.

طبق اطلاعات به دست آمده از شناسایی اجزای موجود در عصاره اتیل استاتی دو گونه A۱ و A۵ فعال در مهار کولین استرازاها توسط دستگاه GC/MS و تطبیق با دو کتابخانه Wiley و NIST، ترکیبات متفاوتی شناسایی شده اند. همان طور که در جدول ۳-۸ آمده است، بیشترین سهم ترکیبات عصاره گونه A۱ مربوط به ترکیبات آلكالوئیدی می باشد که از این بین ترکیب 14-METHYL-16-AZA-BICYCLO[10.3.1]HEXADEC-1(15),12(16),13-TRIENE بیشترین درصد را دارا می باشد. اطلاعات به دست آمده از تطابق طیف این ترکیب با طیفهای استاندارد دو کتابخانه، تشابه زیاد این ترکیب با آلكالوئیدی به نام ماسکوپیریدین<sup>۳</sup> را نشان می دهد که در مشک آهوی سیبری<sup>۴</sup> مشاهده شده است. از گذشته، مشک به صورت سنتی برای درمان برخی بیماریها استفاده می شده است. به عنوان مثال به عنوان یکی از ترکیبات یک داروی

<sup>1</sup> Huperzine A

<sup>2</sup> Huperzia Serrata

<sup>3</sup> Muscopyridine

<sup>4</sup> Moschus Moschiferus

سنتی چینی به کار می‌رود که اثرات ضد درد، ضد تشنج و آرام‌بخش این داروی سنتی گزارش شده است. همچنین طبق بررسی‌هایی، سرکوب تشکیل فیبریل  $A\beta$  را نیز نشان داده است [۱۰۶].

در مورد گونه  $A\delta$  نیز طبق جدول ۳-۹ بیشتر سهم ترکیبات شناخته شده مربوط به ترکیبات آلكالوئیدی از جمله Phenanthridine 6-chloro-2-methyl-7,8,9,10-tetrahydro-، ۲-پیرازولین<sup>۱</sup> و درصد کمتری کینولین<sup>۲</sup> ها می‌باشد؛ که متأسفانه در مورد کاربرد دارویی ترکیب اول اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد. ۲-پیرازولین آلكالوئیدی است که یک سری مشتقات جدید از آن طراحی و سنتز شده و به‌عنوان مهارکننده کولین استراز (ChE) و ضد تجمع پروتئین  $A\beta$  مورد بررسی قرار گرفتند؛ که به‌عنوان مهارکننده‌های قدرتمند در برابر هریک از آنزیم‌های استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز شناخته شده‌اند [۱۰۷]. کینولین‌ها ترکیبات آلكالوئیدی با منشأ طبیعی هستند؛ که طیف وسیعی از مشتقات آن‌ها، فعالیت‌های دارویی از خود نشان داده‌اند [۱۰۸، ۱۰۹]. ترکیبات جدید مشتق شده از کینولین‌ها نیز از جمله هوپرزین A [۱۱۰] و T-82 هستند که فعالیت کولین استرازی چشمگیری را از خود نشان داده‌اند [۱۱۱].

مقادیر کمتری ترکیبات دیگر همچون وارفارین<sup>۳</sup> (ضد انعقاد خون)، بیفنوکس<sup>۴</sup> (علف‌کش)، 9,10-Anthraquinone و 2-Ethylphenol (ترکیبات فنلی)، (Bis(2-ethylhexyl) phthalate) (سیتوتوکسیک) [۱۱۲] و همچنین ترکیب 5-hydroxy-2-4H-Pyran-4-one, (هیدروکسیمتیل) (آنتی‌اکسیدان) نیز در این عصاره‌ها شناسایی شده‌اند [۱۱۳]. علاوه بر این، همانطور که از جدول‌های ۳-۸ و ۳-۹ برمی‌آید، ترکیبات دیگری نیز شناسایی شده‌اند که نوع آن‌ها به علت عدم دسترسی به ساختارشان قابل تشخیص نبود.

---

<sup>1</sup> 2-Pyrazoline

<sup>2</sup> Quinoline

<sup>3</sup> Warfarin

<sup>4</sup> Bifenox

در نهایت، با توجه به اینکه آکالوئیدها درصد بالایی از ترکیبات کلی هر دو عصاره را به خود اختصاص می‌دهند و با توجه به اینکه قبلاً نیز آکالوئیدهایی با فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی شناسایی شده‌اند، می‌توان پیشنهاد نمود که همه یا بخش مهمی از فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی این دو نمونه مربوط به همین آکالوئیدها می‌باشد. البته مطالعات بسیار بیشتری به منظور ابراز نظر قطعی در این زمینه و همچنین اطمینان از عدم بیماری‌زا بودن این ترکیبات لازم می‌باشد.

## پیشنهادها

- ۱- استفاده از سایر حلال‌ها به‌منظور استخراج متابولیت‌ها از مایع تلقیح قارچ‌ها.
- ۲- استفاده از روش‌های دیگر استخراج متابولیت‌های قارچی، مانند گرما دادن تا ۴۰.
- ۳- استخراج متابولیت‌ها از توده هیف قارچی با حلال‌های قطبی و غیرقطبی مختلف.
- ۴- تغییر ترکیب و شرایط محیط کشت، مانند تغییر منبع کربن و بررسی تأثیر آن در تولید ترکیبات شناسایی‌شده با ارزش صنعتی.
- ۵- استفاده از روش‌های کروماتوگرافی Preparative HPLC و کروماتوگرافی ستونی برای آنالیز بهتر نمونه‌ها و انجام تست‌ها توسط هر فرکشن به‌صورت جداگانه.
- ۶- استفاده از روش NMR جهت تعیین ساختار دقیق‌تر ترکیبات شناسایی‌شده و درنهایت، تعیین نوع این ترکیبات.

## فصل پنجم

### منابع

1. Nguyen, T.T., et al., "*Five New Records of the Family Aspergillaceae in Korea, Aspergillus europaeus, A. pragensis, A. tennesseensis, Penicillium fluviserpens, and P. scabrosum*". **2020**. 48(2): p. 81-94.
2. Bennett, J.W.J.A.m.b. and genomics, "*An overview of the genus Aspergillus*". **2010**: p. 1-17.
3. Nouripour-Sisakht, S., et al., "*Characterization of the translation elongation factor 1- $\alpha$  gene in a wide range of pathogenic Aspergillus species*". *Journal of medical microbiology*, **2017**. 66(4): p. 419-429.
4. Al-Fakih, A.A. and W.Q.A.J.M. Almaqtri, "*Overview on antibacterial metabolites from terrestrial Aspergillus spp*". **2019**. 10(4): p. 191-209.
5. Vadlapudi, V., et al., "*Aspergillus secondary metabolite database, a resource to understand the secondary metabolome of Aspergillus genus*". **2017**. 7(1): p. 1-10.
6. "<https://www.iictindia.org/a2mdb/Taxonomy.aspx>".
7. Keller, N.P., G. Turner, and J.W.J.N.R.M. Bennett, "*Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics*". **2005**. 3(12): p. 937-947.
8. Kossah, R., et al., "*Optimization of extraction of polyphenols from Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruits*". *Research Journal of Phytochemistry*, **2010**. 4(3): p. 146-153.
9. Barrow, R.A.J.A.J.o.C., "*Natural Products Version?*". **2016**. 69(2): p. 127-128.
10. Bills, G.F. and J.B.J.T.F.K. Gloer, "*Biologically active secondary metabolites from the fungi*". **2017**: p. 1087-1119.
11. Davies, J. and K.S.J.A.c.b. Ryan, "*Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world*". **2012**. 7(2): p. 252-259.
12. Strachan, C., J.J.J.o.i.m. Davies, and biotechnology, "*Antibiotics and evolution: food for thought*". **2016**. 43(2-3): p. 149-153.
13. Wilkinson, H.H., et al., "*Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway*". **2004**. 96(6): p. 1190-1198.
14. Sumita, T., et al., "*Comparison of cell wall localization among Pir family proteins and functional dissection of the region required for cell wall binding and bud scar recruitment of Pir1p*". **2005**. 4(11): p. 1872-1881.
15. Chiang, Y.M., et al., "*Development of genetic dereplication strains in Aspergillus nidulans results in the discovery of aspercryptin*". **2016**. 55(5): p. 1662-1665.
16. Schreiber, S.L.J.N.c.b., "*Small molecules: the missing link in the central dogma*". **2005**. 1(2): p. 64-66.
17. Dutton, M.V. and C.S.J.C.j.o.m. Evans, "*Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment*". **1996**. 42(9): p. 881-895.
18. de Oliveira Ceita, G., et al., "*Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in Theobroma cacao tissues triggered by the hemibiotrophic fungus Moniliophthora perniciosa*". **2007**. 173(2): p. 106-117.

19. Schmalenberger, A., et al., "*Oxalate secretion by ectomycorrhizal Paxillus involutus is mineral-specific and controls calcium weathering from minerals*". **2015**. 5: p. 12187.
20. Shu, Y.-Z., "*Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective*". *Journal of natural products*, **1998**. 61(8): p. 1053-1071.
21. Brakhage, A.A., "*Regulation of fungal secondary metabolism*". *Nature Reviews Microbiology*, **2013**. 11(1): p. 21.
22. Hautbergue, T., et al., "*Evidencing 98 secondary metabolites of Penicillium verrucosum using substrate isotopic labeling and high-resolution mass spectrometry*". *Journal of Chromatography B*, **2017**. 1071: p. 29-43.
23. Schardl, C.L., et al., "*Currencies of mutualisms: sources of alkaloid genes in vertically transmitted epichloae*". **2013**. 5(6): p. 1064-1088.
24. Boruta, T., M.J.A.m. Bizukojc, and biotechnology, "*Induction of secondary metabolism of Aspergillus terreus ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures*". **2016**. 100(7): p. 3009-3022.
25. Frisvad, J.C., T.O.J.A.m. Larsen, and biotechnology, "*Chemodiversity in the genus Aspergillus*". **2015**. 99(19): p. 7859-7877.
26. Manaenko, A., et al., "*Comparison of different preclinical models of intracerebral hemorrhage*, in *Intracerebral Hemorrhage Research*. **2011**, Springer. p. 9-14.
27. Brae, S., et al., "*Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites*". **2009**. 109: p. 3903-3990.
28. Escusa, S., et al., "*Proteasome- and SCF-dependent degradation of yeast adenine deaminase upon transition from proliferation to quiescence requires a new F-box protein named Saf1p*". **2006**. 60(4): p. 1014-1025.
29. Keller, N.P.J.N.c.b., "*Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry*". **2015**. 11(9): p. 671.
30. Macheleidt, J., et al., "*Regulation and role of fungal secondary metabolites*". **2016**. 50: p. 371-392.
31. Collemare, J. and M.F.J.F.m.r. Seidl, "*Chromatin-dependent regulation of secondary metabolite biosynthesis in fungi: is the picture complete?*". **2019**.
32. Brakhage, A.A.J.N.R.M., "*Regulation of fungal secondary metabolism*". **2013**. 11(1): p. 21-32.
33. Fitzpatrick, D.A.J.F.m.l., "*Horizontal gene transfer in fungi*". **2012**. 329(1): p. 1-8.
34. Rastogi, S. and D.A.J.B.e.b. Liberles, "*Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization*". **2005**. 5(1): p. 28.
35. Newman, D.J. and G.M.J.J.o.n.p. Cragg, "*Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014*". **2016**. 79(3): p. 629-661.
36. Pelaez, F., "*Biological activities of fungal metabolites*". *Handbook of industrial mycology*, **2004**: p. 49-92.
37. Pelaez, F.J.H.o.i.m., "*Biological activities of fungal metabolites*". **2004**. 22: p. 41-92.

38. Goyal, S., K. Ramawat, and J.J.F.m.R.s.i.p.S. Mérillon, Cham, "*Different shades of fungal metabolites: an overview*". **2016**: p. 1-29.
39. Bodey, G., S.J.E.J.o.C.M. Vartivarian, and I. Diseases, "*Aspergillosis*". **1989**. 8(5): p. 413-437.
40. Brakhage, A.A. and V. Schroeckh, "*Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters*". *Fungal Genetics and Biology*, **2011**. 48(1): p. 15-22.
41. Schmid, I., et al., "*Natural products in high throughput screening: automated high-quality sample preparation*". *Journal of biomolecular screening*, **1999**. 4(1): p. 15-25.
42. Higgs, R.E., et al., "*Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts*". *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**. 67(1): p. 371-376.
43. YARBROUGH, G.G., et al., "*Screening microbial metabolites for new drugs-theoretical and practical issues*". **1993**. 46(4): p. 535-544.
44. Schroeder, H.W.J.A.E.M., "*Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus**". **1966**. 14(3): p. 381-385.
45. Pezzementi, L. and A.J.C.-b.i. Chatonnet, "*Evolution of cholinesterases in the animal kingdom*". **2010**. 187(1-3): p. 27-33.
46. "<https://www.rcsb.org/3d-view/1EA5/1>".
47. "<https://www.rcsb.org/3d-view/6EMI/1>".
48. Nicolet, Y., et al., "*Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products*". **2003**. 278(42): p. 41141-41147.
49. Chatonnet, A. and O. Lockridge, "*Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*". *Biochemical*, 260 (3): 625-634. **1989**.
50. Pope, C.N. and S.J.B.p. Brimijoin, "*Cholinesterases and the fine line between poison and remedy*". **2018**. 153: p. 205-216.
51. Bazelyansky, M., E. Robey, and J.F.J.B. Kirsch, "*Fractional diffusion-limited component of reactions catalyzed by acetylcholinesterase*". **1986**. 25(1): p. 125-130.
52. Silman, I. and J.L.J.C.-b.i. Sussman, "*Acetylcholinesterase: how is structure related to function?*". **2008**. 175(1-3): p. 3-10.
53. Wiener, S.W. and R.S.J.J.o.i.c.m. Hoffman, "*Nerve agents: a comprehensive review*". **2004**. 19(1): p. 22-37.
54. Colovic, M.B., et al., "*Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology*". **2013**. 11(3): p. 315-335.
55. Mesulam, M., et al., "*Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain*". **2002**. 9(1): p. 88-93.
56. Nordberg, A., et al., "*A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease*". **2013**. 15(2).
57. Andrisano, V., et al., "*A patent review of butyrylcholinesterase inhibitors and reactivators 2010–2017*". **2018**. 28(6): p. 455-465.



58. Chen, X., et al., "*Reaction pathway and free energy profile for butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine*". **2011**. 115(5): p. 1315-1322.
59. Lockridge, O.J.P. and therapeutics, "*Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses*". **2015**. 148: p. 34-46.
60. Lockridge, O., et al., "*Naturally occurring genetic variants of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and their potential impact on the risk of toxicity from cholinesterase inhibitors*". **2016**. 29(9): p. 1381-1392.
61. Manoharan, I., et al., "*A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India*". **2007**. 378(1-2): p. 128-135.
62. Moodie, L.W., et al., "*Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms*". Natural product reports, **2019**.
63. Weinreb, R.N., T. Aung, and F.A.J.J. Medeiros, "*The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review*". **2014**. 311(18): p. 1901-1911.
64. Goel, M., et al., "*Aqueous humor dynamics: a review*". **2010**. 4: p. 52.
65. Doucette, L.P. and M.A.J.O.g. Walter, "*Prostaglandins in the eye: Function, expression, and roles in glaucoma*". **2017**. 38(2): p. 108-116.
66. Serrano-Pozo, A., et al., "*Neuropathological alterations in Alzheimer disease*". **2011**. 1(1): p. a006189.
67. Vardy, E.R., A.J. Catto, and N.M.J.T.i.m.m. Hooper, "*Proteolytic mechanisms in amyloid- $\beta$  metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease*". **2005**. 11(10): p. 464-472.
68. Macdonald, I.R., et al., "*Probing the peripheral site of human butyrylcholinesterase*". **2012**. 51(36): p. 7046-7053.
69. Konrath, E.L., et al., "*Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease*". **2013**. 65(12): p. 1701-1725.
70. Pinho, B.R., et al., "*Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment*". **2013**. 65(12): p. 1681-1700.
71. Orhan, I.E.J.C.n., "*Nature: a substantial source of auspicious substances with acetylcholinesterase inhibitory action*". **2013**. 11(4): p. 379-387.
72. Tricco, A.C., et al., "*Comparative effectiveness and safety of cognitive enhancers for treating Alzheimer's disease: systematic review and network metaanalysis*". **2018**. 66(1): p. 170-178.
73. Polinsky, R.J., "*Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease*". Clinical therapeutics, **1998**. 20(4): p. 634-647.
74. Wilkinson, D.G., "*The pharmacology of donepezil: a new treatment for Alzheimer's disease*". Expert opinion on pharmacotherapy, **1999**. 1(1): p. 121-135.

75. Sramek, J.J., E.J. Frackiewicz, and N.R. Cutler, "Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine". *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **2000**. 9(10): p. 2393-2402.
76. Komloova, M., et al., "Structure-activity relationship of quaternary acetylcholinesterase inhibitors-outlook for early myasthenia gravis treatment". *Current medicinal chemistry*, **2010**. 17(17): p. 1810-1824.
77. Ali, T.B., et al., "Adverse effects of cholinesterase inhibitors in dementia, according to the pharmacovigilance databases of the United-States and Canada". **2015**. 10(12).
78. Das, S. and S.J.C.t.i.m.c. Basu, "Multi-targeting strategies for Alzheimer's disease therapeutics: pros and cons". **2017**. 17(27): p. 3017-3061.
79. Lan, J.-S., et al., "Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin-N-benzyl pyridinium hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease". **2017**. 139: p. 48-59.
80. Ramsay, R.R. and K.F.J.M. Tipton, "Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs". **2017**. 22(7): p. 1192.
81. Luo, H., et al., "Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilentata*". **2013**. 23(2): p. 161-166.
82. Yoo, I.-D., et al., "Isoterreulactone A, a novel meroterpenoid with anti-acetylcholinesterase activity produced by *Aspergillus terreus*". **2005**. 15(2): p. 353-356.
83. Ge, H.M., et al., "Bioactive alkaloids from the plant endophytic fungus *Aspergillus terreus*". **2010**. 76(08): p. 822-824.
84. Liu, J. and G. Liu, *Analysis of secondary metabolites from plant endophytic fungi*, in *Plant Pathogenic Fungi and Oomycetes*. **2018**, Springer. p. 25-38.
85. Benabent, M., et al., "Cholinesterase assay by an efficient fixed time endpoint method". **2014**. 1: p. 258-263.
86. Shetab-Boushehri, S.V.J.E.J., "Ellman's method is still an appropriate method for measurement of cholinesterases activities". **2018**. 17: p. 798-799.
87. Ellman, G.L., et al., "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". **1961**. 7(2): p. 88-95.
88. Ali-Shtayeh, M.S., et al., "In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease". **2014**. 4(9): p. 381-400.
89. Akar, Z., et al., "A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs". **2017**. 32(1): p. 640-647.
90. Blois, M.S.J.N., "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". **1958**. 181(4617): p. 1199-1200.
91. Brand-Williams, W., et al., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". **1995**. 28(1): p. 25-30.
92. Hudz, N., et al., "Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts". **2019**. 66: p. 209.

93. Rohloff, J.J.M., "Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling". **2015**. 20(2): p. 3431-3462.
94. Kavitha, A. and H.S.J.F.i.m. Savithri, "Biological significance of marine Actinobacteria of east coast of Andhra Pradesh, India". **2017**. 8: p. 1201.
95. Hampel, H., et al., "The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease". **2018**. 141(7): p. 1917-1933.
96. H Ferreira-Vieira, T., et al., "Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system". **2016**. 14(1): p. 101-115.
97. Albarracin, S.L., et al., "Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease". **2012**. 15(1): p. 1-9.
98. Mushtaq, G., et al., "Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus". **2014**. 13(8): p. 1432-1439.
99. Szwajgier, D.J.Z.f.N.C., "Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives". **2013**. 68(3-4): p. 125-132.
100. Lourenço, S.C., M. Moldão-Martins, and V.D.J.M. Alves, "Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications". **2019**. 24(22): p. 4132.
101. Arora, D.S. and P.J.I.p. Chandra, "Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*". **2011**. 2011.
102. Baschieri, A., et al., "Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils". **2017**. 232: p. 656-663.
103. Foti, M.C., R.J.J.o.P. Amorati, and Pharmacology, "Non-phenolic radical-trapping antioxidants". **2009**. 61(11): p. 1435-1448.
104. Hernandez Zarate, M.S., et al., "Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico". **2018**. 38(2): p. 210-215.
105. Sugiharto, S., T. Yudiarti, and I.J.A. Isroli, "Assay of antioxidant potential of two filamentous fungi isolated from the Indonesian fermented dried cassava". **2016**. 5(1): p. 6.
106. Benny, A. and J.J.P.m. Thomas, "Essential oils as treatment strategy for Alzheimer's disease: Current and future perspectives". **2019**. 85(03): p. 239-248.
107. Unsal-Tan, O., et al., "Synthesis, molecular docking, and biological evaluation of novel 2-pyrazoline derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease". **2019**. 10(6): p. 1018-1026.
108. Felczak, A., et al., "Quinoline biodegradation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans* and adaptive modifications of the fungal membrane composition". **2016**. 23(9): p. 8872-8880.
109. Shah, M.S., et al., "Quinoline containing chalcone derivatives as cholinesterase inhibitors and their in silico modeling studies". **2018**. 76: p. 310-317.
110. Camps, P., et al., "New tacrine– huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease". **2000**. 43(24): p. 4657-4666.

111. Isomae, K., et al., "*Effects of T-82, a new quinoline derivative, on cholinesterase activity and extracellular acetylcholine concentration in rat brain*". **2002**. 88(2): p. 206-212.
112. Lotfy, M.M., et al., "*Di-(2-ethylhexyl) phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from river Nile derived fungus Aspergillus awamori*". **2018**. 7(3): p. 263-269.
113. Kumari, M., et al., "*Antiproliferative and antioxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus Talaromyces purpureogenus*". **2018**. 9: p. 1777.

## **Abstract**

Cholinesterase inhibitors (anticholinesterases) are commonly prescribed to reduce the symptoms of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease. Nowadays, achieving drugs with higher pharmaceutical effects and fewer side effects, especially from natural sources, is the goal of many scientific researches around the world. In this dissertation, nine species of *Aspergillus* fungi have been studied. Considering that, four isolates of *Aspergillus tubingensis* and one isolate of other eight species have been used, in all, 12 fungal samples have been investigated. In this study, the ability of ethyl acetate extracts of these 12 fungi to inhibit two cholinesterase enzymes, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), was evaluated by Elman method. The IC<sub>50</sub> values of fungal extracts for AChE and BuChE inhibition were varied between 46-1735 and 75-3467 µg/ml, respectively. A1 (*Aspergillus flavus*) and A12 (*Eurotium Heterothallic*) showed the highest and lowest ability to inhibit AChE, respectively. The lowest anti-BuChE activity was also related to A12, while, A5 which is an isolate of *Aspergillus tubingensis*, had the highest activity. The antioxidant activity and total phenolic content of these 12 extracts were measured by DPPH and Folin-Ciocalteu methods, respectively. Comparison of the results obtained from these two studies, showed that only some extracts have a direct correlation between their DPPH scavenging activity and total phenolic contents. Finally, identification of the constituents of A1 and A5 extracts by GC/MS method indicated that alkaloid compounds account a high percentage of the total composition of the two extracts. It is noteworthy that Alkaloid compounds with anticholinesterase activity have already been identified, so it can be suggested that whole or an important part of the anticholinesterase activity of the two samples is related to these compounds. However, many more studies are required to express a definite opinion in this regard.

**Keywords:** Anticholinesterases, Alzheimer's disease, *Aspergillus*, GC/MS, Alkaloid.



Ministry of Science  
Research and technology  
Graduate University of Advanced Technology  
Institute of Environmental Sciences  
Department of biotechnology

---

**The investigation of anticholinesterase activity of  
secondary metabolites from several species of  
Aspergillus fungus**

---

A Thesis for Degree of Master of Science (M.Sc.) in Biochemistry

Fatemeh Pishgouii

Supervisor

Dr. Safa Lotfi

Advisor

Dr. Ebrahim Sedaghati

September 2020