

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

Mercede Mirkazem¹,
Mehdi Sahmani²,
Ehsan Aali³,
Majid Ghorbani Nohooji⁴,
Amir Javadi⁵,
Koorosh Goodarzvand Chegini⁶

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 resorphone 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)

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

مرسده میرکاظم¹مهدی سهمانی²احسان عالی³مجید قربانی نهوجی⁴امیرجوادی⁵کوروش گودرزوند چگینی⁶

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 *Ginkgo biloba*، *Ferula persica*، *Nelumbo nucifera* و داروی دی سیکلومین بر فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، گیاهان *Ginkgo biloba*، *Ferula persica* 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 به صورت سهم‌بندی در نسبت‌های 1:3، 2:2، 3:1 و بدون سهم‌بندی بر آنزیم اثر داده شد. اندازه‌گیری فعالیت لیپاز، براساس آزادسازی متیل رزورفین به صورت سنجش کالریمتری انجام پذیرفت. **یافته‌ها:** عصاره گیاهان *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* هر یک به تنهایی و به صورت 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 دی سیکلومین اثر مهاری قابل توجهی در غلظت‌ها و نسبت‌های مذکور مشاهده نگردید.

استنتاج: عصاره گیاهان *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* به صورت 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.

واژه‌های 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

E-mail: kgvand@ymail.com

مؤلف مسئول: کوروش گودرزوند چگینی - یزد؛ دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پزشکی

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

برگ *Ginkgo biloba* از خانواده *Ginkgoaceae*، نیز به عنوان مهارکننده لیپاز پانکراسی معرفی شده است. در عصاره برگ این گیاه ترکیبات biflavone از جمله ginkgetin, bilobetin, isoginkgetin و sciadopitysin و ترکیبات Ginkgolides A,B, Trilactone terpenes و bilobalide جداسازی و شناسایی شده است (20-18). اثر مهارى عصاره متانولى و آبى *Nelumbo nucifera* از خانواده *Nelumbonaceae*، بر لیپاز پانکراسی، آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز نیز گزارش شده است (24-21).

در حال حاضر عوامل بسیاری که مبتنی بر مکمل‌های غذایی هستند برای مقابله با چاقی معرفی شده‌اند با این حال به‌طور قاطع ایمنی و موثر بودن هیچ کدام از آن‌ها ثابت نشده است. با عنایت به اهمیت عملکرد لیپاز پانکراسی و نقش گیاهان خانواده *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* که در ایران موجود و قابل دسترس هستند برای دستیابی به فرآورده‌ای با اثر مهارى بر لیپاز پانکراسی انجام پذیرفت. علاوه بر این، داروی دی‌سیکلومین نیز از لحاظ توانایی مهار فعالیت لیپاز پانکراسی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی، با شناسه IR.QUMS.REC.1397.242 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی قزوین به تصویب رسیده است.

مواد و گیاهان مورد مطالعه

گیاهان *Ferula persica*، اوایل تابستان و از ارتفاعات استان مازندران، *Nelumbo nucifera* اوایل تابستان و از مرداب بندرانزلی و *Ginkgo biloba*، اواخر بهار از مزرعه گیاهان دارویی کرج جمع‌آوری گردید و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی

در بزرگسالان و کودکان به عنوان یکی از علل قابل پیشگیری مرگ و میر در سرتاسر جهان شناخته می‌شود. راهکارهای مختلفی برای مقابله با چاقی به کار گرفته شده است. در بسیاری از مطالعاتی که با رویکرد کنترل چاقی با استفاده از منابع گیاهی و طبیعی انجام شده است این منابع از لحاظ دارا بودن خاصیت ضد لیپازی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. بخش عمده فرآیند هیدرولیز چربی‌ها مربوط به لیپاز پانکراسی است که از آسینوس‌های بخش برون‌ریز پانکراس به درون دوازدهه ترشح می‌شود (1). داروهای محدودی برای مهار آنزیم لیپاز تایید شده‌اند. اورلیستات و سیبوترامین از جمله این داروها هستند. با این وجود اورلیستات با عوارض متعددی از جمله نفخ شکمی، کرامپ‌های شکمی، مدفوع آبکی، بی‌اختیاری مدفوع و مدفوع چرب همراه بوده و نگرانی‌ها با افزایش اثر منفی آن بر کلیه، افزایش پیدا کرده است (2،3). داروی سیبوترامین نیز به دلیل افزایش خطرات قلبی عروقی و سکت‌های مغزی مصرف آن در بسیاری از کشورها منع شده است (4). داروی دی‌سیکلومین به عنوان یک داروی آنتی‌کولینرژیک است و در تسکین اسپاسم عضله صاف دستگاه گوارش کاربرد دارد. اخیراً اثر مهارکنندگی این دارو بر لیپاز میکروبی گزارش شده و نشان داده شده است که دی‌سیکلومین با میل ترکیبی بالایی به آنزیم لیپاز سودوموناس آئروژینوزا اتصال یافته و به طور رقابتی آنزیم را مهار می‌نماید (4). با این حال اثر این دارو بر لیپاز پانکراسی مورد بررسی قرار نگرفته است.

گیاهان بسیاری معرفی شده‌اند که بخش‌های مختلف آن‌ها دارای خاصیت مهارکنندگی لیپاز پانکراسی بوده و در مقالات مختلف مرور شده است (3، 14-5). از میان این گیاهان می‌توان به اثر مهارکنندگی عصاره گیاهان *Ferula Gummosa*، *Ferula asafetida* و *Ferula oopoda* از خانواده *Apiaceae* بر لیپاز پانکراسی اشاره نمود که به‌وجود ترکیباتی از گروه ترپن‌ها در عصاره این گیاهان نسبت داده شده است (17-15). علاوه بر این، عصاره

واحد کرج مورد شناسایی قرار گرفت و ثبت گردید. مشخصات گیاهان مذکور در جدول شماره 1 ارایه شده است. عصاره گیری به روش سوکسیله از گیاهان در آزمایشگاه های دانشکده بهداشت و گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. داروی دی سیکلومین نیز به صورت پودر خالص از شرکت داروسازی خوارزمی تهیه شد و در غلظت های 10، 25، 50، 100، 200، و 400 میکروگرم در میلی لیتر در آب مقطر تهیه و بر غلظت ثابت 5 میلی گرم در میلی لیتر لیپاز پانکراسی تجاری اثر داده شد. لیپاز پانکراسی به صورت تجاری از شرکت سیگما خریداری شد. کیت اندازه گیری فعالیت لیپاز و کالیبراتور مربوطه از شرکت پارس آزمون خریداری گردید.

جدول شماره 1: مشخصات گیاهان مورد مطالعه

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

عصاره گیری

شاخه های هوایی یا ریشه گیاه پس از جمع آوری در سایه و دمای محیط خشک شده سپس برگ و ساقه و گل آن جدا و بخش های مدنظر آسیاب گردید و پودری همگن تهیه شد. جهت تهیه عصاره الکلی، مقداری از پودر گیاه وزن شده، با کاغذ صافی بسته بندی گردیده و درون محفظه شیشه ای 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 عصاره ها از کف پلیت پودر خشک شده ای از هر کدام حاصل شد. برای تهیه محلول استوک از هر کدام از عصاره های گیاهی، 0/5 گرم از پودر خشک گیاه مربوطه در 50 میلی لیتر از حلال حل شده و از کاغذ صافی عبور داده شد.

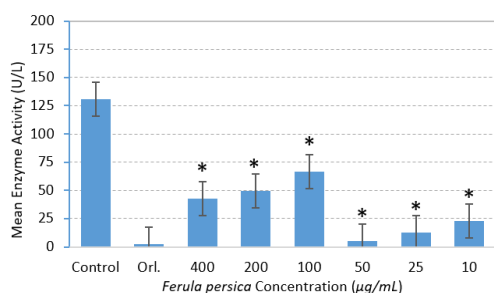
عصاره آبی خام برگ گیاه *Ginkgo biloba*، عصاره الکلی خام ریشه گیاه *Ferula persica*، و عصاره الکلی خام برگ گیاه *Nelumbo nucifera* در ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. عصاره گیاه *Ferula persica* و *Nelumbo nucifera* در حلال متانول به حجم رسانده شد. غلظت های مختلف از عصاره ها شامل 100، 200، 400، 50، 25 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر بر غلظت 5 میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم اثر داده شد. اثر ترکیبی دو گیاه *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* در غلظت های 25 و 50 و 100 میکروگرم بر میلی لیتر نیز به صورت سهم بندی شده در نسبت های 2:1، 3:1 و 1:3 بر غلظت 5 میلی گرم در میلی لیتر از آنزیم اثر داده شد.

اندازه گیری فعالیت لیپاز

اندازه گیری 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 می گیرد. به طور 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 غلظت های مختلف عصاره یا دارو مخلوط گردید. پس از مخلوط نمودن به مدت 5 دقیقه در دمای 37 °C انکوبه شد و سپس 250 میکرولیتر محلول سوبسترا اضافه گردید. پس

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 میلی گرم در میلی لیتر با مهار 98 درصدی باعث کاهش بیش تری 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 معنی دار بوده است ($P < 0/001$). از میان غلظت‌های مختلف مورد مطالعه از عصاره مذکور غلظت 50 میکروگرم بر میلی لیتر به طور میانگین موجب کاهش بیش تری در فعالیت آنزیم گردید (نمودار شماره 1).



نمودار شماره 1: اثر مهار عصاره گیاه *Ferula persica* بر آنزیم لیپاز پانکراسی، ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم بر حسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهار بر فعالیت آنزیم با ارلیستات (کنترل مثبت)، متوسط اثر مهار عصاره گیاه با غلظت‌های 200، 400، 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

از مخلوط نمودن، جذب نوری پس از دو دقیقه انکوباسیون در 37°C در طول موج 580 نانومتر با دستگاه الیزا 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 اندازه گیری 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:

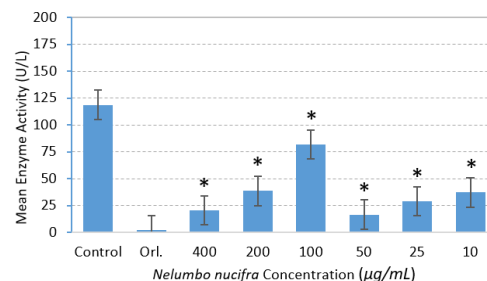
$$\text{Lipase (U/l)} = \frac{\Delta A_{\text{Sample}}}{\Delta A_{\text{Cal}}} \times \text{Cal concentration (U/l)}$$

از ارلیستات با غلظت‌های 10 و 25 و 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر در حلال DMSO به عنوان مهار کننده کنترل مثبت و برای مقایسه اثر مهار 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 نرم افزار SPSS و تست‌های Unpaired T-test و ANOVA صورت گرفت. سطح معنی داری به صورت $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین حداقل سه اندازه گیری گزارش گردید.

یافته ها

در این مطالعه، آنزیم لیپاز پانکراسی تجاری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه

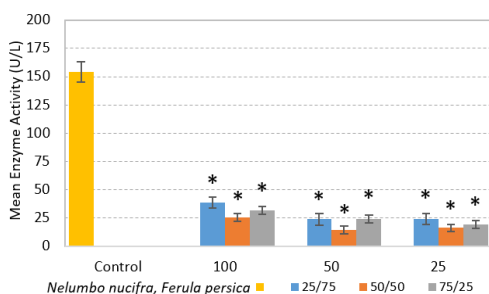
Nelumbo nucifera نسبت به نمونه آنزیمی که در معرض عصاره این گیاه قرار نگرفته است کاهش یافته است و این کاهش معنی دار است ($P < 0/006$). در بین تمامی غلظت‌های مورد بررسی از عصاره مذکور غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور میانگین باعث کاهش بیش‌تری در فعالیت آنزیم گردید (نمودار شماره 2).



نمودار شماره 2: اثر مهارى عصاره گیاه *Nelumbo nucifera* بر آنزیم لیپاز پانکراسی، ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم بر حسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهارى بر فعالیت آنزیم با اریستات (کنترل مثبت)، متوسط اثر مهارى عصاره گیاه با غلظت‌های 400، 200، 100، 50، 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. *: مقدار ارزش احتمالی ($P < 0/006$) است.

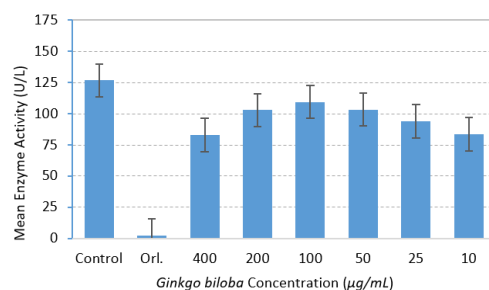
در این مطالعه اثر ترکیبی عصاره دو گیاه *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* در غلظت‌های 25، 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌صورت سهم‌بندی در نسبت‌های 1:3، 2:2، 3:1 و بدون سهمیه و تقسیم‌بندی مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم لیپاز پانکراسی که تحت تاثیر ترکیب دو عصاره گیاهان *Nelumbo nucifera* 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 شماره 3). 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 مهارى ترکیب دو عصاره گیاه *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* بر آنزیم لیپاز پانکراسی به نسبت‌های 1:3، 2:2، 3:1، ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم بر حسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، متوسط اثر مهارى ترکیب دو *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* به ترتیب به نسبت 1:3، 2:2، 3:1 میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. *: مقدار ارزش احتمالی ($P < 0/002$) است.

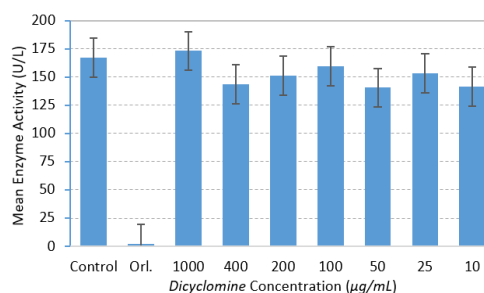
در ارزیابی اثر عصاره گیاه *Ginkgo biloba* بر لیپاز پانکراسی مشخص شد که عصاره فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد ($P < 0/05$). با این حال، این کاهش در اغلب غلظت‌ها چشمگیر نبود و تفاوت زیادی با فعالیت آنزیم مواجهه نیافته نداشت (نمودار شماره 4).



نمودار شماره 4: ارزیابی اثر مهارى عصاره گیاه *Ginkgo biloba* بر فعالیت لیپاز پانکراسی، ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم بر حسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهارى بر فعالیت آنزیم با

ارلیستات (کنترل مثبت)، متوسط اثر مهارى 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 غلظت ها تفاوت بارز و معنی داری مشاهده نگردید (نمودار شماره 5).



نمودار شماره 5: ارزیابی اثر مهارى دی سیکلومین بر فعالیت لیپاز پانکراسی، ستون ها به ترتیب از چپ به راست فعالیت آنزیم بر حسب واحد در لیتر (کنترل منفی)، اثر مهارى بر فعالیت آنزیم با ارلیستات (کنترل مثبت) و متوسط اثر مهارى دارو با غلظت های 400، 1000، 200، 100، 50، 25 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر را نشان می دهد.

بحث

تحقیقات بسیاری در جهت مهار آنزیم های گوارشی برای جلوگیری از جذب مواد غذایی انجام شده است. یکی از آنزیم های 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 مهارى عصاره ها 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 غلظت های مختلف عصاره های 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 مهارى عصاره گیاه

Ferula asafetida از خانواده *Apiaceae* بر آنزیم لیپاز پانکراسی اشاره شد (16). در این مطالعه از میان عصاره های هگزان نرمال، دی کلرومتان، اتیل استات، و متانل، عصاره اتیل استات رزین *Ferrula asafoetida* 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 ترین ها نسبت داده شده است (15، 17). از ترکیبات فعال بیولوژیک دیگری که از آنالیز عصاره های گیاه جنس *Ferula*، به دست آمده است می توان به مشتقات سسکی ترین (sesquiterpene) و ترکیبات حاوی سولفور اشاره نمود (25-28).

عصاره برگ گیاه *Nelumbo nucifera* برای درمان چاقی در چین مورد استفاده قرار گرفته است (28). Velusami و همکاران در مقاله ای در سال 2013 به اثر مهارى عصاره متانولی و آبی *Nelumba Nucifera* بر لیپاز پانکراسی در IC_{50} 47 میکروگرم بر میلی لیتر پی بردند (22). Ratna Kumar و همکاران نیز طی مطالعات خود به اثر مهارى 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 میلی لیتر گزارش شده است (23). در این مطالعه هنگامی که ترکیبات فنلی از عصاره حذف شدند اثر مهارى 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 اندازه گیری شد و به جزئیات متد اندازه گیری اشاره نگردید. در این مطالعه همچنین اثر مهارکنندگی عصاره فوق بر لیپاز پانکراسی در مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گرفته

است. در این مدل عصاره به صورت خوراکی به رت (rat) داده شد و سپس تری گلیسرید در خون اندازه گیری، و نشان داده شد که مصرف خوراکی عصاره فوق باعث کاهش تری گلیسرید 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 بیش تری که نسبت به آب دارد باعث خروج ترکیبات بیش تری می شود، از جمله ترین تری لاکتون که اثر مهاری آن بر آنزیم لیپاز پانکراسی گزارش شده است (30). *Adisakwattana* و همکاران نیز در مطالعه ای 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 ترین تری لاکتون ها، بای فلاونوئیدها، و گلیکوزیدهای فلاوانول است (29، 30). همچنین نشان داده شده است که ترین تری لاکتون ها 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 میلی لیتر صورت می گیرد (29). اثر مهاری بای فلاونوئیدها (biflavonoids) شامل *isoginkgetin*، *ginkgetin*، *bilobetin*، *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 ترین تری لاکتون عنوان شده است و اثر مهاری عصاره برگ این گیاه بیش تر به اجزای بای فلاونوئیدی آن نسبت داده شده است (19). با این حال در مطالعه حاضر مواجهه آنزیم با غلظت های مختلف عصاره گیاه *Ginkgo biloba* کاهش فعالیت قابل ملاحظه ای را نشان نداد و حداکثر مهار آنزیمی در غلظت 10 میکروگرم بر میلی لیتر 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 عصاره های n-هگزان، دی کلرومتان، اتیل استات و متانلی 33 گیاه مختلف بر لیپاز پانکراسی پرداخته است، نشان داده شد که درصد مهارکنندگی عصاره های 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 می توان به استخراج با حلال های مختلف و با نسبت های مختلف و همچنین استفاده از روش های مختلف کروماتوگرافی شامل TLC و HPLC اشاره کرد. بنابراین می توان 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 دی سیکلومین 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 دی سیکلومین بر فعالیت لیپاز پانکراسی مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی صورت گرفته نشان داده شد که آنزیم مواجهه یافته با داروی دی سیکلومین

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.

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 *Nelumbo nucifera* و *Ferula persica* 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 مراحل از استخراج و پالایش بر روی

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 aeruginosa*. *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

- 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, Puwaprisrisan 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, Mäkyinen 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*

- 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.