● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ شانزدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۴۳-۱۳۴، ۱۳۸۸

مقالهٔ پژوهشی

بررسی مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین (زیرگونه ژرمینال) توسط ۲۰ گیاه دارویی با کاربرد ضدفشارخون در طب سنتی ایران

دکتر سیدعلی ضیایی[1*]، دکتر محمودرضا حیدری[2]، دکتر غلامرضا امین[3]، دکتر آزیتا کوچمشکی[4]، محمد حیدری[5]

خلاصه

مقدمه: در طب سنتی از گیاهان دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله کنترل فشارخون استفاده می‌شود. از آنجا که مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) یکی از مکانیسم‌های دخیل در کنترل فشارخون است، در این تحقیق مهار این آنزیم توسط ۲۰ گیاه دارویی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش: گیاهان مورد نظر پس از جمع‌آوری، آسیاب و عصاره‌گیری لیوفیلیزه شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACE توسط سوبسترای هیپوریل ال هیستیدین،ال لوسین (HHL) در شرایط میکرو سنجیده شد. عصاره هایی که توانستند بیش از ۵۰ درصد فعالیت آنزیم را در مقایسه با شاهد، مهارکنند به عنوان مهارکننده احتمالی ACE در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: از ۲۰ گیاه مورد مطالعه بیشترین اثر مهارکنندگی ACE در درجه اول مربوط به دم گیلاس، گل ختمی و ریشه روناس و تا حد۱۰۰ درصد بود و در گیاهان بهار نارنج، زرشک آبی، اسفند و سیر نیز میزان مهار تا حد ۷۰ درصد یا بیشتر از آن مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در میان نمونه‌های آزمایش شده بیشترین میزان مهار ACE مربوط به دم گیلاس، گل ختمی و ریشه روناس بود که می‌توانند در مطالعات آتی به عنوان گیاهان برتر مهارکننده فعالیت ACE برای جداسازی اجزای مؤثره مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، مهار فعالیت ACE، آنزیم ACE زیرگونه ژرمینال، فشارخون

۱- استادیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۲- استاد سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و مراکز تحقیقاتی فارماسیوتیکس، علوم اعصاب و فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- دانشیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران۴- دکتر داروساز، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران ۵- پژوهشگر آزاد

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، خیابان کودکیار، بلوار دانشجو، اوین، تهران

● **آدرس پست الکترونیک:** saziai@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۳/۲۸ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۷/۷/۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۷/۸/۱۵

مقدمه

در بین نظام‌های درمانی مبتنی بر استفاده از طبیعت، گیاهان نقش اساسی را ایفاء کرده و از ارکان اصلی نظام‌های درمانی سنتی و پیچیده کشورهایی نظیر چین (۱) و هند (۲) بوده‌اند. این نظام‌های درمانی مبتنی بر مصرف گیاهان پس از گذشت قرن‌ها هنوز هم در بسیاری از جوامع نقش بنیادین در سلامت انسان‌ها دارند.

طی سالیان متمادی، داروهای دارای منشأ طبیعی شامل مواد معدنی، حیوانی و به‌ویژه گیاهی، اساس و در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می‌شدند ولی عوامل متعددی همچون ازدیاد جمعیت، کمبود منابع طبیعی مورد نیاز و پیشرفت علوم سبب گردید تا مواد صناعی یکی پس از دیگری به دنیا عرضه شوند و گیاهان دارویی رونق اولیه خود را از دست بدهند. هر چند پزشکی مدرن توانست بسیاری از بیماری‌های غیرقابل علاج و غالباً مرگ‌آفرین را درمان کند، با وجود این گیاهان دارویی و داروهایی که از آن‌ها تهیه می‌شوند هرگز به طور کامل کنار گذاشته نشدند و مواد مؤثره گیاهی پیوسته به عنوان موادی غیر قابل جایگزین مورد استفاده بوده و خواهند بود (۳).

از سوی دیگر در سال‌های اخیر بشر متوجه عوارض جانبی نامطلوب بسیاری از داروهای صناعی شده که نه تنها بر روی خود بیمار اثر نامطلوب گذاشته‌اند بلکه می‌توانند بر روی نسل‌های بعدی نیز اثر سوء داشته باشند. بدین جهت توجه و نگرشی جدید نسبت به استفاده از گیاهان دارویی با عوارض بسیار کمتر ایجاد شده است. همچنین مطالعه بر روی داروهای کنونی نشان می‌دهد که گرچه گیاهان از لحاظ میزان، سهم کمتری را در تهیه داروها دارا هستند در عوض، داروهای حیاتی همچون داروهای حاصل از تریاک، بلادون، فیزوستیگما و تعدادی از داروهای ضد سرطان مؤثر، از گیاهان تهیه می‌شوند (۳).

با توجه به نکات فوق، نقش گیاهان دارویی در حل مشکلات پزشکی در قرن حاضر سرنوشت‌ساز تلقی شده است، چرا که تمامی اسکلت‌های ساختمانی داروها در طبیعت موجودند. در حال حاضر تحقیقات و مطالعات علمی در مورد گیاهان دارویی در بسیاری از نقاط دنیا دنبال می‌شود. از آنجایی که کشور ایران از آب و هوای متنوع و شرایط جغرافیایی خاصی برخوردار است، گیاهان متعدد و در بعضی موارد گیاهان منحصر به فرد در سراسر آن رشد می‌کنند که باعث ایجاد یک فلور کم‌نظیر در جهان شده است به طوری که ایران با دارا بودن نزدیک به ۸ هزار گونه گیاهی ذخیره‌ای عظیم و بالقوه از ترکیبات فعال بیولوژیک محسوب می‌گردد. یکی از بهترین بهره‌وری‌هایی که می‌توان از شرایط کم نظیر موجود نمود، انجام تحقیقات گسترده هر چه بیشتر در زمینه داروسازی است (۴).

از دهۀ ۱۹۸۰ میلادی تأثیر بر آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) موفقیت بزرگی را به عنوان خط اول درمان برای بیماری‌های قلبی - عروقی از جمله فشارخون بالا، نارسایی قلبی، بیماری‌های عروق کرونر و نفروپاتی دیابتی کسب کرده است (۵).

آنزیم مبدل آنژیوتانسین (دی‌پپتیدیل کربوکسی‌پپتیداز) یک متالوپروتئاز متصل به اتم روی است و آنزیم اصلی در سیستم رنین ـ آنژیوتانسین محسوب می‌شود (۶). این آنزیم هیدرولیز باند پپتید ماقبل آخر انتهای کربوکسیلی بسیاری از پپتیدها را کاتالیز می‌کند، ولی بهترین سوبسترای آن آنژیوتانسین I و برادی کینین است (۷،۸).

از آنجایی که آنزیم مبدل آنژیوتانسین در هموستاز، فشارخون و نگهداری آب و الکترولیت‌ها نقش دارد، بنابراین عامل مهمی در درمان فشار خون و نارسایی قلبی محسوب می‌شود (۱۱-۹).

تاکنون مهارکنندگان قوی و اختصاصی متعددی برای ACE شناخته شده‌اند (۱۲،۱۳). شباهت جایگاه فعال ACE با دیگر متالوپروتئازهای متصل به روی مانند کربوکسی

پپتیداز A و ترمولیزین، بـه مقـدار زیـاد در طراحـی ایـن مهارکنندگان مؤثر بوده است.

در انسان دو شکل آنزیم ACE تاکنون شناخته شده است:

۱ـ شکل سوماتیک (sACE)، که در بسیاری از بافت‌ها از جمله سلول‌های اندوتلیال، اپی‌تلیـال و نورواپیتلیـال بـا وزن مولکولی حدود ۱۵۰ تا ۱۸۰ کیلودالتـون وجـود دارد. ایـن آنزیم به نوع اندوتلیومی موسوم است.

۲ـ شکل تستیکولار یا ژرمینال (tACE)، که بـر خـلاف sACE منحـصراً در بیـضه‌هـا وجـود داشـته و در تکامـل اسپرماتید و بلوغ اسپرماتوزا و تولیـدمثل نقـش دارد و ایـن ایزوفـرم وزن مولکـولی حـدود ۹۰ تـا ۱۱۰ کیلودالتـون دارد (۱۴).

هر دو فرم ACE اکتوآنزیم هستند (در سطح سلول وجود دارنـد) و توسـط یـک لنگـر آبگریـز کـه در انتهـای کربوکسیلی آن‌ها قرار دارد به غشای سلولی متصل شـده و دارای خاصیت آنزیمی یکسانی هستند (۱۸-۱۵).

مشخص شده است که ACE دارای دو جایگاه فعال بـوده که از لحاظ ساختمان بـسیار مـشابه ولـی کـاملاً یکـسان نیستند (۱۹). تلاش برای یافتن مهارکنندگان ACE با سـنتز کاپتوپریل توسط Ondetti و همکاران افزایش یافـت (۲۰). بلافاصله در طی چند سال بعـد مـواد گونـاگونی بـا تغییـر ساختمانی کاپتوپریل تهیـه و بـه عنـوان مهارکننـده ACE معرفی شدند (۲۱).

اما این داروها هنوز هم به دلیل مهار غیراختصاصی آنزیم ACE مطلوب نیستند. از طرف دیگر وجود منابع گیـاهی بـا خواص درمانی گوناگون سبب شد که مطالعات برای یـافتن داروهای جدید مهارکننده ACE با عوارض جـانبی کمتـر و اختصاصی بودن از لحـاظ مهـار جایگـاه فعـال، بـه‌سـوی غربال‌گری گیاهان دارویی سنتی مناطق مختلف جهان سوق پیدا کند. اولین تحقیقی که در این زمینه در ایـران صـورت گرفته شامل بررسی اثر حدود ۱۳۵ گونه گیاهی بر آنـزیم سوماتیک ریه خرگوش بود (۴). در تحقیق حاضـر بـرای بررسی مهار اختصاصی تبدیل آنژیوتانسین، به جای آنـزیم سوماتیک کـه دو جایگـاه فعـال دارد از آنـزیم ژرمینـال (بیضه‌ای) که دارای یک جایگاه فعـال بـوده و بیـشتر در هیـدرولیز آنژیوتانـسین نقـش دارد تـا در متابولیـسم سوبستراهای دیگر استفاده شد. گیاهان انتخابی نیز ۲۰ گیـاه هستند که در طب سنتی برای درمـان فـشارخون اسـتفاده می‌شوند و در مطالعه قبلی نویسندگان نیز بررسـی شـده‌انـد (۴).

روش بررسی

مـواد شـیمیایی بـه‌کـار رفتـه Hippuric acid, Captopril, Hippuryl Histidyl- Leucine Acetate Salt, و Igepal از کارخانه سـیگما و Quinoline, EDTA $2Na^+$, Benzenlsulfonylchloride, Ethanol, Hepes از کارخانه مرک تهیه شدند.

تهیه و جمع‌آوری گیاهان

از فروردین ۱۳۸۳ تا خرداد ۱۳۸۴ گیاهان انتخاب شده از مراکز فروش این نمونه‌ها به صورت خـشک تهیه شدند و یا از منـاطق موجـود جمـع‌آوری و در شرایط مناسب سریعاً خـشک شـده و در هربـاریوم دانشکده داروسازی دانـشگاه علـوم پزشـکی تهـران مورد مطالعات تاگزونومی قرار گرفتنـد. نـام علمـی دقیق این نمونه‌ها با توجه بـه نمونـه‌هـای رفـرانس تعیین و به صورت شناسنامه برای هر یـک تکمیـل گردید (جدول ۱). منابع و کتب مـورد اسـتفاده بـرای انتخاب گیاهان موجود در جـدول عبارتنـد از: ۱- دکتـر زرگـری، ع: «گیاهـان دارویـی» ۲- دکتـر امـین، غ: «متداول‌ترین گیاهـان دارویـی سـنتی ایـران» ۳- مـؤمن حـسینی، م: «تحفـه حکـیم» ۴- ولاگ، ژ؛ اسـتودولا، ژ: «گیاهان دارویی» ۵- شیخ‌الرئیس ابوعلی سـینا: «قـانون در طـب» ۶- دکتـر سـجادی، ع: «۵۰۰۰ نـسخه گیـاهی»

۷- زکریای رازی، م: «الحاوی» ۸- درمانگران سنتی (عطاری)

روش عصاره‌گیری

نمونه‌های تهیه شده از بخش مورد استفاده گیاه و در مورد عدم اطلاع از بخش مورد استفاده نمونه تهیه شده از کل گیاه توسط آسیاب به صورت پودر درآمده و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. سپس ۱ گرم از گیاهان فوق داخل لوله‌های آزمایش درب‌دار ریخته شده و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر یا اتانول ۹۶٪ به‌طور جداگانه به آن اضافه و در حمام اولتراسوند به مدت ۲ ساعت جهت عصاره‌گیری قرار گرفت. سپس محلول رویی صاف شد. در مواردی که با این روش عصاره مطلوب به‌دست نیامد به روش پرکولاسیون عصاره‌گیری انجام شد. عصاره‌های آبی به روش لیوفیلیزه توسط دستگاه Freeze dryer خشک شدند. عصاره‌های الکلی نیز در شرایط خلأ توسط Rotary در دمای ۵۰ درجه تغلیظ شده و سپس در دستگاه لیوفیلیزاتور قرار گرفتند. عصاره‌های به‌دست آمده در ظروف شیشه‌ای، در دمای ۲۰- درجه و دور از نور تا زمان آزمایش نگهداری شدند. این روش عصاره‌گیری برای غربال‌گری مهارکنندگان آنزیم ACE استفاده می‌شود (۲۲).

اندازه‌گیری فعالیت ACE

فعالیت ACE توسط سوبسترای هیپوریل - ال - هیستیدیل - ال —لوسین (HHL) در شرایط میکرو سنجیده شد.

واکنش آنزیمی طبق معادله زیر صورت می‌گیرد.

$$\text{Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine} \xrightarrow{\text{ACE}} \text{Hippuric acid + L-Histidyl-L-Leucine}$$

۱ میلی‌گرم از هر کدام از عصاره‌های تهیه شده در ۱ میلی‌لیتر بافر سنجش فعالیت آنزیم ACE حل شد (۵۰mM بافر HEPES حاوی ۳۰۰ mM کلرید سدیم و pH ۸/۴ به‌طوری که در شرایط سنجش، غلظتی معادل ۰/۳۳mg/ml داشته باشند). در مورد عصاره‌های الکلی نیز همانند عصاره‌های آبی عمل شد با این تفاوت که برای حل کردن آن‌ها از بافر HEPES حاوی ۱۰٪ اتانول استفاده شد. انکوباسیون آنزیم و سوبسترا طبق الگوریتم زیر انجام می‌گیرد:

$$\text{۵۰μL محلول متوقف‌کننده} \xrightarrow[\text{زمان انکوباسیون}]{\text{دمای ۳۷°C}} \text{۲۵ μL سوبسترا + ۲۵ μL محلول مهار کننده + ۲۵ μL محلول آنزیم}$$

در مرحله بعد ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیم و ۲۵ میکرولیتر محلول عصاره به درون میکروتیوب‌های قرار داده شده در چاهک‌های ترمومیکسر ریخته شده به مدت ۳ دقیقه دستگاه روشن شد تا حین انکوباسیون در دمای ۳۷°C با لرزش دستگاه محلول‌های داخل میکروتیوب‌ها مخلوط شده و زمان و شرایط لازم را برای واکنش با هم داشته باشند. در مرحله بعد با افزودن ۲۵ میکرولیتر از محلول سوبسترا (محلول هیپوریل —ال هیستیدیل —ال —لوسین ۳/۵ میلی‌مولار) به میکروتیوب‌ها انکوباسیون آغاز و بعد از ۳۵ دقیقه برای توقف واکنش ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (Na_2EDTA - ۰/۱ نرمال) به میکروتیوب‌ها اضافه گردید.

هر آزمایش ۲ بار تکرار و یک بلانک برای هر نمونه تهیه شد. طرز تهیه بلانک به این صورت بود که ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده قبل از سوبسترا به میکروتیوب‌ها اضافه شد و فرصت داده شد تا ۳۵ دقیقه زمان انکوباسیون سپری شود.

در کنترل مثبت به جای ۲۰ میکرولیتر عصاره از ۲۰ میکرولیتر بافر سنجش یعنی بافر HEPES استفاده شد.

برای اندازه‌گیری میزان اسیدهیپوریک تولید شده از واکنش آنزیم و سوبسترا طبق پروتکل زیر عمل شد (۲۳):

بر روی این مخلوط، ۷۰ میکرولیتر بافر HEPES و بعد از آن ۳۰۰ میکرولیتر کینولین اضافه شده و بعد از ۵ ثانیه ورتکس بلافاصله بر روی آن ۱۰۰ میکرولیتر بنزن سولفونیل کلراید اضافه شده و مجدداً ۱۰ ثانیه ورتکس شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله بعد ۱۸۵۰ میکرولیتر اتانول بر روی آن اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در تاریکی قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر از این محلول به درون چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته و در طول موج ۴۹۲ نانومتر میزان جذب به کمک دستگاه الایزاریدر مدل MEDISPEC ESR 200 خوانده شد.

برای اندازه‌گیری میزان مهار از فرمول زیر استفاده شد:

$$\%Inhibition = 100 \times (1 - A/C)$$

که در آن A میزان فعالیت در حضور عصاره و C فعالیت کنترل مثبت است.

عصاره‌هایی که بتوانند بیش از ۵۰٪ فعالیت آنزیم را در مقایسه با شاهد مهار کنند، به عنوان مهارکننده احتمالی ACE در نظر گرفته می‌شوند (۲۳).

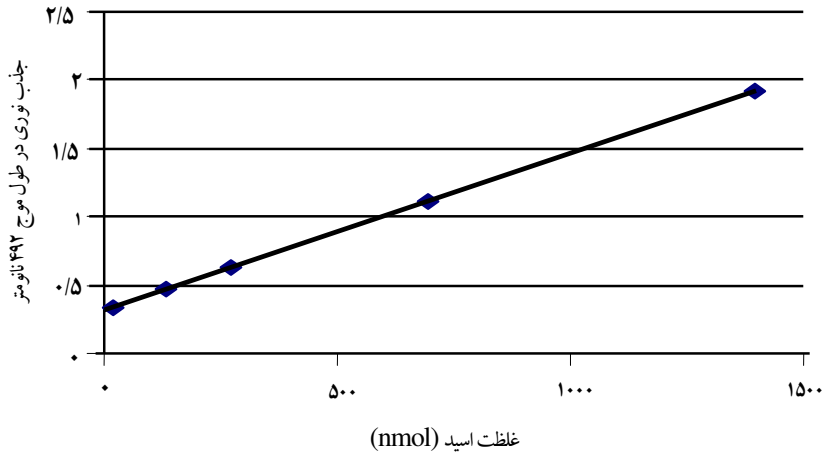
تهیه محلول استاندارد اسیدهیپوریک

برای منحنی استاندارد غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱ و ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسیدهیپوریک تهیه و ۲۵۰ میکرولیتر از آن مطابق پروتکل بالا استفاده می‌شود (۲۳).

نتایج

منحنی استاندارد اسید هیپوریک

انکوباسیون آنزیم ACE با سوبسترای هیپوریل – ال هیستیدیل – ال – لوسین سبب تولید محصولی به نام اسیدهیپوریک می‌شود. برای تعیین فعالیت آنزیم ابتدا منحنی استاندارد (کالیبراسیون) اسیدهیپوریک رسم و مطابق معادله خط رگرسیون که در شکل ۱ نشان داده شده است فعالیت آنزیم تعیین گردید.



شکل ۱: *منحنی استاندارد اسیدهیپوریک بیانگر میانگین ± خطای استاندارد میانگین ۳ اندازه گیری است.*

جدول ۱: *مشخصات گیاه مورد استفاده و درصد مهار آنزیم ACE توسط عصاره های آبی و الکلی زیرگونه ژرمینال و مقایسه آن با نتایج مطالعه قبلی نویسندگان (۴)*

نام عمومی	نام علمی	تیره	بخش مورد استفاده	درصد مهار آنزیم ژرمینال		درصد مهار آنزیم سوماتیک	
				عصاره الکلی	عصاره آبی	عصاره الکلی	عصاره آبی
بهار نارنج	*Citrus aurantium L.*	مرکبات *Rutaceae*	گل	۰	۸۶/۶	۵۶	۶۰
تمشک	*Rubus hyrcanus Juz.*	گل سرخ *Rosaceae*	برگ	۶۰	۰	۶۰	۰
به لیمو	*Lippia citriodora H. B. et K.*	شاه پسند *Verbenaceae*	سرشاخه	۰	۰	۰	۰
کاسنی	*Chicorium intybus L.*	کاسنی *compositae*	ریشه	۶۱	۰	۶۲	۵۱
موسیر	*Allium hirtifolium Boiss.*	لاله *Liliaceae*	غده	۰	۰	۰	۰
رازیانه	*Foeniculum vulgare Miller*	جعفری *Umbelliferae*	دانه	۶۶	۲۳/۳	۷	۵۶
پیاز	*Allium cepa L.*	لاله *Liliaceae*	غده	۵۰	۱۳	۵۰	۵۲
سیر	*Allium sativum L.*	لاله *Liliaceae*	غده	۶۰	۷۰	۶۸	۷۶
زرشک آبی	*Berberis integerrima Bge.*	زرشک *Berberidaceae*	میوه	۸۰	۰	۸۱	۰
کاسنی	*Chicorium intybus L.*	کاسنی *Compositae*	برگ	۰	۳/۳	۱۱	۷
گیلاس	*Cerasus avium (L.) Monech*	گل سرخ *Rosaceae*	دم میوه	۷۰	۱۰۰	۷۰	۷۷
ختمی	*Alcea digitata (Boiss.) Alef.*	پنیرک *Malvaceae*	گل	۵۱	۹۶/۶	۵۱	۰
لیموترش	*Citrus aurantifolia (cristm.) Swingle*	مرکبات *Rutaceae*	پوست میوه	۵۳/۳	۱۳/۳	۳۵	۶۷
سماق	*Rhus coriaria L.*	پسته *Anacardiaceae*	میوه	۰	۲۳/۳	۰	۰
شاتوت	*Morus nigra L.*	توت *Moraceae*	برگ	۵۰	۳/۳	۵۰	۶۷
روناس	*Rubia tinctorum L.*	روناس *Rubiaceae*	ریشه	۲۰	۱۰۰	۶۹	۳۲
خشخاش	*Papaver somniferum L.*	خشخاش *Papaveraceae*	دانه	۰	۰	۷	۲۸
زیتون	*Olea europaea L.*	زیتون *Oleaceae*	برگ	۰	۰	۰	۰
شوید	*Anethum graveolens L.*	جعفری *Umbelliferae*	دانه	۰	۰	۰	۰
اسفند	*Peganum harmala L.*	اسفند *Zygophyllaceae*	دانه	۷۰	۰	۸۴	۷۲

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه یافتن داروهایی با اثر مهار اختصاصی آنزیم ACE و عوارض جانبی کمتر مانند سرفه، صدمات کلیوی به جنین، هایپرکالمی، فقدان حس چشایی، راش‌های پوستی، پروتئین اوری، نوتروپنی و ... مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه پیشین نویسندگان به عنوان اولین مرحله غربال‌گری گیاهان مورد مصرف در طب سنتی ایران به عنوان ضدفشارخون، مدر و مقوی قلب جهت بررسی مهارکنندگی فعالیت ACE مورد مطالعه قرار گرفتند و از میان ۱۳۵ نمونه گیاهی غربال‌گری شده از روش اتنوفارماکولوژی ۵۲ نمونه که حدوداً ۳۹٪ از کل را تشکیل می‌دادند بیش از ۵۰٪ فعالیت ACE را مهار کردند (۴).

آزمایشات انجام شده در هندوستان نیز حاکی از فعال بودن ۳۰/۱٪ از نمونه‌های غربال‌گری شده بود و در بررسی دیگری این میزان ۲۱٪ بوده است (۲۴،۲۵). در برزیل ۱۵/۸٪ از نمونه‌ها سبب مهار ACE شدند (۲۶) و حدود ۴۰٪ گیاهان فلور جزیرهٔ Reunion اثر مهارکنندگی بالایی روی ACE داشتند (۲۷). از میان گونه‌های مورد مصرف در طب سنتی چین، هند و شیلی ۲۲/۶٪ آن‌ها اثر مهارکنندگی ACE نشان دادند (۲۲) و نتایج غربال‌گری گیاهان سنتی زولو حاکی از فعال بودن ۶۵٪ از نمونه‌ها بود (۲۸).

با نگاهی کلی به نتایج مطالعه حاضر در می‌یابیم که حدود ۱۱ عصاره اتانولی و ۵ عصاره آبی بیش از ۵۰٪ اثر مهارکنندگی بر روی فعالیت ACE داشتند (جدول ۱) و در بین عصاره‌های آبی و اتانولی، ۷ عصاره بالای ۷۰ درصد و ۸ عصاره بین ۵۰ تا ۶۹ درصد فعالیت ACE را مهار کردند که این دو گروه بر اساس شاخص قراردادی در مهار فعالیت ACE مثبت فرض شدند. سه گیاه ختمی، روناس و گیلاس در میان نمونه‌های بررسی شده بیشترین درصد مهارکنندگی فعالیت ACE را نشان دادند که می‌توانند در مطالعات آتی به عنوان گیاهان برتر مهارکننده فعالیت ACE تحت عمل جداسازی اجزاء برای یافتن جزء فعال قرار گیرند. البته تفاوت در درصد مهارکنندگی نمونه‌های یکسان در غربال‌گری‌های دیگر گیاهی نیز تاکنون تجربه شده است (۲۴).

در مطالعه پیشین نویسندگان از میان نمونه گیاهان جمع‌آوری شده بیشترین تعداد در میان خانواده‌های Compositae، Rosaceae، Labiatae، Umbelliferae قرار داشتند که در این ۴ خانواده بیشترین تعداد نمونه‌های مهارکننده در تیرهٔ Rosaceae و کمترین آن‌ها در تیره Labiatae بود و بر اساس غربال‌گری انجام شده بیشترین اجزایی از گیاهان که خاصیت مهار فعالیت ACE را نشان دادند میوه، دانه و برگ گیاهان بودند (۴).

بعضی از غربال‌گری‌های گیاهی بیانگر تفاوت بسیار زیاد در تعداد عصاره‌های آبی و اتانولی فعال جهت مهار ACE بوده است (۲۷) که در این تحقیق نیز دیده می‌شود. با این حال ما تفاوت زیادی را در میزان مهار کنندگی بین عصاره‌های آبی و اتانولی یک نمونه خاص مشاهده کردیم (جدول ۱). به‌طوری که مشخص شد که عصاره‌های آبی و اتانولی هر نمونه وابستگی چشمگیری نسبت به یکدیگر ندارند (مهارکنندگان در بین ۱۱ عصاره الکلی و ۸ عصاره آبی و تنها ۳ مورد مشترک).

مقایسه گیاهان غربال‌گری شده در مهار فعالیت ACE در کشورهای دیگر نیز نشان می‌دهد که میزان مهارکنندگی در گونه‌های مختلف از یک جنس یکسان نمی‌باشد و در واقع مهار فعالیت ACE توسط یک گونه دلیل بر مهار آن توسط گونه‌ای دیگر از همان جنس نیست.

با مقایسه نتایج این پژوهش و مطالعه قبلی نویسندگان (۴)، مشخص شد که در ۱۲ مورد (حدود ۶۰٪) تقریباً شباهت کاملی بین مهار آنزیم سوماتیک و ژرمینال وجود دارد و از ۸ نمونه باقی مانده، در ۴ مورد مهار در آنزیم سوماتیک و در نیمی دیگر در آنزیم ژرمینال بیشتر بوده (جدول ۱) که احتیاج به مطالعه بیشتری دارد. می‌توان قسمتی از این تفاوت را به علت متفاوت بودن آنزیم

سوماتیک و ژرمینال دانست، و قسمتی هم به متفاوت بودن درصد مواد مؤثره در عصاره‌های یک گیاه که از منابع متفاوت جمع‌آوری می‌شوند مربوط است که خود باعث ۴۰٪ تفاوت در فعالیت بیولوژیک می‌گردد (۳).

از میان گیاهان مورد بررسی تنها به خواص ضد فشارخونی و مهارکنندگی ACE سیر در منابع اشاره شده‌است (۲۹،۳۰).

در آخر نباید فراموش کنیم که در غربال‌گری حاضر عصاره‌های خام گیاهی که اثر مهارکنندگی ضعیفی بر فعالیت ACE داشتند و یا حتی فعالیت ACE را مهارنمی‌کردند دلیلی بر عدم اثر ضد فشارخونی آن‌ها نیست بلکه ممکن است این گیاهان از طریق مکانیسم‌های دیگر غیر از مهار فعالیت ACE سبب کاهش فشارخون شوند و می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهنده فشارخون محسوب شوند.

سپاسگزاری

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که در تأمین بخشی از هزینه‌های این تحقیق در قالب طرح پژوهشی مشترک به شماره ۸۳/۲۹ همکاری نموده‌اند صمیمانه تشکر می‌شود.

Inhibitory Effects of Germinal Angiotensin Converting Enzyme by Medicinal Plants Used in Iranian Traditional Medicine as Antihypertensive

Ziai S.A, Pharm. D., Ph.D.[*1], Heidari M.R, Pharm. D., Ph.D.[2], Amin Gh. Ph.D.[3], Koochemeshki A. Pharm.D.[4], Heidari M[5].

1. Assistant professor of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Professor of Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical, Neuroscience and Physiology Research Centers, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Associate Professor of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Pharmacist, Faculty of Pharmacy, Tehran Azad University, Tehran, Iran
5. Researcher, High School Student, Kerman, Iran

* Corresponding author, e-mail: saziai@gmail.com

(Received 17 June 2008 Accepted 5 Nov. 2008)

Abstract

Background & Aim: Medicinal plants are used in traditional medicine for the treatment of different diseases such as hypertension. Since inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) is one of the involved mechanisms in control of hypertension, in this study the inhibitory effect of 20 medicinal plants on ACE was investigated.

Methods: The medicinal plants were collected, powdered, extracted, lyophilized and kept in -20º C. ACE activity was assayed with hyporyl L histidine L leusine (HHL) as substrate in the micro scale. The extracts that inhibited 50% of ACE activity in comparison to control were considered as probable ACE inhibitors.

Results: From 20 medicinal plants in this study, the highest ACE inhibitory effect (100%) was related to Alcea digitata (Boiss.) Alef., Rubia tinctorum L. and Cerasus avium (L.) Monech. Citrus aurantium L., Berberis integerrima Bge, Peganum harmala L. and Allium sativum L. also inhibited ACE activity equal or more than 70%.

Conclusion: Since the highest ACE inhibitory effect was observed for Alcea digitata (Boiss.) Alef., Rubia tinctorum L. and Cerasus avium (L.) Monech, this plants can be used in further studies for separation of their active components against ACE activity.

Keywords: Medicinal plants, ACE inhibitors, Hypertension

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(2): 134-143

References

1. Xiao PG. Ethnopharmacological investigation of Chinese medicinal plants. *Ciba Found Symp* 1994;185:169-73.
2. Jain SK. Ethnobotany and research on medicinal plants in India. *Ciba Found Symp* 1994;185: 153-64.
3. Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* 2002; 20(12): 522-31.
4. Ziai SA, Rezazadeh Sh, Dastpak A, Shabestari A, Taghizadeh M, Naghdibadi H, *et al.* Study of the ACE Inhibitory Effect of Medicinal Plants Used in Iranian Folk-Medicine as Antihypertensive Remedy. *Iranian Journal of Medicinal Plants* 2006; 5(20): 53-74 [Persian].
5. Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol* 2003; 4(8):225.

6. Kamata M, Hu J, Shibahara H, Nakagawa H. Assay of testicular angiotensin-converting enzyme activity in human spermatozoa. *Int J Androl* 2001; 24(4): 225-31.

7. Bull HG, Thornberry NA, Cordes EH. Purification of angiotensin-converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography. *J Biol Chem* 1985; 10: 260(5):2963-72.

8. Pantoliano MW, Holmquist B, Riordan JF. Affinity chromatographic purification of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry* 1984; 23(5): 1037-42.

9. Edwards CR, Padfield PL. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: past, present, and bright future. *Lancet* 1985; 5; 1(8419): 30-4.

10. Gavras H, Gavras I. Angiotensin converting enzyme inhibitors. Properties and side effects. *Hypertension* 1988; 11(3 Pt 2):1137-41.

11. Johnston CI. Angiotensin converting-enzyme inhibitors--the balance sheet. *Med J Aust* 1988; 148(10):488-9.

12. Cohen ML. Synthetic and fermentation-derived angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 307-23.

13. Unger T, Gohlke P, Gruber MG, Ganten D, Pj M. Pharmacology of anti-hypertensive therapeutics; handbook of experimental pharmacology. 1990.

14. Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE. Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 1993; 48(6): 1210-8.

15. Beldent V, Michaud A, Wei L, Chauvet MT, Corvol P. Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J Biol Chem* 1993; 268(35): 26428-34.

16. Corvol P, Williams TA, Soubrier F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol* 1995; 248: 283-305.

17. Craig CR, Stitzel RE. Modern pharmacology. Little, Brown; 1982.

18. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(4): 177-83.

19. Meng QC, King SJ, Branham KE, Delucas LJ, Lorber B, Oparil S. Preparative isolation of angiotensin-converting enzyme from human lung. *J Chromatogr* 1992; 579(1):63-71.

20. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196(4288):441-4.

21. Hayashi K, Nunami K, Sakai K, Ozaki Y, Kato J, Kinashi K, *et al.* Studies on angiotensin converting enzyme inhibitors. II. Syntheses and angiotensin converting enzyme inhibitory activities of carboxyethylcarbamoy l-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline - 3 - carboxylic acid derivatives. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 1983; 31(10): 3553-61.

22. Hansen K, Nyman U, Smitt UW, Adsersen A, Gudiksen L, Rajasekharan S, *et al. In vitro* screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). *J Ethnopharmacol* 1995; 48(1):43-51.

23. Li GH, Liu H, Shi YH, Le GW. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37(2): 219-24.

24. Nyman U, Joshi P, Madsen LB, Pedersen TB, Pinstrup M, Rajasekharan S, *et al.* Ethnomedical information and *in vitro* screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). *J Ethnopharmacol* 1998; 60(3): 247-63.

25. Somanadhan B, Varughese G, Palpu P, Sreedharan R, Gudiksen L, Smitt UW, *et al.* An ethnopharmacological survey for potential angiotensin converting enzyme inhibitors from Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1999; 65(2): 103-12.

26. Braga FC, Wagner H, Lombardi JA, de Oliveira AB. Screening Brazilian plant species for *in vitro* inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine* 2000; 6(6):447-52.

27. Adsersen A, Adsersen H. Plants from Reunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects--an experimental and ethnobotanical evaluation. *J Ethnopharmacol* 1997; 58(3): 189-206.

28. Duncan AC, Jager AK, van Staden J. Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *J Ethnopharmacol* 1999; 68(1-3): 63-70.

29. Hosseini M, Shafiee SM, Baluchnejadmojarad T. Garlic extract reduces serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity in nondiabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology* 2007; 14(2): 109-12.

30. Sendl A, Elbl G, Steinke B, Redl K, Breu W, Wagner H. Comparative pharmacological investigations of Allium ursinum and Allium sativum. *Planta Med* 1992; 58(1): 1-7.