بررسی قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) توسط آلکالوییدهای مهم گیاه خشخاش (*Papaver* spp.)

سیدعلی ضیایی[1*]، مسعود محمودیان[2]، بهاره کشاورز[3]، لیلا پورحسینی[4]، آرزو دست‌پاک[5]، احمد ابراهیمی[6]، ابوالفضل فراهانی[7]

۱- استادیار پژوهش فارماکولوژی، گروه پژوهشی فارماکولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
۲- استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران
۳- دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
٤- کارشناس کشاورزی، گروه پژوهشی فارماکولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
۵- کارشناس ارشد علوم گیاهی، گروه پژوهشی فارماکولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
٦- استادیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران
۷- کارشناس ارشد شیمی تجزیه، تهران
* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب، خیابان قدس، خیابان بزرگمهرغربی، شماره ۹۷
صندوق‌پستی: ١٤٤٦- ١٣١٤٥، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
پست الکترونیک: ziai2000@hotmail.com

چکیده

آنزیم مبدل آنژیوتانسین ACE باعث تبدیل پیش‌ساز غیرفعال آنژیوتانسین I به ماده منقبض‌کننده عروقی و ترشح‌کننده آلدوسترون به‌نام آنژیوتانسین II می‌گردد. از آنجایی که این آنزیم در هموستاز فشار خون نقش دارد بنابراین هدف مهمی در درمان فشار خون و نارسایی قلبی محسوب می‌گردد. با این‌حال به علت غیراختصاصی بودن داروهای مهارکننده، برخی از عوارض جانبی مثل سرفه خشک مشاهده می‌شود. در حال حاضر تحقیق در زمینه مهارکنندگان جدید و اختصاصی‌تر این آنزیم در جریان است و در این تحقیق اثر آلکالوییدهای مهم گیاه خشخاش، به عنوان مهارکنندگان آنزیم خالص ACE جدا شده از ریه خرگوش مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان کنترل مثبت از کاپتوپریل استفاده شده و اثرات مهارکنندگی رقت‌های مختلف آلکالوییدهای خالص مرفین، نوسکاپین، تبایین، پاپاورین و کدیین بررسی شده است. غلظت ۱ میلی‌مولار پاپاورین توانست حدود ۴۰ درصد فعالیت آنزیم را مهار نماید که در مطالعات بعدی مشخص گردید در این مهار K_m افزایش و V_{max} کاهش یافته است. نتیجه این که پاپاورین می‌تواند مدل مناسبی برای داروهای ضدفشار خون با مکانیسم مهار ACE باشد و احتمالاً قسمتی از افت فشار خون ناشی از مصرف آن به علت مهار این آنزیم است.

گل‌واژگان: آنزیم مبدل آنژیوتانسین، ACE، آلکالوییدها، اثرات مهاری، خشخاش

مقدمه

آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE، کینیناز II، دی‌پپتیدیل کربوکسی پپتیداز) به‌خاطر اثرات فیزیولوژی مهم آن در سیستم رنین – آنژیوتانسین به‌خوبی شناخته شده است. در این سیستم ACE آنژیوتانسین I را تبدیل به آنژیوتانسین II می‌کند که ماده اخیر یک منقبض‌کننده عروقی قوی بوده و با تحریک ترشح آلدوسترون از کورتکس آدرنال باعث احتباس یون سدیم می‌گردد. به علاوه ACE مسؤول بی‌اثرسازی مادهٔ گشادکنندهٔ عروق یعنی برادی‌کینین است. به‌خاطر اثر دوگانه ACE در نگهداری فشار خون و هموستاز آب و الکترولیت‌ها، مهار ACE جایگاه موفقی در درمان هیپرتانسیون و نارسایی احتقانی قلب پیدا کرده است [۱].

این آنزیم به عنوان فاکتور تبدیل‌کنندهٔ آنژیوتانسین I به آنژیوتانسین II به‌طور تصادفی در پلاسما کشف شد. ACE انسان ۱۲۷۸ اسید آمینه و دو قسمت مشابه دارد. هر کدام از این دو قسمت یک جایگاه فعال و مکانی برای اتصال به اتم روی(Zn^{+2}) دارند. این آنزیم غیراختصاصی بوده و واحدهای دی‌پپتیدی را از سوبستراهایی با سکانس‌های متفاوت اسید آمینه می‌شکند. سوبستراهای ارجح تنها یک گروه کربوکسیل آزاد در اسید آمینه انتهای کربوکسی دارند که این اسید آمینه انتهایی نباید پرولین باشد. بنابراین آنزیم نمی‌تواند آنژیوتانسین II را بشکند. برادی کینین یکی از چندین سوبسترای طبیعی ACE بوده و ACE همان کینیناز II است که برادی کینین و دیگر پپتیدهای وازودیلاتور را می‌شکند. از آنجایی که این آنزیم در هموستاز فشار خون نقش دارد بنابراین هدف مهمی در درمان فشار خون و نارسایی قلبی محسوب می‌گردد [۲،۳]. مهارکنندگان قوی واختصاصی متعددی برای ACE ساخته شده است [٤،٥،٦]. شباهت جایگاه فعال ACE با دیگر متالوپروتئازهای متصل به روی (Zn^{+2}) مانند کربوکسی پپتیداز A و ترمولیزین به مقدار زیادی در طراحی این مهارکننده‌ها موثر بوده است [۷،۸]. اولین مهارکننده موفق ACE که در بزرگسالان استفاده شد ماده‌ای سولفیدریل به‌نام کاپتوپریل بود که گروه تیول آن با اتم روی کئوردیناسیون دارد [۹]. از آن زمان به بعد چندین مهارکننده دیگر ساخته شده‌اند که بیشتر آنان دارای یک گروه کربوکسیل آلکیل برای کئوردیناسیون با اتم روی هستند. بنابراین عوارض جانبی ناشی از گروه تیول در آنها مشاهده نمی‌گردد [۳]. نتایج جدید نشان می‌دهد که تعدادی از این داروها، مهارکننده‌های قوی یکی دیگر از پپتیدازهای وابسته به روی واقع در سطح سلول یعنی آمینوپپتیداز P (EC 3.4.11.9) هستند. این مطلب منعکس‌کنندهٔ تشابه جایگاه فعال متالوپپتیدازهای وابسته به روی بوده [۱۰،۱۱] و ممکن است علت بروز برخی از عوارض جانبی مهارکنندگان ACE باشد [۱،۳].

تشابه‌هایی میان آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) و انکفالیناز وجود دارد. برای مثال هر دو آنزیم غلظت بالایی در مغز داشته و در کورپوس استریاتوم یافت می‌شوند. همچنین هر دو قادر هستند تا انکفالین‌ها را تجزیه کنند، ولی تفاوت‌هایی نیز دارند. انکفالینازها توسط مهارکنندگان استاندارد ACE در غلظتهای بالاتر مهار می‌شوند. گزارش گردیده که بتا- اندورفین، مت- انکفالین و لو- انکفالین به‌طور رقابتی ACE ریه سگ را مهار می‌کنند [۱۲]. هموفین پپتیدی است که از هموگلوبین مشتق می‌شود و به گیرنده‌های اپیوییدی تمایل دارد دارای خاصیت مهارکنندگی ACE است [۱۳]. همچنین از ارتباط بین سیستم اپیوییدی و رنین آنژیوتانسین و بالاخص ACE می‌توان به اثرات ضددردی مهارکنندگان ACE اشاره کرد [۱٤]. نشان داده شده است که تعدادی از ترکیبات اپیوییدی از جمله مرفین قادر به افت فشار خون هستند [۱٥]. در مطالعه‌ای نشان داده شد که فعالیت ACE در هموژنیزه مغز و ریه موش‌های

سالم و بدون دریافت دارو در حضور M $^{-3}$۱۰ × ۳ مرفین و نالوکسان مهار می‌شود [۱۶،۱۷].

همان‌طور که ملاحظه می‌شود از روش اندازه‌گیری میزان آزاد شدن HHL برای تعیین میزان فعالیت آنزیم ACE موجود در مایع هموژنیزه استفاده شده است که این آزاد شدن می‌تواند توسط آنزیم‌های دیگر موجود در محیط نیز باشد. بنابراین جهت تایید این اثرات بهتر است که فعالیت ACE در حضور ACE خالص، مرفین و نالوکسان صورت گیرد تا نتیجه تایید گردد. زیرا در محیط هموژنیزه مورد مطالعه آنزیم‌های دیگری از قبیل کاتپسین D نیز وجود دارند که ممکن است در هیدرولیز سوبسترا موثر باشند و جهت تأکید نقش مهاری ACE توسط این مخدرها لازم است تا در حضور آنزیم خالص این مطالعه صورت گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد مخدر مورد استفاده در این تحقیق طبق مجوز معاونت غذا و دارو به شماره ۵/۱۱۲/۳۹۷۹۸/د به تاریخ ۱۳۸۰/۱۲/۲۱ از شرکت تماد تهیه گردید.

- اندازه‌گیری فعالیت ACE (Angiotensin Converting Enzyme)

فعالیت ACE با استفاده از سوبسترای هیپوریل- ال - هیستیدیل - ال - لوسین و به‌وسیله دستگاه HPLC بر اساس روش شرح داده شده [۱۷،۱۸]، با تغییراتی برای انجام واکنش در شرایط میکرو سنجیده شد.

واکنش آنزیمی طبق معادلهٔ زیر صورت می‌گیرد.

ACE

Hippuryl -L- Histidyl -L- Leucine ----------> Hippuric acid + L-Histidyl- L-Leucine

- ساخت داروها (مهارکننده‌ها)

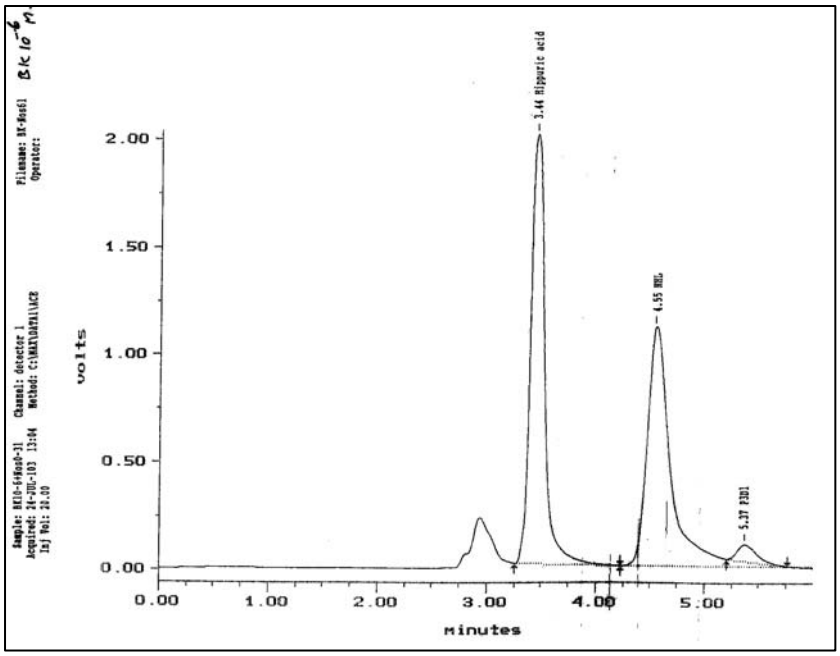
غلظت ۱ میلی‌مولار از مرفین، کدیین، نوسکاپین، برادی‌کینین، پاپاورین، نالوکسان، تبایین و کاپتوپریل در بافر Hepes آماده گردید. البته به علت سه برابر شدن رقت محلول آزمایش غلظت ۳ میلی مولار تهیه شد. سپس به روش رقیق‌سازی سریال غلظت‌های $^{-3}$۱۰، $^{-4}$۱۰، $^{-5}$۱۰، $^{-6}$۱۰ و $^{-7}$۱۰ مولار از هریک از مهارکنندگان ساخته شد. برای بررسی عصاره به ۰/۵ گرم از عصاره ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه درون اولتراسوند قرار می‌دهیم. محلول رویی را صاف و به روش Freez drying حلال آب را جدا می‌کنیم. سپس ۱ میلی‌گرم از آن را در یک میلی‌لیتر بافر Hepes حل نموده تا غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره به‌دست آید. این عصاره در محیط واکنش غلظتی معادل ۰/۳ گرم در میلی‌لیتر خواهد داشت. در مورد عصاره الکلی نیز همانند عصاره آبی عمل می‌کنیم.

ابتدا ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیم را درون چاهک‌های میکروپلیت می‌ریزیم. سپس ۲۵ میکرولیتر محلول مهارکننده را اضافه و به مدت ۵ دقیقه انکوبه می‌نماییم. آنگاه ۲۵ میکرولیتر بافر حاوی سوبسترا را به آن اضافه می‌کنیم. هنگام اضافه کردن سوبسترا کرنومتر را روشن کرده و بعد از خاتمه زمان انکوباسیون (معمولاً ۳۰ دقیقه) ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به آن اضافه می‌نماییم. برای انکوباسیون میکروپلیت از دستگاه لرزاننده میکروپلیت که در گروه ساخته شد استفاده گردید.

استاندارد مورد استفاده اسید هیپوریک (استاندارد خارجی) بود که به همان طریق نمونه‌ها تهیه می‌گردید، یعنی ۵۰µl بافر Hepes + ۲۵µl استاندارد و µl ۵۰ محلول متوقف‌کننده.

دستگاه HPLC مورد استفاده متعلق به شرکت Waters و شامل پمپ 600E، شناساگر UV-Visible مدل 486، و نرم‌افزار Maxima 820 برای محاسبه و انتگراسیون پیک‌ها است. ستون مورد استفاده µBondapak$^{®}$C$_{18}$ به ابعاد ۳۰۰ × ٤٦ میلی‌متر و قطر ذرات ۱۰ میکرون است. ۲۰ میکرولیتر از حاصل انکوباسیون را به دستگاه تزریق می‌کنیم. هر نمونه ۲

بار تزریق می‌شود. فاز متحرک (مخلوط ۱:۱ از KH_2PO_4 ۱۰ میلی مولار و متانول با pH =۳ که با صافی غشایی ۰/٤٥ میکرون صاف گردیده است) با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه جریان دارد و کل زمان کروماتوگرام ٦ دقیقه است. پیک‌ها در طول موج ۲۲۸ نانومتر و ۱ =Aufs ردیابی می‌شود. کروماتوگرام در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. کروماتوگرام نمونه‌های انکوبه شده متشکل است از پیک محصول (اسید هیپوریک) با زمان بازداری ۳/٤٤ دقیقه و پیک سوبسترای تجزیه نشده (هیپوریل هیستیدیل لوسین) با زمان بازداری ٤/٥٥ دقیقه که در شکل نشان داده شده است. دو پیک از یکدیگر به خوبی فاصله دارند و پیک مزاحمی دیده نمی‌شود. همچنین کل زمان کروماتوگرام (٦ دقیقه) کوتاه و با صرفه است.



شکل شماره ۱- کروماتوگرام اسید هیپوریک (محصول تولید شده از فعالیت ACE بر سوبسترا)

نتایج

اندازه گیری فعالیت ACE

همان‌طور که در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شد، انکوباسیون آنزیم ACE با سوبسترای هیپوریل-ال- هیستیدیل- ال- لوسین باعث تولید محصولی به‌نام اسید هیپوریک می‌شود. این ماده به کمک HPLC از سوبسترای واکنش به‌خوبی جدا شده (شکل شماره ۱) و در طول موج ۲۲۸ نانومتر جذب خوبی دارد. بر اساس سطح زیر منحنی غلظت‌های مختلف اسید هیپوریک (به عنوان استاندارد خارجی)، میزان اسیدهیپوریک تولید شده در واکنش آنزیمی را محاسبه کرده و فعالیت آنزیم را به‌دست می‌آوریم. روی همین اصل ابتدا منحنی استاندارد (کالیبراسیون) اسید هیپوریک را با تزریق غلظت‌های مختلف اسید هیپوریک به دستگاه HPLC رسم می‌نماییم. معادله خط رگرسیون و ضریب رگرسیون (r^2 = ۰/۹۹۹) در شکل نشان داده شده است. حداقل میزان قابل سنجش اسیدهیپوریک ۵۰ پیکومول است.

اثر داروها بر فعالیت آنزیم ACE

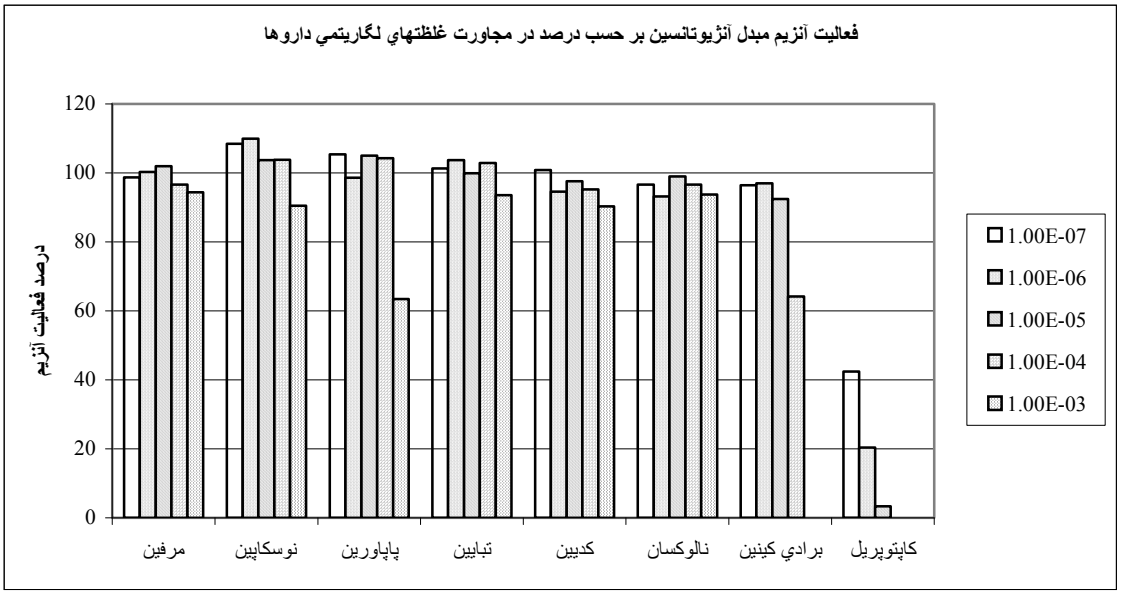
این اثرات در جدول شماره ۱ و شکل شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود پاپاورین در غلظت ۱ میلی‌مولار اثرات مهارکنندگی قابل توجهی دارد و با بررسی‌های به عمل آمده و استفاده از منحنی میکائلیس منتن با استفاده از برازنده‌ترین خم میزان K_m و V_{max} به‌ترتیب نسبت به نمونه کنترل افزایش و کاهش یافت که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

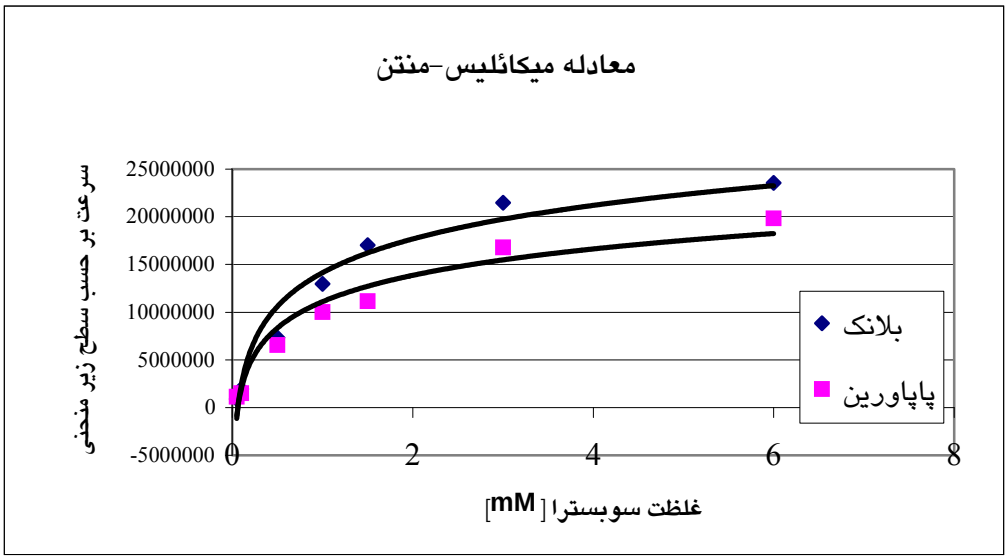
ACE به‌خاطر سوبستراهای مخصوص و زیادی که دارد در دیگر فرآیندهای فیزیولوژی از جمله ایمنی، تولیدمثل و متابولیسم پپتیدهای عصبی و همچنین در پروسه‌های پاتوفیزیولوژی نقش دارد [۱۹،۲۰،۲۱].

جدول شماره ۱- درصد فعالیت آنزیم ACE توسط غلظت‌های مختلف آلکالوییدها

آلکالوییدها / غلظت	مرفین	نوسکاپین	پاپاورین	تبایین	کدیین	نالوکسان	برادی‌کینین	کاپتوپریل
۱×۱۰^{-۷}	۹۸/۷۴۰۶۶	۱۰۸/۴۲۱۷۰	۱۰۵/۴۰۲۷۰	۱۰۱/۳۳۷۸۰	۱۰۰/۸۶۶۶۰	۹۶/۶۷۲۰۴	۹۶/۴۳۱۶۳	۴۲/۴۴۰۱۲
۱×۱۰^{-۶}	۱۰۰/۲۵۲۵۰	۱۰۹/۹۶۸۶۰	۹۸/۵۵۹۵۲	۱۰۳/۶۹۴۰۰	۹۴/۵۸۷۱۸	۹۳/۲۳۰۱۵	۹۷/۰۳۶۴۸	۲۰/۳۲۸۹۶
۱×۱۰^{-۵}	۱۰۱/۹۸۰۶۰	۱۰۳/۷۰۲۱۰	۱۰۵/۰۲۵۱۰	۹۹/۸۹۶۵۷	۹۷/۶۰۸۰۳	۹۹/۰۱۶۱۳	۹۲/۵۰۵۴۴	۳/۳۲۲۷۳
۱×۱۰^{-۴}	۹۶/۶۷۲۷۳	۱۰۳/۸۳۵۲۰	۱۰۴/۲۷۱۱۰	۱۰۲/۹۲۶۴۰	۹۵/۲۳۴۳۴	۹۶/۶۴۷۶۶	۶۴/۱۹۷۴۸	۰
۱×۱۰^{-۳}	۹۴/۳۹۹۸۳	۹۰/۴۷۴۰۶	۶۳/۴۵۴۴۷	۹۳/۵۷۱۱۴	۹۰/۳۶۵۰۲	۹۳/۷۴۳۱۸	۰	۰



شکل شماره ۲- درصد فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین در حضور غلظت‌های مختلف آلکالوییدهای خشخاش



شکل شماره ۳- معادله میکائلیس منتن واکنش آنزیم- سوبسترا در حضور و عدم حضور پاپاورین

ACE گلیکوپروتئینی است در سطح سلول که قسمت اعظم آن از جمله جایگاه فعال آن به سمت خارج سلول قرار گرفته است. یعنی به‌صورت یک اکتوآنزیم است. ACE از بیشتر بافت‌های پستانداران خالص شده است و دو نوع ایزوزیم برای آن شناسایی شده است. نوع بزرگتر (۱۸۰-۱۵۰ کیلو دالتون) در تمام بدن وجود دارد که بیشترین غلظت آن در ریه‌ها و کلیه‌ها است [۸]. این شکل از ACE به نوع اندوتلیومی مشهور است. ایزوزیم کوچکتر ACE با وزن ۱۰۰-۹۰ کیلو دالتون در بیضه‌ها یافت شده است (ACE نوع ژرمینال) [۲۲].

جالب توجه‌ترین مشخصه ACE اندوتلیال وجود تشابه زیاد بین دو قسمت آن است [۷]. این امر مخصوصاً در اسید آمینه‌های حیاتی جایگاه فعال و محل اتصال به اتم روی (His- Glu- X-X-His) که در هر دو قسمت حفظ شده است مشاهده می‌گردد. بر خلاف آن ACE ژرمینال تنها یک جایگاه فعال داشته که مطابق با قسمت انتهای کربوکسی ACE اندوتلیال است [۲۳]. بنابراین شکل اندوتلیالی ACE ناشی از دو برابر شدن ژن اجدادی بوده و ایجاب می‌کند که ACE اندوتلیال دو جایگاه فعال کارا داشته باشد. در حالی که شکل ژرمینال دو برابر ژن اجدادی نمی‌باشد. ACE اندوتلیال در جایگاه فعال خود اتم روی دارد که برای فعالیت آنزیم ضروری است. هر یک از دو قسمت مولکول ACE از توالی‌های کوتاهی مشابه با دیگر متالوپروتئازهای متصل به اتم روی (ترمولیزین، اندوپپتیداز ۲٤/۱۱ و کلاژناز) تشکیل شده است [۲٤]. ولی صرفاً از روی آنالیز توالی‌ها نمی‌توان نتیجه گرفت که یک یا هر دو جایگاه فعال کارا هستند [۲٤]. هردو جایگاه فعال قادر هستند تا آنژیوتانسین I و برادی کینین را مستقل از یکدیگر و به‌طور تجمعی (additive) هیدرولیز نمایند. با این حال تفاوت‌هایی در پارامترهای کاتالیتیکی و نیاز به یون کلر در بین آنها مشاهده می‌شود که نشان‌دهندهٔ تفاوت‌های مهم فیزیولوژیکی و ساختمانی بین دو

جایگاه است. سوالی که اینجا مطرح می‌شود این‌است که آیا ACE یک آنزیم دو کاره است؟ آنزیم‌های دو کاره دارای دو جایگاه فعال هستند که ناشی از دوبرابر شدن ژن اجدادیشان است. اما در همان حال این دو جایگاه فعال تشابه توالی پایینی داشته و یک اختلاف واضح در سوبسترای اختصاصی دارند. پیشنهاد شده است که قسمت انتهای آمینی دارای سوبستراهای متفاوتی نسبت به قسمت انتهای کربوکسی است، گر چه سوبسترای اختصاصی برای آن پیدا نشده است. این پیشنهاد به خاطر تفاوت در پارامترهای کاتالیتیکی حداقل یک سوبسترا (HHL) و اختلاف حساسیت به مهارکنندگان و یون کلر است [۲۵،۲۶]. مطالعات اولیه نشان داد که هر دو جایگاه فعال قادر به شکستن مادۀ P هستند، اگر چه ممکن است در محیط برون‌تن تفاوت‌هایی در شکستن دیگر سوبستراها (LHRH) وجود داشته باشد. LHRH توسط ACE از قسمت انتهای آمینی شکسته می‌شود [۲۷]. گزارش‌های جدید نشان داده‌اند که فقط آنزیم اندوتلیالی و نه آنزیم ژرمینال قادر به شکستن قسمت آمینی LHRH است و این خود نشانگر دخیل بودن جایگاه فعال قسمت آمینی است [۲۸]. برادی کینین (BK) توسط هر دو قسمت به راحتی شکسته شده و پارامترهای آنزیمی برای هر دو جایگاه فعال خوب است. بعد از مهار آنزیم ACE مقادیر کینین پلاسمایی افزایش می‌یابند [۲۹]. مطالعات بیشتری در جریان است تا اختصاصی بودن سوبسترا را برای هر کدام از جایگاه‌های فعال در آنزیم‌های تکه شده و همچنین در آنزیم‌های کامل نشان داده و عملکرد اختصاصی هر کدام از این مکان‌های فعال در مولکول‌های ACE را مشخص نماید [۲٤]. مشخص شده ACE دارای دو جایگاه فعال بوده که از نظر ساختمانی بسیار مشابه ولی کاملاً یکسان نیستند [۲۵].

در بین مهارکنندگان آنزیم ACE نیز در جلوگیری از تخریبBK و ماده P (SP) نیز اختلاف وجود دارد. در حالی که این داروها تماماً در یک سطح ACE را مهار می‌کنند ولی در جلوگیری از تجزیۀ BK و SP ایمیداپریل نسبت به کاپتوپریل و انالاپریل ضعیف‌تر عمل می‌کند. در بالین هم مشاهده می‌شود که ایجاد سرفه خشک توسط ایمیداپریل نسبت به دو داروی دیگر کمتر است [۳۰].

هومورفین که نتیجه اثر آنزیم‌ها بر روی هموگلوبین گاو می‌باشد دارای تمایل به گیرنده‌های اپیوییدی و در قسمت انتهایی که همان Tyr- Pro است و در بتا- کازومورفین نیز وجود دارد دارای خاصیت مهارکنندگی ACE است [۱۳]. اخیراً نیز قسمتی از هموگلوبین که خاصیت اپیوییدی دارد از غدۀ هیپوفیز انسان جدا شده است [۳۱]. این پپتید (Lvv- hemorphin- 6) مطابق با قطعۀ مکان ٤۰-۳۲ زنجیرۀ بتا هموگلوبین انسانی می‌باشد. اثر فیزیولوژی آن تاکنون شناخته نشده است. ولی با این‌حال به مقدار زیاد در غدۀ هیپوفیز وجود دارد. احتمال می‌رود که این قطعه در جریان خون نیز وجود داشته باشد. از خصوصیات مهارکنندگان آنزیم ACE این است که دارای یک گروه پرولین در انتهای کربوکسی هستند و بتا کازومورفین نیز دارای گروه پرولین است. در مطالعه‌ای که صورت گرفت نشان داده شد که هومورفین-٦ و Lvv-hemorphin-6 باعث مهار آنزیم ACE می‌شود و در برابر عصارۀ بافت‌ها که حاوی ACE نیز است مقاوم می‌باشد [۳۲]. بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک مهارکنندۀ طبیعی ACE نام برد.

در مطالعه‌ای اثر ضددردی مهارکنندگان آنزیم ACE و گیرندۀ آنژیوتانسین II در موش سوری بررسی شد. موش‌های سوری به دو گروه

دریافت‌کننده تک‌دوز و دوزهای مکرر (۷ روز) از داروهای زیر تقسیم شدند: اسپیراپریل (mg/kg ۵)، تراندولاپریل (mg/kg ۵)، انالاپریل (mg/kg ۳۰)، لوسارتان (mg/kg ۱۰) و مادهٔ حامل (پایه). تاخیر در پرش به‌طور معنی‌داری در گروه دریافت‌کنندهٔ دوزهای مکرر اسپیراپریل، تراندولاپریل و لوسارتان مشاهده شد در حالی که گروه انالاپریل تاثیری نداشت. از آنجایی‌که انالاپریل جذب مغزی ندارد این اثر در مورد آن قابل مشاهده نبود [۱۴].

فعالیت ACE در مغز و ریه موش‌هایی که ۱۰ میلی گرم مرفین و یا نالوکسان را دریافت کردند به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل بود. تجویز نالوکسان به همراه مرفین در حالی باعث آنتاگونیزه کردن اثر مهاری مرفین بر روی ACE ریه و مغز شد که خود نالوکسان اثر مهار بر روی این آنزیم داشت. فعالیت ACE در هموژنیزه مغز و ریه موش‌های سالم و بدون دریافت دارو در حضور M^{-3} ۱۰ × ۳ مرفین و نالوکسان مهار شد. ترکیب نالوکسان با مرفین باعث تشدید مهار شد که مخالف با اثرات درون‌تن بود. غلظت‌های داروها در محیط انکوباسیون طوری انتخاب شدند که تا حدودی معادل غلظت‌هایشان در قسمت فعال باشند.

اثرات آنتاگونیستی نالوکسان به عنوان یک آنتاگونیست شناخته شده اپیوییدی بر روی اثرات مهارکنندگی ACE مرفین در مغز دور از انتظار نیست. چنین اثری در ریه نیز دیده می‌شود. اما اثر تقویت‌کنندگی نالوکسان بر روی اثرات مهارکنندگی ACE مرفین در مغز و ریه جدا شده (برون تن) موش‌ها مؤید این نکته است که اثرات آنتاگونیستی مشاهده شده در محیط درون تن یک اثر مستقیم نمی‌باشد. نتایج این مطالعات تا حدودی اثرات مهارکنندگی نالوکسان و مرفین را بر روی رفتار آب‌نوشی از طریق مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین بیان می‌کند. بنابراین اثر خوب نالوکسان در درمان شوک نیز شاید قسمتی از طریق مهار آنزیم ACE باشد [۱۷]. در مطالعه‌ای دیگر اثرات افت فشار خون مصرف بیش از حد کاپتوپریل با نالوکسان برگشت پیدا کرد که نشان‌دهندهٔ تاثیر همودینامیک کاپتوپریل و دیگر مهارکنندگان ACE از طریق سیستم اپیوییدی درون‌زاد است [۱۶]. نالوکسان به عنوان آنتاگونیست اپیوییدها می‌تواند باعث مهار رفتار آب‌نوشی شود که احتمالاً این کار را از طریق مهار گیرنده‌های اپیوییدی انجام می‌دهند [۱۷]. علی‌رغم این فرضیه، اپیوییدهای درون‌زاد و مرفین که در درمان شوک منع مصرف دارند و این به‌خاطر اثر گشادکنندگی عروق محیطی و اثر مهاری بر روی مرکز تنفسی است نیز می‌توانند رفتار نوشیدن را مهار کنند. علاوه بر این نشان داده شده که مرفین می‌تواند اثرات ضدتشنگی نالوکسان را به طریق وابسته به دوز و زمان افزایش دهد. از طرفی اثرات مفید نالوکسان در درمان شوک روز به روز تقویت می‌شود. همچنین مهار آنزیم ACE توسط کاپتوپریل نیز باعث مهار رفتار آب‌نوشی می‌گردد و اثرات مفیدی نیز در درمان شوک هموراژیک دارد. با توجه به اطلاعات داده شده جالب است که بدانیم مرفین و یا نالوکسان در محیط درون‌تن و برون‌تن بر روی ACE مغز و ریه چه اثری دارند.

دو سیستم هورمونی پپتیدی مهم که نقش مخالف یکدیگر را در تنظیم الکترولیت‌ها و فشار خون بازی می‌کنند و عدم تعادل بین آنها باعث بیماری‌های قلبی ـ عروقی و حفظ تعادل آب و الکترولیت‌ها می‌شود عبارتند از: ۱) سیستم رنین – آنژیوتانسین ۲) سیستم هورمونی عامل ناتریورتیک دهلیزی (ANF)

نقش حیاتی سیستم اول در احتباس سدیم و انقباض عروق از طریق کاربرد آنزیم‌های مهارکنندهٔ ACE به اثبات رسیده است. داروهای مهارکنندهٔ این آنزیم مانع تشکیل آنژیوتانسین II می‌شوند که این ماده یک منقبض‌کنندهٔ عروقی، ضد ادرار و پپتید ضد دفع سدیم است. این داروها باعث کاهش فشار خون و ترشح آلدوسترون شده و کاربرد وسیعی در درمان فشار خون و نارسایی قلبی دارند. سیستم ANF پپتیدی که توسط قلب به درون جریان خون رانده می‌شود باعث کاهش فشار خون، افزایش دفع سدیم و آب و کاهش غلظت پلاسمایی رنین- آلدوسترون می‌شود. نقش انکفالینازها که از دستهٔ متالوپپتیدازها هستند در بی‌اثرسازی ANF درون‌زاد توسط مهارکنندگان آنزیم اثبات شده است. این داروها باعث افزایش میزان هورمون در پلاسما افراد سالم و با نارسایی قلبی یا سیروز شده است. همچنین باعث القای دیورز، ناتریورز و دفع ادراری cGMP می‌شود و می‌تواند اثر ضدفشارخون داشته باشد.

از آنجایی‌که سیستم مرفین آنژیوتانسین و اپیوییدها مخالف یکدیگر عمل می‌کنند بنابراین ترکیباتی که علاوه بر خاصیت اپیوییدی دارای خاصیت مهارکنندگی آنزیم‌های ACE و بالطبع مهار سیستم RAS باشند از اهمیت ویژه‌ای در درمان برخوردار خواهند شد. لذا برهمین اساس از آلکالوییدهای گیاه خشخاش که برخی عوام مصرف آن را برای کاهش فشارخون توصیه می‌کنند به منظور بررسی اثر احتمالی مهارکنندگی ACE استفاده نمودیم.

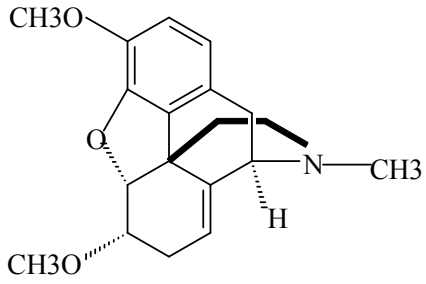
تریاک خمیری است قابض و با طعم تلخ و بوی اختصاصی که یکنواختی متغیری دارد. ۱۰ الی ۱۵ درصد آب دارد و مقادیر زیادی شکر (۲۰درصد) و اسیدهای آلی مثل لاکتیک، فوماریک و اگزالاستیک اسید و بیشتر اسید مکونیک (بیش از ۵درصد) دارد. این اسید آخری یکی از مارکرهای شناسایی خشخاش است. جزء اصلی آن حاوی ۱۰ الی ۲۰ درصد آلکالوییید می‌باشد که مهمترین آنها به شرح زیر هستند:

آلکالوییدهای مرفینان: مرفین مهمترین آلکالوییید خانوادهٔ مرفینان فراوانترین آلکالوییید موجود در تریاک است (۱۲-۱۰درصد). شکل آن از نظر ظاهری یک پنج حلقه‌ای با ۵ مرکز غیرمتقارن است و تنها فرم فعال آن که در طبیعت یافت می‌شود ایزومری چپ گرد 5R, 6S, 9R, 13S, 14R است. حضور گروه هیدروکسیل بر روی حلقهٔ فنلی در موقعیت C_3 باعث حلالیت آن می‌شود.

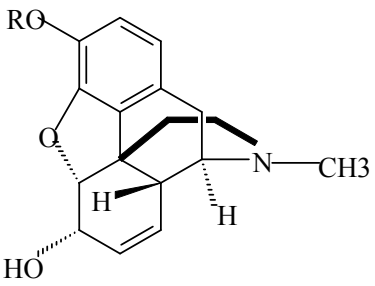
آلکالوییدهای دیگری که در گروه مرفینان‌ها جا می‌گیرند و در تریاک وجود دارند عبارتند از: کدیین (۵-۲/۵ درصد) و ۳-متیل‌اترمرفین یا تبایین (کمتر از ۱ درصد)

آلکالوییدهای دیگر

آلکالوییید مهم دیگر تریاک که از نظر وزنی فراوان

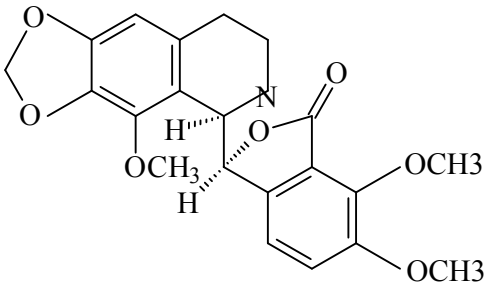


تبایین

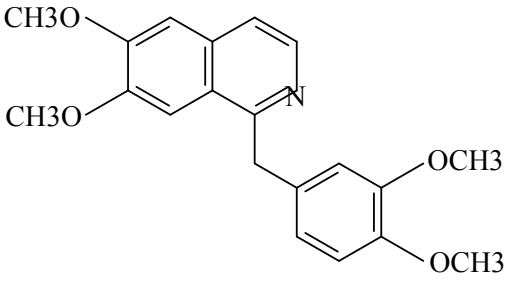


مرفین :R= H

کدیین :R= CH_3



نوسکاپین



پاپاورین

است (-) نوسکاپین می‌باشد که به آن نارکوتین هم می‌گویند. مقادیر آن از ۲ الی ۱۰ درصد متغیر است. باز بسیار ضعیفی است و نمک‌های آن حلالیت کمی در آب دارند. به‌خاطر حلقهٔ لاکتونی موجود در آن نسبت به pH های قلیایی حساس است.

مشتق ایزوکینولونی دیگری که در تریاک یافت می‌شود پاپاورین نام دارد.

خانوادهٔ مرفین اثر خود را از طریق گیرنده‌های اپیوییدی در مغز و محیط اعمال می‌کنند. نوسکاپین که از خانوادهٔ مرفینان مشتق نشده است خاصیت اعتیادآوری ندارد، دارای خاصیت ضددردی نیست و همچنین باعث ضعف سیستم تنفسی نیز نمی‌شود. این ماده یک ضدسرفه اختصاصی است که اثر خود را از طریق مرکزی و محیطی اعمال می‌کند.

با توجه به گزارش مهار آنزیم ACE توسط مرفین و نالوکسان آزمایش به گونه‌ای صورت گرفت تا فعالیت ACE خالص به‌دست آمده از ریهٔ خرگوش (که در مطالعات مهارکنندگان آنزیم ACE استفاده می‌شود) در حضور غلظت‌های مختلف آلکالوییدهای مهم خشخاش بررسی شوند. همچنین عصارهٔ آبی و اتانولی خشخاش نیز جهت تایید مصرف سنتی آن در پایین آوردن فشار خون از طریق مکانیسم مهار آنزیم ACE بررسی گردید. آلکالوییدهای خالص با رقت‌های 10^{-7} الی 10^{-3} مولار تهیه شدند و فعالیت آنزیم ACE در حضور و عدم حضور (بلانک) این موارد بررسی شوند. همچنین جهت عدم تداخل پیک‌های مربوط به این مواد با پیک‌های اسیدهیپوریک بررسی‌های لازم و تغییرات مناسب اعمال گردید تا

هیچ تداخلی در این زمینه رخ ندهد. برخلاف گزارش‌های به‌دست آمده که نشان‌دهندهٔ مهار آنزیم ACE توسط نالوکسان و مرفین در محیط برون‌تن بافت هموژنیزه مغز بود، آنزیم خالص ACE توسط این مواد مهار نگردید. این امر می‌تواند نتیجه حضور آنزیم‌های دیگر موجود در بافت هموژنیزه باشد که اشتباهاً به صورت وجود آنزیم ACE تفسیر گردیده است. حتی برخلاف گزارش مذکور مخلوط دو ماده نالوکسان و مرفین چنین اثری را نداشتند [۱۷].

از طرف دیگر تنها آلکالوییدی که در غلظت ۱ میلی‌مولار قادر به مهار ٤٠ درصد آنزیم است آلکالویید پاپاورین بود. با این حال ساختمان شیمیایی این گروه از آلکالوییدهای خشخاش می‌تواند با تغییراتی به عنوان یک مهارکنندهٔ جدید قابل بررسی باشد که پیشنهاد می‌شود در آینده تحقیقات مفصل‌تری در این زمینه صورت گیرد.

همچنین برادی کینین که یکی از سوبستراهای آنزیم ACE محسوب می‌شود در رقابت با سوبسترای بکار رفته در این آزمایش به عنوان یک مهارکننده عمل می‌کند و می‌تواند در غلظت‌های $۱۰^{-٤}$ و $۱۰^{-۳}$ مولار آنزیم را به ترتیب به میزان ٦٠ و ۱۰۰ درصد مهار نماید. در تمامی این مشاهدات از کاپتوپریل به عنوان شاهد استفاده گردید.

در بررسی اثر عصارهٔ اتانولی و آبی خشخاش آنچه به‌دست آمد نشانگر مهار ۲۵ درصدی عصاره آبی و مهار ٤۳ درصدی عصارهٔ اتانولی بود. البته با توجه به استانداردهای موجود در زمینهٔ مطالعه مهارکنندگان گیاهی آنزیم، چنانچه میزان مهار عصارهٔ ۱mg/ml کمتر از ۵۰ درصد باشد قابل توجه است و احتیاج به مطالعات مفصل‌تر دارد.

در انتها پیشنهاد می‌گردد ترکیبات خانوادهٔ پاپاورین مشتق‌سازی شده و به عنوان مهارکنندهٔ ACE بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پروژه تحقیقاتی با عنوان بررسی اثر آلکالوییدهای گیاه *Papaver* spp. بر فعالیت آنزیم ACE مصوب مرکز ملی تحقیقات بود که بدین‌وسیله از مساعدت مالی آن مرکز تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Edwards CRW and Padfield PL. Angiotensin cconverting enzyme inhibitors: past, present and bright future. *Lancet* 1985; i: 30-4.

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

3. Gavras H and Gavras I. Angiotensin converting enzyme inhibitors; Properties and side effects. *Hypertension* 1988; 11: 37-41.

4. Cohen ML. Synthetic and fermentation derived angiotensin converting enzyme inhibitors. *A. Rev. Pharmac. Toxic.* 1985; 25: 307-23.

5. Ondetti MA. Structural relationships of angiotensin convening enzyme inhibitors to pharmacologic activity. *Circulation.* 1988; 77: I74-8.

6. Unger T, Gohlke P and Gruber MG. Converting enzyme inhibitors. In: Ganten D and Mulrow PS, (EDS). *Pharmacology of Anti-hypertensive Therapeutics.* Springer. Berlin. 1990, pp: 379 - 481.

7. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G and Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by

molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85: 9386-90.

8. Patchett AA and Cordes EH. The design and properties of N-carboxyalkyldipeptide inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Adv. Enzym.* 1985; 57:l-84.

9. Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF and Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of ACE, Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 1977; 16: 5484-91.

10. Jongeneel CV, Bouvier J and Bairoch A. A unique signature identifies a family of zinc dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* 1989; 242: 211-4.

11. Vallee BL and Auld DS. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 1990; 29: 5647-59.

12. Sander GE, Lorenz PE, Verma PS. Inhibition of the partially purified canine lung angiotensin I converting enzyme by opioid peptides. *Biochem. Pharmacol*. 1980; 29: 3115-8.

13. Lantz I, Nyberg F, Terenius L. Molecular heterogeneity of angiotensin converting enzyme in human cerebrospinal fluid. *Biochem. Int.* 1991; 23: 941-8

14. Takai S, Song K, Tanaka T, Okunishi H, Miyazaki M. Antinociceptive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II receptor antagonist in mice. *Life Sci.* 1996; 59: 331-6.

15. Flacke JW, Flacke WE, Bloor BC, Van Etten AP, Kripke BJ. Histamine release by four narcotics: a double-blind study in humans. *Anesth. Analg*. 1987; 66: 723-30.

16. Varon J, Duncan SR. Naloxone reversal of hypotension due to captopril overdose. *Ann. Emerg. Med.* 1991; 20: 1125-7

17. Horiuchi M, Fujimura K, Trashima T, and Iso T. Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*. 1982; 233: 123-30.

18. Schnaith E, Beyrau R, Buckner B, Klein RM and Rick W. Optimized determination of angiotensin I-converting enzyme activity with hippuryl-L-histidyl-L-leucine as substrate. *Clin. Chim. Acta.* 1994; 227: 145-58.

19. Ehlers MRW and Riordan SF. Angiotensin converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 1989; 28: 5311-5318.

20. Kenny AS and Hooper NM. Peptidases involved in the metabolism of bioactive peptides. In: Henricksen JH (Eds). *Degradation of Bioactive Substances. Physiology and Pathophysiology.* CRC Press. Florida. 1991.

21. Erdos EG and Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab. Invest.* 1987*;* 56: 345-8.

22. Velletri PA. Testicular angiotensin I-converting enzyme. *Life Sci.* 1985; 36: 1597-608.

23. Lattion AL, Soubrier F, Allegrini J, Hubert C, Corvol P and Alhenc-Gelas F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett.* 1989; 251: 99-104.

24. Costerousse O, Jaspard E, Wei L, Corvol P and Alhenc-Gelas F. The angiotensin I-converting enzyme (Kininase II): molecular organisation and regulation of its expression in humans. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 1992; 20: S10-S15.

25. Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, and Clauser E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 9002-8.

26. Wei L, Clauser E, Alhene-Gelas F and Corvol P. The two homologues domain of angiotensin-converting enzyme react differently with competitive inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 13398.

27. Skidgel RA, Defendini R, Erdos EG. Angiotensin I converting enzyme and its role in neuropeptide metabolism. In: Turner AJ (Eds).

Neuropeptides and their peptidases. Ellis-Horwood. England. 1987, pp: 165-82.

28. Ehlers MRW and Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme: zinc- and inhibitor-binding stiochiometries of the somatic and testis isozymes. *Biochemistry* 1991; 30:7118-26.

29. Pellacani A, Brunner HR, Nussberger J. Plasma kinins increase after angiotensin-converting enzyme inhibition in human subjects. *Clin. Sci.* 1994; 87: 567-74.

30. Murata T, Matsumoto Y, Kashida T, Kaminuma O, Naito K, Ikezawa K, Tsuzurahara K. Difference among angiotensin-converting enzyme inhibitors in potentiating effects on bradykinin-induced microvascular leakage in guinea pig airways. *Jpn. J. Pharmacol*. 1995**;** 69: 111-8.

31. Glamsta EL, Marklund A, Hellman U, Wernstedt C, Terenius L, Nyberg F. Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland. *Regul. Pept*. 1991; 34:169-79.

32. Lantz I, Glamsta EL, Talback L, Nyberg F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Lett*. 1991; 287: 39-41.