ORIGINAL ARTICLE

Inhibitory Effect of Ferula persica, Ginkgo biloba, Nelumbo nucifera, and Dicyclomine on the Activity of Pancreatic Lipase

Mercede Mirkazem[1],
Mehdi Sahmani[2],
Ehsan Aali[3],
Majid Ghorbani Nohoohji[4],
Amir Javadi[5],
Koorosh Goodarzvand Chegini[6]

[1] MSc Student in Biochemistry, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[2] Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry and Genetics, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Plant and Agricultural Sciences, Medicinal Plants Research Center, Academic Center for Education, Culture, and Research, Karaj, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Community Medicine, Medical Microbiology Research Center, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[6] Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Received June 12, 2021 Accepted November 1, 2021)

Abstract

Background and purpose: Pancreatic lipase is a major digestive enzyme in digestion and absorption of fats. Inhibition of the pancreatic lipase activity has always been one of the goals of researchers to control obesity and related disorders. Current inhibitory agents have several side effects. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of *Ferula persica*, *Ginkgo biloba*, *Nelumbo nucifera*, and Dicyclomine on pancreatic lipase activity.

Materials and methods: In this experimental study, *Ferula persica*, *Ginkgo biloba*, and *Nelumbo nucifera* were extracted by soxhlet method. Methanolic or aqueous extracts of plants and dicyclomine at 10, 25, 50, 100, 200, and 400 µg/ml were prepared and their inhibitory effect on a fixed concentration of commercial pancreatic lipase were investigated. The combined extracts of *Ferula persica* and *Nelumbo nucifera* were also applied to the enzyme at the ratio of 1:3, 2:2, 3:1, and without quotas. Lipase activity was measured based on the release of methyl resorphine as colorimetric assay.

Results: Extracts of *Ferula persica* and *Nelumbo nucifera* alone or combined in a ratio of 1:2 at 50 µg/ml led to further decrease in pancreatic lipase activity compared to the unexposed enzyme. *Ginkgo biloba* and Dicyclomine did not show any considerable inhibitory effect at concentrations and ratios studied.

Conclusion: The extracts of *Ferula persica* and *Nelumbo nucifera*, alone or in combination, showed inhibitory effect on pancreatic lipase activity. Further studies, especially clinical trials are suggested to evaluate the efficacy and safety of these compounds.

Keywords: pancreatic lipase, *Ferula persica*, *Nelumbo nucifera*, *Ginkgo biloba*, Dicyclomine

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (203): 50-60 (Persian).

* **Corresponding Author: Koorosh Goodarzvand Chegini -** Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran (E-mail: kgvand@ymail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 203 آذر سال 1400 (60-50)

بررسی اثرات مهاری گیاهان Ferula persica، Ginkgo biloba، Nelumbo nucifera و داروی دی سیکلومین بر فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی

مرسده میرکاظم[1]
مهدی سهمانی[2]
احسان عالی[3]
مجید قربانی نهوجی[4]
امیرجوادی[5]
کوروش گودرزوند چگینی[6]

چکیده

سابقه و هدف: لیپاز پانکراسی از مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی در هضم و جذب چربی‌ها است و مهار فعالیت آن همواره از اهداف محققین جهت کنترل چاقی و اختلالات مربوطه بوده است. عوامل مهارکننده موجود دارای عوارض متعددی هستند. این مطالعه با هدف بررسی مهاری گیاهان *Ferula persica*، *Ginkgo biloba*، *Nelumbo nucifera* و داروی دی سیکلومین بر فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی انجام پذیرفت

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، گیاهان *Ferula persica*، *Ginkgo biloba* و *Nelumbo nucifera* تحت عصاره‌گیری به روش سوکسیله قرار گرفتند. عصاره‌های متانولی یا آبی گیاهان یا داروی دی سیکلومین در غلظت‌های 10، 25، 50، 100، 200، و 400 میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و بر غلظت ثابت لیپاز پانکراسی تجاری اثر داده شد. عصاره ترکیبی گیاهان *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* نیز به‌صورت سهم‌بندی در نسبت‌های 1:3، 2:2، 3:1 و بدون سهم‌بندی بر آنزیم اثر داده شد. اندازه‌گیری فعالیت لیپاز، براساس آزادسازی متیل رزورفین به‌صورت سنجش کالریمتری انجام پذیرفت.

یافته‌ها: عصاره گیاهان *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* هر یک به تنهایی و به‌صورت ترکیبی با نسبت یک به دو در غلظت 50 میکروگرم در میلی‌لیتر موجب کاهش بیش‌تری در فعالیت لیپاز پانکراسی در مقایسه با آنزیم مواجهه نیافته گردید. اما از گیاه *Ginkgo biloba* و داروی دی‌سیکلومین اثر مهاری قابل توجهی در غلظت‌ها و نسبت‌های مذکور مشاهده نگردید.

استنتاج: عصاره گیاهان *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* به‌صورت تک به تک و ترکیبی دارای اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی بودند. انجام کارآزمایی بالینی جهت بررسی اثربخشی و ایمنی این ترکیبات پیشنهاد می‌گردد.

واژه های کلیدی: لیپاز پانکراسی، *Ferula persica*، *Nelumbo nucifera*، *Ginkgo biloba*، Dicyclomine

مقدمه

چاقی و بیماری‌هایی که از آن ناشی می‌شود مثل اختلالات قلبی عروقی، افزایش فشارخون، دیابت، اختلالات تنفسی در خواب و برخی سرطان‌ها از مشکلات بزرگ جامعه پزشکی است. مرض چاقی با افزایش شیوع

مولف مسئول: کوروش گودرزوند چگینی - یزد: دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پزشکی E-mail: kgvand@ymail.com
1.دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی شهید بابایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
2. دانشیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی شهید بابایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
3. استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی شهید بابایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
4. استادیار، گروه علوم کشاورزی و گیاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
5. استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی شهید بابایی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
6. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
تاریخ دریافت : 1400/3/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1400/4/29 تاریخ تصویب :1400/8/10

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

در بزرگسالان و کودکان بـه عنـوان یکـی از علـل قابـل پیشگیری مرگ و میر در سرتاسر جهان شناخته می‌شود. راهکارهای مختلفی برای مقابله با چـاقی بـه‌کـار گرفتـه شده است. در بسیاری از مطالعاتی که با رویکرد کنتـرل چاقی با استفاده از منابع گیاهی و طبیعی انجام شده است این منابع از لحاظ دارا بودن خاصیت ضـد لیپـازی مـورد ارزیابی قرار گرفته اند. بخـش عمـده فرآینـد هیـدرولیز چربی‌ها مربوط به لیپاز پانکراسی است که از آسینوس‌هـای بخـش بـرون‌ریـز پـانکراس بـه درون دوازدهـه ترشـح می‌شود(1). داروهای محـدودی بـرای مهـار آنـزیم لیپـاز تایید شـده‌انـد. اورلیسـتات و سـیبوترامین از جملـه ایـن داروهـا هسـتند. بـا ایـن وجـود اورلیسـتات بـا عـوارض متعددی ازجمله نفخ شکمی، کرامپ‌های شکمی، مدفوع آبکی، بی‌اختیاری مدفوع و مدفوع چرب همـراه بـوده و نگرانی‌ها با افزایش اثر منفی آن بر کلیـه، افـزایش پیـدا کرده است(3،2). داروی سیبوترامین نیز به دلیـل افـزایش خطرات قلبی عروقی و سکته های مغزی مصـرف آن در بسـیاری از کشـورها منـع شـده اسـت(4). داروی دی سیکلومین به‌عنوان یک داروی آنتی‌کولینرژیک است و در تسکین اسپاسم عضله صاف دستگاه گوارش کـاربرد دارد. اخیرا اثر مهارکنندگی این دارو بر لیپـاز میکروبـی گزارش شده و نشان داده شده اسـت کـه دی‌سـیکلومین با میل ترکیبی بالایی به آنزیم لیپاز سودوموناس آئروژینـوزا اتصال یافته و به طور رقابتی آنزیم را مهار می‌نماید(4). با این حال اثر این دارو بـر لیپـاز پانکراسـی مـورد بررسـی قرار نگرفته است.

گیاهان بسیاری معرفی شده‌اند که بخش‌هـای مختلـف آن‌ها دارای خاصیت مهارکنندگی لیپاز پانکراسی بوده و در مقالات مختلف مرور شده است(3، 14-5). از میان این گیاهان می تـوان بـه اثـر مهارکننـدگی عصـاره گیاهـان *Ferula Gummosa*، *Ferula asafetida* و *Ferula oopoda* از خانواده *Apiaceae* بر لیپاز پانکراسی اشاره نمـود کـه به‌وجود ترکیباتی از گروه ترپن‌ها در عصاره این گیاهان نسبت داده شـده اسـت(17-15). عـلاوه بـر ایـن، عصـاره برگ *Ginkgo biloba* از خانواده *Ginkgoaceae*، نیز به عنوان مهارکننده لیپاز پانکراسی معرفـی شـده اسـت. در عصـاره بـرگ ایـن گیـاه ترکیبـات biflavone از جملـه isoginkgetin، bilobetin، ginkgetin و sciadopitysin و ترکیبـات Trilactone terpenes، Ginkgolides A,B و bilobalide جداسـازی و شناسـایی شـده اسـت(20-18). اثـر مهـاری عصـاره متـانولی و آبـی *Nelumbo nucifera* از خانواده *Nelumbonaceae*، بر لیپاز پانکراسی، آلفـا آمـیلاز و آلفا گلوکوزیداز نیز گزارش شده است(24-21).

در حال حاضر عوامل بسیاری که مبتنی بر مکمل‌هـای غذایی هستند برای مقابله با چاقی معرفی شده‌اند بـا ایـن حال به‌طور قاطع ایمنی و موثر بودن هیچ کـدام از آن‌هـا ثابت نشـده اسـت. بـا عنایـت بـه اهمیـت عملکـرد لیپـاز پانکراسـی و نقـش گیاهـان خـانواده *Ginkgoaceae*، *Apiaceae* و *Nelumbonaceae* که در بالا به مواردی از آن‌ها اشاره گردید این مطالعه با هدف بررسی گیاهانی از این خانواده‌ها شامل *Ferula persica*، *Ginkgo biloba* و *Nelumbo nucifera* کـه در ایـران موجـود و قابـل دسترس هستند برای دستیابی به فرآورده‌ای با اثر مهاری بر لیپاز پانکراسی انجام پـذیرفت.علاوه بـر ایـن، داروی دی‌سیکلومین نیـز از لحـاظ توانـایی مهـار فعالیـت لیپـاز پانکراسی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی، با شناسـه IR.QUMS.REC.1397.242 در کمیتـه اخـلاق در پـژوهش دانشـگاه علـوم پزشـکی قزوین به تصویب رسیده است.

مواد و گیاهان مورد مطالعه

گیاهـان *Ferula persica*، اوایـل تابسـتان و از ارتفاعات اسـتان مازنـدران، *Nelumbo nucifera* اوایـل تابستان و از مرداب بندرانزلی و *Ginkgo biloba*، اواخر بهار از مزرعه گیاهان دارویی کرج جمع‌آوری گردید و توسـط پژوهشـکده گیاهـان دارویـی جهـاد دانشـگاهی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

واحدکرج مورد شناسایی قرار گرفت و ثبت گردید. مشخصات گیاهان مذکور در جدول شماره 1 ارایه شده است. عصاره‌گیری به روش سوکسیله از گیاهان در آزمایشگاه‌های دانشکده بهداشت و گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. داروی دی‌سیکلومین نیز به‌صورت پودر خالص از شرکت داروسازی خوارزمی تهیه شد و در غلظت‌های 10، 25، 50، 100، 200، و 400 میکروگرم در میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه و بر غلظت ثابت 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیپاز پانکراسی تجاری اثر داده شد. لیپاز پانکراسی به صورت تجاری از شرکت سیگما خریداری شد. کیت اندازه‌گیری فعالیت لیپاز و کالیبراتور مربوطه از شرکت پارس آزمون خریداری گردید.

جدول شماره 1: مشخصات گیاهان مورد مطالعه

نام علمی گیاه	خانواده گیاهی	مختصات جمع آوری	شماره هرباریومی
Ferula persica Willd.	Apaiaceae	N: 36°06'86" E: 51°16'60"	IMPH-4503
Ginkgo biloba L.	Ginkgoaceae	N: 35°54'12" E: 50°53'14	IMPH-7119
Nelumbo nucifera Gaertn.	Nelumbonaceae	N: 37°09'13" E: 49°39'09"	IMPH-7120

عصاره گیری

شاخه‌های هوایی یا ریشه گیاه پس از جمع‌آوری در سایه و دمای محیط خشک شده سپس برگ و ساقه و گل آن جدا و بخش‌های مدنظر آسیاب گردید و پودری همگن تهیه شد. جهت تهیه عصاره الکلی، مقداری از پودر گیاه وزن شده، با کاغذ صافی بسته‌بندی گردیده و درون محفظه شیشه‌ای دستگاه سوکسیله قرار گرفت. داخل بالن متانول 90 درصد ریخته، جریان آب بر قرار شد و دمای هیتر افزایش داده شد تا متانول به نقطه جوش برسد. در پایان محلول موجود در بالن در چندین پلیت ریخته شد و زیر هود که از قبل با اشعه UV استریل شده بود چند روز نگه داشته شد تا خشک شوند. جهت تهیه عصاره آبی، مقداری از پودر گیاه وزن شده و داخل بشر حاوی آب مقطر به میزان متناسب با وزن گیاه ریخته شد و به مدت 20 دقیقه روی حرارت قرار داد شد تا بجوشد. بعد از سرد شدن محلول داخل قیف با کاغذ صافی ریخته شد. در پایان بعد از عبور کامل از کاغذ صافی محلول داخل چندین پلیت ریخته شده و زیر هود که از قبل با اشعه UV استریل شده بود چند روز نگهداری شد تا خشک شوند. سپس با تراشیدن عصاره‌ها از کف پلیت پودر خشک شده‌ای از هرکدام حاصل شد. برای تهیه محلول استوک از هر کدام از عصاره‌های گیاهی، 0/5 گرم از پودر خشک گیاه مربوطه در 50 میلی‌لیتر از حلال حل شده و از کاغذ صافی عبور داده شد.

عصاره آبی خام برگ گیاه *Ginkgo biloba*، عصاره الکلی خام ریشه گیاه *Ferula persica*، و عصاره الکلی خام برگ گیاه *Nelumbo nucifera* در ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. عصاره گیاه *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* در حلال متانول به حجم رسانده شد. غلظت‌های مختلف ازعصاره‌ها شامل 400، 200، 100، 50، 25 و 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر بر غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم اثر داده شد. اثر ترکیبی دو گیاه *Ferulapersica* و *Nelumbo nucifera* در غلظت‌های 25 و 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز به‌صورت سهم‌بندی شده در نسبت‌های 2:2، 3:1 و 1:3 بر غلظت 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آنزیم اثر داده شد.

اندازه‌گیری فعالیت لیپاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم براساس سنجش میزان آزادسازی متیل رزورفین از سوبسترای کروموژن استر 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid (6-methylresorufin) امولسیون شده با اسیدهای صفراوی در واکنش لیپاز استوار است که براساس دستورالعمل موجود در کیت به روش کالریمتری صورت می‌گیرد. به‌طور خلاصه، در مخلوط واکنشی 20 میکرولیتر از محلول لیپاز یا کالیبراتور به محلول Goods buffer با pH = 8 اضافه شد و با حجم مناسبی از غلظت‌های مختلف عصاره یا دارو مخلوط گردید. پس از مخلوط نمودن به مدت 5 دقیقه در دمای □ 37 انکوبه شد و سپس 250 میکرولیتر محلول سوبسترا اضافه گردید. پس

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

از مخلوط نمودن، جذب نوری پس از دو دقیقه انکوباسیون در 37 در طول موج 580 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. بعد از یک و دو دقیقه نیز جذب نوری قرائت گردید. سپس مقدار اختلافات جذب نوری پس از دقایق اول و دوم با هم جمع شده، بر عدد دو تقسیم گردید و میانگین تغییرات جذب نوری (δA) برای هر یک از نمونه‌ها، کالیبراتور و بلانک محاسبه گردید. محلول بلانک حاوی تمام مواد و معرف‌های مورد استفاده در سنجش نمونه‌ها منهای آنزیم لیپاز بوده است. از کالیبراتور (Cal) کیت تجاری اندازه‌گیری لیپاز مذکور برای محاسبه فعالیت لیپاز در فرمول شماره 1 استفاده گردید. فعالیت کالیبراتور به صورت واحد در لیتر (U/l) در فرمول شماره 1 مورد استفاده قرار گرفت.

فرمول شماره 1 :

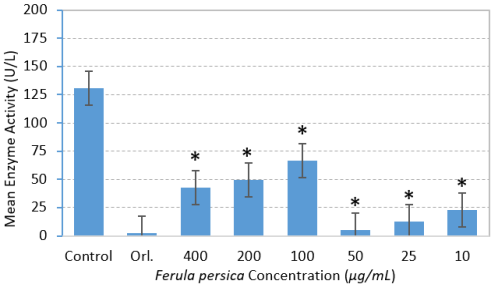
$$Lipase\ (U/l) = \frac{\delta A\ Sample}{\delta A\ Cal} \times Cal\ concentration(U/l)$$

از ارلیستات با غلظت‌های 10 و 25 و 50 و 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال DMSO به‌عنوان مهارکننده کنترل مثبت و برای مقایسه اثر مهاری عصاره‌های گیاهی استفاده گردید. نمونه فاقد عصاره یا داروی مورد مطالعه در شرایط مشابه به عنوان کنترل با فعالیت 100 درصد آنزیم در نظر گرفته شد. اثر مهارکنندگی عصاره یا داروی مورد مطالعه به صورت باقی مانده فعالیت محاسبه و گزارش گردید. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست‌های Unpaired T-test و ANOVA صورت گرفت. سطح معنی‌داری به‌صورت $P< 0/05$ در نظر گرفته شد. داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل سه اندازه‌گیری گزارش گردید.

یافته ها

در این مطالعه،آنزیم لیپاز پانکراسی تجاری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه *Ginkgo biloba* و عصاره متانولی گیاهان *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* و نسبت‌های ترکیبی عصاره گیاهان *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera*، و همچنین در معرض داروی دی سیکلومین قرار گرفت و از نظر اثر مهارکنندگی این عوامل مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی‌های صورت گرفته نشان داد که فعالیت لیپاز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ارلیستات نسبت به آنزیم مواجهه نیافته کاهش یافته است. در بین غلظت‌های مورد بررسی غلظت 100 میلی‌گرم در میلی‌لیتر با مهار 98 درصدی باعث کاهش بیش‌تری در فعالیت آنزیم گردید. بنابراین در ادامه از این غلظت برای ارزیابی مهار آنزیم استفاده گردید. با توجه به نتایج به ست آمده از تحلیل داده‌ها، میزان فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی مواجهه یافته با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Ferula persica* نسبت به آنزیم مواجهه نیافته کاهش یافته است که این کاهش معنی‌دار بوده است($P< 0/001$). از میان غلظت‌های مختلف مورد مطالعه از عصاره مذکور غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور میانگین موجب کاهش بیش‌تری در فعالیت آنزیم گردید (نمودار شماره 1).

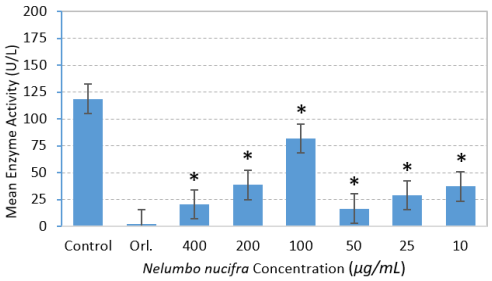


نمودار شماره 1: اثر مهاری عصاره گیاه *Ferula persica* بر آنزیم لیپاز پانکراسی، ستون ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم برحسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهاری بر فعالیت آنزیم با ارلیستات (کنترل مثبت)، متوسط اثر مهاری عصاره گیاه با غلظت های 400، 200، 100، 50، 25 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر را نشان می دهد.
* : مقدار ارزش احتمالی ($P< 0/001$) است.

میزان فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی قرار گرفته تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه

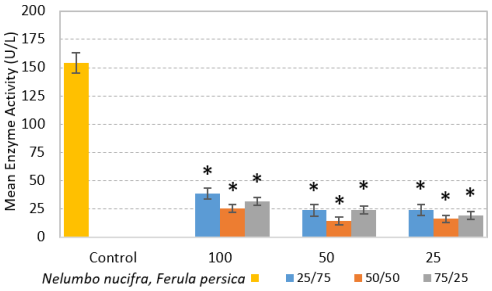
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

Nelumbo nucifera نسبت به نمونه آنزیمی که در معرض عصاره این گیاه قرار نگرفته است کاهش یافته است و این کاهش معنی‌دار است (P<0/006). در بین تمامی غلظت‌های مورد بررسی از عصاره مذکور غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور میانگین باعث کاهش بیش‌تری در فعالیت آنزیم گردید (نمودار شماره2).



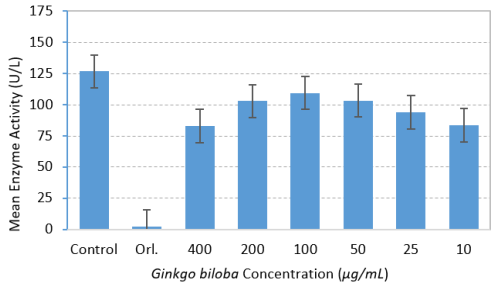
نمودار شماره 2: اثر مهاری عصاره گیاه *Nelumbo nucifera* بر آنزیم لیپاز پانکراسی، ستون ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم بر حسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهاری بر فعالیت آنزیم با ارلیستات (کنترل مثبت)، متوسط اثر مهاری عصاره گیاه با غلظت های 400، 200، 100، 50، 25 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر را نشان می دهد.
* : مقدار ارزش احتمالی (P< 0/006) است.

در این مطالعه اثر ترکیبی عصاره دو گیاه *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* در غلظت‌های 25، 50، و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌صورت سهم‌بندی در نسبت‌های 1:3، 2:2، 3:1 و بدون سهمیه و تقسیم‌بندی مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی که تحت تاثیر ترکیب دو عصاره گیاهان *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* به نسبت‌های مختلف قرار گرفته بود نسبت به نمونه آنزیمی مواجهه نیافته کاهش نشان داد و این کاهش معنی‌دار بود (P<0/01). از میان داده‌های به دست آمده غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر با نسبت برابر به‌طور میانگین باعث کاهش بیش‌تری در فعالیت آنزیم گردید (نمودار شماره3). همچنین میزان فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی که تحت تاثیر ترکیب دو عصاره گیاهان *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* بدون اختصاص سهم قرار گرفته بود نسبت به آنزیم مواجهه نیافته کاهش نشان داد و این کاهش معنی‌دار بود (P<0/006). در بین نتایج به‌دست آمده از ارزیابی غلظت‌های مختلف، غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش بیش‌تری در فعالیت آنزیم گردید.



نمودار شماره 3: اثر مهاری ترکیب دو عصاره گیاه *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* بر آنزیم لیپاز پانکراسی به نسبت های 1:3، 2:2، 3:1، ستون ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم برحسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، متوسط اثر مهاری ترکیب دو *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* به ترتیب به نسبت 1:3، 2:2، 3:1 میکروگرم بر میلی لیتر را نشان می دهد.
* : مقدار ارزش احتمالی (P< 0/002) است.

در ارزیابی اثر عصاره گیاه *Ginkgo biloba* بر لیپاز پانکراسی مشخص شد که عصاره فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد (P< 0/05). با این حال، این کاهش در اغلب غلظت‌ها چشمگیر نبود و تفاوت زیادی با فعالیت آنزیم مواجهه نیافته نداشت (نمودار شماره 4).

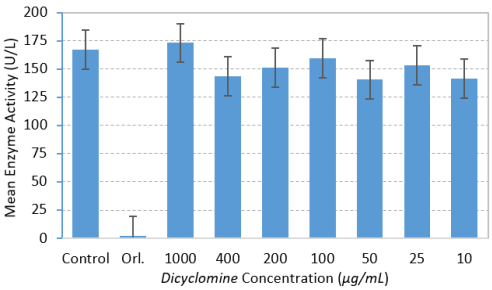


نمودار شماره 4: ارزیابی اثر مهاری عصاره گیاه *Ginkgo bilob* بر فعالیت لیپاز پانکراسی، ستون ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم برحسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهاری بر فعالیت آنزیم با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

ارلیستات (کنترل مثبت)، متوسط اثر مهاری عصاره گیاه با غلظت های 400، 200، 100، 50، 25 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر را نشان می دهد.

در ارزیابی اثر داروی دی سیکلومین بر فعالیت لیپاز پانکراسی، در اغلب غلظت‌ها تفاوت بارز و معنی‌داری مشاهده نگردید (نمودار شماره 5).



نمودار شماره 5: ارزیابی اثر مهاری دی سیکلومین بر فعالیت لیپاز پانکراسی، ستون ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم برحسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهاری بر فعالیت آنزیم با ارلیستات (کنترل مثبت) ومتوسط اثر مهاری دارو با غلظت های1000، 400، 200، 100، 50، 25 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر را نشان می دهد.

بحث

تحقیقات بسیاری در جهت مهار آنزیم‌های گوارشی برای جلوگیری از جذب مواد غذایی انجام شده است. یکی از آنزیم‌های موثر در هضم و جذب مواد غذایی لیپاز پانکراسی است که با توجه به عوارض جانبی برخی از داروهای شیمیایی مهارکننده این آنزیم، مطالعات بسیاری در جهت ترویج مصرف داروهای گیاهی به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی انجام شده است. در این مطالعه از لیپاز پانکراسی خوک جهت بررسی اثر مهاری عصاره‌ها و دارو استفاده گردید. این لیپاز همولوژی بالایی با لیپاز پانکراسی انسانی دارد و خصوصیات کینتیکی آن مشابه است(21). همچنین در این مطالعه فعالیت باقی مانده آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های مورد مطالعه و دارو تعیین شد و با فعالیت آنزیم در عدم حضور عصاره یا دارو مقایسه گردید. در مطالعه Kumar و همکاران در سال 2013، به اثر مهاری عصاره گیاه *Ferula asafetida* از خانواده *Apiaceae* بر آنزیم لیپاز پانکراسی اشاره شد(16). در این مطالعه از میان عصاره‌های هگزان نرمال، دی کلرومتان، اتیل استات، و متانل، عصاره اتیل استات رزین *Ferrula asaefoetida* باعث کاهش حدود 72 درصدی در فعالیت لیپاز پانکراسی شده است که در غلظت 250 میکروگرم در میلی لیتر به دست آمده است. در مطالعات دیگر اثر مهارکنندگی عصاره گیاهان *Ferula Gummosa* و *Ferula oopoda* بر لیپاز پانکراسی نشان داده شد و به ترکیباتی از گروه ترپن‌ها نسبت داده شده است(17،15). از ترکیبات فعال بیولوژیک دیگری که از آنالیز عصاره‌های گیاه جنس *Ferula*، به دست آمده است می‌توان به مشتقات سسکی‌ترپن (sesquiterpene) و ترکیبات حاوی سولفور اشاره نمود(28-25).

عصاره برگ گیاه *Nelumbo nucifera* برای درمان چاقی در چین مورد استفاده قرار گرفته است(28). Velusami و همکاران در مقاله‌ای در سال 2013 به اثر مهاری عصاره متانولی و آبی *Nelumba Nucifera* بر لیپاز پانکراسی در IC_{50}، 47 میکروگرم بر میلی‌لیتر پی بردند(22).

Ratna Kumar و همکاران نیز طی مطالعات خود به اثر مهاری فوق العاده ای اشاره کرده اند که *Nelumbo nucifera* داشته است و همسو با نتایج این مطالعه است(21).

در مطالعه Ono و همکاران، اثر مهارکنندگی عصاره اتانلی برگ *Nelumbo nucifera* بر فعالیت لیپاز در IC_{50} 0/46 میلی گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است(23). در این مطالعه هنگامی که ترکیبات فنلی از عصاره حذف شدند اثر مهاری عصاره بر فعالیت لیپاز از بین رفته است. بر این اساس اثر مهارکنندگی به ترکیبات فنلی موجود در عصاره نسبت داده شده است. البته در این مطالعه فعالیت لیپاز با استفاده از کیت اندازه‌گیری شد و به جزئیات متد اندازه‌گیری اشاره نگردید. در این مطالعه همچنین اثر مهارکنندگی عصاره فوق بر لیپاز پانکراسی در مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گرفته

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

است. در این مدل عصاره به‌صورت خوراکی به رت (rat) داده شد و سپس تری‌گلیسرید در خون اندازه‌گیری، و نشان داده شد که مصرف خوراکی عصاره فوق باعث کاهش تری‌گلیسرید پلاسما می شود.

مهار آنزیم های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز توسط عصاره *Nelumbo nucifera* نیز گزارش گردید که به ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی موجود در برگ این گیاه نسبت داده شد(21).

در مطالعه Bustanji و همکاران به اثرات مهاری آنزیم لیپاز در عصاره متانولی گیاه *Ginkgo biloba* و فواید دیگر آن اشاره گردید. همچنین در این مطالعه اشاره شد که متانول به دلیل قطبیت بیش‌تری که نسبت به آب دارد باعث خروج ترکیبات بیش‌تری می‌شود، از جمله ترپن تری لاکتون که اثر مهاری آن بر آنزیم لیپاز پانکراسی گزارش شده است(30). Adisakwattana و همکاران نیز در مطالعه‌ای به اثر مهاری عصاره آبی *Ginkgo biloba* بر آنزیم لیپاز پانکراسی اشاره کردند(18). اثر مهاری عصاره برگ *Ginkgo biloba* بر فعالیت لیپاز پانکراسی در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است. عصاره برگ این گیاه حاوی ترکیبات فعال بسیاری از جمله ترپن تری لاکتون‌ها، بای فلاونوئیدها، و گلیکوزیدهای فلاوانول است(29،30). همچنین نشان داده شده است که ترپن تری لاکتون‌ها شامل ginkgolides و bilobalide، دارای اثر مهاری متوسطی بر فعالیت لیپاز پانکراسی هستند که با مقادیر IC_{50} در محدوده 23 تا 60 میکروگرم در میلی‌لیتر صورت می‌گیرد(29). اثر مهاری بای فلاونوئیدها (biflavonoids) شامل isoginkgetin، bilobetin، ginkgetin، sciadopitysin بر فعالیت لیپاز پانکراسی نشان داده شده است که دارای اثر مهاری قوی تا متوسط بوده است. همچنین نشان داده شده است که محتوی بای فلاونوئیدها در برگ *Ginkgo biloba* در نواحی جغرافیایی مختلف از 4072 تا 8641 میکروگرم در گرم متفاوت است و این در حالی است که بای فلاونوئیدها از ترکیبات اصلی موجود در برگ این گیاه هستند. محتوی بای فلاونوئیدهای موجود در عصاره برگ *Ginkgo biloba* به مراتب بیش از محتوی ترپن تری لاکتون عنوان شده است و اثر مهاری عصاره برگ این گیاه بیش‌تر به اجزای بای فلاونوئیدی آن نسبت داده شده است(19). با این حال در مطالعه حاضر مواجهه آنزیم با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Ginkgo biloba* کاهش فعالیت قابل ملاحظه ای را نشان نداد و حداکثر مهار آنزیمی در غلظت 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. موارد فوق می تواند حداقل بخشی از دلایل عدم انطباق نتایج به دست آمده در این مطالعه با مطالعات دیگر در ارتباط با *Ginkgo biloba* باشد. علاوه بر این، نوع عصاره هم در حصول میزان اثر مهارکنندگی تاثیر گذار است. به عنوان مثال در مطالعه Kumar و همکاران که به بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌های n-هگزان، دی‌کلرومتان، اتیل استات و متانلی 33 گیاه مختلف بر لیپاز پانکراسی پرداخته است، نشان داده شد که درصد مهارکنندگی عصاره‌های مختلف یک گیاه متفاوت است(16). در مطالعه حاضر عصاره خام گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت اما در برخی مطالعات عصاره های گیاهی مراحل متفاوت و مختلفی از استخراج و پالایش را طی نمودند که می‌توان به استخراج با حلال‌های مختلف و با نسبت‌های مختلف و همچنین استفاده از روش‌های مختلف کرماتوگرافی شامل TLC و HPLC اشاره کرد. بنابراین می‌توان انتظار داشت، نوع ترکیب یا ترکیباتی که در فرآورده نهایی تغلیظ شده است بر میزان اثر مهارکنندگی تاثیر گذار بوده باشد.

مطالعات انجام شده در ارتباط با اثر داروی دی‌سیکلومین بر فعالیت لیپاز محدود است. در مطالعات انجام شده توسط طالبی و همکاران، اثر مهارکنندگی داروی دی سیکلومین بر لیپاز باکتریایی و توقف رشد باکتری گزارش شده است(4). بر این اساس در این مطالعه اثر داروی دی‌سیکلومین بر فعالیت لیپاز پانکراسی مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی صورت گرفته نشان داده شد که آنزیم مواجهه یافته با داروی دی‌سیکلومین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

نسبت به آنزیم مواجهه نیافته در اغلب غلظت‌ها تفاوت خاص و مشهودی در فعالیت اندازه‌گیری شده ندارد.

براساس یافته‌های موجود در مطالعه حاضر می‌توان گفت، اگرچه *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* هر یک به تنهایی اثرات مفیدی بر مهار آنزیم لیپاز پانکراسی داشت اما ترکیب این دو عصاره با یکدیگر نیز توانست نتایج مثبت و قابل توجهی نشان دهد. در این مطالعه رابطه ای وابسته به دوز بین غلظت عصاره و اثر مهارکنندگی آن به دست نیامد (نمودار شماره 1 و 2). این یافته در حقیقت از محدودیت‌های این مطالعه است. در صورتی که مراحلی از استخراج و پالایش بر روی عصاره‌ها صورت بگیرد ممکن است فرآورده ای حاصل شود که مواد موثره آن اثر معنی‌داری را ایجاد نماید. در این مطالعه از روش رنگ سنجی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده گردید، پیشنهاد می‌شود اثر عصاره‌ها بر فعالیت لیپاز با استفاده از روش‌های دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد. اثر عصاره‌ها بر ساختار آنزیم و چگونگی مهار و ماده موثره موجود در عصاره‌های مورد بررسی نیز از مواردی هستند که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفتند. همچنین پیشنهاد می‌گردد مطالعات حیوانی جهت بررسی اثر بخشی و ایمنی کاربرد عصاره گیاهان مذکور انجام گیرد.

References

1. Little TJ, Horowitz M, Feinle-Bisset C. Role of cholecystokinin in appetite control and body weight regulation. Obes Rev 2005; 6(4): 297-306.
2. Hollander PA, Elbein SC, Hirsch IB, Kelley D, McGill J, Taylor T, et al. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes: A 1-year randomized double-blind study. Diabetes Care 1998; 21(8): 1288-1294.
3. Seyedan A, Alshawsh MA, Alshagga MA, Koosha S, Mohamed Z. Medicinal Plants and Their Inhibitory Activities against Pancreatic Lipase: A Review. Evid Based Complement Alternat Med 2015; 2015: 973143.
4. Talebi M, Minaei Tehrani D, Fazilati M, Tehrani AM. The Study of Inhibition of Lipase Activity in Pseudomonas aeroginosa. J Arak Uni Med Sci (AMUJ) 2017; 20(9): 57-64 (Persian).
5. Birari R, Roy SK, Singh A, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitory alkaloids of Murraya koenigii leaves. Natural Product Communications 2009; 4(8): 1089-1092.
6. Buchholz T, Melzig MF. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. Planta Med 2015; 81(10): 771-783.
7. Dechakhamphu A, Wongchum N. Screening for anti-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2015; 5(12): 1042-1045.
8. Garza AL de la, Milagro-Yoldi FI, Boque N, Campión-Zabalza J, Martinez JA. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. Planta Med 2011; 77(8): 773-785.
9. Lunagariya NA, Patel NK, Jagtap SC, Bhutani KK. Inhibitors of pancreatic lipase: State of the art and clinical perspectives. EXCLI J 2014; 13: 897-921.
10. Ado MA, Abas F, Mohammed AS, Ghazali HM. Anti- and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. Molecules 2013; 18(12): 14651-14669.
11. Yoshikawa M, Sugimoto S, Kato Y, Nakamura S, Wang T, Yamashita C, et al. Acylated oleanane-type triterpene saponins with acceleration of gastrointestinal transit and

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

inhibitory effect on pancreatic lipase from flower buds of Chinese tea plant (Camellia sinensis). Chem Biodivers 2009; 6(6): 903-915.

12. Ong SL, Paneerchelvan S, Lai HY, Rao NK. In vitro lipase inhibitory effect of thirty two selected plants in Malaysia. Asian J Pharm Clin Res 2014; 7(SUPPL. 2): 19-24.
13. Kim YS, Lee Y, Kim J, Sohn E, Kim CS, Lee YM, et al. Inhibitory activities of cudrania tricuspidata leaves on pancreatic lipase in vitro and lipolysis in vivo. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2012; 2012: 878365.
14. Kaewpiboon C, Lirdprapamongkol K, Srisomsap C, Winayanuwattikun P, Yongvanich T, Puwaprisirisan P, et al. Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. BMC Complement Altern Med 2012; 12(1): 217.
15. Mandegary A, Sayyah M, Reza Heidari M. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the seed and root extracts of Ferula gummosa Boiss in mice and rats. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2004; 12(2): 58-62.
16. Kumar D, Karmase A, Jagtap S, Shekhar R, Bhutani KK. Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of Cassiamin A, a Bianthraquinone from Cassia siamea. Natural Product Communications 2013; 8(2): 195-198.
17. Mhatre SV, Bhagit AA, Yadav RP. Pancreatic Lipase Inhibitor from Food Plant: Potential Molecule for Development of Safe Anti-obesity Drug. MGM Journal of Medical Sciences 2016; 3(1): 34-41.
18. Adisakwattana S, Intrawangso J, Hemrid A, Chanathong B, Mäkynen K. Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. Food Technology and Biotechnology 2012; 50(1): 11-16.
19. Liu PK, Weng ZM, Ge GB, Li HL, Ding L le, Dai ZR, et al. Biflavones from Ginkgo biloba as novel pancreatic lipase inhibitors: Inhibition potentials and mechanism. Int J Biol Macromol 2018; 118(Pt B): 2216-2223.
20. Singh G, Suresh S, Bayineni VK, Kadeppagari RK. Lipase inhibitors from plants and their medical applications. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2015; 7(Supple 1): 1-5.
21. Ratnakumar PK, Shaik KB. Evaluation of Anti-Obesity Properties of Few South Indian Medicinal Plants by Using Pancreatic Lipase Assay. International Journal of Chemical and Life Sciences 2019; 3(5): 1327-30.
22. Velusami CC, Agarwal A, Mookambeswaran V. Effect of nelumbo nucifera petal extracts on lipase, adipogenesis, adipolysis, and central receptors of obesity. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 145925.
23. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of Nelumbo nucifera leaves extract in mice and rats. J Ethnopharmacol 2006; 106(2): 238-244.
24. Siegień J, Buchholz T, Popowski D, Granica S, Osińska E, Melzig MF, et al. Pancreatic lipase and α-amylase inhibitory activity of extracts from selected plant materials after gastrointestinal digestion in vitro. Food Chem 2021; 355: 129414.
25. Kogure K, Yamauchi I, Tokumura A, Kondou K, Tanaka N, Takaishi Y, et al. Novel antioxidants isolated from plants of the genera Ferula, Inula, Prangos and Rheum collected in Uzbekistan. Phytomedicine 2004; 11(7-8): 645-651.
26. Iranshahi M, Kalategi F, Rezaee R, Shahverdi AR, Ito C, Furukawa H, et al. Cancer chemopreventive activity of terpenoid coumarins from Ferula species. Planta Med

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]

2008; 74(02): 147-150.

27. Motai T, Daikonya A, Kitanaka S. Sesquiterpene Coumarins from Ferula fukanensis and Nitric Oxide Production Inhibitory Effects. J Nat Prod 2004; 67(3): 432-436.
28. Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. Drug discovery today 2007; 12(19-20): 879-889.
29. Bustanji Y, Al-Masri IM, Mohammad M, Hudaib M, Tawaha K, Tarazi H, et al. Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of Ginkgo biloba. J Enzyme Inhib Med Chem 2011; 26(4): 453-459.
30. Eckert A. Mitochondrial effects of Ginkgo biloba extract. Int Psychogeriatrics 2012; 24(S1): S18-20.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-07]