بررسی فعالیت ضد گلیکوزیلاسیونی عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر(*Gundelia tournefortii*) در آلبومین سرم گاوی: استراتژی برای کاهش عوارض مزمن دیابت

فریبا عزیزی مرادی و سیف الله بهرامی کیا*

ایران، خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۵

چکیده

گلیکه شدن غیرآنزیمی پروتئینها و تشکیل محصولات نهایی پیشرفته این فرآیند (AGEs) از عوامل دخیل در پاتوژنز عوارض مزمن دیابت می باشند. از آنجایی که این حوادث باعث تخریب کارکرد صحیح پروتئینها می شوند ترکیبات آنتی‌اکسیدان با منشأ گیاهی می تواند به عنوان یک راه درمانی برای جلوگیری از بروز این عوارض مزمن مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق اثرعصاره هیدروالکلی گیاه کنگر(*Gundelia tournefortii*) استان لرستان بر روی مهار فرآیند گلیکه شدن غیرآنزیمی آلبومین سرم گاوی (BSA) در مدلهای دیابتی بررسی شد. برای این منظور ابتدا محتوای فنول و فلاونویید عصاره هیدروالکلی تعیین شد. برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه از آزمون مهار تشکیل رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. سپس به منظور تشکیل AGEs، BSA در شرایط In Vitro به وسیله گلوکز، گلایکه شد و اثر عصاره هیدروالکلی گیاه بر فرآیند گلیکیشن با استفاده از آزمونهای مختلف اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که عصاره گیاه کنگر در یک رفتار وابسته به دز (۲۵-۴۰۰ µg/ml) دارای توانایی جمع کنندگی (Scavenging) رادیکالهای DPPH و فعالیت ضد گلیکیشن می باشد. علاوه بر این، عصاره هیدروالکلی، باعث مهار تولید رادیکالهای هیدروکسیل طی فرآیند اتواکسیداسیون قندها شد. با توجه به درگیر شدن واکنشهای اکسیداتیو درتولید AGEs تحت شرایط هیپرگلیسمیا و همچنین با توجه به محتوای بالای ترکیبات فنولی و فلاوونویدی (ترکیبات آنتی اکسیدانی) در عصاره هیدروالکلی، *G. tournefortii* احتمالاً از طریق خاصیت آنتی اکسیدانی قوی خود باعث مهار فرآیند گلیکیشن پروتئین می شود.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد گلیکوزیلاسیونی، محصولات انتهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته پروتئین، کنگر، دیابت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۶۱۴۰۸۲، پست الکترونیکی: Bahramikia.s@lu.ac.ir

مقدمه

دیابت مهمترین بیماری متابولیک انسان است که بیش از ۱۵۰ میلیون نفر در جهان و نزدیک به ۳ میلیون نفر در ایران به آن دچار هستند و موارد قابل توجهی از آنان ناشناخته باقی مانده است. دیابت از بیماریهای پرهزینه بوده و در بسیاری از کشورها در سنین ۷۰-۲۰ سالگی علت اصلی کوری و سر دسته علل قطع عضو و نارسایی مزمن کلیه محسوب می شود. از آنجا که درمان قطعی آن هنوز در بسیاری از موارد دست نیافتنی است، تنها با شناخت به موقع و مراقبتهای مناسب می‌توان شیوع و عوارض و پیامدهای ناشی از آن را به میزان چشمگیری کاهش داد (۲). هایپرگلیسمی به عنوان یک فاکتور سهیم در هردو نوع دیابت ۱ و ۲ عامل مهمی در ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد.

هایپرگلیسمی یا از طریق تولید مستقیم ROS و یا از طریق تغییر در تعادل اکسید-احیاء در استرس اکسیداتیو نقش دارد. تاکنون چندین مکانیسم مهم در ارتباط با این امر ارائه شده است که شامل: افزایش شار مسیر پلی ال، افزایش

تشکیل درون سلولی محصولات انتهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته(AGEs) ، فعال‌سازی پروتئین کینازC و تولید بیش از حد سوپراکسید توسط زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی می باشند (۱ و ۲).

قنددارشدن غیرآنزیمی پروتئینها و تشکیل محصولات انتهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته فاکتورهای مهم پاتوژنز عوارض مزمن دیابت هستد. واکنش غیرآنزیمی بین گروه آمینو پروتئینها و گروه کربونیل قندهای احیاء یا دیگر ترکیبات کربونیل به عنوان واکنش میلارد شناخته می‌شود (۱۷ و ۲۳). این واکنش به سه مرحله اساسی تقسیم می‌شود: اولیه، حدواسط و پایانی.

در مرحله اولیه، گلوکز(یا دیگر قندهای احیاء مثل فروکتوز، پنتوز، گالاکتوز، مانکوز، زایلولوز) با گروه آمینو آزاد پروتئینها برای تشکیل ترکیب ناپایدار باز شیف واکنش می‌دهد که تحت بازآرایی به محصول با ثبات تر شناخته شده به نام محصول آمادوری تبدیل می‌شود. در مرحله حدواسط، محصول آمادوری به انواعی از ترکیبات دی کربونیل فعال مثل گلی اکسال، متیل گلی اکسال و دئوکسی گلوکوزان ها از طریق دهیدراته شدن، اکسیداسیون و واکنشهای شیمیایی دیگر، تجزیه می‌شود. در مرحله پایانی گلیکوزیلاسیون، ترکیبات بازگشت ناپذیری به نام AGEs از طریق واکنشهای اکسیداسیون، دهیدراته شدن و حلقوی شدن تشکیل می‌شوند. AGEs ترکیبات زرد- قهوه ای، فلورسانس و نامحلول هستند که روی پروتئینهای با عمر طولانی تجمع می‌یابند و در نتیجه عملکرد فیزیولوژیکی آنها را مختل می‌کنند.

تشکیل درون سلولیAGEs توسط سه مکانیسم اصلی به سلولهای هدف آسیب می‌رساند (۲ و ۲۸) (شکل۲-۱) : اول، پروتئینهای درون سلولی تغییریافته توسطAGEs، عملکردشان تغییر می‌یابد. دوم، اجزای ماتریکس خارج سلولی تغییریافته به وسیله AGEs به طورغیرطبیعی با اجزای ماتریکسهای دیگر و اینتگرین های(گیرنده هایی برای پروتئین ماتریکس) روی سلول میانکنش می‌کنند. سوم، میانکنش لیگاند-RAGE باعث تولید ROS درون سلولی از طریق فعال‌سازی سیستم NADPH اکسیداز می‌گردد.

از طرفی دیگر، اتواکسیداسیون گلوکز تحت تأثیر انتقال یونهای فلزی می‌تواند منجر به تشکیل کتوآلدئید و H_2O_2 شود. کتوآلدئید ها می‌توانند با گروه آمین کتوایمین ها واکنش دهند که در نهایت این کتوایمین ها می‌توانند منجر به تشکیل AGEs شوند(۲۹). بنابراین رادیکالهای آزاد در تولید ترکیبات AGE و در بحث تخریب اکسیداتیو پروتئینها نقش دارند.

بر اساس این مکانیسمها، مهار تشکیل ترکیبات AGE می تواند به عنوان یک روش درمانی مفید برای کاهش عوارض مزمن دیابت مطرح باشد. یکی از استراتژهای ضدAGE استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان به خصوص با منشأ گیاهی است (۱۷ و ۱۹). گیاه کنگر با نام علمی *Gundelia tournefortii* L از خانواده Asteraceae است. در طب سنتی ترکیه از دانه خشک شده این گیاه برای درمان بیماری پیسی استفاده می شود، حال آنکه برگهای تازه آن ادرارآوراست. همچنین درکشور ترکیه به صورت سنتی، از ساقه آن برای درمان اسهال، درد معده، برونشیت، سنگ‌کلیه، آماس گردن و التهاب استفاده می شود (۲۱). در اردن نیز مردم محلی از گیاه کنگر برای درمان دیابت استفاده می کنند (۱۲). نتایج حاصل از یک پژوهش درایران نظریه طب سنتی در باره اثرات محافظتی هپاتوسیت واثرات مفید کنگردر درمان بیماریهای کبدی را تأیید می نماید (۱۵). در پژوهش دیگری در ترکیه نشان داده شده است که عصاره متانولی قسمتهای هوایی و دانه این گیاه خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی نسبت به آلفا توکوفرول دارد، علاوه بر این عصاره متانولی این گیاه دارای اثر مهاری بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز می باشد. پژوهش همچنین نشان داد که محتوی ترکیبات

پلی فنولی دانه گیاه بیشتر از قسمتهای هوایی آن است و در نتیجه خاصیت آنتی اکسیدانی دانه از سایر قسمتها بیشتر است (۷).

در این پژوهش ابتدا خاصیت آنتی اکسیدان گیاه کنگر لرستان بررسی شد و پس از تأیید خاصیت آنتی اکسیدانی، اثر عصاره اتانولی آن بر فرآیند گلایکه شدن غیرآنزیمی پروتئینها در شرایط in vitro بررسی شد.

مواد و روشها

جمع آوری گیاه کنگر: ساقه زیرزمینی گیاه کنگر در اردیبهشت ماه و خرداد ماه سال ۱۳۹۴ از شهرستان نورآباد (لرستان، ایران) جمع آوری گردید و توسط دکتر خدایاری(دانشگاه لرستان، ایران) شناسایی و با کد Lu120 در هرباریوم دانشگاه لرستان ثبت شد. ساقه های جمع آوری شده به منظور رفع آلودگی و گل ولای چسبیده به آنها شسته شده و در سایه به دور از نور آفتاب خشک گردید. پس از خشک شدن، گیاه آسیاب شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

آماده سازی عصاره هیدروالکلی کنگر: ۲۵۰ گرم گیاه پودر شده سه مرتبه توسط اتانول(۸۰درصد) به صورت تمام شب در دمای اتاق عصاره گیری شد. عصاره های به دست آمده باهم ترکیب شدند و با دستگاه روتاری تغلیظ شد تا حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسید و به این ترتیب عصاره هیدروالکلی حاصل گردید. عصاره تغلیظ شده به وسیله انکوباتور خشک شدند و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

تعیین مقدار کل فنول ها: محتوای کل ترکیبات فنولی در عصاره هیدروالکلی گیاه *Gundelia tournefortii* با معرف فولین- سیوکالتیو (FCR) مطابق روشهای منتشر شده تعیین شد (۲۴). نیم میلی لیتر از عصاره گیاه و گالیک اسید به عنوان استاندارد، با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتیو (رقیق شده با نسبت۱ به ۱۰) و به دنبال آن با ۲ میلی لیتر محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد مخلوط شد. پس از ۹۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. نتایج بر اساس میزان میلی گرم گالیک اسید معادل هر گرم از عصاره خشک شده بیان شد.

تعیین محتوای فلاونوییدها: محتوای کل فلاونوییدهای عصاره هیدروالکلی گیاه Gundelia tournefortii توسط روش کالریمتری توصیف شده در مقالات علمی سنجیده شد (۳۱). نیم میلی لیتر از هرنمونه گیاهی و کاتچین به عنوان استاندارد با ۲ میلی لیتر آب مقطر و به دنبال آن با ۰/۱۵ میلی لیتر محلول سدیم نیتریت ۱۵ درصد مخلوط گردید. پس از۶ دقیقه، ۰/۱۵ میلی لیتر محلول آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد اضافه شد. بعد از ۶ دقیقه، ۲ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۴ درصد و پس از آن بلافاصله ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد تا حجم محلول نهایی به ۵ میلی لیتر برسد. پس از ۱۵ دقیقه انکوبه کردن در دمای اتاق، جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر در مقابل بلانک (آب مقطر) خوانده شد. نتایج بر اساس میزان میلی گرم کاتچین معادل هر گرم از عصاره خشک شده بیان شد.

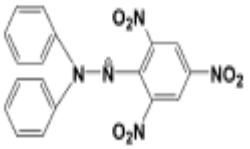
سنجش میزان فعالیت جمع آوری رادیکالهای DPPH: سنجش فعالیت جمع آوری رادیکالهای آزاد توسط عصاره هیدروالکلی بر اساس روش Blios صورت گرفت (۵). به این منظور یک میلی لیتر از غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی (۵۰-۲۰۰μg/ml) تهیه شد و به هرکدام یک میلی لیتر محلول DPPH (۰/۲ میلی مولار) که در اتانول حل شده بود افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه کاهش جذب نمونه ها به علت خاصیت پروتون دهندگی در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نمونه کنترل به جای عصاره، آب مقطر استفاده شد. درصد فعالیت جمع آوری رادیکالهای آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$R\% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

R% : درصد مهار

A_0: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر

A_1: جذب نمونه ها در ۵۱۷ نانومتر



DPPH

تعیین رادیکالهای هیدروکسیل تولید شده توسط اتواکسیداسیون گلوکز: درجهت بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بر روی جمع آوری رادیکالهای هیدروکسیل حاصل از اتواکسیداسیون قند، از روش Hunt و همکارانش استفاده شد (۱۴). به طور خلاصه، مخلوطی شامل سدیم بنزوات یک میلی مولار، بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH برابر با ۷/۴ ، گلوکز ۵۰۰ میلی مولار و سولفات مس۰/۱ میلی مولار آماده شد. درون هریک از میکروفیوژها ۵۰۰ میکرولیتر از این مخلوط ریخته شد و سپس غلظتهای مختلف (۱۰۰-۵۰۰μg/ml) از عصاره هیدروالکلی اضافه شد. در نمونه های کنترل منفی عصاره اضافه نشد. سپس نمونه ها به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در نهایت شدت جذب فلورسانس نمونه ها در طول موج برانگیختگی ۳۰۸ نانومتر و طول موج نشر ۴۱۰ نانومتر اندازه گیری شد. کاهش در شدت فلورسانس نمونه ها که به معنای کاهش در مقدار بنزوات هیدروکسیله است، با فعالیت جمع آوری رادیکالهای هیدروکسیل توسط عصاره هیدروالکلی مرتبط است. نتایج به صورت درصد مهار بیان شدند.

گلیکوزیلاسیون آلبومین سرم گاوی در شرایط In Vitro: برای بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بر روی فرآیند گلیکوزیلاسون آنزیمی ابتدا لازم است که محیطی را به صورت In Vitro برای انجام واکنش فراهم آورده شود. به این منظور در گام اول باید پروتئین به وسیله قندهای احیاء گلیکوزیله شود. برای این امر از روش Sharma و همکارانش استفاده شد (۲۲). BSA با غلظت ۱۰mg/ml به همراه گلوکز با غلظت۵۰۰ میلی مولار و سدیم آزید ۳ میلی مولار در بافر فسفات۰/۲ میلی مولار با ۷/۴ pH مخلوط شدند. سدیم آزید جهت جلوگیری از ایجاد آلودگی باکتریایی در محیط استفاده شد. سپس درون هر میکروفیوژ ۱/۵ میلی لیتر از محلول واکنش ریخته شد و در پایان غلظتهای مختلف از عصاره هیدروالکلی به نمونه ها افزوده شد. انکوباسیون برای عصاره هیدروالکلی به مدت سه هفته در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور از نور انجام شد.

سنجش فروکتوز آمین: نمونه های گلایکه شده برای بررسی تشکیل محصولات آمادوری و اثر عصاره هیدروالکلی بر روی تشکیل این محصولات در پایان هر هفته توسط سنجش فروکتوزآمین بررسی شدند. جهت انجام این تست از روش Johnson و همکارانش استفاده شد (۱۶). به طور خلاصه، یک میلی لیتر معرفNBT که با غلظت ۰/۵ میلی مولار در بافر سدیم کربنات ۰/۲ مولار با۱۰/۴ pH تهیه شده بود، به نمونه ها اضافه گردید. نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس در طول موج ۵۳۰ نانومتر جذب نمونه ها در برابر بلانک (معرف) اندازه گیری شد.

اندازه گیری AGEs تام: اندازه گیری شدت فلورسانس یکی از راههای سنجش میزان AGEs تام و برخی از محصولات ویژه آن است. در پایان هر هفته از انکوباسیون (برای عصاره هیدروالکلی سه هفته بود) میزان AGEs کل با اندازه گیری شدت فلورسانس نمونه ها با استفاده از برانگیختگی و نشر ماکزیمم به ترتیب در ۳۷۰ و ۴۱۰ نانومتر دنبال شد (۲۲).

تعیین محتوای کربونیل پروتئین: ازجمله نشانگرهای آسیب اکسیداتیو پروتئینها تشکیل کربونیل پروتئین است،

بنابراین اندازه گیری مقدار آن راه مناسبی برای تشخیص میزان آسیب اکسیداتیو پروتئین است. برای اندازه گیری مقدار کربونیل پروتئین براساس روشهای موجود درمقالات علمی اقدام شد (۲). به طور خلاصه، یک میلی لیتر از ۲و۴ دی نیترو فنیل هیدرازین(DNPH) ۱۰ میلی مولار که در اسیدکلریدریک(HCl) ۲ مولار حل شده بود به نمونه هایی با غلظت ۱mg/ml اضافه شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس یک میلی لیترTCA سرد (W/V ۱۰ درصد) به نمونه ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. رسوب پروتئینی به دست آمده سه بار با ۲ میلی لیتر محلول اتانول/ اتیل استات (۱:۱V/V) شسته شد و در پایان در یک میلی لیتر گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار با۲/۳ pH حل شد. جذب نمونه ها در طول موج ۳۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. محتوای کربونیل براساس ضریب خاموشی مولی DNPH(cm^{-1} M^{-} ε= ۲/۲× $۱۰^{۴}$) محاسبه شد و نتایج بر اساس نانومول/ میلی گرم پروتئین بیان شد.

اندازه گیری گروه تیول: نشانگر دیگر آسیب اکسیداتیو در پروتئینها از دست رفتن گروههای تیول است. اندازه گیری گروههای تیول طبیعی و تغییر یافته در آلبومین سرم گاوی موجود در نمونه ها مطابق با روش المن با استفاده از ۵ و/ ۵ – دی تیو بیس نیتروبنزوییک اسید(DTNB) یا معرف المن انجام شد (۹). به طور خلاصه، نمونه های BSA با غلظت ۳/۵ mg/ml (۱۰۰ میکرولیتر) با بافرفسفات سالین ۰/۰۵ مولار با ۷/۶ pH (۱۵۰ میکرولیتر)مخلوط شدند و سپس ۳۰ میکرو لیتر DTNB با غلظت ۲/۵ میلی مولار به مخلوط اضافه شد و نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در پایان جذب نمونه ها در ۴۱۰ نانومتر با میکروپلیت ریدر خوانده شد. غلظت تیول آزاد نمونه ها براساس نمودار استاندارد آماده شده با غلظتهای متفاوت L–سیستئین محاسبه شد.

آنالیز های آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از آزمونt– تست انجام شدند. تمامی داده ها به صورت میانگین±SD بیان شدند. داده ها زمانی معنی دار بودند که $P < 0.05$ به دست آمد.

نتایج

تعیین محتوای کل فنول و فلاونویید عصاره هیدروالکلی: در این مطالعه برای تخمین ترکیبات فنولی از واکنشگر Folin-Ciocalteu و برای ترکیبات فلاونوئیدی از واکنشگرآلومینیوم کلراید($AlCl_3$) استفاده شد. میزان محتوای کلی ترکیبات فنولی و فلاوونوییدی در عصاره معادل میزان میلی گرم گالیک اسید(به عنوان فنولیک استاندارد) و کاتچین (به عنوان فلاونوئید استاندارد) در گرم ماده خشک عصاره بیان شده است. مقدار کل ترکیبات فنول و فلاونویید در عصاره هیدروالکلی گیاه به ترتیب ۳۳۵/۸۵ میلی گرم گالیک اسید به ازای هر گرم از عصاره خشک شده و ۳۰۳/۲ میلی گرم کاتچین به ازای هر گرم از عصاره خشک شده به دست آمد (جدول۱).

جدول۱– میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر

نمونه	محتوای ترکیبات فنول[a]	محتوای ترکیبات فلاونویید[b]
عصاره تام	۱۰۷,۲ ±۱,۳۳	۲۱,۸ ±۱,۰۶

[a] مقدار کل ترکیبات فنولی بر اساس میلی گرم گالیک اسید معادل گرم وزن خشک گیاه بیان شد.

[b] مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدها بر اساس میلی گرم کاتچین معادل گرم وزن خشک گیاه بیان شد.

نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD می‌باشد.

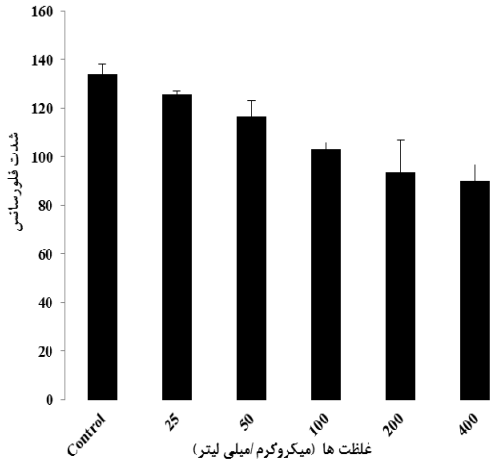
عصاره هیدروالکلی باعث جمع آوری رادیکالهای DPPH می شود: در جدول ۲ فعالیت آنتی اکسیدانی غلظتهای مختلف عصاره اتانولی گیاه کنگر (25-400 µg/ml)در جع آوری رادیکالهای DPPH و IC_{50} مربوط به آن نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود عصاره هیدروالکلی دریک رفتار وابسته به غلظت دارای فعالیت جمع آوری کنندگی رادیکال آزاد هستند مقدارIC_{50} برای عصاره و ویتامین ث برابر با ۱۸۳ با ۳/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

جدول۲- فعالیت آنتی اکسیدانی غلظتهای مختلف عصاره اتانولی گیاه کنگر(۲۵-۴۰۰ µg/ml) در جمع آوری رادیکالهای DPPH.

	DPPH radical Scavenging (%)			IC50 (µg/ml)
غلظت	۵۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml	۲۰۰ µg/ml	
عصاره تام	۱۰,۹۴ ±۲,۰	۲۸,۸۳ ±۱,۲	۵۸,۰۵ ±۳,۱	۱۸۳,۰ ±۲,۱
ویتامین ث	-	-	-	۳,۵ ±۰,۱۸

نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD می‌باشد.

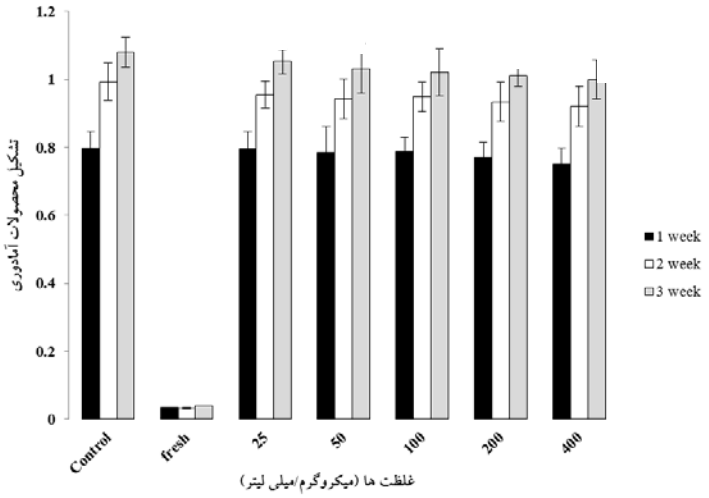
مهار هیدروکسیلاسیون بنزوات توسط عصاره هیدروالکلی: همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، انکوباسیون همزمان گلوکز با BSA باعث افزایش قابل ملاحظه ای در مقدار هیدروکسیلاسیون بنزوات می شود. در حالی که، عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت موجب مهار هیدروکسیلاسیون بنزوات در حضور گلوکز و یونهای فلزی می‌گردد.



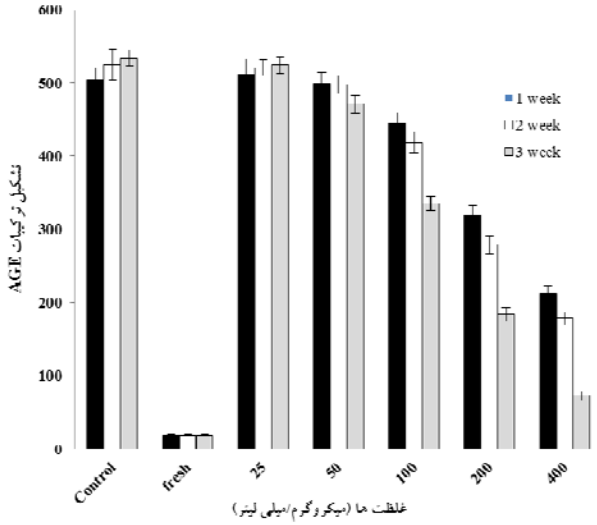
شکل۱- تأثیر مهاری عصاره هیدروالکلی بر هیدروکسیلاسیون بنزوات. عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت باعث مهار هیدروکسیلاسیون بنزوات می‌شود. *نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD ($p<0.01$) می‌باشد.

عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر تأثیری بر روند تولید محصولات آمادوری ندارد. تشکیل محصولات آمادوری توسط سنجش فروکتوزآمین بررسی شد. آزمایش فروکتوز آمین روش رنگ سنجی برای تعیین میزان گلیکوزیله شدن پروتئین براساس توانایی محصولات آمادوری برای احیای نیتروبلوتترازولیوم است. هنگامی که BSA با گلوکز انکوبه شد با گذشت زمان افزایش مقدار محصولات آمادوری مشاهده شد (شکل۲). درحالی که، در حضورغلظتهای مختلف عصاره هیدروالکل گیاه کنگر نیزتأثیر قابل توجهی بر تشکیل محصولات آمادوری صورت نگرفت.

تأثیر مهاری عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت در مهار تشکیل ترکیبات AGE: بررسی تشکیل ترکیبات کلی AGE (Total AGE) با سنجش فلورسانس این ترکیبات (Ex 370, Em 440) صورت گرفت. شدت فلورسانس این ترکیبات در طول مدت انکوباسیون در حضور گلوکز افزایش یافت. همان طور که در شکل۳ مشاهده می‌شود عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت باعث کاهش شدت قلورسانس ترکیبات AGE گردیده است.

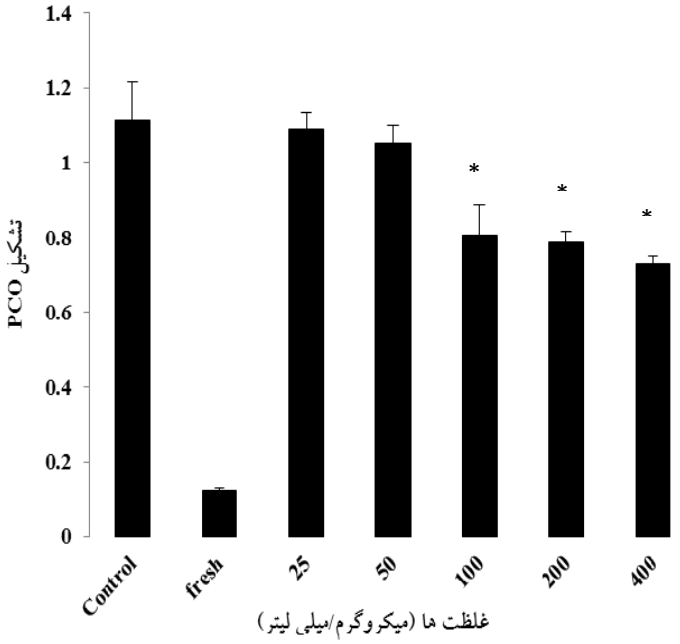


شکل۲- تأثیر غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی بر روند تشکیل محصولات آمادوری. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD (p>0.05)

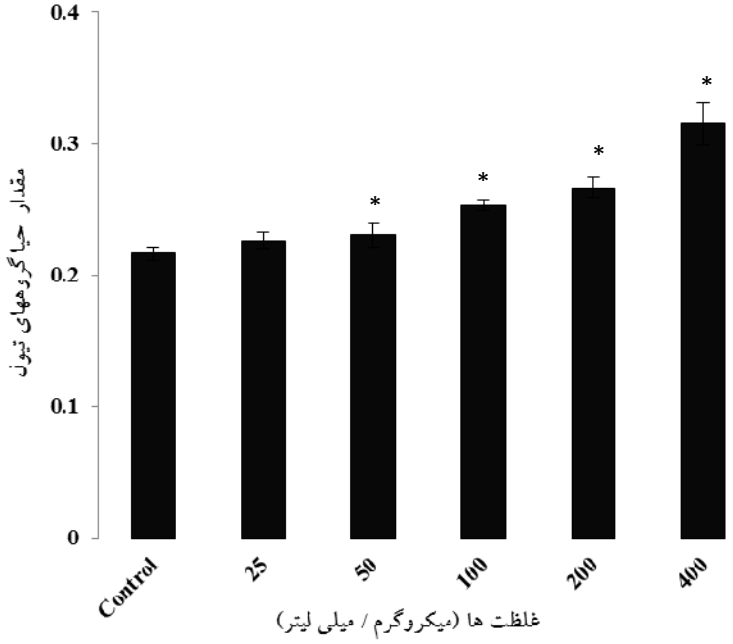


شکل۳- تأثیر مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر بر تشکیل ترکیبات AGE در حضور گلوکز. *نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD (p<0.01)

تأثیر مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر در اکسیداسیون پروتئینها: بیشترین تغییرات مولکولی پروتئینها که منجر به تغییرات ساختاری آنها می‌گردد تشکیل PCO و اکسیداسیون گروههای تیول است که نشانگر تخریب اکسیداتیو پروتئینها می‌باشد که این اتفاق در روند گلیکوزیلاسیون پروتئینها و تشکیل AGE نیز رخ می‌دهد. انکوباسیون BSA با گلوکز باعث افزایش تشکیل PCO می‌شود و اضافه کردن غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر موجب مهار تولید PCO در روندی وابسته به غلظت شد(شکل۴). علاوه بر این، انکوباسیون پروتئین با گلوکز موجب کاهش گروههای تیول شده بود که نشان از اکسیداسیون گروههای تیول طی پدیده تشکیل AGE دارد. اما اضافه کردن عصاره هیدروالکلی به طور قابل توجهی باعث مهار اکسیداسیون گروههای تیول و افزایش احیاء گروههای تیول شد(شکل۵).



شکل ۴- تأثیر مهاری غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر برتشکیل PCO در حضور گلوکز. * نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD ($p<0.05$)



شکل ۵- تأثیر غلظتهای متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر بر احیای گروههای تیول در حضور گلوکز. *نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD ($p<0.05$)

بحث

مطالعات مختلف نشان داده است که استرس اکسیداتیو به شدت با دیابت و عوارض آن در ارتباط است، به طوری که هر دو نوع دیابت ۱و ۲ و حتی در غیاب عوارض دیابتی، استرس اکسیداتیو در خون افزایش یافته و درمان با آنتی اکسیدانهایی نظیر ویتامینE و ملاتونین منجر به کاهش عوارض دیابت گردیده است (۱۱). فاکتورهای زیادی تحت شرایط هیپرگلیسمیا مسئول تولید رادیکالهای آزاد هستند. از جمله این فاکتور ها می توان به گلایکه شدن پروتئینها، اتواکسیداسیون گلوکز، مسیر Polyol و فعال شدن پروتئین کیناز C اشاره کرد. ضمن اینکه علاوه بر موارد بالا افت کارآیی سیستمهای آنتی اکسیدان در دیابت را نیز می توان از عوامل دیگر اصلی تولید رادیکالهای آزاد و استرس اکسیداتیو دانست. آنتی اکسیدانها به طور کلی با مکانیسمهای متفاوت و پیچیده ای بر پروسه های اکسیداتیو تأثیر می گذارند. این مکانیسمها معمولاً شامل مهار واکنشهای زنجیره ای اکسیداتیو، اتصال به فلزات واسطه و کلاته کردن آنها، تجزیه پراکسیدها و خاصیت جمع کنندگی رادیکالهای آزاد است (۱ و ۲).

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی اساساً ناشی از محتوای فنولیک یا غیر فنولیک آنهاست (۴). مطالعات گسترده و مقالات متعدد نشان داده است که بخش اعظم خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان به خصوص گیاهان دارویی ناشی از محتوای فنولی آنها به ویژه ترکیبات فلاونوئیدی است (۳ و ۱۳). برای بررسی توانایی آنتی اکسیدانی گیاه کنگر (*G. tournefortii*) از تست DPPH استفاده شد. در تست DPPH، توانایی آنتی اکسیدانها در جمع آوری رادیکالهای DPPH به طور مستقیمی در ارتباط با قدرت هیدروژن دهندگی (Hydrogen-donating ability) آنهاست. نتایج این مطالعه حاکی از پتانسیل جمع کنندگی رادیکالهای DPPH در عصاره گیاه می باشد. از طرفی این عصاره دارای میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بالایی است. با توجه به توانایی ترکیبات فنولی در انتقال هیدروژن منطقی است که این عصاره توانایی خوبی در جمع آوری این رادیکالهای آزاد داشته باشد.

یکی از اثرات مخرب هیپرگلیسمیا تشکیل ترکیبات AGE است. مطالعات گسترده و زیادی نشان دهنده تأثیر این ترکیبات بر عوارض سوء و بلند مدت دیابت است (۲، ۲۳، ۲۶). در حقیقت این نکته که واکنشهای گلایکه شدن توأم با واکنشهای اکسیداسیون باعث تخریب کارکرد صحیح پروتئینها می شوند، خود دلیل محکمی بر تأثیر AGE در پاتولوژی دیابت است (۶). واکنشهای گلایکه شدن به عنوان منبع اصلی ROS و ترکیبات فعال کربونیلی تلقی می شوند. مطالعات سالهای اخیر دخالت رادیکالهای آزاد از جمله H_2O_2، سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل را در واکنشهای تشکیل AGE نشان می دهد (۸، ۱۸ و ۳۰). به علاوه پروسه اتواکسیداسیون خود به خودی قندهای احیاء کننده از جمله گلوکز منجر به تشکیل H_2O_2 و کتو آلدهید مربوطه می شود و این خود به عنوان مسیر دیگر در جهت تشکیل رادیکالهای آزاد و ترکیبات فعال کربونیلی تحت شرایط هیپرگلیسما تلقی می‌شود (۱۴) .این نکات حداقل به لحاظ تئوریک ارزش ترکیبات آنتی اکسیدان را در جهت مهار تشکیل AGE نشان می دهند. به طور کلی مهارکننده های تشکیل AGE را می توان به سه دسته تقسیم بندی کرد (۱۹ و ۲۷) :

۱- مواد به دام اندازنده ترکیبات کربونیلی (هیدارزین ها) از جمله آمینو گوانیدین.

۲- مواد کلاته کننده یونهای فلزی واسطه از جمله فیتات و penicillamine

۳- آنتی اکسیدانها (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، ویتامین C وE)

آمینو گوانیدین به عنوان یک ترکیب هیدرازینی به طور گسترده ای به عنوان مهار کننده AGE عمل می کند. اگرچه مصرف آن باعث اثرات سوئی از جمله مقاوت دارویی و

مشکلات کبدی شده است. لذا علی رغم پتانسیل بالای این ترکیبات در مهار AGE استفاده از آنها محدود شده است (۲۵). هر چند کلاته کردن عناصر فلزی واسطه نقش مهمی در کاهش رادیکالهای آزاد تولید شده و کاهش میزان AGE دارد ولی به لحاظ بیولوژیکی کلاته کردن عناصر فلزی واسطه درشرایط *In vivo* با این ترکیبات عملی نیست. در نقطه مقابل، استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان احتمالاً استراتژی مناسبی در جهت مهار تشکیل ترکیبات AGE است (۱۷).

به طور کلی واکنشهای گلایکه شدن به دو مرحله تقسیم می شود. در مرحله اول واکنشهای صورت گرفته منجر به تولید ترکیبات آمادوری می شود و در مرحله دوم ترکیبات آمادوری تولید شده طی واکنشهای متعدد ترکیبات AGE را تولید می کنند (۲۸). پیشنهاد شده است که واکنشهای اکسیداتیو و رادیکالهای آزاد نقشی در تولید ترکیبات آمادوری طی مرحله اول نداشته، در حالی که نقش مهمی در تشکیل ترکیبات AGE طی مرحله دوم دارند (۱۰ و ۲۰). در این مطالعه سنجش میزان فروکتوز آمین نشان دهنده میزان تولید ترکیبات آمادوری طی مرحله اول گلایکه شدن است. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر فارغ از غلظت آن تأثیری بر روند تشکیل ترکیبات آمادوری ندارد. در مقابل استفاده از فلورسانس اختصاصی به عنوان روشی پذیرفته شده در جهت شناسایی ترکیبات نهایی AGE در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بیانگر تأثیر عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت بر مهار تشکیل ترکیبات کلی AGE بود.

با توجه به تشکیل رادیکالهای آزاد چه در مسیر گلایکه شدن پروتئینها و چه از طریق مسیر گلایکه شدن اتواکسیداتیو، بررسی پروتئین به لحاظ پارامترهای اکسیداتیو حائز اهمیت است. لذا برای بررسی تخریب اکسیداتیو پروتئینها حین واکنشهای گلایکه شدن میزان PCO و گروههای تیول در BSA سنجیده شد. نتایج این تحقیق قویاً نشان داد که گلوکز (قند احیاء کننده استفاده شده در آزمایشات) بعد از ۱۴ روز قادر به افزایش PCO و اکسیداسیون گروههای تیول هستند. در حالی که عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت باعث کاهش PCO و افزایش تعداد گروههای تیول شد.

باتوجه به فرضیه Wolff که تولید رادیکالهای هیدروکسیل طی پدیده "Autoxidative Glycosylation" را مسئول تخریب اکسیداتیو پروتئینها و تولید AGE می داند (۲۹)، تأثیر عصاره تام بر تولید رادیکالهای هیدروکسیل طی اتواکسیداسیون گلوکز بررسی شد. نتایج حاصل از هیدروکسیلاسیون بنزوات نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر باعث مهار تولید یا جمع آوری رادیکالهای هیدروکسیل می شوند. این اثر مهاری به احتمال زیاد ناشی از جمع کردن مستقیم رادیکالهای هیدروکسیل یا کلاته کردن عناصر فلزی واسطه و کاهش تولید این رادیکال است.

با توجه به خاصیت قوی آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی و همچنین توانایی آن در جمع کردن رادیکالهای آزاد، اثرات گیاه در مهار واکنشهای گلایکه شدن و تشکیل AGE را می توان به این ویژگی آنتی اکسیدانی گیاه که ناشی از محتوای بالای فنولی و فلاونوئیدی آن می‌باشد، ارتباط داد. یافته های این مطالعه نه تنها نشانگر دخالت واکنشهای اکسیداتیو در تشکیل AGE بود، بلکه نشان داد که از آنتی اکسیدانها با منشأ گیاهی می توان به عنوان مهار کننده های AGE در درمان عوارض مزمن دیابت استفاده کرد.

منابع

1- Ames, S.N., Shigrenaga, M.K., Hagen, T.M. 1993. Oxidant, antioxidant and degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 90: 7915-7922.

2- Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007. Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. Food. Chem, 104: 21-29.

3- Bahramikia, S., Yazdanparast, R., Ardestani, A. 2009. Protective effects of some Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. Food. Chem, 115, 37-42.

4- Basta, G., Schmidt, A.M., De Caterina, R. 2004. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. Cardiovasc. Res, 63: 582-592.

5- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200.

6- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414: 813–820.

7- Coruh, N., Sag hdicog lu Celep, A.G., Ozgpkce, F., Iscan, M. 2007. Antioxidant capacities of Gundelia tournefortii L. extracts and inhibition on glutathione-s-transferase activity. Food. Chem, 100: 1249-1253.

8- Elgawish, A., Glomb, M., Friedlander, M., Monnier, V.M. 1996. Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. J. Biol. Chem, 271: 12964-12971.

9- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys, 82: 70-77.

10- Fu, M.X., Wells-Knecht, K.J., Blackledge, J.A., Lyons, T.J., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. 1994. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. Diabetes 43: 676-683.

11- Halliwell, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. Annu. Rev. Nutr, 16: 33-50.

12- Hamdan, II., Afifi, FU. 2004. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. J. Ethnopharmacol, 93: 117-121.

13- Hollman, P.C.H., Katan, M.B. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food. Chem. Toxicol, 37: 937-942.

14- Hunt, J.V., Dean, R.T., Wolff , S.P. 1988. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. Biochem. J, (256): 205-212.

15- Jamshidzadeh, A., Fereidooni, F., Salehi., Niknahad, H. 2005. Hepatoprotective activity of Gundelia tourenfortii. J. Ethnopharmacol, 101: 233-237.

16- Johnson, R.N., Metcalf, P.A., Baker. J.R. 1983. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. Clin. Chim. Acta 127: 87-95.

17- Khalifah, R.G., Baynes, J.W., Hudson. B.G. 1999. Amadorins: novel post-amadori inhibitors of advanced glycation reactions. Biochem Biophys. Res. Commun, 257: 251-258.

18- Oya, T., Osawa, T., Kawakishi. S. 1997. Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. Biosci. Biotechnol. Biochem, 61: 263-266.

19- Rahbar, S., Figarola, J.L. 2003. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. Arch. Biochem. Biophys, 419: 63-79.

20- Sakurai, T., Tsuchiya, S. 1988. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. FEBS. Lett, 236: 406-410.

21- Sarper, F., Akadin, G., Simsek, I., Yesildad, E. 2009. An ethnobotanical field survey in the haymana district of Ankara Province in Turkey. Turk. J. Biol, 33: 79-88.

22- Sharma, S.D., Pandey, B.N., Mishra, K.P., Sivakami, S. 2002. Amadori product and age formation during nonenzymatic glycosylation of bovine serum albumin in vitro. J. Biochem. Mol. Biol. Biophys, (6): 233-242.

23- Singh, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia 44: 129-146.

24- Slinkard, J., Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Viticult, 28: 49-55.

25- Thornalley, P.J. 2003. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Arch. Biochem.Biophys, 419: 31-40.

26- Thorpe, S.R., Baynes, J.W. 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. Amino Acids, 25: 257-281.

27- Verbeke, P., Siboska, G.E., Clark, B.F.C., Rattan, S.I.S. 2000. Kinetin inhibits protein

oxidation and glycoxidation in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun, 276: 1265–1270.

28- Vlassara, H., Bucala, R., Striker, L. 1994. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. Lab. Invest, 70: 138-151.

29- Wolff, S.P., Dean, R.T. 1987. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. Biochem. J. 245: 243-250.

30- Yim, H.S., Kang, S.O., Hah, Y.C., Chock, P.B., Yim, M.B. 1995. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. J. Biol. Chem, 270: 28228-28233.

31- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food. Chem, 64: 555-559.

Antiglycation Effect of Hydroalcoholic Extract of Acanthus (*Gundelia tournefortii L*) in Bovine Serum Albumin (BSA): A Strategy to Reduce the Chronic Complications of Diabetes

Azizimoradi F. and Bahramikia S.

Dept. of Biology, Lorestan University, Khoramabad, I.R. of Iran.

Abstract

Non-enzymatic glycation of proteins and the formation of its advanced glycation end products (AGEs) are the important factors involved in pathogenesis of diabetes chronic complications. Since these events damage the proper function of proteins, antioxidant compounds with plant origins can be used as a therapy to prevent such chronic effects. In this research, the effect of *G. tournefortii* L. hydroalcoholic extract of Lorestan province on the inhibition of the non-enzymatic glycation process of bovine serum albumin (BSA) in diabetes models was investigated. For this purpose, at first the phenol and flavonoid contents of the plant were determined. To investigate the antioxidant activity of this plant, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test was used. Then, for the AGEs formation, BSA was glycated in vitro by using the glucose and the effect of different concentrations of *G. tournefortii* hydroalcoholic extract on the AGEs formation was evaluated by using various assays. The results showed that the hydroalcoholic extract in a dose-dependent (25- 400 µg/ml) manner has DPPH radical scavenging ability as well as antiglycation activity. In addition, the hydroalcoholic extract inhibited benzoate hydroxylation during glucose autoxidation. Concerning the involvement of oxidative reactions in AGEs formation under hyperglycemia condition and also regarding the high phenolic and flavonoid contents (antioxidant compounds) of the plant, it can be concluded that the *G. tournefortii* hydroalcoholic extract probably through its potent antioxidant activity inhibits the protein glycation process.

Key words: Non-enzymatic glycation, advanced glycation end products (AGEs), Acanthus (*Gundelia tournefortii* L), Diabetes