Sadra Med. Sci. J. 2026; 14(1): 12-23.

Sadra Medical Sciences Journal

https://smsj.sums.ac.ir/

Original Article

Antioxidant and Acetyl- and Butyryl Cholinesterase Inhibitory Activities of Safoof-e-Hefz: A Polyherbal Memory-Enhancer Formulation from Traditional Persian Medicine

Mohammad Ali Farboodniay Jahromi[1], PhD; Donya Ezzati[1,2], Pharm.D; Fatemeh Farmani[1], MSc; Amirhossein Sakhteman[3], PhD; Mahmoudreza Moein[4], PhD; Hamidreza Adhami[5], PhD; Mohammad Mehdi Zarshenas[1,2*], PhD

[1]Medicinal Plants Processing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[2]Department of Phytopharmaceuticals (Traditional Pharmacy), School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[3]Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[4]Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[5]Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article History:
Received: May 26, 2024
Accepted: July 25, 2024

***Corresponding Author:**
Mohammad Mehdi Zarshenas, PhD;
Medicinal Plants Processing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Email: zarm@sums.ac.ir

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease, known as "Nesyan" in Traditional Persian Medicine (TPM), is characterized by progressive memory loss and cognitive decline. TPM proposes various treatments, including compound remedies such as Safoof-e-hefz. The cholinergic hypothesis posits that excessive acetylcholinesterase (AChE) activity reduces brain acetylcholine levels, contributing to disease symptoms.

Methods: This study evaluated the antioxidant activity of six herbal constituents of Safoof-e-hefz using the DPPH radical scavenging assay. Methanol and dichloromethane extracts of each constituent, as well as the complete formulation, were assessed for acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activities using Ellman's method, with tacrine as the positive control.

Results: The findings identified Melissa officinalis (lemon balm) as the most effective constituent, exhibiting the highest antioxidant (IC50=64.1 µg/mL) and AChE inhibitory (89%) activities. The prepared formulation revealed an acceptable effect on AChE (up to 77%) and BChE, while showing no significant overall antioxidant activity.

Conclusion: In all quantitative analyses, methanol extracts demonstrated superior overall activity to dichloromethane extracts. Additionally, none of the extracts displayed a dose-dependent effect, which could be attributed to their high tannin content, as tannins can chelate the enzyme and interfere with accurate inhibitory activity determination.

Keywords: Alzheimer's disease, Antioxidants, Cholinesterase Inhibitors, Persian medicine, Nootropic Agents

Please cite this article as:
Farboodniay Jahromi MA, Ezzati D, Farmani F, Sakhteman AH, Moein MR, HR Adhami, Zarshenas MM. Antioxidant and Acetyl- and Butyryl Cholinesterase Inhibitory Activities of Safoof-e-Hefz: A Polyherbal Memory-Enhancer Formulation from Traditional Persian Medicine. Sadra Med. Sci. J. 2026; 14(1): 12-23. doi: 10.30476/smsj.2025.107280.1644.

Copyright: ©Sadra Medical Sciences Journal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 4.0 International License. This license allows reusers to copy and distribute the material in any medium or format in unadapted form only, and only so long as attribution is given to the creator. The license allows for commercial use.

دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۵، ۱۲-۲۳.

مجله علوم پزشکی صدرا

https://smsj.sums.ac.ir/

مقاله پژوهشی

اثر آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیمی استیل و بوتیریل کولین استراز در فرمولاسیون ترکیبی «سفوف حفظ» مورد استفاده در آلزایمر در طب سنتی ایران

محمد علی فربودنیای جهرمی[۱]، دنیا عزتی[۱،۲]، فاطمه فرمانی[۱]، امیرحسین ساختمان[۳]، محمودرضا معین[۴]، حمیدرضا ادهمی[۵]، محمد مهدی زرشناس[۱،۲*]

[۱]مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[۲]گروه داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[۳]گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[۴]گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[۵]گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۳

***نویسنده مسئول:**
محمد مهدی زرشناس،
مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
پست الکترونیکی: zarm@sums.ac.ir

چکیده

مقدمه: آلزایمر مهم‌ترین و رایج‌ترین نوع بیماری فراموشی در انسان است. تاکنون مکانیسم و پاتوفیزیولوژی بروز این بیماری به‌درستی روشن نشده است، اما یکی از مهم‌ترین فرضیه‌های موجود، فرضیه کولینرژیک است که فعالیت زیاد آنزیم استیل کولین استراز سبب کم شدن میزان استیل کولین در مغز می‌شود و علائم بیماری بروز پیدا می‌کنند. آلزایمر در طب سنتی با عناوینی همچون نسیان و فسادالذکر بررسی شده و برای آن مفردات و مرکبات مختلفی تجویز شده است. یکی از مرکبات تجویز شده، «سفوف حفظ» شامل دارچین، گل گاوزبان، عروسک پشت پرده، دارفلفل، مصطکی و بادرنجبویه است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکالی DPPH و اثر مهار آنزیمی عصاره‌های متانولی و دی کلرومتانی هر یک از اجزا و فراورده سفوف علیه آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز در حضور تاکرین به‌عنوان کنترل، مورد ارزیابی گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در میان اجزای سفوف، بادرنجبویه بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز را دارد. سفوف بر مهار دو آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز نیز اثری قابل قبول دارد، اما اثر آنتی‌اکسیدانی آن به‌طورکلی چندان قابل ملاحظه نبود.

نتیجه‌گیری: اثرگذاری عصاره‌های متانولی بیش از عصاره‌های دی کلرومتانی بود. علاوه بر این، اثر هیچ‌یک از گیاهان و فراورده سفوف، وابسته به دوز مصرفی نبود. یکی از دلایل این امر می‌تواند غلظت‌های بالای تانن‌ها در بین ترکیبات باشد که با نقش شلات کنندگی روی آنزیم، مانع از تعیین دقیق اثر ضد آنزیمی می‌شوند.

کلمات کلیدی: آلزایمر؛ آنتی‌اکسیدان‌ها؛ مهارکننده‌های کولین‌استراز؛ طب ایرانی؛ عوامل تقویت‌کننده‌ی شناخت (نوتروپیک‌ها)

لطفاً این مقاله را به این صورت استناد کنید:
فربودنیای جهرمی مع، عزتی د، فرمانی ف، ساختمان اح، معین مر، ادهمی حر، زرشناس مم. اثر آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیمی استیل و بوتیریل کولین استراز در فرمولاسیون ترکیبی «سفوف حفظ» مورد استفاده در آلزایمر در طب سنتی ایران. مجله علوم پزشکی صدرا. دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۵، ۱۲-۲۳.

Copyright: ©Sadra Medical Sciences Journal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 4.0 International License. This license allows reusers to copy and distribute the material in any medium or format in unadapted form only, and only so long as attribution is given to the creator. The license allows for commercial use.

مقدمه

آلزایمر[1] که در فارسی به‌عنوان بیماری زوال عقل نیز شناخته می‌شود، رایج‌ترین فرم بیماری فراموشی است (۱). این بیماری به‌تدریج سبب زوال عقل می‌شود و با اختلال در رفتار، آگاهی و کارکرد فرد نیز همراه است. مکانیسم پاتوفیزیولوژیک این بیماری به طور دقیق شناخته نشده است. ضمناً درمان واقعی نیز برای این بیماری وجود ندارد. اگرچه داروها روند بیماری را کند می‌کنند و علائم را تسکین می‌دهند، اما در نهایت این بیماری سبب مرگ مبتلا خواهد شد (۲).

به‌طورکلی تظاهرات بالینی آلزایمر به دو دسته شناختی و رفتاری تقسیم می‌شوند. تظاهرات شناختی شامل علائمی همچون فراموشی و اختلال تکلم است، درحالی‌که اختلالات غیر شناختی یا رفتاری شامل علائمی نظیر عدم توانایی در مراقبت از خویشتن و انجام مواردی مانند لباس پوشیدن است (۳).

حدوداً ۳۵ میلیون انسان در جهان به آلزایمر یا سایر انواع زوال عقلی مبتلا هستند که برآورد می‌شود این آمار در سال ۲۰۳۰ به ۶۵ میلیون نفر و در سال ۲۰۵۰ به ۱۱۵ میلیون نفر برسد. شیوع بیماری با افزایش سن، زیاد می‌شود. به ازای هر ۵ سال از ۶۵ سالگی به بالا شیوع بیماری دو برابر می‌شود و در افراد بالای ۸۵ سال به طور میانگین از هر سه نفر یک نفر به آلزایمر مبتلا است (۵، ۴).

برای درمان آلزایمر داروی قطعی وجود ندارد. داروهای تأیید شده برای درمان آلزایمر بیشتر نشانه‌ها و علائم آلزایمر را در فرد کنترل می‌کنند و به خودی خود تأثیر کمی بر جلوگیری از پیشرفت بیماری دارند. اکنون تکیه‌گاه اصلی درمان آلزایمر نوروترانسمیترهای مغز[2] ست که به‌عنوان هدف درمان مورد توجه قرار گرفته‌اند (۶). استیل کولین[3] یک نوروترانسمیتر مهم در امر یادگیری و حافظه است. استیل کولین ابتدا در وزیکول‌های پیش سیناپسی[4] سنتز و ذخیره‌سازی می‌گردد و پس از رهایی و آزاد شدن به داخل سیناپس، می‌تواند هم گیرنده‌های موسکارینی[5] و هم نیکوتینی[6] را فعال سازد و داخل سیناپس توسط دو آنزیم استیل کولین استراز[7] و بوتیریل کولین استراز[8] تجزیه می‌شود.

1. Alzheimer's disease or AD
2. Brain neurotransmitters
3. Acetylecholine
4. Presynaptic vesicles
5. Muscarinic receptors
6. Nicotinic receptors
7. Acetylcholinesterase
8. Butyrylcholinesterase

ازاین‌رو مهارکنندگان استیل کولین استراز می‌توانند زمان ماندن استیل کولین را در سیناپس افزایش دهند. بررسی بیوشیمی مغز بیماران آلزایمر در دهه ۱۹۷۰ نشان داد که در سطح نئوکورتکس[9] کمبود شدید استیل کولین و آنزیم سازنده آن کولین ترانسفراز[10] وجود دارد (۷). از سوی دیگر فرآیند اکسیداسیون در تجمع پپتیدهای آمیلوئیدی[11] نقش ایفا می‌کند که می‌توانند در تخریب نورونی و پیشرفت بیماری آلزایمر نقش داشته باشند. کاهش آسیب ناشی از اکسیداسیون می‌تواند به جلوگیری از پیشرفت بیماری کمک کند، ازاین‌رو اثر ترکیبات آنتی‌اکسیدان در بیماری آلزایمر در مطالعات پیش بالینی مورد تحقیق گسترده قرار گرفته است (۸) در کنار راهکارهای درمانی در طب امروزی، مکاتب طب سنتی دنیا همچون طب سنتی ایران نیز علاوه بر راهکارهای تغذیه‌ای و تغییر و اصلاح سبک زندگی، داروهای متنوع مفرد و مرکب در کنترل آلزایمر ارائه داده‌اند. در متون داروسازی سنتی برای کنترل و درمان آلزایمر (نسیان، زوال عقل، رَعونت و حُمق) و علائم مرتبط با آن، جدا از داروهای مفرده، درمان‌های مرکب فراوانی در قالب اشکال دارویی سنتی که تنوع آن نیز بسیار گسترده است، ذکر شده است (۱۰، ۹). این مرکبات که در آن‌ها، مفردات با تعداد و نسبت‌های مختلفی وارد شده‌اند، بسته به فرم مصرف به‌صورت یک شکل دارویی مشخص و با مقدار مصرف معین (قدر شربت) توصیه شده‌اند. از مثال‌های معروف اشکال دارویی که اختصاصاً برای کنترل آلزایمر در طب سنتی ایران از آن‌ها سخن به میان آمده است، می‌توان به اشکال دارویی خوراکی معجون، قرص، حَب، سَفوف، اِطریفَل، ایارَج و... اشاره کرد. در مطالعه حاضر با استناد به قَرابادین کبیر[12] (۱۱) یکی از متون مرجع داروسازی سنتی، یکی از فرمول‌ها به نام «سَفوف حِفظ»[13] (به فرم مخلوط پودر خوراکی) مد نظر قرار گرفته و پس از تهیه در آزمایشگاه به بررسی اثرات مهاری احتمالی آن بر آنزیم‌های استیل[14] و بوتیریل کولین استراز[15] و همچنین توان جمع‌آوری رادیکال آزاد[16] DPPH[17] توسط آن پرداخته می‌شود. اجزاء گیاهی سفوف حفظ شامل گل گاوزبان، عروسک پشت پرده، دارفلفل، بادرنجبویه، مَصطکی و دارچین است.

9. Neocortex
10. Cholinetransferase
11. Amyloid peptide
۱۲. از کتب مرجع طب سنتی درباره داروهای مرکب.
13. Safoof-e-hefz
14. Aacetylcholinesterase
15. Butyrylcholinesterase
16. Free radical scavenging
17. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

جدول ۱. فراورده سفوف مورد استفاده و نسبت تشکیل‌دهنده اجزای گیاهی

نام فارسی	نام علمی گیاه	کد هرباریوم	اندام مورد استفاده
دارچین	*Cinnamomum verum* J.Presl	PM905	پوست
گل گاوزبان	*Echium amoenum Fisch.* C.A.Mey.	PM960	گل
عروسک پشت پرده	*Physalis alkekengi* L.	PM956	میوه
بادرنجبویه	*Melissa officinalis* L.	PM959	برگ
دارفلفل	*Piper longum* L.	PM957	میوه
مصطکی	*Pistacia lentiscus* L.	PM958	صمغ

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی

گیاهان مورد مطالعه از بازار گیاهان دارویی شیراز تهیه و توسط گیاه‌شناس بخش داروسازی سنتی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز شناسایی و نمونه‌های کدگذاری شده هر یک از آن‌ها در هرباریوم دانشکده ذخیره شد. فهرست این گیاهان و نسبت آن‌ها در فراورده سفوف در (جدول ۱) ارائه شده است.

آماده‌سازی عصاره‌ها و تهیه سفوف

گیاهان مورد بررسی توسط دستگاه آسیاب برقی خرد و پودر شدند. میزان ۳۰ گرم از پودر هر گیاه با ۳۰۰ میلی‌لیتر دی کلرو متان[18] در یک ارلن مخلوط و استخراج عصاره، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سونیکاتور[19] انجام شد. فرایند استخراج با دو بار تکرار انجام و محلول حاصل، جمعاً ۶۰۰ میلی‌لیتر عصاره دی کلرو متانی[20] از هر گیاه از کاغذ صافی عبور داده شد و در روتاری اواپراتور[21] تغلیظ و به مدت ۷۲ ساعت در فریز درایر[22] برای حذف کامل رطوبت و حلال خشک شد.

گیاه باقی‌مانده از مرحله قبل در فضای آزمایشگاه خشک و استخراج عصاره متانولی[23]، با روش مشابه تهیه عصاره دی کلرو متانی انجام شد. در این مرحله نیز از هر گیاه ۶۰۰ میلی‌لیتر عصاره متانولی استخراج شد که پس از عبور از صافی با شرایط مشابه مرحله قبل، تغلیظ و خشک شدند. در مرحله بعد، عصاره دی کلرومتانی و متانولی از فراورده سفوف (مخلوط گیاهان) تهیه گردید. بدین منظور، از گیاه مصطکی (۱۱ گرم)، دارفلفل، گل گاوزبان، بادرنجبویه و دارچین هر کدام (۱ گرم) و گیاه عروسک پشت پرده ۱۱ عدد میوه، پودر تهیه و مخلوط شد. مخلوط حاصل، مشابه روش قبل با متانول و دی کلرومتان صاره‌گیری شدند. عصاره‌های به دست آمده سپس در روتاری تغلیظ و در دستگاه اسپید وکیوم[24] و فریز درایر خشک شد و تا زمان آنالیز در دمای ۱۸°C نگهداری شدند.

ارزیابی توان پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH

برای تهیه واکنشگر، محلول ۱ میلی‌گرم DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) در متانول در یک بالن ژوژه[25] به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به دور از نور در یخچال نگه‌داری و تا قبل از ۲۴ ساعت استفاده شد. غلظت‌های ۳۲۰۰- ۶/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه و برای انجام آزمون از پلیت ۹۶ خانه[26] استفاده شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی مولار DPPH به تمام خانه‌های پلیت اضافه و پس از مخلوط شدن، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور نگهداری شد و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر فرابنفش[27] خوانده شد. هر یک از تست‌ها تا سه بار تکرار انجام شد و درصد پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌ها بر اساس (معادله ۱) محاسبه گردید (۱۲).

درصد پاکسازی رادیکال آزاد DPPH

$$(\%) = 100 \times \left[100 - \frac{Absorbance\ test - absorbance\ blank}{absorbance\ control}\right]$$

(معادله ۱)

ارزیابی مهار آنزیمی

در این مرحله به‌منظور ارزیابی توان مهار آنزیمی عصاره‌های متانولی و دی کلرو متانی، ۴ غلظت ۱/۲۵،

18. Dichloromethane
19. Sonicator
20. Dichloromethane extract
21. Rotary evaporator
22. Freezdryer
23. Methanolic extract
24. Speed vacuum cocentrator
25. Volumetric flask
26. 96-well plate
27. UV spectrophotometer

۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه شدند. برای تهیه این غلظت‌ها ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره خشک‌شده هر گیاه در محلول حاوی ۴ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO)[28] و ۶ میلی‌لیتر بافر فسفات حل‌شده و به‌این‌ترتیب غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه شد. سپس با روش رقیق‌سازی سریالی، سایر غلظت‌ها تهیه شدند. بدین ترتیب که ۵ میلی‌لیتر از محلول حاوی عصاره به ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات افزوده شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از این محلول نیز به ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات افزوده شد و به همین ترتیب رقیق‌سازی تا دستیابی به غلظت‌های پایین‌تر ادامه یافت. در انجام تست آنزیمی از شناساگر المن[29]، 5, 5′-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) استفاده شد. برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر از محلول DTNB، ۶/۳۹ میلی‌گرم از پودر DTNB در کمی آب مقطر حل شد و بعد با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این شناساگر برای اندازه‌گیری فعالیت استیل کولین استراز با روش اسپکتروفوتومتری[30] به کار می‌رود و عملکرد آن به‌گونه‌ای است که تیوکولین[31] حاصل از تجزیه استیل کولین، توسط استیل کولین استراز با DTNB واکنش می‌دهد و تولید رنگ زرد می‌کند. فعالیت بیشتر منجر به تولید رنگ زرد بیشتر خواهد شد که می‌توان برای سنجش شدت فعالیت آنزیم، بر اساس جذب نوری محصول واکنش در اسپکتروفوتومتر فرابنفش فعالیت آنزیم را اندازه گرفت. در این مطالعه، از دو آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز استفاده شد. به‌عنوان سوبسترای[32] این دو آنزیم، از دو ماده یدید بوتیریل تیوکولین[33] و یدید استیل تیوکولین[34] استفاده شد. از هر دو سوبسترا غلظت ۰/۰۷۵ میلی مولار تهیه شد. بدین منظور، ۲۳۷/۹ میلی‌گرم یدید بوتیریل تیوکولین و ۲۱۶/۸ میلی‌گرم یدید استیل تیوکولین، هر یک در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. همچنین برای تهیه آنزیم‌ها ۲ میلی‌لیتر بافر گلیسیرین[35] به ویال حاوی آنزیم افزوده شد و سپس این حجم به ۴ حجم ۵۰۰ میکرو لیتر تقسیم شد. هر یک از حجم‌های ۵۰۰ میکرو لیتری، به طور جداگانه با استفاده از بافر گلیسیرین به حجم ۱۵ میلی‌لیتر رسانده و در انتها به ۱۵ حجم ۱ میلی‌لیتری تقسیم شده و در اپندورف[36]، در دمای ۱۸°C نگهداری شدند تا آنزیم، غیرفعال و پایدار باقی بماند. سنجش میزان فعالیت آنزیمی با استفاده از پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای[37] انجام شده و ستون اول هر پلیت به آنزیم اختصاص داده شد. ستون‌های ۲ تا ۶ حاوی عصاره گیاهان (هر ستون مربوط به یک گیاه) و آنزیم است. در هر پلیت، از ۵ گیاه مختلف، با غلظت‌های برابر (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) استفاده شد.

در هر پلیت ۲۴ خانه‌ای، مقدار ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۵۰ میکرو لیتر شناساگر المن و ۲۰ میکرو لیتر سوبسترا منتقل شد. ردیف D عاری از آنزیم و به‌عنوان بلانک[38] در نظر گرفته شد. در خانه‌های A تا D به هر یک از ستون‌های ۲ تا ۶، ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره گیاه حل‌شده در DMSO [39]و بافر منتقل شد. ازآنجاکه DMSO ممکن است اثر مهارکنندگی داشته باشد، در ستون اول، میزان ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (نسبت ۲ به ۳ از DMSO به بافر فسفات) که به‌عنوان حلال عصاره استفاده شد، به‌عنوان بلانک در خانه‌های A تا D اضافه شد. سپس در تمام خانه‌های ردیف‌های A، B و C مقدار ۵۰ میکرو لیتر از آنزیم اضافه و خانه D از ستون اول به‌عنوان بلانک آنزیم و سایر خانه‌های ردیف D به‌عنوان بلانک عصاره‌ها در نظر گرفته شدند.

سپس پلیت‌ها به دستگاه اسپکتروفوتومتر انتقال داده شدند و جذب نوری هر خانه در ۶ زمان شامل دقایق ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ خوانده شد. شدت جذب نوری بیشتر بیانگر فعالیت مهاری بالاتر عصاره‌ها علیه آنزیم‌های مورد مطالعه محسوب شدند. از داروی تاکرین[40] به‌عنوان استاندارد مهار آنزیمی به همراه عصاره‌های مورد آزمایش استفاده شد و تاکرین نیز مشابه عصاره‌های گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. تنها تفاوت این مرحله با مرحله تست آنزیمی عصاره‌ها، غلظت تاکرین بود. در این مرحله ابتدا در DMSO و بافر فسفات (pH=۸)، با نسبت مشابه با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها، غلظت ۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تاکرین تهیه و سپس غلظت‌های ۰/۲، ۰/۰۲، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از این محلول تهیه گردید و مراحل ارزیابی توان مهار آنزیمی آن‌ها انجام شد. سایر مراحل ارزیابی تاکرین به‌عنوان استاندارد، مشابه با عصاره‌ها بود.

ملاحظات اخلاقی

- آزمون‌های انجام شده در شرایط برون تنی انجام شده و از پروتکل‌های استاندارد رایج آزمایشگاهی استفاده گردیده است.

28. Dimethylsufoxide
29. Ellman's reagent
30. Spectrophotometric method
31. Thiocholine
32. Substrate
33. Butyrylthiocholine iodide
34. Acetylcholine iodide
35. Glycerin buffer
36. Eppendorf
37. 24-well plate
38. Blank
39. Dimethylsulfoxide
40. Tacrine

جدول ۲. راندمان عصاره‌های متانولی و دی کلرو متانی فراورده سفوف و اجزاء گیاهی آن.

عصاره دی کلرومتانی	بازده عصاره گیری (٪)	عصاره متانولی	بازده عصاره گیری (٪)
سفوف	۴۰	سفوف	۹/۵
گل گاوزبان	۳	گل گاوزبان	۲۱
عروسک پشت پرده	۹	عروسک پشت پرده	۴
دارفلفل	۵	دارفلفل	۱۰
مصطکی	۹۰	مصطکی	۰/۴
بادرنجبویه	۲/۹	بادرنجبویه	۸/۶
دارچین	۵/۵	دارچین	۷

جدول ۳. ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی و پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH فراورده سفوف و اجزاء گیاهی آن

عصاره دی کلرومتانی	IC50 (µg/ml)*	عصاره‌های متانولی	IC50 (µg/ml)
سفوف	۵۶۱۶±۳	سفوف	۱۲۲۹±۱
گل گاوزبان	۵۰۷۴/۷±۱	گل‌گاوزبان	۶۰۰/۱±۴
عروسک پشت پرده	۱۲۲۹/۳±۸	عروسک پشت پرده	۲۸۷۷/۵±۷
دارفلفل	۲۳۸۷/۵±۵	دارفلفل	۳۰۲۰±۵
بادرنجبویه	۱۱۱۳/۶±۳	بادرنجبویه	۶۴/۰±۱/۳
مصطکی	۴۰۳۹±۱۱	مصطکی	۵۰۵۳/۶±۴
دارچین	۳۷۴/۱±۱	دارچین	۴۱/۰±۰۳/۰۵

*µg/ml= میکروگرم/میلی‌لیتر، IC50=Inhibitory concentration

جدول ۴. درصد مهار آنزیمی توسط استاندارد تاکرین در غلظت‌های مختلف

غلظت داروی تاکرین *(mg/ml)	مهار آنزیم استیل کولین استراز (٪)	مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز (٪)
۰/۲	۶۳	۷۵
۰/۰۲	۴۱	۵۵
۰/۰۰۲	۲۱	۲۰

*mg/ml= میلی‌گرم/میلی‌لیتر

• این مقاله شامل بخشی از نتایج به دست آمده از پایان‌نامه خانم دکتر دنیا عزتی جهت اخذ درجه دکترای عمومی داروسازی است (شماره طرح: ۱۰۸۳۹) و از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز کد تأیید اخلاق با شماره IR.SUMS.REC.1394.S1203 دریافت نموده است.

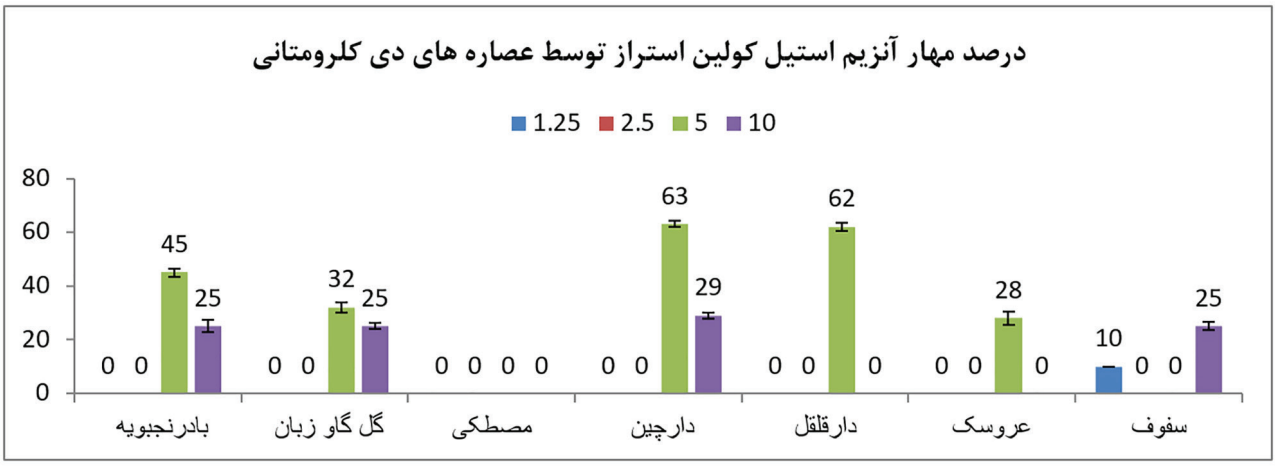
یافته‌ها

راندمان هریک از عصاره‌های متانولی و دی کلرو متانی فراورده سفوف و اجزاء گیاهی آن تعیین و در (جدول ۲) ارائه شده است.

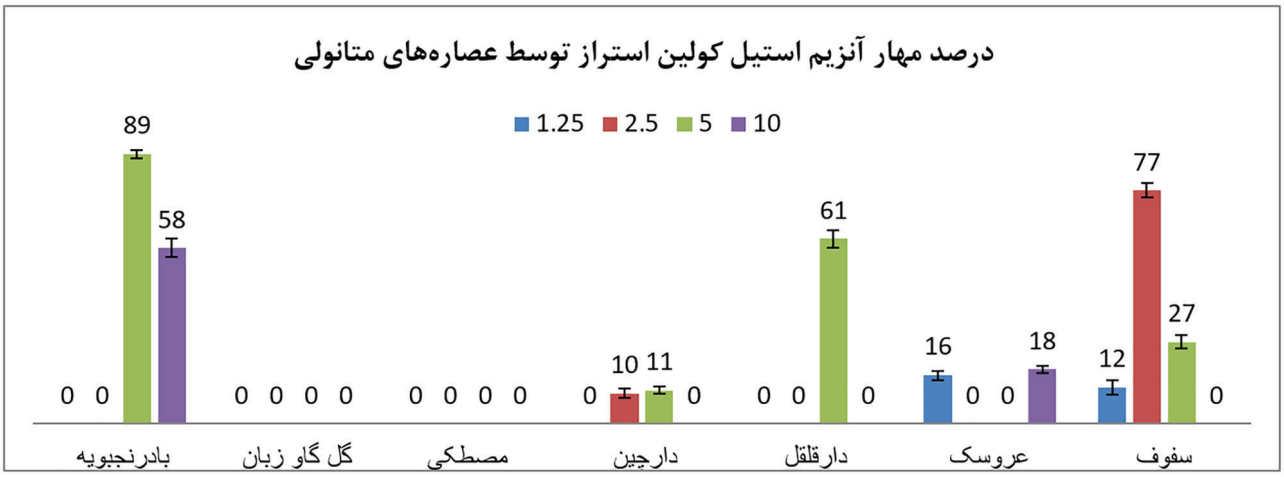
به‌منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، آزمون ارزیابی توان پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH برای هر یک از عصاره‌ها و همچنین عصاره سفوف انجام شد و میزان IC50[41] هر یک از عصاره‌ها محاسبه گردید. مقادیر به دست آمده در این آزمون در (جدول ۳) ارائه شده است.

نتایج تست آنزیمی بر مبنای یافتن درصد مهار آنزیمی استوار بود. بدین منظور، شدت جذب نمونه‌ها در پلیت‌های حاوی عصاره و آنزیم و همچنین پلیت‌های حاوی داروی تاکرین و آنزیم در شش

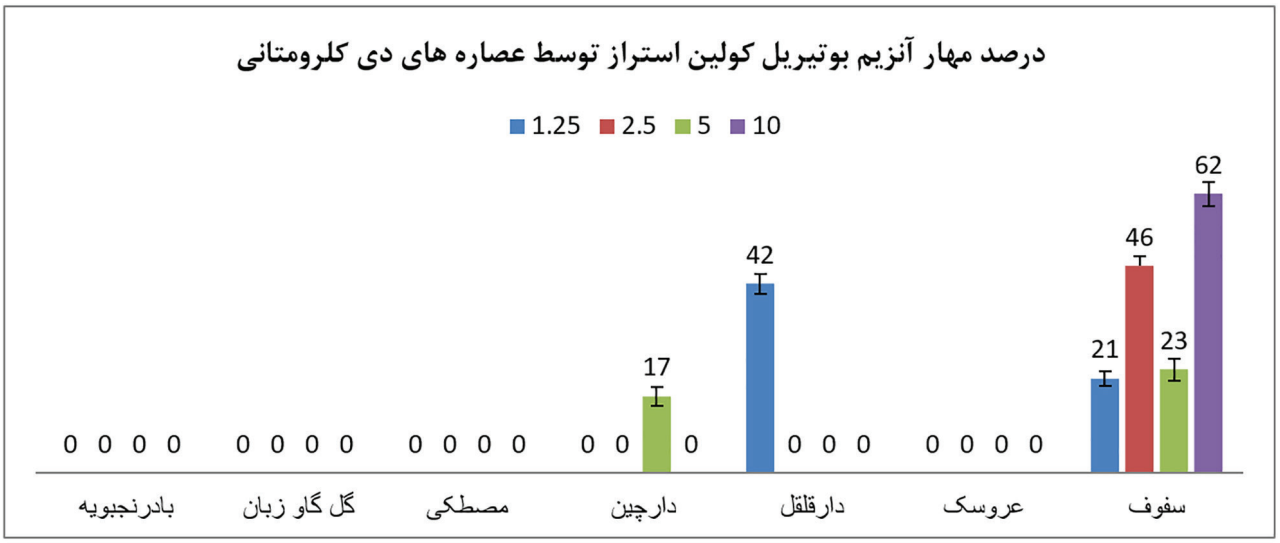
41. Half maximal inhibitory concentration



شکل ۱. اثرات مهاری عصاره های دی کلرومتانی بر آنزیم بوتیریل کولین استراز؛ *: عروسک= عروسک پشت پرده



شکل ۲. اثرات عصاره های متانولی بر مهار آنزیم استیل کولین استراز؛ *: عروسک= عروسک پشت پرده



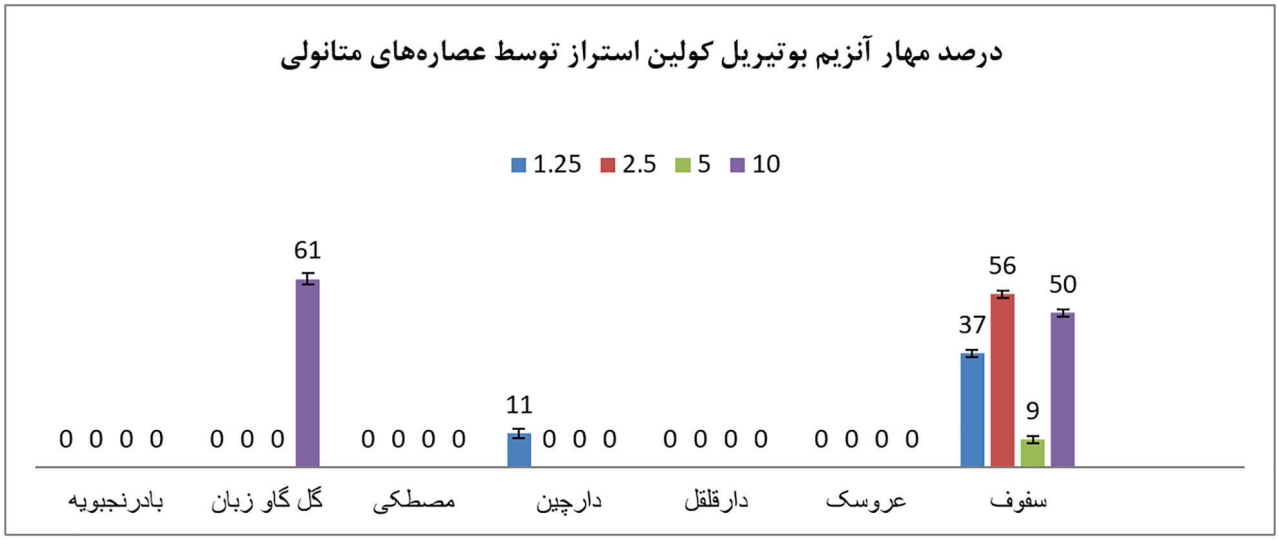
شکل ۳. اثرات مهاری عصاره های دی کلرومتانی بر آنزیم بوتیریل کولین استراز؛ *: عروسک= عروسک پشت پرده

زمان مختلف با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش خوانده شدند و درصد مهار آنزیمی برای هر یک از نمونه‌ها تعیین گردید. جدول ۴ و شکل ۱-۴ به ترتیب درصد مهار آنزیم‌ها را توسط تاکرین به‌عنوان کنترل و نمونه عصاره‌های متانولی و دی کلرومتانی را نشان می‌دهند.

بحث

در طب سنتی مناطق مختلف جهان مانند چین، گیاهان متعددی به عنوان درمان آلزایمر یا تقویت حافظه مطرح شده‌اند. به‌عنوان نمونه در مطالعه لین[۴۲] و همکاران، اثرات مهارکنندگی آنزیم استیل

42. Lin



شکل ۴. اثرات مهاری عصاره های متانولی بر آنزیم بوتیریل کولین استراز؛ *: عروسک= عروسک پشت پرده

کولین استراز توسط ترکیبی از گیاهان توصیه‌شده در طب سنتی چین و هند ارائه شده است (۱۴، ۱۳). در طب سنتی ایرانی از بیماری آلزایمر با نام‌هایی همچون نسیان[۴۳] و فساد الذکر[۴۴] یادشده و درمان‌هایی برای آن مطرح شده است. علاوه بر این، راهکارهای غیر دارویی مطرح شده در طب سنتی مانند سبک زندگی و تغذیه، راهکارهای دارویی در قالب مفردات و مرکبات نیز ارائه شده است. از جمله مهم‌ترین مفردات مورد استفاده در بیماری آلزایمر در طب سنتی ایرانی می‌توان به وَج، کندر و اسطوخودوس اشاره کرد (۱۰).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌های متانولی و دی کلرومتانی هریک از عصاره‌ها و سفوف حفظ بر روی دو آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز بود. نتایج نشان داد که عصاره متانولی سفوف قادر به مهار هر دو آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز، و عصاره دی کلرو متانی به طور مشخص قادر به مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز بوده است. دلیل اثربخشی بالاتر عصاره‌های متانولی در مقایسه با عصاره‌های دی کلرومتانی را می‌توان به وجود طیف ترکیبات متفاوتی نسبت داد که در این عصاره‌ها وجود دارد. به دلیل ماهیت الکلی و قطبیت بالاتر متانول، طیف وسیع‌تری از ترکیبات قطبی و بیواکتیو[۴۵] نظیر فلاونوییدها[۴۶] وارد عصاره می‌شود. فلاونوییدها با تنوع ساختاری گسترده به‌عنوان دسته بزرگی از ترکیبات طبیعی در درمان الزایمر شناخته می‌شوند (۱۶، ۱۵). این ترکیبات از خصوصیات آنتی‌اکسیدانی مطلوبی برخوردارند و هم‌چنین مهارگر آنزیم استیل کولین استراز هستند که قادرند به‌عنوان ترکیبات مؤثر در روند درمان بیماری آلزایمر نقش قابل توجهی داشته باشند (۱۹-۱۷).

بررسی نتایج نشان می‌دهد که در بروز اثرات مهاری عصاره‌های متانولی بر آنزیم استیل کولین استراز، عصاره متانولی بادرنجبویه در غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از سفوف سبقت گرفته است، لذا می‌توان گفت که خصوصیات مهارکنندگی مشاهده شده در فراورده سفوف بیشتر از دو جزء بادرنجبویه و دارفلفل تأثیر می‌پذیرد. در مطالعه حاضر با توجه به داده‌های به دست آمده عصاره متانولی بادرنجبویه و دارفلفل در غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به طور قابل توجهی در مهار آنزیم استیل کولین استراز نقش داشته‌اند. نتایج مطالعات قبلی که فعالیت مهارکنندگی ۲۰ نمونه گیاهی مصرف‌شده در تایلند را در برابر کولین استرازها مورد آزمایش قرار داده‌اند، اثر مهارکنندگی بادرنجبویه مشاهده شده در مطالعه حاضر را به خوبی تأیید می‌کند، به‌طوری‌که در میان نمونه‌های آزمایش‌شده، بادرنجبویه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، میزان ۸۲/۵ درصد اثر مهاری را در برابر بوتیریل کولین استراز بروز داده است (۲۰-۲۳). علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که مهارکننده‌های بوتیریل کولین استراز یا مهارکننده‌های دوگانه استیل و بوتیریل کولین استراز نتایج درمانی مؤثرتری برای آلزایمر ارائه می‌دهند، درحالی‌که عوارض جانبی کمتری در مقایسه با مهارکننده‌های خاص استیل کولین استراز دارند (۲۴). آنچه قابل توجه است عدم وجود ارتباط معنادار میان افزایش غلظت عصاره این دو گیاه و اثر مهارکنندگی آن‌ها بر آنزیم استیل کولین استراز است. در مطالعات بسیاری این مسئله مورد توجه قرار گرفته است و نشان داده شده است که ارتباط بین غلظت عصاره و درصد مهار آنزیم وابسته به مقدار مصرف، و قابل پیش‌بینی نیست. یکی از دلایل

43. Amnesia
44. Dementia
45. Bioactive
46. Flavonoids

این اتفاق می‌تواند وجود پلی فنول‌ها[47] در گیاه به‌عنوان عامل شلات کننده[48] و غیر فعال‌کننده آنزیم باشد. برای مثال، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ روی تأثیر پلی فنول‌های موجود در چای روی آنزیم لیپاز انجام شد، مشاهده گردید که پلی فنول‌ها تا میزان زیادی قادر به اتصال به پروتئین‌ها و غیر فعال نمودن آن‌ها هستند (۲۵). در این حالت پلی فنول‌ها به‌عنوان لیگاندهای چنددندانه‌ای[49] عمل می‌کنند و با اتصال به سطح چندین پروتئین به طور هم‌زمان موجب رسوب پروتئین می‌گردند. حضور تانن[50] نیز به‌عنوان یک پلی فنول مهم که در بسیاری از گیاهان اثر مهارکنندگی آنزیم بروز داده است از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۲۶).

در مطالعه حاضر، با توجه به اینکه ترکیبات پلی فنولی در بادرنجبویه وجود دارند عدم مهارکنندگی آن در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر قابل توجیه است. بادرنجبویه به طور مشخص حاوی ترپنوییید[51]، فلاونوییدکورستین[52] و تانن است. در پژوهش‌ها از ترکیبات فلاونوییدی اثرات مهاری استیل کولین استراز شاخصی گزارش شده است (۲۷). تانن‌ها فنول‌های محلول در آب با وزن مولکولی ۵۰۰ دالتون[53] یا بیشتر هستند و ظرفیت زیادی برای اتصال به پروتئین‌ها دارند (۲۸، ۲۶). در مطالعه دیگری نیز به تأثیر پلی فنول‌ها بر مهار آنزیم استیل کولین استراز پرداخته شده است. در سایر مطالعات و پژوهش‌های مرتبط نیز اشاره شده است که تانن‌ها و به‌طورکلی پلی فنول‌ها با تأثیر بر جایگاه فعال آنزیم باعث مهار آنزیم استیل کولین استراز می‌شوند (۳۱-۲۹). دارفلفل نیز همانند بادرنجبویه حاوی ترکیبات پلی فنولی است و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به علت افزایش میزان این ترکیبات، درصد مهار کم‌تری مشاهده گردید که احتمالاً به دلیل شلات شدن آنزیم استو در تداخل فلاوونوییدها با سایر آنزیم ها نیز گزارش شده است (۳۳، ۳۲). ترکیب پایپرین[54] یک آلکالوییید[55] است که جزء اصلی و فعال *Piper longum* و *Piper nigrum* است. در مطالعات قبلی انجام شده، مکانیسم پیشنهادی برای اثرات این ترکیب شامل مهار پراکسیداسیون لیپیدها و مهار آنزیم استیل کولین استراز ارائه شده است (۳۵، ۳۴). همچنین عصاره‌های دی کلرومتانی هر دو این گیاهان به همراه عصاره دی کلرومتانی دارچین در غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر قادر به مهار آنزیم استیل کولین استراز هستند. درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز دو عصاره دی کلرومتانی دارچین و دارفلفل نسبت به سفوف اختلاف معنی‌داری دارد ($P<0/05$).

در خصوص سایر اجزاء، با توجه به میزان مصطکی استفاده شده در فراورده سفوف و همچنین بازده عصاره‌گیری که در (جدول ۲) آمده است، عدم مهارکنندگی عصاره دی کلرومتانی سفوف بر آنزیم استیل کولین استراز را می‌توان به تنهایی از عدم مشاهده اثر مهارکنندگی مصطکی دانست. بازده بالای عصاره دی کلرو متانی مصطکی نسبت به عصاره متانولی آن را می‌توان به حضور ترکیبات اولئوگام رزین[56] موجود در مصطکی نسبت داد (۳۶).

با توجه به نتایج آزمون‌های انجام شده، عصاره متانولی بادرنجبویه از خواص آنتی‌اکسیدانی و اثرات مهارکنندگی مطلوب آنزیم استیل کولین استراز برخوردار است، لذا این جزء تشکیل‌دهنده فراورده سفوف می‌تواند در مطالعات آتی به‌عنوان یک عامل مؤثر در درمان بیماری آلزایمر مورد بررسی قرار گیرد.

توان عصاره متانولی و دی کلرومتانی سفوف در مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز تقریباً یکسان محاسبه شد. گل‌گاوزبان می‌تواند به‌عنوان جزء اثربخش در توان مهار آنزیمی عصاره متانولی سفوف، مطرح شود. گل‌گاوزبان به علت داشتن ترکیبات آنتوسیانینی[57] که محلول در متانول هستند، از بازده عصاره متانولی بالاتری از دی کلرو متان برخوردار است (۳۷). در بررسی مهار بوتیریل کولین استراز عصاره متانولی، با اینکه گل‌گاوزبان، از کمترین سهم در میان اجزا تشکیل‌دهنده سفوف برخوردار است میزان فعالیت مهاری آنزیم بوتیریل کولین استراز توسط فراورده سفوف کاهش نشان داده است ($P<0/05$)؛ اما باید توجه داشت که نمی‌توان از برهم‌کنش احتمالی سایر گیاهان و تأثیر آن‌ها به‌صورت سینرژی[58] بر قدرت مهارکنندگی سفوف چشم پوشید.

در بررسی مهار بوتیریل کولین استراز توسط عصاره‌های دی کلرومتانی، اکثر نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف فاقد فعالیت مهاری بودند، درحالی‌که عصاره‌های دارفلفل و دارچین به ترتیب در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر اثرات مهارکنندگی از خود بروز دادند. علیرغم غیر فعال بودن برخی اجزا، سفوف به تنهایی، عصاره دی کلرومتانی فراورده سفوف، فعالیت قابل توجهی در مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز نشان داد.

47. Polyphenols
48. Chelating agent
49. Multidentate ligands
50. Tannin
51. Terpenoid
52. Quercetin (flavonoid)
53. Dalton
54. Piperine
55. Alkaloid
56. Oleo gum resin
57. Anthocyanin
58. Synergy

محدودیت‌های پژوهش

● گیاهان مورد استفاده در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل تفاوت‌هایی که در شرایط و زمان برداشت گیاهان، روش‌های استخراج و غیره نیازمند چالش‌هایی در تکرار نتایج باشند. این گیاهان حاوی ترکیبات بیواکتیو[59] متعددی هستند و شناسایی اجزای فعال و ارزیابی سمیت عصاره‌ها یا ترکیبات شاخص آن‌ها ضروری است، زیرا سمیت بالقوه ممکن است استفاده درمانی فراورده را با وجود مهار معنی‌دار آنزیمی، محدود کند.

● تفاوت در روش ارزیابی مهار آنزیم، منبع آنزیم، نوع محیط کشت و روش تجزیه و تحلیل ممکن است منجر به تفاوت در نتایج گردد.

● اگرچه گیاهان فوق از تاریخچه طولانی مصرف در طب سنتی برخوردارند و منابع طبیعی از مهارکننده‌های استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز ارائه می‌دهند، اما مطالعات گسترده بالینی به‌منظور ترجمه این نتایج به درمان‌های مؤثر آلزایمر ضروری است. تحقیقات آینده باید بر پایه استانداردسازی، مطالعه مکانیسم عملکرد و ایمنی متمرکز گردد.

● آلزایمر یک بیماری چندعاملی شامل استرس اکسیداتیو[60]، انباشت β-آمیلوئید[61]، هایپرفسفوریلاسیون تاو[62] و غیره است، بنابراین هدف قرار دادن تنها فعالیت کولین استراز فراورده سفوف یا اجزاء گیاهی آن ممکن است مزایایی را در دستیابی به فراورده طبیعی آنتی کولین استراز فراهم سازد، اما لازم است که مطالعات گسترده‌تر با سایر روش‌ها و آزمون‌های ارزیابی قابلیت‌های محافظت عصبی در درمان آلزایمر ترکیب شود.

پیشنهادات پژوهش

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌توان مواردی همچون جزءبه‌جزء نمودن عصاره متانولی با تکنیک‌هایی مانند استخراج فاز جامد، تغییر نسبت اجزاء فراورده سفوف به سمت افزایش جزء مؤثر، مطالعه و تمرکز روی سایر مکانیسم‌های مؤثر در تقویت حافظه و کاهش فراموشی و همچنین طراحی و هدایت مطالعه به سوی اثربخشی فراورده سفوف در فاز حیوانی و انسانی را جهت تحقیقات آتی پیشنهاد داد.

نتیجه‌گیری

بررسی محتوای ترکیبات شاخص در عصاره‌های فعال با روش‌های آنالیز دستگاهی از ضرورت قابل توجهی در دستیابی به ترکیبات مؤثر در کمک به جلوگیری یا درمان آلزایمر برخوردار است. در این پژوهش، فعالیت‌های مهارکنندگی فراورده سفوف و اجزای گیاهی آن در برابر آنزیم‌های استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز نشان داد که فعالیت‌های مهارکنندگی آنزیمی معنی‌داری بودند و بادرنجبویه مؤثرترین جزء سفوف بود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز برای تأمین هزینه‌های مالی این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

59. Bioactive compounds
60. Oxidative stress
61. β-Amyloid accumulation
62. Tau hyperphosphorylation

منابع

1. DiPiro JT, Talbert RL, Yee G, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, et al. A pathophysiologic approach. In: Pharmacotherapy. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 385-400.
2. Cajal SR. Degeneration & regeneration of the nervous system. New York: Hafner Publishing Company; 1959.
3. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):263-9.
4. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. Alzheimers Dement. 2013;9(1):63-75.
5. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? Neurology. 2007;68(5):326-37.
6. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. Sci Transl Med. 2011;3(77):77srl.
7. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. J Neurol Sci. 1977;34(2):247-65.
8. Suh WH, Suslick KS, Suh YH. Therapeutic agents for Alzheimer's disease. Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents. 2005;5(4):259-69.
9. Ibn Sina (Avicenna). Kitab al-Qanun fi al-Tibb (Canon of medicine). New Delhi: Jamia Hamdard Printing Press; 1998. Arabic.
10. Ahmadian-Attari MM, Ahmadiani A, Kamalinejad M, Dargahi L, Shirzad M, Mosaddegh M. Treatment of Alzheimer's disease in Iranian traditional medicine. Iran Red Crescent Med J. 2015;17(1):e18052. Persian.
11. Aghili MH. Qarabadin Kabir. Tehran: Ostad Allah Qoli Khan Qajar Publisher; 1855. Persian.
12. Sabahi Z, Zarshenas MM, Farmani F, Faridi P, Moein S, Moein M. Essential oil composition and in vitro antioxidant activity of ethanolic extract of Thymus daenensis Celak from Iran. Glob J Pharmacol. 2013;7(2):153-8.
13. Manyam BV. Dementia in Ayurveda. J Altern Complement Med. 1999;5(1):81-8.
14. Lin HQ, Ho MT, Lau LS, Wong KK, Shaw PC, Wan DC. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. Chem Biol Interact. 2008;175(1-3):352-4.
15. Lima E, Rauter AP, Medeiros J. Flavonoids as promising multitarget agents in Alzheimer's disease therapy. Appl Sci. 2023;13(8):4651.
16. Li J, Sun M, Cui X, Li C. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease: pathological hypothesis, potential targets, and structure-activity relationship. Int J Mol Sci. 2022;23(17):10020.
17. Ferreira A, Proenca C, Serralheiro ML, Araujo ME. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. J Ethnopharmacol. 2006;108(1):31-7.
18. Cao J, Xia X, Chen X, Xiao J, Wang Q. Characterization of flavonoids from Dryopteris erythrosora and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. Food Chem Toxicol. 2013;51:242-50.
19. Uriarte-Pueyo I, Calvo MI. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. Curr Med Chem. 2011;18(34):5289-302.
20. Fikrican B, Serap D, Mehmet Emin D. Antioxidant and anti-cholinesterase inhibition properties of Melissa officinalis subsp. officinalis and Lavandula angustifolia. J Int Sci Publ. 2022;16:317-24.
21. Ozarowski M, Mikolajczak PL, Piasecka A, Kachlicki P, Kujawski R, Bogacz A, et al. Influence of the Melissa officinalis leaf extract on long-term memory in scopolamine animal model with assessment of mechanism of action. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;2016:9729818.
22. Chaiyana W, Okonogi S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. Phytomedicine. 2012;19(8-9):836-9.

23. Khatami Z, Herdlinger S, Sarkhail P, Zehl M, Kaehlig H, Schuster D, et al. Isolation and characterization of acetylcholinesterase inhibitors from Piper longum and binding mode predictions. Planta Med. 2020;86(15):1118-24.
24. Zhou S, Huang G. The biological activities of butyrylcholinesterase inhibitors. Biomed Pharmacother. 2022;146:112556.
25. He Q, Lv Y, Yao K. Effects of tea polyphenols on the activities of α-amylase, pepsin, trypsin and lipase. Food Chem. 2007;101(3):1178-82.
26. Spencer CM, Cai Y, Martin R, Gaffney SH, Goulding PN, Magnolato D, et al. Polyphenol complexation—some thoughts and observations. Phytochemistry. 1988;27(8):2397-409.
27. Cichon N, Grabowska W, Gorniak L, Stela M, Harmata P, Ceremuga M, et al. Mechanistic and therapeutic insights into flavonoid-based inhibition of acetylcholinesterase: implications for neurodegenerative diseases. Nutrients. 2024;17(1):78.
28. Zarei A, Changizi AS, Taheri S, Hosseini N. A brief overview of the effects of Melissa officinalis L. extract on the function of various body organs. J Med Plants. 2015;17(7):1-6.
29. Mehansho H, Butler LG, Carlson DM. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. Annu Rev Nutr. 1987;7:423-40.
30. Jabir NR, Khan FR, Tabrez S. Cholinesterase targeting by polyphenols: a therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. CNS Neurosci Ther. 2018;24(9):753-62.
31. Roseiro LB, Rauter AP, Serralheiro MLM. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: structural specificity and impact on human disease. Nutr Aging. 2012;1(2):99-111.
32. Parmar VS, Jain SC, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VK, Kumar R, et al. Polyphenols and alkaloids from Piper species. Phytochemistry. 1998;49(4):1069-78.
33. Farboodniay Jahromi MA, Zare F, Sakhteman A, Bahadori S, Seradj H, Emami L. Molecular docking studies, DFT, and ADMET calculations of some flavonoids and their characteristic structural features involved in inhibition of pro-inflammatory enzymes. Nat. Prod. Res. 2025;39(18):5289-99.
34. Chonpathompikunlert P, Wattanathorn J, Muchimapura S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. Food Chem Toxicol. 2010;48(3):798-802.
35. Tripathi AK, Ray AK, Mishra SK. Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials. Beni Suef Univ J Basic Appl Sci. 2022;11(1):16.
36. Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis AL, Chinou IB, Mitaku S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. chia. Planta Med. 1999;65(8):749-52.
37. Adel Pilerood S, Prakash J. Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (Echium amoenum) and Valerian (Valerian officinalis). J Food Sci Technol. 2014;51(5):845-54.