زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۱، صفحات ۱۵- ۱

**مقاله پژوهشی**

# ارزیابی اثر مهارکنندگی عصاره اسیدین *Phallusia nigra* بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

**اسماء تاجیک، موسی کشاورز*، احمد همایی**

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

*مسئول مکاتبات: musakeshavarz@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1938794.1293

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰

## چکیده

افزایش سطح قند خون نقش مهمی در ایجاد دیابت دارد، لذا مهار آنزیم آلفا آمیلاز موجب مهار تبدیل پلی‌ساکاریدها به گلوکز یا کاهش آن می‌شود. در بیماران دیابتی، این آنزیم می‌تواند در جذب گلوکز از دستگاه گوارش موثر باشد و از افزایش سریع قند خون جلوگیری می‌کند. اسیدین‌ها به عنوان گروهی از فون دریایی سرشار از متابولیت‌های ثانویه زیست فعال شناخته شده‌اند. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر بازدارندگی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در گونه *Phallusia nigra* (Savigny, 1816) انجام شده است. نمونه‌های *P. nigra*، مربوط به جزایر قشم و هرمز بود. در شرایط خلاء با استفاده از دستگاه روتاری، عصاره‌گیری از نمونه‌ها به ترتیب قطبیت یعنی اتیل‌استات، متانول و آب–متانول انجام شد. درصد فعالیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز براساس روش DNSA در محیط بیرونی هم بررسی گردید و از آکاربوز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج پژوهش نشان داد که در بین تمام عصاره‌ها بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به آکاربوز در غلظت ۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر ۶۹/۶۵ درصد و کمترین مقدار آن مربوط به عصاره آب–متانول در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برابر با ۱۵/۳۹ درصد می‌باشد. بیشترین فعالیت مهارکنندگی به صورت آکاربوز > اتیل‌استات> متانول > آب–متانول مشاهده شده است. همچنین نتایج نشان داد که بین میزان مهارکنندگی آنزیم و غلظت عصاره‌ها رابطه مستقیم وجود دارد. در این بررسی عصاره اتیل‌استاتی بیشترین اثر مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز با $IC_{50}$ برابر با ۱۳۲۷/۲۴۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سپس عصاره متانولی با $IC_{50}$ برابر با ۱۵۲۹/۶۸ میکروگرم بر میلی-لیتر را دارد. عصاره آب – متانولی کمترین اثر مهارکنندگی با $IC_{50}$ و برابر با ۲۳۳۴/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارد. درصد بازدارندگی آکاربوز نسبت به سایر عصاره‌ها بالاتر است ($IC_{50}$ برابر با ۱۱۵۸/۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). با توجه به قدرت بازدارندگی عصاره‌های *P. nigra*، می‌توان از آن‌ها در آینده در زمینه تولید داروهای ضد دیابتی با حداقل عوارض جانبی نامطلوب یا بدون آن عوارض استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** آلفا آمیلاز، ضددیابت، آکاربوز، $IC_{50}$، DNSA، *Phallusia nigra*

## مقدمه

آمیلازها به سه زیرگروه آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1)، بتا آمیلاز (EC 3.2.1.2) و گاما آمیلاز (EC 3.2.1.3) تقسیم‌بندی می‌شوند (۴۳). آلفا آمیلاز آنزیمی است که پیوندهای آلفا را در پلی‌ساکاریدهایی مانند نشاسته و گلیکوژن هیدرولیز نموده و به گلوکز یا مالتوز تبدیل می‌کند. آلفا آمیلاز شکل اصلی آمیلاز در انسان و سایر پستانداران است این آنزیم همچنین در جوانه‌های حاوی نشاسته هم وجود دارد و توسط بسیاری از قارچ‌ها ترشح می‌شود. در صدف *Crassostrea gigas* اثبات شده است که اختلال در بیان ژن آمیلاز می‌تواند

منجر به تاخیر در فرآیند گامتوژنز به همراه کاهش نرخ فعالیت تولیدمثلی شود (۱۱). آلفا آمیلاز در پانکراس تولید شده و پیوندهای گلیکوزیدی آلفا ۱-٤ را در نشاسته مورد حمله قرار داده و تاثیر کمی روی اشکال دیگر کربوهیدرات‌ها دارد. تجزیه نشاسته توسط آلفا آمیلاز منجر به تولید دکسترین و مالتوز می‌شود. آلفا آمیلاز به طور طبیعی از سلول‌های آسینار پانکراس به مجرای پانکراس و سپس دوازدهه ترشح می‌گردد و در روده، نشاسته را به قندهای ساده‌تر تجزیه می‌کند. به جهت اینکه مدت توقف غذا در دهان ناچیز است، آلفا آمیلاز موجود در بزاق، نشاسته را به طور جزئی تجزیه می‌کند ولی قسمت عمده فعالیت این آنزیم مربوط به آمیلاز پانکراس است (۸، ۱٦). اگر چه آمیلاز در بیشتر بافت‌ها وجود دارد اما این آنزیم عمدتا در عصاره پانکراس و بزاق یافت می‌شود و هر یک از این بافت‌ها آلفا آمیلاز خاص خود را دارند و می‌توانند با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ویژه‌ی خود، از یکدیگر تشخیص داده شوند (۲۳). آلفا آمیلاز موجود در بزاق، مولکول‌های بزرگ و نامحلول نشاسته را به مولکول‌های کوچکتر و قابل حل و در نهایت به مالتوز و دکسترین تجزیه می‌کند که این شکل از آمیلاز، پتیالین نیز نامیده می‌شود. شرایط بهینه برای فعالیت پتیالین، دمای بدن انسان و pH معادل ۷ است (۸). دمای بهینه فعالیت آمیلازها خاص هر گونه می‌باشد بطوری که در خیار دریایی *Holothuria leucospilota* برای آلفا آمیلاز استخراجی از آن بهینه pH و دما به ترتیب ٦ و ٥٥ درجه سانتیگراد و نیز قویترین فعالیت آلفا آمیلازی در شرایط اسیدی نسبت به شرایط خنثی و قلیایی تایید شده است (٤٧).

دیابت شیرین یا ملیتوس نوعی بیماری متابولیکی است که با افزایش قند خون مزمن همراه با اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و هم چنین پروتئین ناشی از نقص در ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو مشخص می‌شود (٤٦). بیماری دیابت پس از سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی در جایگاه سومین عامل مرگ‌ومیر افراد قرار می‌گیرد که تخمین زده شده است که تا سال ۲۰۳۰ تعداد بیماران دیابتی به ۳٦٦ میلیون نفر خواهد رسید (۳۲).

یکی از رویکردهای درمانی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ که امروزه مورد توجه دانشمندان می‌باشد، کاهش هیپرگلایسمی بعد از مصرف ترکیبات قندی است (٦). این روش از طریق مهار آنزیم‌های موثر در هضم کربوهیدرات‌ها از جمله آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز میسر می‌باشد (۲، ۱۷). آکاربوز و میگلیتول از مهمترین مهارکننده‌هایی هستند که در حال حاضر در بیماران دیابتی استفاده می‌شوند و باعث مهار گلیکوزیدازهایی مانند آلفا آمیلاز و بتا گلوکوزیداز می‌شوند در حالی که برخی دیگر مانند وگلیبوز باعث مهار آلفا گلوکوزیداز می‌شود. با این حال، بسیاری از این عوامل هیپوگلیسمی مصنوعی محدودیت‌های خود را دارند، غیر اختصاصی هستند، عوارض جانبی جدی ایجاد می‌کنند و قادر به کاهش عوارض دیابتی نیستند.

رده اسیدین‌ها یا آبفشان‌های دریایی، بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین رده غلافداران هستند که تقریبا در تمام اکوسیستم‌های دریایی یافت می‌شوند (۱۸).

گونه *Phallusia nigra* یک آبفشان دریایی منفرد از رده اسیدین متعلق به شاخه کورداتا است (۱۳، ٤٤) و فراوانترین اسیدین موجود در خلیج فارس به شمار می‌رود (۳۹). این گونه، مانند سایر گونه‌ها دارای یک پوشش نازک چرمی با لایه‌ای از مواد شبه‌سلولزی می‌باشد. این گونه در آب‌های گرمسیری کم عمق، بر روی بسترهای صخره‌ای یا سخت مانند مرجان‌های زنده و مرده، ستون‌های اسکله یا اجسام شناور زندگی می‌کند (۱۲).

گونه *P. nigra* در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله دریای مدیترانه، دریای سرخ (۳۶) و بطور وسیعی در غرب اقیانوس اطلس و کارائیب (۲۰) گزارش شده است. پراکندگی آن شامل خلیج‌فارس، دریاهای سرخ و عدن، اقیانوس هند- آرام و مناطق غربی اقیانوس اطلس از فلوریدا و Bermudas تا برزیل جنوبی بوده و به عنوان یک گونه جهان‌شمول مطرح می‌باشد (۱۲).

پراکنش این گونه برای اولین بار در خلیج‌فارس در مناطق لارک، قشم، هنگام و بندرلنگه گزارش شده و بیشترین حضور این گونه در سواحل بندرلنگه می‌باشد که دلایل آن تردد کشتی‌ها، موج شکن‌ها و وجود ساختارهای مصنوعی مناسب جهت نشست لارو می‌باشد (۳۹).

موجودات آبزی در طب سنتی برای بهبود دیابت از دیرباز بکار رفته‌اند. در سال‌های اخیر تحقیقات درباره آبزیان دارویی برای کنترل دیابت، توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است به طوری تعدادی از آبزیان شناخته شده‌اند که فعالیت هیپوگلیسمیک آنها از طریق مهار آنزیم‌های هیدرولیز کننده کربوهیدرات‌ها انجام می‌شود (۳). بنابراین تحقیقات برای یافتن مهارگرها در آبزیان به منظور دستیابی به داروهای ارزان، قابل اطمینان و ایمن در کنترل دیابت و سایر بیماری‌ها ادامه دارد.

هدف ما در این مطالعه، بررسی اثر مهارکنندگی عصاره سلولی استخراجی از اسیدین *P. nigra* بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در محیط بیرونی بوده است.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش اسیدین *Phallusia nigra* از مناطق جزایر قشم و هرمز جمع‌آوری شده و ویژگی‌های مورفولوژیکی آنها ملاحظه و اصالت نمونه‌ها توسط کلید شناسایی موجود (۲۶) مورد تایید قرار گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از پاکسازی تونیک نمونه‌ها از ذرات رسوبی و بارناکل‌های متصل شده با آب مقطر شستشو و سپس نمونه‌ها در ظروف محتوی یخ در دمای ٤ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه دانشگاه هرمزگان انتقال داده شد. در آزمایشگاه، نمونه‌ها تشریح و خشک نموده و به قطعات ریز برش داده شدند. حلال‌های مورد استفاده در این آزمایش بر اساس قطبیت به ترتیب شامل اتیل‌استات، متانول و آب – متانول بودند. به منظور تهیه عصاره‌های مختلف ۱۰۰ گرم از نمونه‌های آماده شده به همراه ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر در ارلن ریخته سپس درب آن را با پنبه و پارافیلم مسدود نموده و با فویل آلومینیومی پوشانیده در ادامه به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر صفحه‌ای قرار داده و سپس به مدت ٤٨ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. محلول مورد نظر به کمک کاغذ صافی واتمن صاف و توسط دستگاه روتاری در شرایط خلاء تبخیر شدند. عصاره تغلیظ شده در پتری‌دیش به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ٤۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته سپس پودر حاصل شده توزین شده و درون میکروتیوب در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد جهت انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری گردید. بررسی مهار آنزیم آلفا آمیلاز بر اساس روش (١٤) با اندکی تغییرات انجام شد. در این آزمایش آکاربوز که از مهارکننده‌های سنتزی قوی آنزیم آلفا آمیلاز بوده به عنوان مهارکننده استاندارد، نشاسته به عنوان سوبسترا و محلول رنگی دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNSA) به عنوان متوقف کننده آزادسازی مالتوز از محلول نشاسته مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام بررسی واکنش آنزیم آلفا آمیلاز، ٤۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) که هر کدام از عصاره‌ها را به همراه ۳٦۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار با pH = ۷، ۵۰۰ میکرولیتر

محلول نشاسته ۱ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم آلفا آمیلاز درون لوله‌های آزمایش جداگانه ریخته شده و مخلوط را در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری قرار داده شد. به منظور خاتمه واکنش و اندازه‌گیری میزان مالتوز آزاد شده در واکنش، یک میلی‌لیتر معرف DNSA به مخلوط افزوده شده و در دمای ۱۰۰ درجه‌سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به منظور اتمام کامل واکنش قرار گرفتند. پس از خنک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق میزان جذب آنها را در طول موج ۵۴۰ نانومتری توسط دستگاه اسپکتوفتومتری مشاهده و سه خوانش برای هر غلظت ثبت گردید. در تمامی آزمایشات نمونه بلانک که فاقد آنزیم آلفا آمیلاز بوده به عنوان کنترل کننده منفی و نمونه شاهد که فاقد مهارکننده بوده به عنوان کنترل کننده مثبت در نظر گرفته شد. به منظور بررسی مهار آنزیم توسط آکاربوز از قرص آکارماکس ۱۰۰ محصول شرکت تهران شیمی استفاده گردید. نتایج آزمایشات برحسب درصد واکنش و درصد مهاری آنزیم آلفا آمیلاز براساس روابط زیر محاسبه شد (۱۴):

۱۰۰×(میزان مالتوز در کنترل/میزان مالتوز در نمونه) = درصد واکنش

درصد واکنش – ۱۰۰ = درصد مهار آنزیم

**آنالیز آماری:** تمامی آزمایشات در سه تکرار صورت گرفته و مقادیر میانگین، انحراف معیار (±SD) و $IC_{50}$ هر کدام از عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف محاسبه شد. نمودارهای مربوط به فعالیت نسبی، مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلازی عصاره‌ها در غلظت‌های متفاوت با استفاده از نرم افزار Excel رسم و مقایسه میانگین‌های بدست آمده به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ > $p$ استفاده شد. درصد مهار آنزیم آلفا آمیلاز بر اساس غلظت نمونه و منحنی رگرسیون لگاریتمی به منظور محاسبه مقدار $IC_{50}$ رسم شد که نشان دهنده غلظت نمونه لازم برای کاهش جذب ۵۰ درصد آنزیم آلفا آمیلاز است.

## نتایج

به منظور عصاره‌گیری از گونه *Phallusia nigra*، ۱۰۰ گرم از اسیدین در حلال‌های اتیل‌استات، متانول و آب – متانول قرار داده و توسط دستگاه روتاری در شرایط خلاء تبخیر شده و پس از خشک شدن به صورت پودر حاصل شد که میزان بازده در حلال‌های اتیل‌استات، متانول و آب- متانول به ترتیب ۷/۳۳، ۸/۱۹ و ۱۲/۴۹ گرم بدست آمد (جدول ۱). در این بررسی اثر مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر چهار عصاره متانولی، اتیل‌استاتی، آب–متانولی و آکاربوز حاصل از *Phallusia nigra* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد مهارکنندگی با افزایش غلظت این پارامتر افزایش یافته و روند صعودی بوده است به طوری که در بین تمام عصاره‌ها بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به آکاربوز در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر ۶۹/۶۵ درصد بوده و کمترین درصد این پارامتر مربوط به آب – متانولی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر ۱۵/۳۹ درصد بوده و در بین تمامی غلظت عصاره‌ها بیشترین فعالیت مهارکنندگی به صورت: آکاربوز > اتیل‌استات> متانول > آب- متانول مشاهده شد (جدول ۲ و نمودار ۱). درصد واکنش در تمامی غلظت‌های عصاره‌های به کار رفته یک روند نزولی داشته مشاهده شده و بیشترین فعالیت نسبی مربوط به عصاره آب – متانول در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر ۸۴/۶ درصد و کمترین مقدار این پارامتر مربوط به عصاره آکاربوز در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر ۳۰/۳۴ درصد بوده است و در بین تمامی غلظت عصاره‌ها بیشترین درصد واکنش

به صورت: آب–متانول > متانول > اتیل‌استات > آکاربوز مشاهده شد (نمودار ۲).

در نمودارهای تابع لگاریتمی تمامی عصاره‌ها بین غلظت عصاره‌ها و مقدار $IC_{50}$ یک رابطه مستقیم وجود داشته به طوری که در عصاره‌های اتیل‌استات و آب– متانول به طور مساوی دارای بالاترین مقدار ضریب همبستگی (۰/۹۸) و برای عصاره‌های آکاربوز و متانولی به ترتیب دارای ضریب همبستگی ۰/۹۷ و ۰/۹۵ مشاهده شده و نتایج مقدار $IC_{50}$ آنزیم آلفا آمیلاز بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در تیمارهای آکاربوز و آب – متانول مشاهده گردید (نمودار ۳ و جدول ۳).

جدول ۱: ویژگی فیزیکی ماده حاصل از عصاره‌های مختلف *P. nigra*

| عصاره‌ها | رنگ | ماده حاصل | بازده (گرم) |
|---|---|---|---|
| متانولی | قهوه‌ای | پودر | ۸/۱۹ |
| آب– متانولی | سیاه | پودر | ۱۲/٤۹ |
| اتیل‌استاتی | زرد | پودر | ۷/۳۳ |

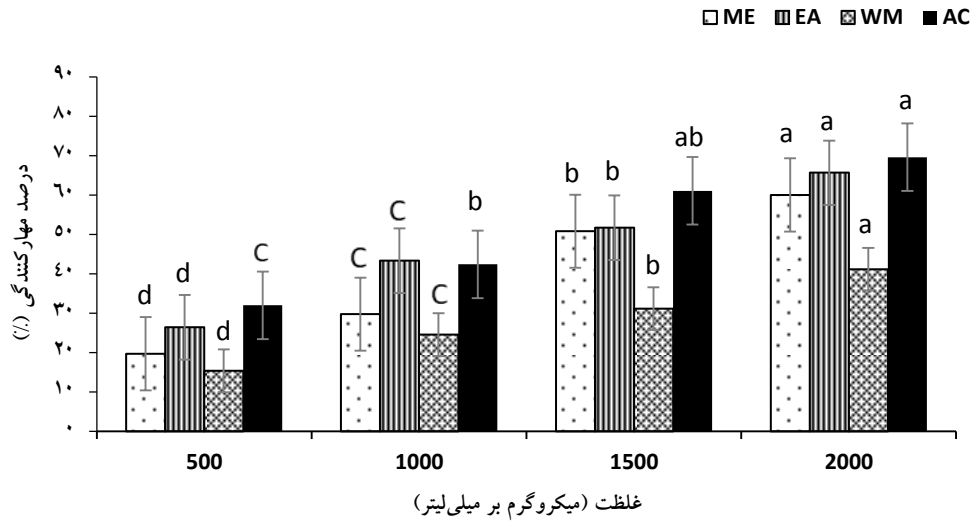
جدول ۲ – اثر مهارکنندگی آلفا آمیلازی عصاره‌های بکار رفته در بررسی

| غلظت (µg/ml) | عصاره متانولی | عصاره‌اتیل‌استاتی | عصاره آب– متانولی | عصاره‌آکاربوز |
|---|---|---|---|---|
| ۵۰۰ | – | + | – | + |
| ۱۰۰۰ | + | + | + | + |
| ۱۵۰۰ | ++ | ++ | + | ++ |
| ۲۰۰۰ | ++ | ++ | + | ++ |

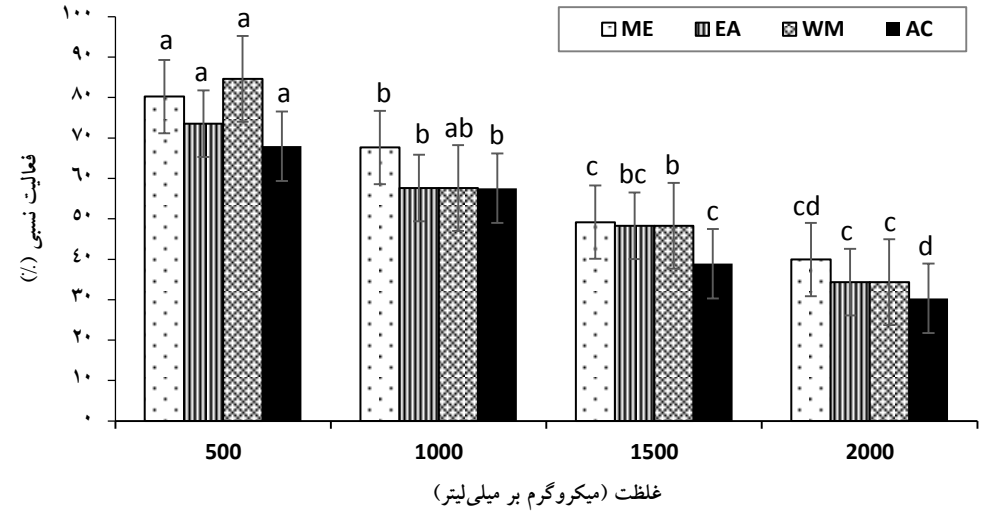
–: اثر مهاری کمتر از ۲۰درصد  +: اثر مهاری بین ۲۰ تا ۵۰درصد  ++: اثر مهاری بالاتر از ۵۰درصد

جدول ۳ – مقادیر $IC_{50}$ آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر عصاره‌های مختلف (Mean± SD)

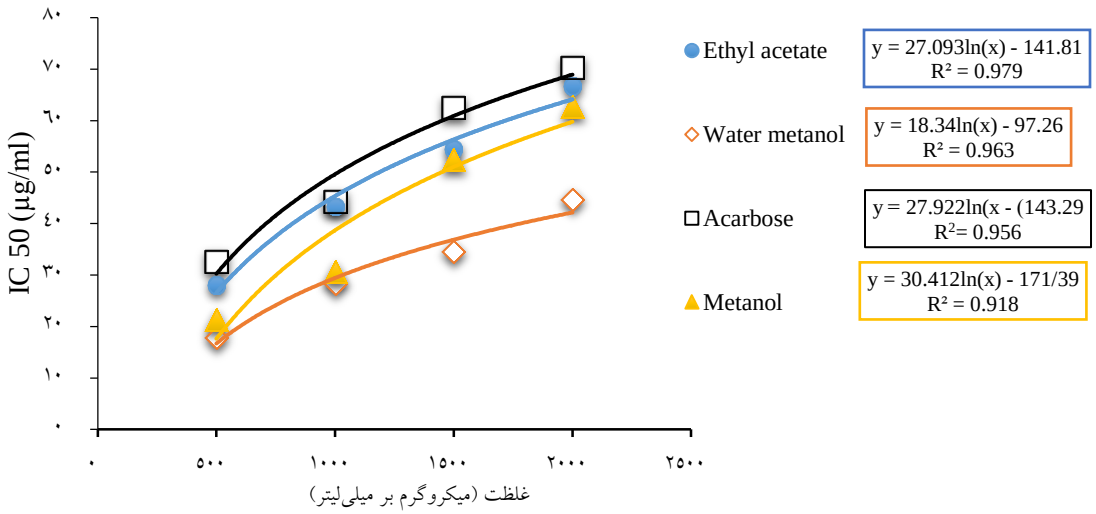
| عصاره‌ها | متانولی | اتیل‌استاتی | آب– متانولی | آکاربوز |
|---|---|---|---|---|
| $IC_{50}$ (µg/ml) | ۱۵۲۹/٦۸ ± ۱/۵۲ | ۱۳۲۷/۲٤٤ ± ۱/۳۲ | ۲۳۳٤/۰۱ ± ۲/۳۳ | ۱۱۵۸/٤۰ ± ۱/۱۵ |




نمودار ۱- بررسی میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی (ME)، اتیل‌استاتی (EA)، آب- متانول (WM) و آکاربوز (AC) گونه *P. nigra* (حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌ها می‌باشد ($P<0.05$).




نمودار ۲- بررسی میزان واکنش آنزیم آلفا آمیلاز توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی (ME)، اتیل‌استاتی (EA)، آب- متانول (WM) و آکاربوز (AC) گونه *P. nigra* (حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌ها می‌باشد ($P<0.05$).




نمودار ۳- تابع لگاریتمی مقادیر $IC_{50}$ آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر عصاره‌های مختلف

## بحث

دیابت به دلیل افزایش شیوع و عوارض ناتوان‌کننده یکی از اصلی‌ترین تهدیدات سلامت انسان است (۵). از این رو، تاخیر در هضم نشاسته با مهار آنزیم‌هایی مانند آلفا آمیلاز نقش اساسی در کنترل دیابت دارد. مهارکننده‌های آلفا آمیلاز لوزالمعده، هضم کربوهیدرات را به تأخیر می‌اندازند و باعث کاهش میزان جذب گلوکز و کاهش سطح گلوکز سرمی بعد از مصرف غذا می‌شوند. برخی از مهارکننده‌هایی که حال حاضر در زمینه بالینی استفاده می‌شوند، آکاربوز و میگلیتول هستند که باعث مهار آلفا گلیکوزیداز و آلفا آمیلاز می‌شوند (۳۳). با وجود اینکه داروهای سنتزی یا شیمیایی برای درمان دیابت و کنترل عوارض ناشی از آن وجود دارند، با این حال بسیاری از آن‌ها محدودیت‌های خود را دارند و غیراختصاصی هستند و علاوه بر این، استفاده طولانی مدت از این داروها ممکن است عوارض جانبی نامطلوب ایجاد کند (۱۰). بنابراین جستجوی یک دسته جدید از ترکیبات برای غلبه بر مشکلات دیابتی ضروری است (۳۳). در بیماران دیابتی بیان گیرنده‌های آمیلاز و آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) در غده پاراتیروئید تغییر یافته و این امر می‌تواند منجر به تغییر در پروتئین‌های بزاقی و بویژه آمیلاز بزاقی شود (۳۰). اسیدین‌ها موجودات کم‌تحرک دریایی هستند که با منابع امیدوارکننده دارویی در رتبه دوم قرار دارند (۳۴).

در مطالعه حاضر، درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانول، اتیل‌استات، آب- متانول و آکاربوز در اسیدین *Phallusia nigra* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بر اساس درصد بازدارندگی در غلظت مشخصی از نمونه و نیز شاخص $IC_{50}$ با یکدیگر مقایسه شد.

در این بررسی درصد مهار آلفا آمیلاز در غلظت‌های ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی گردید که بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به آکاربوز و عصاره اتیل‌استاتی در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برابر ۶۹/۶۵ و ۶۵ درصد و کمترین مقدار این پارامتر مربوط به عصاره آب – متانول در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر ۱۵/۳۹درصد به ثبت رسید. نتایج هم چنین نشان داد که همواره با افزایش غلظت نمونه‌ها میزان مهار آنزیمی در تمام عصاره‌ها افزایش یافته که این روند با نتایج (۳۳) که بر روی عصاره سلولی ده گونه اسیدین و اثر

مهارکنندگی آن بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در محیط درونی صورت گرفته بود، روندی مشابه داشت. در مطالعه فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در گونه *P. nigra* نتایج بین درصد واکنش و فعالیت مهار کنندگی یک رابطه معکوس مشاهده شد. درصد واکنش در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اتیل‌استات و آب- متانول دقیقا برابر ۳۴/۳۲ درصد و در عصاره‌های آب- متانول و اتیل‌استات در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دقیقا مشابه هم برابر ۴۸/۲۸ درصد مشاهده شد.

گزارشات محدودی درباره مهار آلفا آمیلاز توسط ترکیبات استخراجی از اسیدین‌ها وجود داشته و این بررسی به عنوان این مورد مطالعه بر اسیدین غالب در منطقه خلیج‌فارس مطرح می‌باشد. برموفنول ($C_6H_5BrO$) مهارکننده آلفا آمیلازی گونه *Phallusia mammallita* تولید شده که از آن در جهت درمان دیابت نوع ۲ استفاده می‌شود تا بیماران بتوانند محتوای قند خون خود را هنگام زندگی با رژیم‌های حاوی نشاسته کنترل کنند. گونه‌های دیگر اسیدین نیز اجزای مختلفی را تولید می‌کنند که موجب مهار آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز می‌شود، اما جدا کردن آن ترکیبات در هنگام عصاره‌گیری و خالص‌سازی دشوار است (۳۳). با توجه به مطالعاتی که بر روی موش‌های دیابتی و چاق به وسیله لیپیدهای اسیدین *Halocynthia roretzi* انجام گرفته؛ به این نتایج دست یافته‌اند که مقدار چربی و سطح گلوکز خون به طور قابل توجهی کاهش یافته است (۲۴) هم چنین در سایر مطالعات به این نکته پی برده شده که بسیاری از ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدهای گیاهی علاوه بر مهار آنزیم آلفا آمیلاز دارای فعالیت‌های مهارکننده کلسترول استراز بوده (۴۲) که می‌توانند موجب کاهش چربی نیز شوند (۲۱).

در پژوهشی، درصد مهار آلفا آمیلاز که بر روی اثر ضددیابتی و مهارکنندگی نانو ذره اکسید روی و عصاره دو گونه جلبک دریایی *Gracilaria corticata* و *Sargassum angustifolium* بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز انجام شد. میزان بازدارندگی فعالیت آنزیمی آلفا آمیلاز توسط عصاره سدیم فسفات در این کار بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب برای *Gracilaria corticata* (۷۲ درصد) و با $IC_{50}$ برابر ۰/۴۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و برای *Sargassum angustifolium* (۳۱درصد) و با $IC_{50}$ برابر ۱/۸۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تعیین شد که در این پژوهش نیز همواره با افزایش غلظت نمونه‌ها میزان مهار آنزیمی در تمام عصاره‌ها افزایش یافته بود که با نتایج این بررسی روندی مشابه بوده است (۴).

در مطالعه‌ای عصاره اتیل‌استاتی فعالیت مهارکنندگی غالب آنزیم آلفا آمیلاز برای تمامی گونه‌های مورد آزمایش نشان داد و حداکثر میزان مهارکنندگی برای اسیدین *Phallusia mammillata* (۶۸ درصد) در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین فعالیت در *Microcosmus squamiger* (۱۲ درصد) در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۳۳). پس از نتایج اولیه، جهت تأیید مهار آنزیم آلفا آمیلاز، عصاره متانولی *P. mammallita* را مورد سنجش بیشتر قرار دادند که حداکثر نتایج (۸۲ درصد) در ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین مقدار $IC_{50}$ در این بررسی را ۰/۴ ± ۱۴۵ میکروگرم در گرم گزارش شد.

در پژوهشی سنجش مهار آنزیم در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر صورت گرفت در حالی که در این پژوهش سنجش مهار آنزیم آلفا آمیلاز در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام شد (۳۳).

در گونه *Microcosmus squamiger*، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اتیل‌استات

بیشترین درصد بازدارندگی را دارد و با نتایج این پژوهش شباهت دارد. در گونه *Polyclinum aurantium* بالاترین درصد بازدارندگی مربوط به عصاره اتیل‌استات و در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در این تحقیق نیز نتایج مشابهی بدست آمد. در ارزیابی فعالیت مهارکنندگی آلفا آمیلازی گیاهان دارویی در معالجه دیابت در نپال استفاده شده که در گونه‌های *Acacia catechu*، *Dioscorea bulbifera* و *Swertia chirata* دارای مقادیر $IC_{50}$ به ترتیب ۴۹/۹، ۲۹۶/۱ و ۴۱۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد محاسبه قرار گرفت. مدل مطالعه بیرونی و درونی نشان داد که گیاهان دارویی می‌توانند منبع مهمی برای مهار آلفا آمیلاز باشند بنابراین از آن‌ها می‌توان به عنوان کاندیداهای بالقوه در زمینه توسعه دارویی آینده برای درمان دیابت با حداقل و یا هیچ عوارض جانبی استفاده کنند (۱۵).

در گیاهان عوامل متعددی مانند میزان رسیدن در زمان برداشت، عوامل محیطی، فرآوری و ذخیره‌سازی محتوای پلی‌فنلی ممکن است عامل تغییر در مقدار $IC_{50}$ باشد (۲۲) از طرف دیگر روش استخراج عصاره‌ها نیز آثار متفاوتی از خود نشان داده به طوری که در بررسی *Galega officinalis* عصاره آماده شده در دمای اتاق تقریبا فاقد اثر مهارکنندگی بر روی آنزیم آلفا آمیلاز بوده ولی عصاره استخراج شده گیاه با جوشانیدن منجر به اثر مهاری ۳۵ درصد آنزیم مذکور شد (۹).

عصاره متانولی برگ *Lindernia ciliata* دارای فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز بوده ($IC_{50}$ برابر ۶/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و با داروی استاندارد آکاربوز برای این آنزیم ($IC_{50}$ برابر ۵/۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد محاسبه قرار گرفت (۲۵).

در بررسی‌های ارزیابی ضددیابتی برگ‌های *Schleichera oleosa* مشخص شد که عصاره اتانولی در غلظت ٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر روی آنزیم آلفا آمیلاز دارای اثر مهارکنندگی ۵۲/۷۶ درصد و اتیل‌استات و عصاره‌های آبی مهارکنندگی ۵۰ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای آکاربوز مهارکنندگی ۸۹/۲٤ درصد در ۰/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شده است و این مطالعه نشان داد که ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی بیشتر عاملی برای مهار آلفا آمیلاز دانست (۲۸) که توانایی اتصال به بخش فعال پروتئین آنزیم دارد (۲۷) از جمله عواملی که می‌تواند در مهار فعالیت آلفا آمیلاز کمک کند وجود پیوندهای هیدروژنی و آبگریز برخی از اسیدهای آمینه در ترکیبات است که می‌توانند تاثیرگذار باشد (۷). در پژوهش (٤۰) نیز اثر مهاری ترکیبات فنلی عصاره متانولی *Eleusine coracana* بر آنزیم‌های آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز مورد بررسی قرار دادند و نتایج اثر مهارکنندگی قوی بر هر دو آنزیم نشان داده و مقدار $IC_{50}$ به ترتیب ۱٦/۹ و ۲۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه (٤۵)، بررسی میزان فعالیت مهاری آلفا آمیلاز مقادیر $IC_{50}$ برای عصاره‌های متانولی، اتیل‌استات، اتر و آبی *Adenanthera pavonina* به ترتیب ۲/۲۳ ±۱٦/۱٦، ۰/۲۵ ± ۵۹/۹۳، ٤/۸٦ ± ۱٤۵/٤۹ و ۹/۷۲ ± ۲۱٤/۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای آکاربوز ۱/۲۱ ± ۱۸/٦۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

در مطالعه فعالیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز بذر *Morus nigra* مشخص شد که آکاربوز دارای مهارکنندگی ۸۹/۲۳- ۳/۷۵٦ درصد در غلظت‌های مختلف ۵۰۰۰- ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با $IC_{50}$ =٦۱۷/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و عصاره اتانولی نشان‌دهنده بالاترین فعالیت مهاری آلفا آمیلازی با $IC_{50}$ =٦۷۹/۵ و در عصاره اتیل‌استات $IC_{50}$ =۷۸۰/۹ میکروگرم بر میلی-لیتر بوده است (٤۱) در این بررسی *P. nigra* آکاربوز دارای مهارکنندگی ٦۹/٦۵ – ۳۲/۲۰درصد به ترتیب

در غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۰۰۰ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) و مقدار $IC_{50}$ =۱۱۵۸/۴۰ و $IC_{50}$ عصاره‌های اتیل‌استات، متانول و آب-متانول به ترتیب برابر ۱۳۲۷/۲۴۴، ۱۵۲۹/۶۸ و ۲۳۳۴/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده که بیانگر این مطلب است از بین عصاره‌های بکار رفته عصاره اتیل‌استات و آب-متانول به ترتیب بیشترین و کمترین اثر درمانی داشته و عصاره اتیل‌استاتی این گونه می‌تواند به عنوان یک مهارکننده عالی آلفا آمیلاز مطرح شود. در مطالعه اثر مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز در دو گونه *Heracleum persicum* و *Ziziphus jujuba* نتایج نشان داد که $IC_{50}$ به ترتیب ۳۰۷ و ۸۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شده و ضریب همبستگی بین غلظت و $IC_{50}$ تحت محلول آکاربوز برای گونه‌های مورد بررسی یکسان و معادل ۰/۹۸ بوده (۱) در صورتی که این پارامتر در گونه *P. nigra*، r =۰/۹۷ مورد محاسبه قرار گرفت.

آکاربوز دارای یک حلقه شبه قندی و پیوند نیتروژنی گلیکوزیدی بوده که حالت موقتی را برای برش آنزیمی پیوند گلیکوزیدی داشته و از این رو آلفا آمیلاز را به صورت رقابتی مهار می‌کند (۳۵).

در بررسی مهاری آلفا آمیلاز نتایج نشان داد که عصاره متانولی گیاه *Cinnamomum zeylanicum* (۱۳۰/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، *Artocarpus altilis* (۱۱۸/۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، *Piper betel* (۸۴/۶۳ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) و *Artocarpus heterophyllus* (۷۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ۵۰ درصد فعالیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز در غلظت‌های ذکر شده مشاهده شد (۲۹). فعالیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز با عصاره برگ های گیاه *Tamarindus indica* به مقدار۹۰ درصد مشاهده شد. برای تعیین کمیت میزان مهار از آکاربوز ($IC_{50}$ برابر با ۲۳/۲ میکرومولار) استفاده شد (۹). بیشترین میزان مهار آکاربوز در این بررسی حدود ۸۵ درصد بوده است. ترکیبات فنلی مانند اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها به صورت کووالانسی به آلفا آمیلاز متصل شده و فعالیت آنها به دلیل تشکیل توانایی کوئینون یا لاکتون‌ها تغییر کرده تا با گروه‌های نوکلئوفیلی مولکول آنزیم واکنش نشان می‌دهند (۳۱) از طرف دیگر، فلاونوئیدها ترکیبات فنلی هیدروکسیله‌ای هستند که در گیاهان در پاسخ به عفونت‌های میکروبی وجود دارد که برخی از این ترکیبات به طور موثر آلفا آمیلاز را مهار می‌کنند (۳۷)، فعالیت بازدارندگی آنزیم عصاره‌های گیاهی نه تنها به مقدار پلی‌فنل‌ها بستگی دارد بلکه ممکن است به کیفیت پلی‌فنل‌ها مانند میزان هیدروکسیلاسیون و ترکیب بستگی دارد (۱۹).

در مطالعه فعالیت مهاری آلفا آمیلاز، فعالیت مهاری همه عصاره‌های گیاهی استخراج شده بین $IC_{50}$ برابر با ۱۸/۶ - ۱/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و علاوه بر این عصاره اتیل‌استات از *Phlomis bruguieri*، $IC_{50}$ برابر با ۱/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و عصاره بوتانولی *Phlomis persica*، ۳/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و کمترین مقدار $IC_{50}$ را در بین تمام گونه‌ها به عنوان قوی‌ترین عصاره‌ی گیاهی نشان دادند. در حالی که فعالیت مهاری *Satureja sahendica* و *Salvia macrosiphon* (عصاره اتیل‌استات) و همچنین *Phlomis caucasica* (عصاره بوتانول) روی آنزیم آلفا آمیلاز به عنوان ضعیف مشاهده شد و حداقل به مرحله ۵۰ درصد مهار آنزیم نرسید (۳۸).

جستجوی عوامل فعال دارویی جدید که از طریق غربالگری منابع طبیعی یا عصاره آن‌ها حاصل می‌شود، می‌تواند منجر به تولید مهارکننده‌های خاص و قوی آلفا آمیلاز شود. خواص دارویی مهارکننده‌های آلفا گلوکوزیداز مانند آکاربوز که می‌تواند آلفا آمیلاز پانکراس را نیز مهار کند، نشان داد که از عوارض دیابت شیرین از جمله تغییرات بافت کلیوی، بافت شبکیه و عدسی چشم، تغییرات عصبی و ضایعات

میوکاردیال جلوگیری کرده یا به تأخیر می‌اندازد. مدیریت طولانی مدت روزانه دیابت، با آکاربوز به خوبی قابل تحمل است و می‌تواند کنترل قند خون را به عنوان تک درمانی و همچنین در درمان‌های ترکیبی بهبود بخشد (۳۳). در مجموع، مهار آنزیم‌های کلیدی هضم کربوهیدرات مانند آلفا آمیلاز کمک می‌کند تا سطح قند خون کنترل شود.

## نتیجه‌گیری

به طور کلی و بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش فعالیت ضددیابتی عصاره *P. nigra* نشان داده شد. اسیدین *P. nigra* مورد تحقیق در این پژوهش با نشان دادن فعالیت ضد دیابتی، پتانسیل قرارگیری در سبد دارویی و غذایی افراد یا رژیم غذایی بیماران دیابتی را داشته و یک رویکرد درمانی آینده‌نگر برای مدیریت دیابت را ارائه می‌دهد.

## منابع


1. Afrisham R., Aberomand M., Ghaffari M. A., Siahpoosh, A., Jamalan M. 2015. Inhibitory Effect of *Heracleum persicum* and *Ziziphus jujuba* on Activity of Alpha-Amylase. *Journal of Botany*, 2015: 1-8.

2. Akkarachiyasit S., Charoenlertkul P., Yibchok-Anun S., Adisakwattana S. 2010. Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α-glucosidase and pancreatic α-amylase. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9): 3387-3396.

3. Ali H., Anwar M., Ahmad T., Chand N. 2006. Diabetes mellitus from antiquity to present scenario and contribution of Greco-Arab physicians. *Jishim*, 5(10): 46-50.

4. Baharmiyan Nasab S. 2018. Evaluation of antidiabetic and inhibitory effects of zinc oxide nanoparticles and extracts of two species of sea Algae *Gracilaria corticata* and *Sargassum angustifolium* on alpha-amylase activity. M.Sc. Thesis in Marine biology. University of Hormozgan, (In Persian)

5. Bhandari M.R., Jong-Anurakkun N., Hong G., Kawabata J. 2008. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry*, 106(1): 247-252.

6. Ceriello A. 2005. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes*. 54(1): 1-7.

7. Choudhary D.K., Mishra A. 2017. In vitro and in silico interaction of porcine α-amylase with *Vicia faba* crude seed extract and evaluation of antidiabetic activity. *Bioengineered*, 8(4): 393-403.

8. Des Gachons C.P., Breslin P.A. 2016. Salivary amylase: digestion and metabolic syndrome. *Current Diabetes Reports*, 16(10): 1-7.

9. Funke I., Melzig M.F. 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1): 1-5.

10. Groop L., Pociot F. 2014. Genetics of diabetes–are we missing the genes or the disease? *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1): 726-739.

11. Huvet A., Béguel J.P., Cavaleiro N.P., Thomas Y., Quillien V., Boudry P., Alunno-Brusciaa M., Fabioux C. 2015. Disruption of amylase genes by RNA interference affects reproduction in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *The Journal of Experimental Biology*, 218(11): 1740-1747.

12. Izquierdo Muñoz A., Díaz Valdés M., Ramos-Esplá A.A. 2009. Recent non-indigenous ascidians in the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions*, 4(1): 59-64.

13. Karthikeyan M.M., Ananthan G., Ali A. J. 2009. Food and Feeding Habits of *Herdmania pallida* (Heller)(Urochordata: Ascidiacea) from Palk Strait, Southeast of

22. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5): 727-747.

23. Matull W.R., Pereira S.P., O'donohue J.W. 2006. Biochemical markers of acute pancreatitis. *Journal of Clinical Pathology*, 59(4): 340-344.

24. Mikami N., Hosokawa M., Miyashita K. 2010. Effects of sea squirt (*Halocynthia roretzi*) lipids on white adipose tissue weight and blood glucose in diabetic/obese KK-Ay mice. *Molecular Medicine Reports*, 3(3): 449-453.

25. Momina S.S., Rani V.S. 2020. In vitro Studies on α-Amylase and α-Glucosidase Inhibitory Activity of Some Bioactive Extracts. *Journal of Young Pharmacists*, 12(2): 72-75.

26. Monniot C. Monniot F. 2001. Ascidians from the tropical western Pacific. *Zoosystema*, 23(2): 201-383.

27. Muthukrishnan S. 2014. In silico docking studies of cholesterol esterase inhibitory activity of commercially available flavonoids. *International Journal of Pharmacy Education and Research*, 1(2): 1-7.

28. Muthukrishnan S., Sivakkumar T. 2017. In vitro studies to assess the antidiabetic potential of *Schleichera oleosa* (Lour) oken leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(7): 280-283.

29. Nair S.S., Kavrekar V., Mishra A. 2013. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1): 128-132.

30. Nater U.M., Rohleder N. 2009. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4): 486-496.

India. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(3): 225-229.

14. Kazeem M.I., Adamson J.O., Ogunwande I.A. 2013. Modes of inhibition of α-amylase and α-glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* Benth leaf. *BioMed Research International*, 2013: 1-6.

15. Khadayat K., Marasini B.P., Gautam H., Ghaju S., Parajuli N. 2020. Evaluation of the alpha-amylase inhibitory activity of Nepalese medicinal plants used in the treatment of diabetes mellitus. *Clinical Phytoscience*, 6(34): 1-8.

16. Kim J.C., Simmins P.H., Mullan B.P., Pluske J.R. 2005. The digestible energy value of wheat for pigs, with special reference to the post-weaned animal. *Animal Feed Science and Technology*, 122(3-4): 257-287.

17. Kim J.S., Kwon C.S., Son K.H. 2000. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(11): 2458-2461.

18. Kott P. 2003. New syntheses and new species in the Australian Ascidiacea. *Journal of Natural History*, 37(13): 1611-1653.

19. Kwon Y.I., Jang H.D., Shetty K. 2006. Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type II diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(3): 425-432.

20. Lambert G., Lambert C.C. 1987. Spicule formation in the solitary ascidian, *Herdmania momus*. *Journal of Morphology*, 192(2): 145-159.

21. Lo Piparo E., Scheib H., Frei N., Williamson G., Grigorov M., Chou C.J. 2008. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α-amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(12): 3555-3561.

(Savigny, 1816) from Persian Gulf. *European Journal of Experimental Biology*, 4(1): 250-253.

40. Shobana S., Sreerama Y.N., Malleshi N. G. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α-glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115(4): 1268-1273.

41. Shukla R.K., Painuly D., Shukla A., Singh J., Porval A., Vats S. 2014. In vitro biological activity and total phenolic content of *Morus nigra* seeds. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(11): 200-210.

42. Sivashanmugam T., Muthukrishnan S., Umamaheswari M., Asokkumar K., Subhadradevi V., Jagannath P., Madeswaran A. 2013. Discovery of potential cholesterol esterase inhibitors using in silico docking studies. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 8(3): 223-229.

43. Tiwari S.P., Srivastava R., Singh C.S., Shukla K., Singh R.K., Singh P., Singh R., Singh N.L., Sharma R. 2015. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*, 4(1): 1886-1901.

44. Vandepas L.E., Oliveira L.M., Lee S. S., Hirose E., Rocha R.M., Swalla B.J. 2015. Biogeography of *Phallusia nigra*: is it really black and white?. *The Biological Bulletin*, 228(1): 52-64.

45. Wickramaratne M.N., Punchihewa J.C., Wickramaratne D.B.M. 2016. In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenanthera pavonina*. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1): 1-5.

46. World Health Organization. WHO global strategy on diet, physical activity and health: European regional consultation meeting report. 2003.

47. Wu X., Ruan Y., Chen T., Yu Z., Huo D., Li X., Wu F., Jiang X., Ren C. 2020.

31. Oyedemi S., Koekemoer T., Bradley G., Van de Venter M., Afolayan A. 2013. In vitro anti-hyperglycemia properties of the aqueous stem bark extract from *Strychnos henningsii* (Gilg). *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 33(2): 120-127.

32. Park M.K., Jung U., Roh C. 2011. Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. *Marine Drugs*, 9(8): 1359-1367.

33. Prabhu A.S., Ananthan G. 2014. Alpha-amylase inhibitory activities of ascidians in the reatment of diabetes mellitus. *Bangladesh Pharmacological Society*, 9(4): 498-500.

34. Priya D.S., Christy H.K.S., Sankaravadivu S. 2016. Quality and quantitative estimations of chemical constituents in a simple Ascidian *Phallusia nigra*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(02): 1492-1497.

35. Robyt J.F. 2005. Inhibition, activation, and stabilization of α-amylase family enzymes. *Biologia Bratislava*, 60(16):17-26.

36. Rocha R.M., Faria S.B., Moreno, T.R. 2005. Ascidians from Bocas del Toro, Panama. I. Biodiversity. *Caribbean Journal of Science*, 41(3): 600-612.

37. Rohn S., Rawel H.M., Kroll J. 2002. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3566-3571.

38. Safamansouri H., Nikan M., Amin G., Sarkhail P., Gohari A.R., Kurepaz-Mahmoodabadi M., Saeidnia S. 2014. α-Amylase inhibitory activity of some traditionally used medicinal species of Labiatae. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 13(1): 1-5.

39. Sarhadizadeh N., Afkhami M., Ehsanpour M. 2014. Evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic agents of Ascidian *Phallusia nigra*

First echinoderm alpha-amylase from a tropical sea cucumber (*Holothuria leucospilota*): Molecular cloning, tissue distribution, cellular localization and functional production in a heterogenous *E. coli* system with codon optimization. *PloS One*, 15(9): 1-18.

# Inhibitory Effect of *Phallusia Nigra* (Savigny, 1816) Extract on Activity of Alpha –Amylase

**Asmae Tajik, Mousa Keshavarz*, Ahmad Homaei**

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, BandarAbbas, Iran

## Abstract

Increased blood sugar levels play an important role in the development of diabetes. Thus, inhibition of alpha-amylase enzyme inhibits the conversion of polysaccharides to glucose or reduces it. In diabetics, this enzyme can be effective in absorbing glucose from the gastrointestinal tract and preventing a rapid rise in blood sugar. Ascidians are known as a group of marine fauna rich in bioactive secondary metabolites. This study was aimed at evaluating the inhibitory effect of alpha-amylase activity on *Phallusia nigra*. Specimens of *P. nigra* belonged to Qeshm and Hormoz islands. Under vacuum, using a rotary evaporator, the samples were extracted from polarity, i.e. ethyl acetate, methanol and water-methanol, respectively. Moreover, the percentage of alpha-amylase inhibitor activity was evaluated based on DNSA method in vitro and acarbose was used as a positive control. The results revealed that among all extracts, the highest inhibitory percentage was related to acarbose at a concentration of 2000 µg/ml equal to 69.65% and the lowest value was related to water-methanolic extract at a concentration of 500 µg/ml and equal to 15.39%. The highest inhibitory activity was observed as acarbose>ethyl acetate>methanol>water-methanol. Furthermore, the results showed a direct relationship between the level of enzyme inhibition and the concentration of extracts. In this study, ethyl acetate extract had the highest inhibitory effect of alpha-amylase enzyme with $IC_{50}$ equal to 1327.244 µg/ml, followed by methanolic extract with $IC_{50}$ equal to 1529.68 µg/ml. Water-methanolic extract had the lowest inhibitory effect with $IC_{50}$ and equal to 2334.01 µg/ml. The inhibitory percentage of acarbose was higher than other extracts ($IC_{50}$=1158.40 µg/ml). Due to the inhibitory power of *P. nigra* extracts, they can be used in the future in the production of anti-diabetic drugs with minimal or no adverse side effects.

**Keywords:** Alpha-Amylase, Antidiabetic, Acarbose, $IC_{50}$, DNSA, *Phallusia Nigra*