

بررسی فعالیت ضد گلیکوزیلاسیون 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

گلیکته شدن غیرآنزیمی پروتئینها و تشکیل محصولات نهایی پیشرفته این فرآیند (AGES) از عوامل دخیل در پاتوژنز عوارض مزمن دیابت می باشد. از آنجایی که این حوادث باعث تخریب کارکرد صحیح پروتئینها می شوند ترکیبات آنتی اکسیدان با منشأ گیاهی می تواند به عنوان یک راه درمانی برای جلوگیری از بروز این عوارض مزمن مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق اثر عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر (*Gundelia tournefortii*) استان لرستان بر روی مهار فرآیند گلیکته شدن غیرآنزیمی آلبومین سرم گاوی (BSA) در مدل‌های دیابتی بررسی شد. برای این منظور ابتدا محتوای فنول و فلاونوئید عصاره هیدروالکلی تعیین شد. برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه از آزمون مهار تشکیل رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. سپس به منظور تشکیل BSA، AGES 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 $\mu\text{g/ml}$) 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 در تولید AGES تحت شرایط هیپرگلیسمیا و همچنین با توجه به محتوای بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی (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 گلیکوزیلاسیون، محصولات انتهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته پروتئین، کنگر، دیابت

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

مقدمه

پیامدهای ناشی از آن را به میزان چشمگیری کاهش داد (۲). هایپرگلیسمی به عنوان یک فاکتور سهمیم در درد نوع دیابت ۱ و ۲ عامل مهمی در ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد.

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

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 می توان شیوع و عوارض و

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

قندارشدن غیرآنزیمی پروتئینها و تشکیل محصولات انتهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته فاکتورهای مهم پاتوژنز عوارض مزمن دیابت هستند. 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، زایلوز) 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 سلولی AGEs توسط سه مکانیسم اصلی به سلولهای هدف آسیب می‌رساند (۲ و ۲۸) (شکل ۲-۱): اول، پروتئینهای درون سلولی تغییر یافته توسط AGEs، عملکردشان تغییر می‌یابد. دوم، اجزای ماتریکس خارج سلولی تغییر یافته به وسیله AGEs به طور غیرطبیعی با اجزای ماتریکسهای دیگر و اینتگرین‌های (گیرنده‌هایی

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 کتوآمین ها واکنش دهند که در نهایت این کتوآمین 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 می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مفید برای کاهش عوارض مزمن دیابت مطرح باشد. یکی از استراتژیهای ضد AGE 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 پسی استفاده می‌شود، حال آنکه برگهای تازه آن ادرارآور است. همچنین در کشور ترکیه به صورت سنتی، از ساقه آن برای درمان اسهال، درد معده، برونشیت، سنگ کلیه، آماس گردن و التهاب استفاده می‌شود (۲۱). در اردن نیز مردم محلی از گیاه کنگر برای درمان دیابت استفاده می‌کنند (۱۲). نتایج حاصل از یک پژوهش در ایران نظریه طب سنتی در باره اثرات محافظتی هپاتوسیت و اثرات مفید کنگر در درمان بیماریهای کبدی را تأیید می‌نماید (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 گلوکوتیون S ترانسفراز می‌باشد. پژوهش همچنین نشان داد که محتوی ترکیبات

محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد مخلوط شد. پس از ۹۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، جذب نمونه‌ها 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 فلاونوئیدها: محتوای کل فلاونوئیدهای عصاره هیدروالکلی گیاه *Gundelia tournefortii* توسط روش کالریتری توصیف شده در مقالات علمی سنجیده شد (۳۱). نیم میلی لیتر از هر نمونه گیاهی و کاتچین به عنوان استاندارد با ۲ میلی لیتر آب مقطر و به دنبال آن با ۰/۱۵ میلی لیتر محلول سدیم نیتريت ۱۵ درصد مخلوط گردید. پس از ۶ 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 نمونه‌ها 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 Blis صورت گرفت (۵). به این منظور یک میلی لیتر از غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی (۲۰۰-۵۰ μg/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 نمونه‌ها به علت خاصیت پروتون دهنده‌گی 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:

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 هربرایوم 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 نسبت ۱ به ۱۰) و به دنبال آن با ۲ میلی لیتر

این منظور در گام اول باید پروتئین به وسیله قندهای احیاء گلیکوزیده شود. برای این امر از روش Sharma و همکارانش استفاده شد (۲۲). BSA با غلظت ۱۰ mg/ml به همراه گلوکز با غلظت ۵۰۰ میلی مولار و سدیم آزید ۳ میلی مولار در بافر فسفات ۰/۲ میلی مولار با pH ۷/۴ مخلوط شدند. سدیم آزید جهت جلوگیری از ایجاد آلودگی باکتریایی در محیط استفاده شد. سپس درون هر میکروپیوژ ۱/۵ میلی لیتر از محلول واکنش ریخته شد و در پایان غلظت‌های مختلف از عصاره هیدروالکلی به نمونه‌ها افزوده شد. انکوباسیون برای عصاره هیدروالکلی به مدت سه هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور از نور انجام شد.

سنجش فروکتوز آمین: نمونه‌های گلاایکه شده برای بررسی تشکیل محصولات آمادوری و اثر عصاره هیدروالکلی بر روی تشکیل این محصولات در پایان هر هفته توسط سنجش فروکتوز آمین بررسی شدند. جهت انجام این تست از روش Johnson و همکارانش استفاده شد (۱۶). به طور خلاصه، یک میلی لیتر معرف NBT که با غلظت ۰/۵ میلی مولار در بافر سدیم کربنات ۰/۲ مولار با pH ۱۰/۴ تهیه شده بود، به نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس در طول موج ۵۳۰ نانومتر جذب نمونه‌ها در برابر بلانک (معرف) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری AGEs تام: اندازه‌گیری 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 اندازه‌گیری شدت فلورسانس نمونه‌ها با استفاده از برانگیختگی و نشر ماکزیمم به ترتیب در ۳۷۰ و ۴۱۰ نانومتر دنبال شد (۲۲).

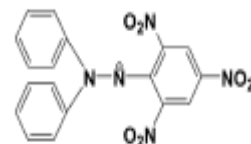
تعیین محتوای کربونیل پروتئین: از جمله نشانگرهای آسیب اکسیداتیو پروتئینها تشکیل کربونیل پروتئین است،

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

R% : درصد مهار

A₀: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر

A₁: جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر



DPPH

تعیین رادیکال‌های هیدروکسیل تولید شده توسط اتواکسیداسیون گلوکز: درجهت بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بر روی جمع‌آوری 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 مس ۰/۱ میلی مولار آماده شد. درون هر یک از میکروپیوژها ۵۰۰ میکرولیتر از این مخلوط ریخته شد و سپس غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۵۰۰ μg/ml) از عصاره هیدروالکلی اضافه شد. در نمونه‌های کنترل منفی عصاره اضافه نشد. سپس نمونه‌ها به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت شدت جذب فلورسانس نمونه‌ها در طول موج برانگیختگی ۳۰۸ نانومتر و طول موج نشر ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کاهش در شدت فلورسانس نمونه‌ها که به معنای کاهش در مقدار بنزوات هیدروکسیله است، با فعالیت جمع‌آوری 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 گلیکوزیلاسیون آنزیمی ابتدا لازم است که محیطی را به صورت In Vitro برای انجام واکنش فراهم آورده شود. به

سپس ۳۰ میکرو لیتر DTNB با غلظت ۲/۵ میلی مولار به مخلوط اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در پایان جذب نمونه‌ها در ۴۱۰ نانومتر با میکروپلیت ریدر خوانده شد. غلظت تیول آزاد نمونه‌ها براساس نمودار استاندارد آماده شده با غلظت‌های متفاوت I-سیستئین محاسبه شد.

آنالیزهای آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از آزمون t-تست انجام شدند. تمامی داده‌ها به صورت میانگین \pm SD بیان شدند. داده‌ها زمانی معنی دار بودند که $P < 0.05$ به دست آمد.

نتایج

تعیین محتوای کل فنول و فلاونوئید عصاره هیدروالکلی: در این مطالعه برای تخمین ترکیبات فنولی از واکنشگر Folin-Ciocalteu و برای ترکیبات فلاونوئیدی از واکنشگر آلومینوم کلراید ($AlCl_3$) استفاده شد. میزان محتوای کلی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی 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 فلاونوئید 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 (جدول ۱).

بنابراین اندازه‌گیری مقدار آن راه مناسبی برای تشخیص میزان آسیب اکسیداتیو پروتئین است. برای اندازه‌گیری مقدار کربونیل پروتئین براساس روش‌های موجود در مقالات علمی اقدام شد (۲). به طور خلاصه، یک میلی لیتر از ۴ و ۲ دی نیترو فنیل هیدرازین (DNPH) ۱۰ میلی مولار که در اسیدکلریدریک (HCl) ۲ مولار حل شده بود به نمونه‌هایی با غلظت ۱ mg/ml اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس یک میلی لیتر TCA سرد (۱۰ W/V درصد) به نمونه‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتیفریوژ 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 با pH ۲/۳ حل شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای کربونیل براساس ضریب خاموشی مولی (DNPH) $cm^{-1} M^{-1}$ $(\epsilon = 2/2 \times 10^4)$ محاسبه شد و نتایج بر اساس نانومول/میلی گرم پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری گروه تیول: نشانگر دیگر آسیب اکسیداتیو در پروتئین‌ها از دست رفتن گروه‌های تیول است. اندازه‌گیری گروه‌های تیول طبیعی و تغییر یافته در آلومین سرم گاوی موجود در نمونه‌ها مطابق با روش المن با استفاده از ۵ و ۵ - دی تیو بیس نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) یا معرف المن انجام شد (۹). به طور خلاصه، نمونه‌های BSA با غلظت ۳/۵ mg/ml (۱۰۰ میکرولیتر) با بافر فسفات سالین ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۶ (۱۵۰ میکرولیتر) مخلوط شدند و

جدول ۱- میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر

نمونه	محتوای ترکیبات فنول ^a	محتوای ترکیبات فلاونوئید ^b
عصاره تام	۱۰۷,۲ \pm ۱,۳۳	۲۱,۸ \pm 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 \pm SD می‌باشد.

عصاره هیدروالکلی در یک رفتار وابسته به غلظت دارای فعالیت جمع آوری کنندگی رادیکال آزاد هستند مقدار IC_{50} برای عصاره و ویتامین ث برابر با ۱۸۳ با ۳/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

عصاره هیدروالکلی باعث جمع آوری رادیکالهای DPPH می شود: در جدول ۲ فعالیت آنتی اکسیدانی غلظتهای مختلف عصاره اتانولی گیاه کنگر (۲۵-۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$) در جمع آوری رادیکالهای DPPH و IC_{50} مربوط به آن نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود

جدول ۲- فعالیت آنتی اکسیدانی غلظتهای مختلف عصاره اتانولی گیاه کنگر ($25-400 \mu\text{g/ml}$) در جمع آوری رادیکالهای DPPH.

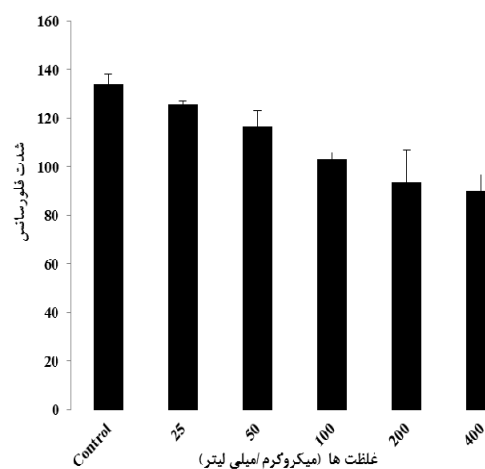
غلظت	DPPH radical Scavenging (%)			IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	۵۰ $\mu\text{g/ml}$	۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$	۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$	
عصاره تام	10.94 ± 2.0	28.83 ± 1.2	58.05 ± 3.1	183.0 ± 2.1
ویتامین ث	-	-	-	3.5 ± 0.18

نتایج میانگین سه آزمایش مستقل \pm SD می باشد.

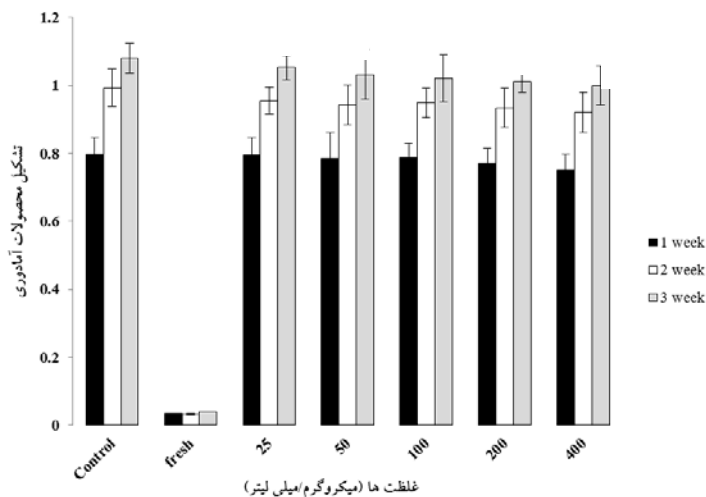
عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر تأثیری بر روند تولید محصولات آمادوری ندارد. تشکیل محصولات آمادوری توسط سنجش فروکتوزآمین بررسی شد. آزمایش فروکتوز آمین روش رنگ سنجی برای تعیین میزان گلیکوزیده شدن پروتئین براساس توانایی محصولات آمادوری برای احیای نیتروبلوترازولیوم است. هنگامی که BSA با گلوکز انکوبه شد با گذشت زمان افزایش مقدار محصولات آمادوری مشاهده شد (شکل ۲). درحالی که، در حضور غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکل گیاه کنگر نیز تأثیر 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 شکل ۳ مشاهده می شود عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت باعث کاهش شدت فلورسانس ترکیبات AGE گردیده است.

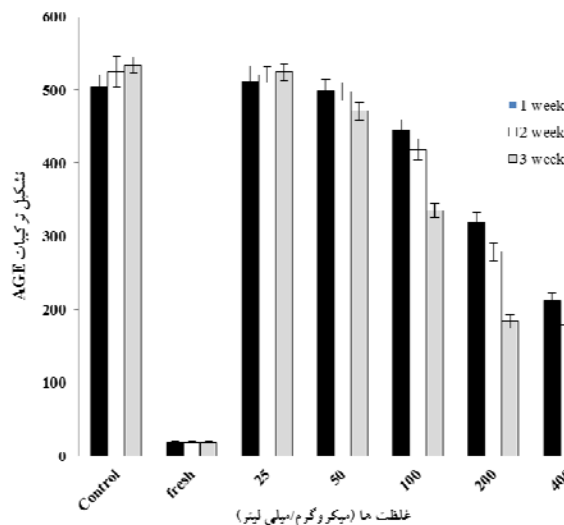
مهار هیدروکسیلاسیون بنزوات توسط عصاره هیدروالکلی: همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، انکوباسیون همزمان گلوکز با BSA باعث افزایش قابل ملاحظه ای در مقدار هیدروکسیلاسیون بنزوات می شود. در حالی که، عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت موجب مهار هیدروکسیلاسیون بنزوات در حضور گلوکز و یونهای فلزی می گردد.



شکل ۱- تأثیر مهاری عصاره هیدروالکلی بر هیدروکسیلاسیون بنزوات. عصاره هیدروالکلی در روندی وابسته به غلظت باعث مهار هیدروکسیلاسیون بنزوات می شود. *نتایج میانگین سه آزمایش مستقل \pm SD ($p < 0.01$) می باشد.



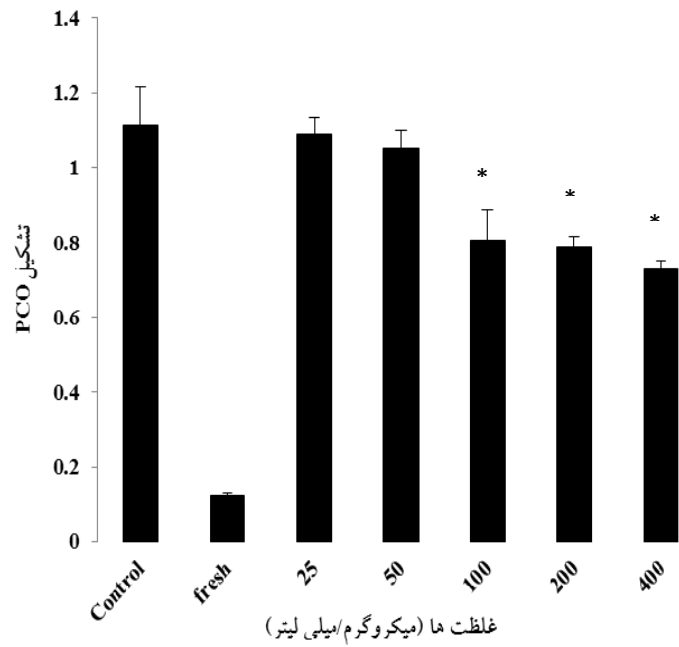
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروآلکلی بر روند تشکیل محصولات آمادوری. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل \pm SD ($p > 0.05$)



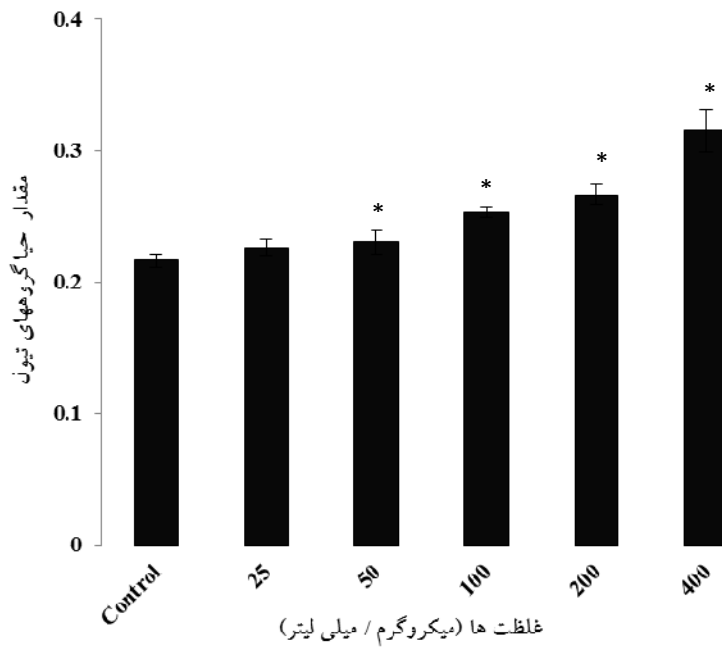
شکل ۳- تأثیر مهاری عصاره هیدروآلکلی گیاه کنگر بر تشکیل ترکیبات AGE در حضور گلوکز. *نتایج میانگین سه آزمایش مستقل \pm SD ($p < 0.01$)

هیدروآلکلی گیاه کنگر موجب مهار تولید PCO در روندی وابسته به غلظت شد (شکل ۴). 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 هیدروآلکلی به طور قابل توجهی باعث مهار اکسیداسیون گروه‌های تیول و افزایش احیاء گروه‌های تیول شد (شکل ۵).

تأثیر مهاری عصاره هیدروآلکلی 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



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



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

بحث

است. با توجه به توانایی ترکیبات فنولی در انتقال هیدروژن منطقی است که این عصاره توانایی خوبی در جمع‌آوری 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 گلايک‌شدن توأم با واکنش‌های اکسیداسیون باعث تخریب کارکرد صحیح پروتئین‌ها می‌شوند، خود دلیل محکمی بر تأثیر AGE در پاتولوژی دیابت است (۶). واکنش‌های گلايک‌شدن به عنوان منبع اصلی ROS و ترکیبات فعال کربونیلی تلقی می‌شوند. مطالعات سال‌های اخیر دخالت رادیکال‌های آزاد از جمله H_2O_2 ، سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل را در واکنش‌های تشکیل AGE نشان می‌دهد (۸، ۱۸ و ۳۰). به علاوه پروسه اتواکسیداسیون خود به خودی فندهای احیاء کننده از جمله گلوکز منجر به تشکیل H_2O_2 و کتو آلدئید مربوطه می‌شود و این خود به عنوان مسیر دیگر در جهت تشکیل رادیکال‌های آزاد و ترکیبات فعال کربونیلی تحت شرایط هیپرگلیسمیا تلقی می‌شود (۱۴). این نکات حداقل به لحاظ تئوریک ارزش ترکیبات آنتی‌اکسیدان را در جهت مهار تشکیل AGE نشان می‌دهند. به طور کلی مهارکننده های تشکیل AGE را می‌توان به سه دسته تقسیم بندی کرد (۱۹ و ۲۷):

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

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

۳- آنتی‌اکسیدانها (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، ویتامین C و E)

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

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 او ۲ و حتی در غیاب عوارض دیابتی، استرس اکسیداتیو در خون افزایش یافته و درمان با آنتی‌اکسیدانهایی نظیر ویتامین E 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 می‌توان به گلايک‌شدن پروتئینها، اتواکسیداسیون گلوکز، مسیر Polyol و فعال شدن پروتئین کیناز C اشاره کرد. ضمن اینکه علاوه بر موارد بالا افت کارایی سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در دیابت را نیز می‌توان از عوامل دیگر اصلی تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو دانست. آنتی‌اکسیدانها به طور کلی با مکانیسم‌های متفاوت و پیچیده ای بر پروسه های اکسیداتیو تأثیر می‌گذارند. این مکانیسمها معمولاً شامل مهار واکنش‌های زنجیره ای اکسیداتیو، اتصال به فلزات واسطه و کلاته کردن آنها، تجزیه پراکسیدها و خاصیت جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد است (۱ و ۲).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی گیاهان به خصوص گیاهان دارویی ناشی از محتوای فنولی آنها به ویژه ترکیبات فلاونوئیدی است (۳ و ۱۳). برای بررسی توانایی آنتی‌اکسیدانی گیاه کنگر (*G. tournefortii*) از تست DPPH استفاده شد. در تست DPPH، توانایی آنتی‌اکسیدانها در جمع‌آوری رادیکال‌های DPPH به طور مستقیمی در ارتباط با قدرت هیدروژن دهنده گی (Hydrogen-donating ability) آنهاست. نتایج این مطالعه حاکی از پتانسیل جمع‌کنندگی رادیکال‌های DPPH در عصاره گیاه می‌باشد. از طرفی این عصاره دارای میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بالایی

اکسیداتیو حائز اهمیت است. لذا برای بررسی تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها حین واکنش‌های گلاپیکه 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 می‌داند (۲۹)، تأثیر عصاره تام بر تولید رادیکال‌های هیدروکسیل طی اتواکسیداسیون گلوکز بررسی شد. نتایج حاصل از هیدروکسیلاسیون بنزوات نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر باعث مهار تولید یا جمع‌آوری رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شوند. این اثر مهار 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 آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی و همچنین توانایی آن در جمع کردن رادیکال‌های آزاد، اثرات گیاه در مهار واکنش‌های گلاپیکه شدن و تشکیل AGE را می‌توان به این ویژگی آنتی‌اکسیدانی گیاه که ناشی از محتوای بالای فنولی و فلاونوئیدی آن می‌باشد، ارتباط داد. یافته‌های این مطالعه نه تنها نشانگر دخالت واکنش‌های اکسیداتیو در تشکیل AGE بود، بلکه نشان داد که از آنتی‌اکسیدانها با منشأ گیاهی می‌توان به عنوان مهار کننده های AGE در درمان عوارض مزمن دیابت استفاده کرد.

مشکلات کبدی شده است. لذا علی‌رغم 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 در شرایط *In vivo* با این ترکیبات عملی نیست. در نقطه مقابل، استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان احتمالاً استراتژی مناسبی در جهت مهار تشکیل ترکیبات AGE است (۱۷).

به طور کلی واکنش‌های گلاپیکه شدن به دو مرحله تقسیم می‌شود. در مرحله اول واکنش‌های صورت گرفته منجر به تولید ترکیبات آمادوری می‌شود و در مرحله دوم ترکیبات آمادوری تولید شده طی واکنش‌های متعدد ترکیبات AGE را تولید می‌کنند (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 گلاپیکه 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 گلاپیکه شدن پروتئین‌ها و چه از طریق مسیر گلاپیکه شدن اتواکسیداتیو، بررسی پروتئین به لحاظ پارامترهای

منابع

1- Ames, S.N., Shigenaga, 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, glycooxidation, 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 glycooxidation 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

Azizmoradi 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