فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۴۸-۱۳۹ (۱۳۸۸)

اندازه‌گیری اثر مهاری عصاره آبی هفت گیاه دارویی بر فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز به روش برون‌تنی

علی روحبخش[1*] و غلامرضا کریمی[2]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
پست الکترونیک: aroohbakhsh@rums.ac.ir
۲- دانشیار، گروه سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۷

چکیده

تولید بیش از اندازه اسید اوریک بوسیله آنزیم گزانتین اکسیداز باعث بروز بیماری نقرس می‌شود. مهارکننده‌های این آنزیم ازجمله داروی آلوپورینول از مهمترین داروهای ضد نقرس موجود می‌باشند. گیاهان دارویی ازجمله منابع طبیعی در دسترس هستند که ممکن است در درمان نقرس مؤثر و مفید باشند. در این مطالعه اثر مهاری عصاره آبی گیاهان کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.)، بادیان رومی (*Trachyspermum copticum* (L.) Link)، بابونه (*Matricaria chamomilla* L.)، عشقه (*Hedera helix* L.)، ذرت (*Zea mays* L.)، زبان‌گنجشک (*Fraxinus excelsior* L.) و هوفاریقون (*Hypericum perforatum* L.) بر آنزیم گزانتین اکسیداز ارزیابی شد. آزمایش بدین شرح است که تحت شرایط کنترل شده، گزانتین در مجاورت آنزیم گزانتین اکسیداز به اسیداوریک تبدیل می‌شود. میزان جذب اسید اوریک در طول موج ۲۹۵ به‌وسیله اسپکتروفتومتر UV قابل اندازه‌گیری می‌باشد. افزودن عصاره‌های گیاهی یا آلوپورینول (به‌عنوان گروه کنترل) به محلول حاوی آنزیم، با مهار آن می‌تواند باعث کاهش تولید اسید اوریک شود. ابتدا اثر مهاری آلوپورینول بر آنزیم و تکرارپذیری روش طی سه سری آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفت و EC50 معادل ۰/۴۳µg/ml بدست آمد. بعد از تثبیت روش، اثر عصاره‌های گیاهی در غلظتهای ۰/۱ mg/ml، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ بر آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. بابونه با ۶۸٪ مهار آنزیم ($P<0/001$) در غلظت ۳mg/ml دارای اثر بارز مهاری و هوفاریقون و کنگرفرنگی به‌ترتیب با ۳۶٪ ($P<0/001$) و ۲۱٪ ($P<0/001$) مهار آنزیم، اثر متوسط و بقیه گیاهان فاقد اثر مهاری بر آنزیم بودند. نتایج ما نشان داد که بخشی از اثرهای ضد نقرس گزارش شده بابونه، کنگرفرنگی و هوفاریقون بدلیل مهار آنزیم گزانتین اکسیداز در بدن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Matricaria chamomilla* L.، *Hypericum perforatum* L.، *Fraxinus excelsior* L.، *Zea mays* L.، *Trachyspermum copticum* (L.) Link، *Cynara scolymus* L.، *Hedera helix* L.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نقرس بیماری متابولیکی مزمنی است که با افزایش اسید اوریک و التهاب شناخته می‌شود (Fauci *et al*., 2008). آنزیم گزانتین اکسیداز با تولید اسید اوریک در بدن، آنزیمی مهم در آسیب‌شناسی بیماری نقرس محسوب می‌شود. این آنزیم در بدن هیپوگزانتین و گزانتین را به اسید اوریک تبدیل می‌کند (Cos *et al*., 1998). از این‌رو، مهارکننده‌های این آنزیم ازجمله داروی آلوپورینول به‌عنوان مؤثرترین داروهای ضد نقرس مطرح هستند. آنزیم گزانتین اکسیداز در کنار تبدیل بازهای پورین به اسید اوریک، با مصرف اکسیژن مقادیر زیادی رادیکال آزاد و سوپراکسید نیز تولید می‌کند؛ در نتیجه، این آنزیم یکی از مهمترین منابع مولد یون سوپراکسید و رادیکالهای آزاد در بدن است. این مواد در آسیب‌شناسی بیماریهای زیادی ازجمله سرطان، پیری، تصلب شرایین و التهاب نقش دارند (Cos *et al*., 1998). تولید رادیکال آزاد به‌وسیله این آنزیم آنقدر زیاد است که از آن در طراحی سیستمهای مولد رادیکال آزاد برای تحقیقات استفاده می‌شود (Lin *et al*., 2000). در کشور ما گرایش عمومی به سمت استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماریها وجود دارد. این مسئله به‌خصوص در مورد بیماری نقرس به‌دلیل طبیعت مزمن بیماری که در آن به‌علت مصرف طولانی مدت داروها عوارض ناخواسته دارویی شیوع بیشتری دارد حائز اهمیت بیشتری می‌باشد. گیاهان دارویی زیادی در طب سنتی ایران و دنیا به‌عنوان ضد نقرس معرفی شده‌اند، با این حال مطالعه مدون و علمی در خصوص ارزیابی واقعی تأثیر این گیاهان و نحوه اثر آنها در درمان نقرس در ایران صورت نگرفته است. از این رو، بر آن شدیم که اثر مهاری عصاره آبی تعدادی از گیاهانی که در ایران وجود دارند و در منابع علمی به‌عنوان ضد نقرس معرفی شده‌اند، بر آنزیم گزانتین اکسیداز که مهمترین عامل دخیل در بروز نقرس است را ارزیابی کنیم. گیاهانی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند کنگر فرنگی، بادیان رومی، بابونه، عشقه، ذرت، زبان‌گنجشک و هوفاریقون می‌باشند.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده

گزانتین اکسیداز و گزانتین (هر دو از شرکت سیگما، آمریکا)، فسفات هیدروژن پتاسیم مونوبازیک و فسفات هیدروژن پتاسیم دی بازیک (هر دو از شرکت فلوکا، سوئیس)، آلوپورینول (شرکت EGIS، مجارستان)، اسید کلریدریک و اسید اوریک (شرکت مرک، آلمان) مواد مورد استفاده در این مطالعه می‌باشند.

انتخاب، جمع‌آوری و عصاره‌گیری گیاهان

ابتدا لیستی از گیاهانی که براساس منابع فارسی و لاتین خاصیت ضد نقرس دارند تهیه شد و از میان آنها تعداد ۷ گیاه شامل: بابونه، کنگرفرنگی، هوفاریقون، بادیان رومی، عشقه، زبان‌گنجشک و ذرت انتخاب شدند. بابونه و کنگرفرنگی از محل باغچه گیاهان دارویی دانشکده داروسازی مشهد، زبان‌گنجشک و عشقه از محوطه دانشگاه فردوسی مشهد، ذرت از منطقه خواجه ربیع (مشهد) از یک زمین زراعی و هوفاریقون از روستای ازغد (اطراف مشهد) جمع‌آوری شدند. اسامی گیاهان به‌وسیله هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد مورد تأیید قرار گرفتند. خشک کردن گیاهان در سایه و در جای خشک انجام شد. پس از آسیاب قسمتهای مورد نظر هر کدام از گیاهان، عصاره‌گیری انجام شد. برای تهیه عصاره آبی از روش خیساندن در آب

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. علت استفاده از عصاره آبی، استفاده مردم از عصاره‌های آبی این گیاهان در طب سنتی بود. در این روش عصاره‌گیری، ۱۵-۱۰ گرم از پودر گیاهی بدست آمده در ارلن ریخته شده و به مدت ۳ روز در حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر خیسانده می‌شود. پس از صاف کردن محلول بدست آمده با صافی، عمل تبخیر حلال در پلیت‌های پهن و بر روی بن‌ماری دمای ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از ماده جامد باقی‌مانده عصاره، جهت انجام آزمایشها استفاده شد. لازم به یادآوری است که در مورد بابونه، کنگرفرنگی و هوفاریقون از تمام اندام هوایی گیاه و بادیان رومی از میوه آن و عشقه و زبان‌گنجشک از برگ آنها و گیاه ذرت از قسمت انتهایی اندام هوایی آن که کاکل نامیده می‌شود استفاده شد.

روش کار

روش کار در این تحقیق با تغییراتی مختصر، روش کاری است که قبلاً در این زمینه گزارش شده است (Sweeney *et al.*, 2001). ۱/۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (K2HPO4, KH2PO4, 1/15N, pH=7.5) با ۰/۲ میلی‌لیتر محلول unit/ml ۰/۲۵ آنزیم گزانتین اکسیداز و ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر (بدون نمونه مورد آزمایش) یا محلول مورد آزمایش (که رقت‌های مختلف از آلوپورینول یا عصاره است) در دو لوله آزمایش مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این زمان به هر نمونه ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱۵mM گزانتین اضافه شد. نمونه‌ها دوباره در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. بعد از این مدت برای خاتمه واکنشهای آنزیم، به هر نمونه یک میلی‌لیتر محلول یک نرمال اسید کلریدریک افزوده شد. در این مرحله، پس از تهیه کنترل (که همان‌طور که گفته شد حاوی تمام اجزای بالا بجز محلول آنزیمی است و می توان بجای آن از بافر استفاده نمود)، جذب نمونه‌ها در برابر کنترل آنها در طول موج ۲۹۵ خوانده شد. همان‌طور که اشاره شد کار به‌صورت دو بار تکرار (Bosisio *et al.*, 2000) برای هر رقت از محلول مورد آزمایش انجام شد. یعنی برای هر رقت دو جذب خوانده شد و دو نمونه نیز در هر سری آزمایش بدون مهارکننده به‌عنوان کنترل منفی برای اعمال شرایط یکسان بر همه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای از بین رفتن خطاهای غیر قابل پیش‌بینی، میزان مهار آنزیم نسبت به نمونه‌های کنترل همان گروه اندازه‌گیری شد.

تعیین طول موج حداکثر جذب اسید اوریک

برای این منظور طیفی از محلولهای رقیق شده گزانتین و اسید اوریک در فاصله ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج UV (Shimadzu-UV-160A) گرفته شد (شکل ۱).

ارزیابی صحت روش با اندازه‌گیری EC50 آلوپورینول

در ابتدا برای ارزیابی صحت و دقت روش، از داروی آلوپورینول به‌عنوان مهارکننده استاندارد آنزیم استفاده شد. برای این منظور میزان EC50 (غلظتی از مهارکننده که فعالیت آنزیم را به نصف کاهش می‌دهد) آلوپورینول اندازه‌گیری شد. به همین جهت بعد از انجام آزمایشهای مقدماتی و ارزیابی اثر غلظتهای مختلف آلوپورینول بر آنزیم، در نهایت میزان جذب اسید اوریک در برابر غلظتهای ۰/۰۵ µg/ml، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ از آلوپورینول اندازه‌گیری شد و بعد درصد مهار آنزیم

Archive of SID

www.SID.ir

از فرمول ۱۰۰× (۱–A/B) محاسبه شد (Owen & Johns, 1999) که در آن A میزان جذب نمونه مورد آزمایش و B میزان جذب نمونه شاهد منفی می‌باشد (شکل ۲).

برای اندازه‌گیری اثر مهاری عصاره‌ها بر فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز، ابتدا لازم بود که محدوده غلظتی مؤثر عصاره‌ها اندازه‌گیری شود. به همین منظور محدوده‌های غلظتی مختلفی از عصاره‌ها در مطالعات مقدماتی مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت غلظتهای مناسب از عصاره‌ها انتخاب شدند.

اندازه‌گیری میزان اثر مهاری عصاره آبی گیاهان بر آنزیم گزانتین اکسیداز

برای اندازه‌گیری میزان اثر مهاری عصاره‌ها بر فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز، غلظتهای mg/ml ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ از عصاره‌های آبی گیاهان عشقه، ذرت، هوفاریقون، بابونه، زبان‌گنجشک، بادیان رومی و کنگرفرنگی تهیه شدند. اثر مهاری هر عصاره در هر غلظت دو بار اندازه‌گیری شد (شکلهای ۳ و ۴).

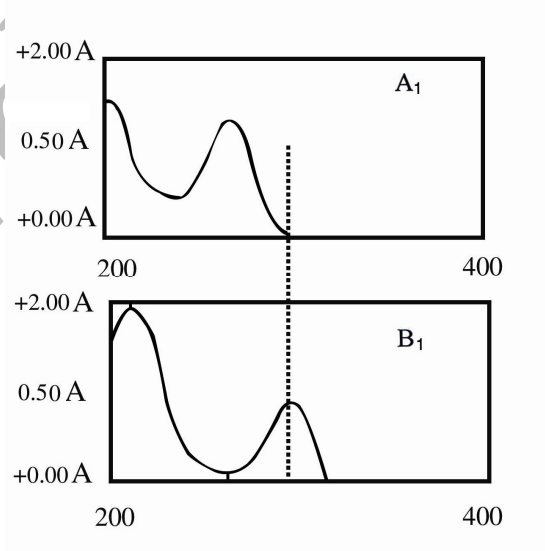
محاسبات آماری

روش آماری مورد استفاده در این آزمایشها با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، ANOVA می‌باشد. از ANOVA یک طرفه برای مقایسه گروهها استفاده شد که در صورت معنی‌دار شدن F، از Tukey post-hoc برای یافتن میزان معنی‌دار بودن هر کدام از گروهها استفاده شد. $P<0.05$ در این مطالعه معنی‌دار فرض شد.

نتایج

طول موج حداکثر جذب اسید اوریک

با توجه به اینکه حداکثر جذب اسید اوریک در طول موجهای ۲۹۵/۲ و ۲۱۰/۶ می‌باشد (نمودار A_1 در شکل ۱) و در طول موج ۲۹۵ گزانتین دارای حداقل جذب است (نمودار B_1 در شکل ۱)، بنابراین از طول موج ۲۹۵ برای اندازه‌گیری جذب اسید اوریک در کلیه آزمایشها استفاده شد (Hatano *et al*., 1989).



شکل ۱– A_1 نمودار جذب UV محلول گزانتین، B_1 نمودار جذب UV محلول اسید اوریک

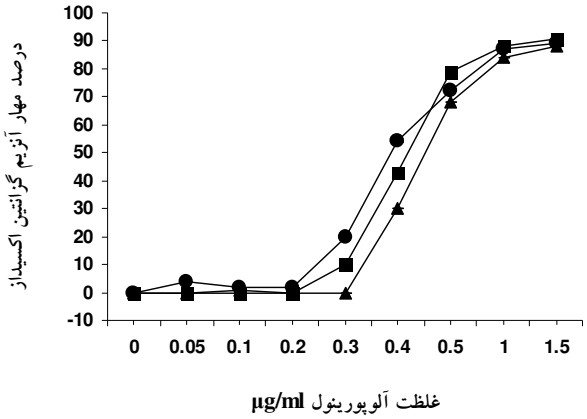
اسید اوریک در طول موج ۲۹۵ دارای حداکثر جذب و گزانتین دارای حداقل جذب است.

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی صحت و دقت روش با اندازه‌گیری EC50 آلوپورینول

EC50 غلظتی از مهارکننده است که فعالیت آنزیم را ۵۰ درصد کاهش می‌دهد. به‌عبارتی، در این آزمایشها غلظتی از آلوپورینول است که در آن جذب UV و در نتیجه غلظت اسید اوریک نسبت به گروه کنترل منفی ۵۰٪ کاهش یافته است. با توجه به نتایج بدست آمده (شکل ۲)، EC50 آلوپورینول بین غلظتهای ۰/۱ µg/ml و ۰/۵ مشاهده می‌شود. برای محاسبه دقیق EC50 از نرم‌افزار Instat استفاده شد. EC50 بدست آمده در این آزمایشها معادل ۰/۴۳ µg/ml می‌باشد.



شکل ۲- اثر مهاری غلظتهای مختلف آلوپورینول بر آنزیم گزانتین اکسیداز

محدوده غلظتی مؤثر عصاره‌ها بر آنزیم

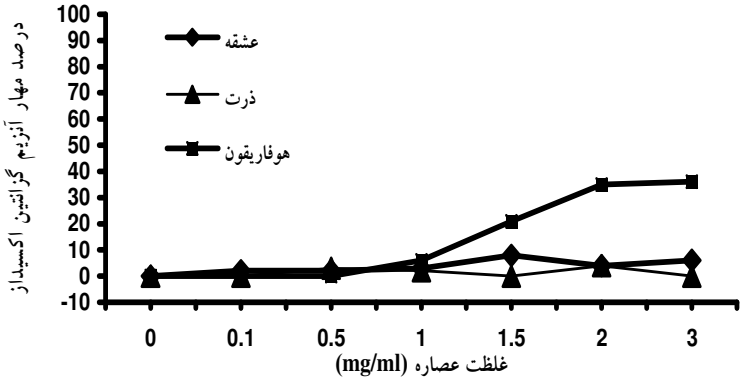
ارزیابی آزمایشهای مقدماتی نشان داد که بهترین محدوده غلظتی مؤثر عصاره‌ها، استفاده از غلظتهای mg/ml ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ است. بدلیل بدست آمدن یک نمودار پاسخ وابسته به غلظت عصاره در این محدوده غلظتی و استفاده از این غلظتها در سایر کارهای تحقیقاتی (Sweeney *et al.*, 2001)، غلظتهای یاد شده تا پایان آزمایشها برای بررسی اثر مهاری عصاره‌ها بر آنزیم مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج حاصل از بررسی اثر مهاری عصاره آبی گیاهان بر آنزیم گزانتین اکسیداز

شکلهای ۳ و ۴ نشان‌دهنده اثر عصاره گیاهان عشقه، ذرت، هوفاریقون، بابونه، زبان‌گنجشک، بادیان رومی و کنگرفرنگی بر فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز می‌باشد. در بین عصاره‌ها با توجه به حداکثر قابلیت مهار آنزیم، بابونه با ۶۸٪ مهار آنزیم در غلظت ۳mg/ml، بیشترین اثر مهاری را بر فعالیت آنزیم داشت [$P<0/001$ و $F(6،13)=126$]. کنگرفرنگی با ۲۱٪ [$P<0/001$ و $F(6،13)=254$] و هوفاریقون با ۳۶٪ مهار آنزیم [$P<0/001$ و $F(6،13)=228$] در غلظت ۳mg/ml نیز اثر مهاری متوسطی بر فعالیت این آنزیم در دوزهای بکار رفته داشتند. اثر سایر گیاهان بر فعالیت آنزیم معنی‌دار نبود؛ بادیان رومی [$P>0/05$ و $F(6،13)=3/36$]، کاکل ذرت [$P>0/05$ و $F(6،13)=3/32$]، زبان‌گنجشک [$P>0/05$ و $F(6،13)=2/67$] و عشقه [$P>0/05$ و $F(6،13)=0/64$].

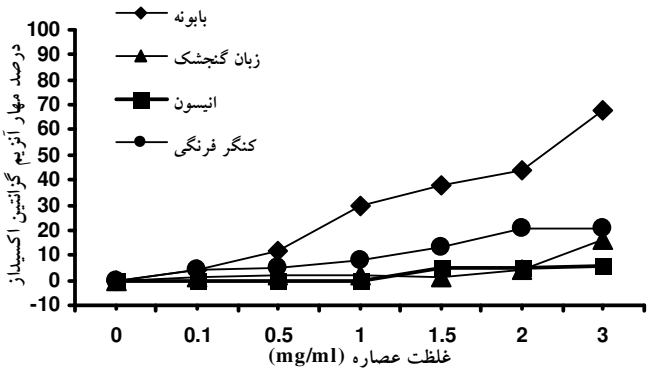
Archive

www.SID.ir



شکل ۳- اثر مهاری غلظتهای مختلف عصاره‌های عشقه، ذرت و هوفاریقون بر آنزیم گزانتین اکسیداز

هر نقطه میانگین دو نمونه است. نتایج بر حسب میانگین± انحراف معیار می‌باشند (***، به معنی P<۰/۰۰۱ می‌باشد).



شکل ۴- اثر مهاری غلظتهای مختلف عصاره‌های بابونه، زبان‌گنجشک، بادیان رومی و کنگرفرنگی بر آنزیم گزانتین اکسیداز.

هر نقطه میانگین دو نمونه است. نتایج بر حسب میانگین± انحراف معیار می‌باشند (***، به معنی P<۰/۰۰۱ و **، به معنی P<۰/۰۱ می‌باشد).

بحث

همان طور که نتایج نشان می‌دهد آنزیم گزانتین اکسیداز به‌وسیله آلوپورینول که مهارکننده استاندارد آن است، به‌خوبی مهار شده است. میانگین EC50 بدست آمده برای آلوپورینول در این آزمایشها معادل ۰/۴۳ µg/ml است. این عدد تا حدودی به EC50 که در روش کار مرجع (Sweeney *et al*., 2001) به میزان ۰/۱۵۸ µg/ml گزارش شده است، نزدیک می‌باشد. با توجه به اینکه در روش کار مرجع از دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌جای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مدت انکوباسیون ۱۰ دقیقه برای انجام آزمایش استفاده شده و همچنین آنزیم از منبع دیگری تهیه شده است، وجود این اختلاف در EC50 گزارش شده تا حدودی منطقی به نظر می‌رسد. این نکات و نیز تکرار نتایج حاصل از مهار آنزیم به‌وسیله غلظتهای مختلف آلوپورینول، همگی بر صحت و تکرارپذیری روش بکار رفته در این مطالعه تأکید دارند. از طرفی انحراف معیار

www.SID.ir

بسیار کم نتایج و نیز نشان دادن اثر مهاری آلوپورینول در رقت‌های بسیار کم بر کارایی و دقت بالای این روش در اندازه‌گیریها تأکید دارد. لازم به یادآوری است که انحراف معیارها به دلیل اینکه مقادیر بسیار کوچکی دارند در منحنی‌ها قابل مشاهده نیستند. نتایج بدست آمده، اثر مهاری غلظتهای مختلف آلوپورینول بر آنزیم را به‌صورت سیگموئیدی نشان می‌دهد که در قسمت نقطه عطف منحنی‌ها، میزان مهار آنزیم بشدت تغییر می‌کند. این یافته به این معنی است که اثرهای مهاری بر آنزیم در رقت‌های مخصوصی بشدت افزایش یافته و فعالیت آنزیم به همان نسبت وابسته به غلظت مهارکننده می‌شود. این نکته از لحاظ بالینی از جهت تنظیم دقیق دوز مصرفی آلوپورینول جهت داشتن کارایی حداکثر و داشتن حداقل عوارض می‌تواند حائز اهمیت باشد. همان طور که اشاره شد در اندازه‌گیری اثر مهاری عصاره‌ها بر آنزیم با تأکیدی که بر استفاده بالینی این گیاهان در طب سنتی به‌عنوان ضد نقرس است و مردم نیز از جوشانده این گیاهان به‌عنوان درمان استفاده می‌کنند، از عصاره آبی گیاهان یاد شده استفاده شد. با این حال، از عصاره‌های دیگر نیز برای این منظور می‌توان استفاده کرد به‌خصوص که حلالهایی مانند اتیل استات ترکیبهای مهارکننده آنزیم را که عموماً از خانواده فلاونوئیدها هستند به‌خوبی استخراج می‌کند و چه بسا استفاده از عصاره‌های استخراج شده با حلالهای آلی در مورد گیاهانی که عصاره آبی آنها فاقد اثر مهاری بوده است نتایج معنی‌داری بدست آید (Kong *et al*., 2000). همان طور که در قسمت نتایج گزارش شد گیاه بابونه در مقایسه با سایر گیاهان مورد بررسی دارای اثر بارز مهاری بر آنزیم گزانتین اکسیداز بوده و کنگرفرنگی و هوفاریقون دارای اثر مهاری متوسط و بقیه فاقد اثر مهاری بر آنزیم بودند. در تأیید این یافته، خاصیت ضد نقرس بابونه، کنگرفرنگی و هوفاریقون به‌ترتیب در منابع (Duke, 2001) و (Gruenwald *et al*., 2000) قبلاً گزارش شده است. انجام این آزمایشها می‌تواند مؤید خاصیت ضد نقرس گزارش شده برای این گیاهان باشد. مطالعه جدیدی نیز منتشر شده است که نشان‌دهنده اثر مهاری کنگرفرنگی بر آنزیم گزانتین اکسیداز است (Sarawek *et al*., 2008) که خود مجدداً مؤید یافته ما در این مطالعه است. با این حال، این مطالعه نشان داده است که خوراندن ترکیبهای مؤثره گیاه بر خلاف تزریق آنها تأثیری بر سطح اسید اوریک خون موشها نداشته است که البته می‌تواند به دلیل مشکلات مربوط به جذب این ترکیبها از دستگاه گوارش باشد. تاکنون ترکیبهای طبیعی زیادی به‌عنوان مهارکننده‌های این آنزیم مطرح شده‌اند که مهمترین آنها فلاونوئیدها هستند. ازجمله این مهارکننده‌های طبیعی می‌توان به پنتاگالوئیل گلوکز (Hayashi *et al*., 1989)، فلاونوئیدها (Lio *et al*., 1985)، فلاونولها (Costantino *et al*., 1992a)، پلی‌فنولها (Costantino *et al*., 1992b)، آلکالوئیدهای استروئیدی (Zhou *et al*., 1999)، آنتروکینونها (Nakanishi *et al*., 1990)، دی‌هیدروکسی آدنین، گزانتون‌ها، بتاکاربولین‌ها و هیدروکسی چالکن‌ها (Gonzalez *et al*., 1995)، کومارین‌ها (Hatano *et al*., 1989)، پترین‌ها (Wede *et al*., 1998)، فاکتورهای رشد گیاهی (Sheu & Chiang, 1996)، آنتوسیانیدین (Costantino *et al*., 1995) و اسید فولیک (Owen & Johns, 1999) اشاره کرد. گیاهان بابونه و هوفاریقون دارای مقادیر زیادی فلاونوئید، فلاونول، گزانتون و کومارین هستند. این گیاهان دارای لوتئولین، آپی ژنین، روتین، کوئرستین و هسپریدین می‌باشند که اثر مهاری

Archive of SID

www.SID.ir

قوی این ترکیبها بر آنزیم گزانتین اکسیداز به‌خوبی شناخته شده است (Cos *et al*., 1998؛ Lio *et al*., 1985). از این رو، به احتمال قوی اثرهای مهاری عصاره‌های این گیاهان مربوط به این ترکیبات می‌باشد. با توجه به مکانیسم مهاری کوئرستین بر آنزیم گزانتین اکسیداز که از نوع توأم رقابتی و غیررقابتی گزارش شده است (Lio *et al*., 1985) و با توجه به اینکه گزارش شده است که عصاره‌های گیاهانی که دارای خواص قوی مهاری بر آنزیم می‌باشند، با مکانیسم توأم (Mixed) آنزیم را مهار می‌کنند (Owen & Johns, 1999) مکانیسم احتمالی مهار آنزیم به‌وسیله عصاره‌های این گیاهان از نوع توأم می‌باشد. همان طور که اشاره شد مهمترین ترکیبهای طبیعی مهارکننده این آنزیم از دسته فلاونوئیدها هستند. توانایی فلاونوئیدها در مهار این آنزیم به حدی است که در بعضی مطالعات از آنها به‌عنوان کنترل مثبت (بجای آلوپورینول) استفاده شده است (Bosisio *et al*., 2000). این ترکیبها بر تولید رادیکالهای آزاد به‌وسیله آنزیم نیز اثر می‌گذارند. به همین جهت بعضی از این ترکیبها به‌دلیل مهار تولید رادیکال آزاد که در مقدمه به آن اشاره شد در کنترل بیماریهای زیادی ازجمله: سرطان، پیری، آترواسکلروز و التهاب نیز مؤثر شناخته شده‌اند (Cos *et al*., 1998). با توجه به این مطالب نقش مهار کننده‌های آنزیم گزانتین اکسیداز در کنترل بیماریهای مختلف ازجمله: نقرس و ایسکمی به‌خوبی درک می‌شود، زیرا این آنزیم در طی ایسکمی با تبدیل هیپوگزانتین به اورات، مقدار زیادی رادیکال آزاد تولید می‌کند که باعث آسیبهای بافتی می‌شوند (Cos *et al*., 1998). در همین خصوص تحقیقاتی که بر آلوپورینول و اکسی پورینول صورت گرفته، نشان داده است که هر دو با مهار آنزیم گزانتین اکسیداز در کاهش صدمات مغزی ناشی از ایسکمی مؤثر می‌باشند (Akdemir *et al*., 2001). دقت در آسیب‌شناسی بیماری نقرس این نکته را یادآور می‌شود که گیاهان دیگری که در این مطالعه خواص مهارکنندگی آنزیم گزانتین اکسیداز را نداشته‌اند به‌عنوان گیاهانی که فاقد خاصیت ضد نقرس هستند مطرح نمی‌شوند. چون که این گیاهان می‌توانند با خاصیت ضد التهابی و یا مدر خود در بهبود این بیماری نقش داشته باشند (Katzung, 2007). با توجه به مطالب ارائه شده و نتایج بدست آمده، سه گیاه هوفاریقون، بابونه و کنگرفرنگی کاندیدهای مناسبی جهت درمان نقرس می‌باشند. با توجه به اینکه خواص ضد التهابی مؤثری برای فلاونوئیدها گزارش شده است و در آسیب‌شناسی بیماری نقرس التهاب نیز نقش عمده‌ای دارد (Katzung, 2007)، این گیاهان به‌خصوص بابونه که قبلاً خواص ضد التهابی آن از طریق مهار لکوترین B4 (Presibella *et al*., 2007)، که یک ترکیب قوی در کموتاکسی است، گزارش شده و در درمان نقرس می‌تواند مفید باشد.

منابع مورد استفاده

- Akdemir, H., Aşik, Z., Paşaoğlu, H., Karaküçük, I., Oktem, I.S. and Koç, R.K., 2001. The effect of allopurinol on focal cerebral ischaemia: an experimental study in rabbits. Neurosurgery Review, 24(2-3): 131-135.
- Bosisio, E., Mascetti, D. and Caballion, P., 2000. Screening of plants from New caledonia and Vanuatu for inhibitory activity of Xanthine oxidase and elastase. Pharmaceutical Biology, 38(1): 18-24.
- Costantino, L., Rastelli, G. And Albasini, A., 1992a. Inhibitory activity of flavonols towards the xanthine oxidas enzyme. International Journal of Pharmaceutics, 86: 17-23.
- Costantino, L., Albasini, A., Rastelli, G. and Benvenuti, S., 1992b. Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. Planta Medica, 58(4): 342-344.

Archive of SID

www.SID.ir

some Chinese medicinal plants used to treat gout. Journal of Ethnopharmacology, 73(1-2): 199-207.
- Lin, C.C., Yen, F.L., Hsu, F.F. and Lin, J.M., 2000. Anti-hypercholesterolaemia, antioxidant activity and free radical scavenger effects of traditional Chinese medicine prescriptions used for stroke. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 52(11): 1387-1393.
- Lio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takakin, N. and Fukumoto, M., 1985. Inhibiton of xanthine oxidase by flavonoids. Agricultural and Biological Chemistry, 49(7): 2173-2176.
- Nakanishi, T., Nishi, M., Inada, A., Obata, H., Tanabe, N., Abe, S. and Wakashiro, M., 1990. Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 38(6): 1772-1774.
- Owen, P.L. and Johns, T., 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. Journal of Ethnopharmacology, 64(2): 149-160.
- Presibella, M., Santos, C. and Weffort-Santos, A., 2007. In Vitro Antichemotactic Activity of *Chamomilla recutita* Hydroethanol Extract. Pharmaceutical Biology, 45(2): 124 - 130
- Sheu, S.Y. and Chiang, H.C., 1996. Inhibitory effects of plant growth regulators on xanthine oxidase. Anticancer Research, 16(1): 311-315.
- Sarawek, S., Feistel, B., Pischel, I. and Butterweck, V., 2008. Flavonoids of *Cynara scolymus* possess potent xanthin oxidase inhibitory activity in vitro but are devoid of hypouricemic effects in rats after oral application. Planta Medica, 74(3): 221-227.
- Sweeney, A.P., Wyllie, S.G., Shalliker, R.A. and Markham, J.L., 2001. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. Journal of Ethnopharmacology, 75(2-3): 273-277.
- Zhou, C.X., Tanaka. J., Cheng, C.H., Higa, T. and Tan, R.X., 1999. Steroidal Alkaloids and Stilbenoids from *Veratrum taliense*. Planta Medica, 65(5): 480-482.
- Wede, I., Altindag, Z.Z., Widner, B., Wachter, H. and Fuchs, D., 1998. Inhibition of xanthine oxidase by pterins. Free Radical Research, 29(4): 331-338.
- Costantino, L., Rastelli, G. and Albasini, A., 1995. Anthocyanidines as inhibitors of xanthine oxidase. Pharmazie, 50(8): 573-574.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Vanden Berghe, D., 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. Journal of Natural Products, 61(1): 71-76.
- Duke, J., 2001. Hand book of Medicinal Herbs. CRC Press, Washington D.C., 893p.
- Fauci, A., Kasper, D., Longo, D., Braunwald, E., Hauser, S., Jameson, J. and Loscalzo, J., 2008. Harrison's Principle of Internal Medicine. McGraw Hill, New York, 2674p.
- González, A.G., Bazzocchi, I.L., Moujir, L., Ravelo, A.G., Correa, M.D. and Gupta, M.P., 1995. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae. Journal of Ethnopharmacology, 46(1): 25-29.
- Gruenwald, J., Brendler, T. and Jaenicke, C., 2000. PDR for Herbal Medicines. Medical Economics, Montvale, 1108p.
- Hatano, T., Yasuhara, T., Fukuda, T., Noro, T. and Okuda, T., 1989. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoarylcoumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 37(11): 3005-3009.
- Hayashi, T., Nagayama, K., Arisawa, M., Shimizu, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I. and Berganza, L.H., 1989. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug, "Molle-i" (Schinus terebinthifolius). Journal of Natural Products, 52(1): 210-211.
- Katzung, B., 2007. Basic & Clinical Pharmacology. McGraw Hill, New York, 1082p.
- Kong, L.D., Cai, Y., Huang, W.W., Cheng, CH. and Tan, R.X., 2000. Inhibition of xanthine oxidase by

Archive of SID

www.SID.ir

In vitro evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity of aqueous extract of seven medicinal herbs

A. Roohbakhsh[1*] and G. Karimi[2]

1*- Corresponding author, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, Email: aroohbakhsh@rums.ac.ir
2- Department of Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: August 2008 Revised: January 2009 Accepted: February 2009

Abstract

Over production of uric acid by xanthine oxidase (XO) causes gout. XO inhibitors for example allopurinol are the most important available anti gout drugs. Medicinal herbs are available natural sources that may be useful for the treatment of gout. In this study the inhibitory activity of aqueous extracts of *Matricaria chamomilla* L., *Hypericum perforatum* L., *Fraxinus excelsior* L., *Zea mays* L., *Trachyspermum copticum* (L.) Link, *Cynara scolymus* L. and *Hedera helix* L. were measured. In these experiments, under controlled conditions xanthine turns into uric acid by XO. Uric acid absorbance was measured at 295 nm using a UV spectrophotometer. Adding allopurinol (as positive control) or aqueous extracts to the solution containing XO, can decrease uric acid production by inhibition of this enzyme. At first, XO inhibitory activity of allopurinol and reproducibility of the method was evaluated by conducting three experiments. The results showed an EC50= 0.43 μg/ml for allopurinol. Then, XO inhibitory activity of aqueous extracts at 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 mg/ml were measured. *Matricaria chamomilla* could inhibit enzyme up to 68% ($P< 0.001$) while maximum XO inhibitory activities of *Hypericum perforatum* and *Cynara scolymus* were 36% ($P< 0.001$) and 21% ($P< 0.001$) respectively. Other extracts did not have any significant effect on XO. Our obtained results showed that part of anti gout effects of *Matricaria chamomilla*, *Hypericum perforatum* and *Cynara scolymus* is due to XO inhibition.

Key words: *Matricaria chamomilla* L., *Hypericum perforatum* L., *Fraxinus excelsior* L., *Zea mays* L., *Trachyspermum copticum* (L.) Link, *Cynara scolymus* L., *Hedera helix* L.

Archive of SID

www.SID.ir