



Investigation of the Effect of Rooibos (*Aspalathus linearis*) Herbal Tea on Acetylcholinesterase Enzyme Activity

Şüheda Yıldırım^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye

*Corresponding author

Research Article

History

Received: 21/8/2024

Accepted: 21/11/2024

ABSTRACT

Rooibos herbal tea, whose popularity has increased in recent years, is rich in antioxidants and contains flavonoids and polyphenols in its chemical composition. The enzyme acetylcholinesterase (AChE) is associated with Alzheimer's disease (AD), one of the most common neurodegenerative diseases in the world. Cholinesterase inhibitors have positive effects on AD and have been used in the treatment of the disease for many years. In this study, the effect of rooibos herbal tea, obtained ready-to-use in teabag form from a single brand, on the acetylcholinesterase enzyme was investigated. The studies were conducted *in vitro* using the Ellman method. As a result of the data, an %activation-matter concentration graph was plotted. The results indicated that rooibos herbal tea at different concentrations did not exhibit inhibitory effects on AChE but may possess an activating effect.

Keywords: Acetylcholinesterase, Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, Alzheimer, enzyme activity

Rooibos (*Aspalathus linearis*) Bitki Çayının Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Süreç

Geliş: 21/8/2024

Kabul: 21/11/2024

ÖZET

Son dönemlerde popülerliği artan rooibos bitki çayı, antioksidan açısından oldukça zengindir ve kimyasal bileşeninde flavonoidler, polifenoller bulunur. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi, dünyada en yaygın bulunan nörodejeneratif hastalıklardan biri olan alzheimer hastalığı (AH) ile ilişkilidir. Kolinesteraz inhibitörleri AH üzerinde olumlu etkileri vardır ve hastalığın tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu çalışmada poşet çay halinde hazır olarak temin edilen, tek bir markaya ait olan rooibos bitki çayının asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkisi incelendi. Çalışmalar Ellman yöntemiyle *in vitro* olarak yapıldı. Veriler sonucunda %aktivasyon-madde konsantrasyon grafiği çizildi. Grafik sonucunda farklı konsantrasyonlardaki rooibos bitki çayının, AChE üzerinde inhibitör etkisi olmadığı ancak aktivatör etkiye sahip olabileceği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, Rooibos Çayı, *Aspalathus linearis*, Alzheimer, enzim aktivitesi

Copyright



This work is licensed under
Creative Commons Attribution
4.0 International License

Giriş

Ticari olarak fermente edilmiş (kırmızı rooibos, RR) ve fermente edilmemiş (yeşil rooibos, GR) iki formu bulunan Rooibos çayı, güçlü antioksidan özelliğiyle sağlık alanında popülerlik kazanmıştır [1,2]. Güney Afrika'ya özgü olmakla birlikte bölgede siyah çay ile birlikte en çok tüketilen çaylardan biridir. Flavonoidler, polifenoller ve fenolik asit gibi antioksidanlar açısından zengindir [3,4]. Rooibos özünün antidiyabetik etkisinin yanı sıra yaşlanma karşıtı, antimutajenik, antiinflamatuvar, antiviral, antikarsinojenik, antispazmodik, kardiyoprotektif aktiviteler gibi çeşitli alanlardaki olumlu çalışmalar sağlık alanında yarar sağlayabileceğini öne sürmektedir [5,6,7]. Çayın fitokimyasal analizi sonucunda hammadde; bitkinin türüne özgü C-C glikozit bağı içeren dihidrokalkonlar, aspalatin, notofagin ve bol miktarda fenolik bileşenler içerir [8,9]. İçeriğinde bakır, çinko, demir, manganez, sodyum, potasyum, kalsiyum mineralleri bulunur [10].

Asetilkolinesteraz (E.C.3.1.1.7.) nörotransmisyon bir ezim olup asetilkolin nörotransmitterini asetik asit ve koline parçalayan serin hidrolaz sınıfı enzim grubundadır [11,12]. Omurgalılarda bulunan AChE ve BuChE iki farklı gen tarafından kodlanır ve AChE'nin kolinerjik sinapslara asetilkolini hidroliz etmek ana işlevidir [13]. Beynin işleyişinin düzgün olması için dopamin, norepinefrin, serotonin, glutamat, asetilkolin gibi nörotransmitterlerin dengede olması gerekir [14]. AChE dünyada en yaygın bulunan nörodejeneratif hastalıklardan biri olan alzheimer hastalığı (AH) ile ilişkilidir [15,16]. Oksidatif stres, amiloid hipotezi, kolinerjik işlev kaybı AH en yaygın nedenleridir. Yaş en etkin faktördür bunun yanı sıra yaşam tarzı, metabolik hastalık tablosu, yanlış beslenme ile de tetiklendiği için Batı toplumlarında daha yaygın görülür [17,18,19,20]. Hastalık üzerine binlerce çalışma yapılmasına rağmen hala etkili tedavi bulunamamıştır. Gündelik aktivitelerle hastalığı önlemek öncelik haline gelmiştir [21,22]. Kolinesteraz inhibitörleri AH üzerinde olumlu etkileri vardır ve hastalık tedavisinin temel taşı oluşturmaktadır [23,24,25]. Kolinerjik iletimi güçlendiren AChE inhibitörleri, asetilkolin miktarını artırarak

sinapslerin iletimini güçlendirirken AH hastalığının erken dönemde tedavisi için heyecan vericidir [26,27,28].

Bu çalışmanın amacı rooibos bitki çayının AChE aktivitesi üzerine etkisini incelemektir.

Yöntem

Rooibos Bitki Çayının Hazırlanması

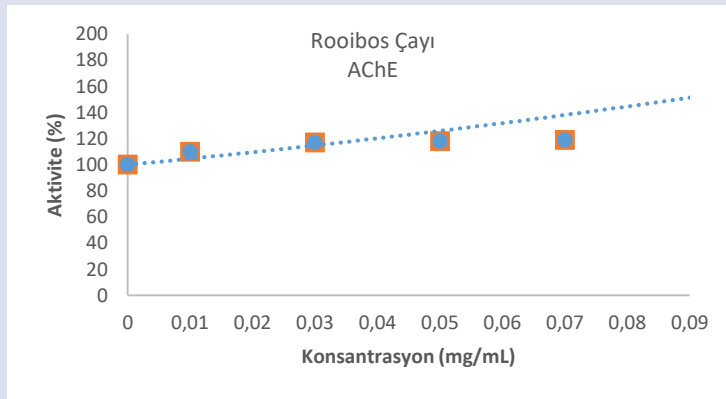
Ticari bir markaya ait olan, hazır şekilde satılan rooibos poşet bitki çayı marketten temin edildi. Üzerinde yazan prosedüre göre bir adet poşet çay 100 °C 200 mL içme suyu ile 5-6 dakika bekletilerek demlendi. Oda ısısına gelince deneyde kullanılmak üzere 2mL'lik eppendorf tüpüne alındı. Enzim aktivitesi yalnızca tek bir markaya ait olan rooibos poşet çay üzerinde çalışılmıştır.

AChE Aktivite Ölçümü

Ellman ve ark. Spektrofotometrik yöntemi kullanılarak enzim aktivitesi belirlendi [29]. 100 µl Tris/HCl (1M pH:8.0), 50 µl asetilkolin iyodid (50mM), 50 µl DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)), 10 µl ticari AChE enzim çözeltisi eklenerek çay konsantrasyonu ve distile suyun toplam hacmi 790 µl olacak şekilde ayarlandı. Toplam hacmi 1 mL olan küvet spektrofotometre yardımıyla 412 nm'de 5 dakikanın başında ve sonunda absorban okuması yapıldı. Absorbanların farkı alındı. Elde edilen sonuçlardan %aktivasyon-madde konsantrasyonu grafiği çizildi.

Bulgular

Sonuç verileri Şekil 1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre rooibos bitki çayının AChE üzerinde inhibitör etkisi saptanmamıştır. İlgili veriler incelendiğinde kontrol grubunun aktivitesinin (%100) ilgili çaydan eklenerek hesaplanan %aktivitenin eklenen madde konsantrasyonu arttıkça artışı görülmüştür. (0.01 mg/mL için %110, 0.03 mg/mL için %116, 0.05 mg/mL için %118, 0.07 mg/mL için %119, 0.1 mg/mL için %187). Kontrole göre %87 lik bir enzim aktivitesinde artış olması rooibos bitki çayının AChE enzim aktivitesini artırdığını göstermektedir.



Şekil 1. Rooibos Bitki Çayının % Aktivite-Madde Konsantrasyon Grafiği

Tartışma ve Sonuç

Rooibos çayı son zamanlarda sağlık alanındaki çalışmalarla popüler hale gelmiştir. Son zamanlarda tadı, kokusu ve aromasının etkisiyle de tüketimi artmıştır. Sindirim sorunlarını hafifletme, sinir gerginliği ve kansere yakalanma riski açısından ilgi görmektedir [30,31].

Yapılan çalışmalarda kolinesteraz inhibitörlerinin bilişsel ve işlevsel AH belirtilerini tedavi etmede etkili olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Tedavi kolinejik etkiye dayanmaktadır. Alzheimer hastalığının tedavisinde AChE enzim inhibisyonu, beyindeki asetilkolin kullanımını artırarak ve Aβ birikimini azaltarak önemli bir rol oynamaktadır [32,33,34].

Rooibos bitki çayının fitokimyasal içeriği ele alındığında AChE üzerinde inhibitör etki sağlaması beklenirken aktivatör etkisinin olabileceği gözlemlendi. Literatürle karşılaştırıldığında bu uyumsuzluğun nedeni çay hazır halde ticari olarak temin edildiği için bitkinin fermente sürecindeki işleyiş veya çayın demlenme koşulları olabileceği düşünülmektedir. Çayın demlenme koşullarının bitki içeriğindeki fenolik maddelerin çözünmesinde yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Literatürdeki çalışmalar göz önüne alındığında, rooibos (*Aspalathus linearis*) bitkisinin çevre kirliliği gibi koşullara duyarlı olduğu, ayrıca çayın polifenol içeriğinin rooibos bitkisinin formu, çeşiti ve çayın demlenme süresi ile değiştiği görülmüştür [35,36,37,38]. Demlenme suyunun iyonik içeriği, rooibos bitkisinin mevsiminde üretilip toplanması da çayın fitokimyasal özelliği üzerinde etkilidir [39,40].

Sonuç olarak rooibos bitki çayı, AChE üzerinde aktive edici bir etkisinin de olabileceği görülmüştür. Bu çalışma sonraki çalışmalara yol göstermesi açısından önemli bir incelemidir.

Çıkar Çatışması

Çıkar çatışması yoktur.

Bilgi

Bu çalışma herhangi bir finansal destek alınmaksızın gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada yapay zekâ destekli herhangi bir araç kullanılmamıştır.

Etik Beyan

Bu çalışma etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Kaynaklar

- [1] Pretorius L., Staden V.A., Kellermann T.A., Henning H., Smith C., Rooibos (*Aspalathus linearis*) alters secretome trace amine profile of probiotic and commensal microbes in vitro, *Journal of Ethnopharmacology*, 297, (2022) 2-18.
- [2] Bednarska K., Fecka I., Aspalathin and Other Rooibos Flavonoids Trapped α -Dicarbonyls and Inhibited Formation of Advanced Glycation End Products In Vitro, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), (2022) 14738.
- [3] Xiao X., Erukainure L.O., Sanni O., Koorbanally N.A., İslam S.Md., Phytochemical properties of black tea (*Camellia*

sinensis) and rooibos tea (*Aspalathus linearis*); and their modulatory effects on key hyperglycaemic processes and oxidative stress, *J Food Sci. Technol*, 57(12), (2020) 4345-4354.

- [4] Rodgers A., Mokoena B., Durbach B. & ark., Do teas rich in antioxidants reduce the physicochemical and peroxidative risk factors for calcium oxalate nephrolithiasis in humans? Pilot studies with Rooibos herbal tea and Japanese green tea, *Urolithiasis*, 44, (2016) 299-310.
- [5] Canda B.D., Oguntibeju O.O., Marnevic J.L., Effects of Consumption of Rooibos (*Aspalathus linearis*) and a Rooibos-Derived Commercial Supplement on Hepatic Tissue Injury by tert-Butyl Hydroperoxide in Wistar Rats, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1, (2014) 9-18.
- [6] Dladla V.P., Joubert E., Muller C.J.F., Louw J., Johnson R., Hyperglycemia-induced oxidative stress and heart disease-cardioprotective effects of rooibos flavonoids and phenylpyruvic acid-2-O- β -D-glucoside, *Nutrition & Metabolism*, 14, (2017) 45.
- [7] Stander E.A., Williams W., Rautenbach F., Roes-Hill M.L., Mgwatyu Y., Marnewick J., Hesse U., Visualization of Aspalathin in Rooibos (*Aspalathus linearis*) Plant and Herbal Tea Extracts Using Thin-Layer Chromatography, *molecules*, 25(5), (2019) 938-949.
- [8] Pryzanowska J., Pharmacological activity of *Aspalathus linearis* extracts: pre-clinical research in view of prospective neuroprotection, *Nutritional Neuroscience*, 26(5), (2023) 384-402.
- [9] Panti W.G., Marnewick J.L., Esterhuysen A.J., Rautenbach F., Rooyen J.V., Rooibos (*Aspalathus linearis*) offers cardiac protection against ischaemia/reperfusion in the isolated perfused rat heart, *Phytomedicine*, 18(14), (2011) 1220-1228.
- [10] Gilani E.H., Han A., Ghayur M.N., Ali S.F., Herzig J.W., Antispasmodic Effects of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) is Mediated Predominantly through K⁺-Channel Activation, *BCPT*, 99(5), (2006) 365-373.
- [11] Thapa S., Lv M., Xu H., Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(17), (2017) 1665-1676.
- [12] Koçyiğit Ü.M., Investigation of Inhibition Effect of Oxytocin on Carbonic Anhydrase and Acetylcholinesterase Enzymes in the Heart Tissues of Rats, *Iğdır University Journal of the Institute of Science & Technology*, 8(1), (2018) 119-207.
- [13] Talesa V.N., Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease, *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(16), (2001) 1921-2150.
- [14] Koçyiğit Ü.M., Arık S., Investigation of the Effects of Favipiravir and Oseltamivir Active Substances Used in the Treatment of Covid-19 on Carbonic Anhydrase I-II Isoenzymes and Acetylcholine Enzyme Activities in Vitro, *Cumhuriyet Science Journal*, 44(1), (2023) 67-71.
- [15] Karakaya A., Erçetin T., Yıldırım Ş., Koçyiğit Ü.M., Rudrapal M., Rakshit G., Çevik U.A., Özkay Y., New Thiazole Derivatives: Carbonic Anhydrase I-II and Cholinesterase Inhibition Profiles, *Molecular Docking Studies Chemistry Select*, 28(9), (2024) 1-11.
- [16] Shen Y., Jiang W., Li X., Cao A., Li D., Li S., Yang J., Qian J., Mitochondrial dynamics in neurological diseases: a narrative review, *Annals of Translational Medicine*, 11(6), (2023) 264.
- [17] Çiftçi B., Ökten S., Koçyiğit Ü.M., Atalay V.E., Atas M., Çakmak O., Functionalized methoxy quinoline derivatives: Experimental and in silico evaluation as new antiepileptic, anti-Alzheimer, antibacterial and antifungal drug candidates, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 10, (2024) 10127.

- [18] Bortolami M., Pandolfi F., De D., Carafa C., Messori A., Santo R.D., Feroci M., Costi R., Chiarotto I., Bagetta D., Alcaro S., Colone M., Stringaro A., Scipione L., New deferiprone derivatives as multi-functional cholinesterase inhibitors: design, synthesis and *in vitro* evaluation, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 198, (2020) 112350.
- [19] Fold J., Pedros I., Patraca I., Martinez N., Suresa F., Camins A., Metabolic Basis of Sporadic Alzheimer's Disease. Role of Hormones Related to Energy Metabolism, *Current Pharmaceutical Desing*, 19(38), (2013) 6739-6748.
- [20] Athar T., Balushi K.A., Khan S.A., Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease, *Molecular Biology Reports*, 48, (2021) 5629-5645.
- [21] Passeri E., Elkhoury K., Morsink M., Broersen K., Linder M., Tamayol A., Malaplate C., Yen F.T., Tehrani E.A., Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), (2022) 13954.
- [22] Cummings J.L., Tong G., Ballard C., Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options, *Journal of Alzheimer's Disease*, 67(3), (2019) 779-794.
- [23] Joe E., Ringman J.M., Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention, *State of the Art Review*, 367, (2019) 16217.
- [24] Balanz N., Bereczki D., Kovacs T., Cholinesterase inhibitors and memantine for the treatment of Alzheimer and non-Alzheimer dementias, *Ideggyógyászati Szemle*, 74(11-12), (2021) 379-387.
- [25] Brambilla D., Drug Discovery Development and Delivery in Alzheimer's Disease, *Pharm Res*, 35(3), (2018).
- [26] Galimberti D., Scarpini E., Old and New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 25(10), (2016) 1181-1187.
- [27] McGleenon B.M., Dynan K.B., Passmore A.P., Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease, *Br. J. Clin. Pharmacol*, 48(4), (1999)471-480.
- [28] Marucci G., Bulcioni M., Ben D.D., Lambertucci C., Volpini R., Amenta F., Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease, *Neuropharmacology*, 190, (2021) 108352.
- [29] Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr, V, Featherstone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical pharmacology*, 7: 88-95.
- [30] Areo O.M., Njobeh P.B., Risk assessment of heavy metals in rooibos (*Aspalathus linearis*) tea consumed in South Africa, *Environ Sci Pollut Res*, 28, (2021) 59687-59695.
- [31] Song N.E., Kim M.K., Le K.G., Jang H.W., Analysis of volatile compounds in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) using different extraction methods and their relationship with human sensory perception, *Food Research International*, 141, (2021) 109942.
- [32] Liston D.R.,Nielsen J.A., Villalobos A., Chapin D., Jones S.B., Hubbard S.T., Shalaby I.A., Ramirez A., Nason D., White W.F., Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease, *European Journal of Pharmacology*, 486(1), (2004) 9-17.
- [33] Saify Z.S., Sultan G., Chapter 7 - Role of Acetylcholinesterase Inhibitors and Alzheimer Disease, *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*, (2014) 387-425.
- [34] Poyraz İ.E., Kıyan H.T., Zeybekoğlu E., Özzambak M.E., vd. (2021). Farklı nergis kültür çeşitleri soğanlarının *in vitro* antioksidan, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz aktiviteleri. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi - C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji*, 10(2), 90-101.
- [35] Pyrzanowska, J., The toxic contaminants of *Aspalathus linearis* plant material as well as herb-drug interactions may constitute the health risk factors in daily rooibos tea consumers, *International Journal of Environmental Health Research*, 33(2), (2021) 129-142.
- [36] Piek H., Venter I., Rautenbach F., Marnewick J.L., Rooibos herbal tea: An optimal cup and its consumers, *Health S.A.*, 21(24), (2019) 1090.
- [37] Gaggia F., Baffoni L., Galiano M., Nielsen D.S., Jakobsen R.R., Castro-Mejía J.L., Bosi S., Truzzi F., Musumeci F., Dinelli G.,Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology Chemistry and Antioxidant Activity, *Nutrients*,11(1), (2019) 1.
- [38] Liu A., Ka Makhaya S.C., Osewe M., Factors Influencing Rooibos Tea Certification and Quality Control for Smallholder Farmers in South Africa, *Foods*, 11(21), (2022) 3495.
- [39] Giacomini C.E., Chen R.Y., Hack E., Fischer P., Tea film formation in artificial tap water, *Soft Matter*, 19(31), (2023)5967-5977.
- [40] Stanimirova I., Kazura M, Beer D., Joubert E., Schulze A.E., Beelders T., Villiers A., Walczak B., High-dimensional nested analysis of variance to assess the effect of production season, quality grade and steam pasteurization on the phenolic composition of fermented rooibos herbal tea, *Talanta*,15(115), (2013) 590-599.