تأثیر عصاره‌ی هیدروالکلی گل سرخ (*Rosa damascena* Mill) و شوید (*Anethum graveolens*) بر گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی

مینا سلیمانی دهنوی[1]، کهین شاهانی‌پور[2]*

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
* آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، گروه بیوشیمی
تلفن: ۳۷۶۵۳۲۵۸ (۰۳۱)، نمابر: ۷۴۲۰۱۴۰ (۰۳۱)
پست الکترونیک: shahanipur_k@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۵ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۵/۱۷

چکیده

مقدمه: یکی از عوارض دیابت ملیتوس گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های مختلف بدن است که باعث تغییر ماهیت، ساختمان و عملکرد بیوشیمیایی آنها می‌شود. کاهش یا مهار این واکنش باعث بهبود علائم دیابت می‌شود. به نظر می‌رسد که استفاده از گیاهان حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان در این راه مفید و مؤثر می‌باشد.

هدف: هدف از این تحقیق، بررسی واکنش گلیکوزیلاسیون آلبومین و هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه *Rosa damascena* Mill و *Anethum graveolens* می‌باشد.

روش بررسی: ۱) جمع‌آوری گیاهان، ۲) عصاره‌گیری به روش خیساندن، ۳) بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام با روش DPPH و میزان فنول به روش فولیت- سیویکالتو ۴) خالص‌سازی و اندازه‌گیری مقدار هموگلوبین از خون انسان، ۵) بهینه‌سازی تثبیت‌سازی، ۶) بررسی میزان گلیکوزیلاسیون، در حضور و غیاب عصاره‌ها.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده میزان فنول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام عصاره هیدروالکلی شوید به طور معناداری از گل سرخ بیشتر بوده ($P<0/05$). بیشترین میزان گلیکوزیلاسیون هموگلوبین در زمان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم گلوکز در مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون و برای آلبومین ۳۰ میلی‌گرم در مدت ۷۲ ساعت بوده است. برای هر دو عصاره در غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای دو پروتئین بوده که عصاره هیدروالکلی شوید نسبت به گل سرخ بهتر عمل کرده است ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: دو عصاره هیدروالکلی شوید و گل سرخ به طور متوسط باعث کاهش گلیکوزیلاسیون آلبومین و هموگلوبین می‌شوند. اما مطالعات بیشتری برای اثبات این موضوع لازم است.

گل‌واژگان: شوید، گل سرخ، آلبومین، گلیکوزیلاسیون، هموگلوبین

مقدمه

دیابت ملیتوس (DM) بیماری متابولیکی است که با افزایش مزمن گلوکز خون و اختلال در متابولیسم قندها، چربی‌ها و پروتئین‌ها مشخص می‌شود، که نتیجه نقص در ترشح انسولین و یا عملکرد انسولین می‌باشد [۲، ۱]. بیماری دیابت با عوارض طولانی مدت شامل رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی- عروقی نمایان می‌شود [۳].

درصد بالایی از مرگ و میرها در بیماران دیابتی بر اثر عوارض میکرو و ماکروواسکولار می‌باشد که منجر به نارسایی کلیه، چشم دستگاه قلب و عروق، و سیستم عصبی مرکزی می‌شود [۴]. و مهم‌ترین و شاخص‌ترین علامت کلینیکی آن افزایش قند خون می‌باشد [۵].

گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی شامل کمپلکسی از واکنش‌ها بین گروه‌های کربونیل قند (گلوکز، ریبوز و فروکتوز) و گروه آمینه‌ی پروتئین است. گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها از طریق ایجاد ترکیبی با آرایش باز شیف صورت می‌پذیرد که در این واکنش گروه آلدهیدی مولکول قند با گروه‌های آمین آزاد در پروتئین مانند گروه آمین زنجیر جانبی اسید آمینه لیزین در پروتئین ترکیب می‌شود. ترکیبات حاصل از اتصال غیرآنزیمی گلوکز به گروه‌های آمین آزاد در پروتئین‌های پلاسمایی را فروکتوزآمین می‌نامند [۷، ۶]. در نتیجه واکنش گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها، ماهیت و ساختمان فضایی آنها تغییر می‌یابد و فعالیت بیوشیمیایی آنها دچار تغییرات گوناگون و بروز بیماری-های مختلفی نظیر آترواسکلروز، رتینوپاتی، نفروپاتی، کاتاراکت و... می‌شود. در بسیاری از بافت‌های بدن همچون بافت عضلانی، برای استفاده از گلوکز نیاز به انسولین می‌باشد و در دیابت ملیتوس به دلیل کاهش انسولین و همچنین کاهش حساسیت بافت‌ها به انسولین، جذب گلوکز توسط این بافت‌ها کاهش و غلظت گلوکز خون افزایش می‌یابد و در نتیجه زمینه برای انجام واکنش گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها مثل آلبومین زیاد می‌شود [۸]. جلوگیری از اتصال غیرآنزیمی گلوکز به پروتئین‌ها ممکن است عوارض بیماری دیابت قندی را کاهش دهد. بر این اساس تحقیق بر روی عواملی که سبب تعدیل در میزان گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها می‌شوند، اهمیت پیدا می‌کند [۹].

سال‌هاست که توجه محققین به یافتن ترکیباتی که مانع از گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها شوند و فاقد اثرات جانبی نگران‌کننده نباشند معطوف شده و بر این اساس توجه خاصی به ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی مثل ترکیبات گیاهی و به طور کلی ترکیبات آنتی‌اکسیدان شده است [۱۰].

گل سرخ: *Rosa damascena* Mill از خانواده‌ی Rosaceae می‌باشد که در فارسی گل محمدی یا گل گلاب خوانده می‌شود. عصاره گل سرخ که حاوی چندین مادهٔ مؤثر می‌باشد و از دیرباز در متون طبی سنتی به عنوان نشاط افزا، ضد اضطراب و ضدافسردگی مطرح شده است. این گیاه عمدتاً در بلغارستان، ترکیه و فرانسه به صورت صنعتی کشت می‌شود ولی در اکثر مناطق خاورمیانه، اروپا و روسیه نیز به وفور یافت می‌شود و گل سرخ در بسیاری از مناطق ایران نیز به خوبی می‌روید [۱۱]. از خواص دیگری که برای آن ذکر شده است اثر ضدافسردگی، تنظیم‌کنندهٔ اشتها، آرامبخش، ترمیم‌کنندهٔ پوست، ضدخشکی و خارش پوست، ضد استفراغ، و درمان کننده سنگ صفرا و التهاب کبد، آسم و سرفه، ناتوانی جنسی و سردمزاجی، سردرد، بیخوابی و دیابت می‌باشد [۱۲].

شوید: شوید *Anethum graveolens* یک گیاه یک‌ساله‌ای است که در حال حاضر این گیاه در قسمت‌های مختلف ایران از جمله نواحی جنوب شرق به صورت گسترده‌ای کاشته می‌شود. به طور کلی از برگ‌ها و تخم شوید به عنوان ادویه و چاشنی استفاده می‌شود. معمولاً اسانس شوید از برگ‌ها و تخم‌های آن تهیه می‌شود و می‌تواند در تهیه آدامس، شیرینی جات و ترشیجات استفاده شود [۱۳]. اثر فارماکولوژیک این گیاه نیز گزارش شده که از جمله آن می‌توان به اثرات ضد میکروبی، ضد اسپاسمی، ضد چربی و غیره اشاره نمود. حضور فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنولیک در انواع عصاره‌های شوید گزارش شده است [۱۴]. با توجه به بومی بودن گیاه شوید در ایران، دسترسی آسان، ارزان، مصرف غذایی و دارویی این گیاه از زمان‌های دور این گیاه جهت این مطالعه انتخاب شده است.

به طور کلی هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر عصاره‌های هیدروالکلی بر واکنش گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. بدین‌منظور در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی *Rosa damascena* Mill و *Anethum graveolens* واکنش گلیکوزیلاسیون آلبومین و هموگلوبین به صورت برون بدنی سنجش می‌شود.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی گیاهان و عصاره‌گیری

پس از تهیه و خشک نمودن گیاهان مورد نظر، عصاره‌گیری به روش خیساندن انجام شد. ۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه در اتانول ۷۰ به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا عمل خیساندن کامل و ترکیبات گیاه از آن خارج شود. محلول حاصل با صاف نمودن عصاره توسط کاغذ صافی جدا شده خشک شد و بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از از رادیکال آزاد DPPH (2,2-Diphenyl- Picryl- Hydrazyl) استفاده شد. ابتدا عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های متفاوت 5×10^{-2} mg/100 الی 5×10^{-6} در متانل خالص تهیه شد و سپس مخلوطی به نسبت ۱:۱ از محلول DPPH (8 mg/100) و عصاره‌های گیاهی با غلظت های متفاوت تهیه شد. جذب نمونه‌ها بعد از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر به دست آمد.

$$R\% = AD - AS/AD \times 100$$

AD: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر

AS: جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر

اندازه‌گیری میزان فنل تام

محتوای فنلی عصاره هیدروالکلی گیاه شوید توسط معرف فولین سیو کالتئو سنجش شد، از محلول رقیق شده‌ی عصاره آبی به ترتیب ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰ میکرولیتر به ۸ لوله آزمایش اضافه شد و حجم آنها با آب مقطر به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از کربنات سدیم ۷ درصد و ۱۰۰۰ میکرولیتر از معرف فولین رقیق شده به هر لوله آزمایش افزوده شد، برای هر رقت سه لوله آزمایش در نظر گرفته شد، همچنین محلول حاوی ۱۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد و ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین رقیق شده را به نسبت (۱:۱) با هم ترکیب کرده و به عنوان بلانک، مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط بلانک صفر شد. لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در تاریکی در حال تکان مداوم قرار گرفت و جذب نوری محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

برای تهیه پروتئین هموگلوبین خالص، از فرد سالم و غیرسیگاری خونگیری شده و با استفاده از پروتکل Austen Riggs به صورت زیر تخلیص شد. برای جلوگیری از انعقاد خون، محلول سدیم سیترات ۴ درصد به نسبت حجمی ۹ به ۱ به نمونه خون اضافه شد. با استفاده از میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت بالا (Max=20000 r.p.m) با دور ۳۰۰۰، پلاسما از نمونه خون جدا شده و رسوب به دست آمده جهت شستشو با محلول سالین نه درصد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ و پس از آن مجدداً با بافر فسفات ۰/۲ مولار به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس جهت لیز شدن گلبول قرمز و رها شدن هموگلوبین، آب دو بار تقطیر و سرد اضافه و با دور ۱۸۰۰۰، ده دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از آن جهت رسوب پروتئین های اضافی، سولفات آمونیوم ۲۰ درصد اضافه شد. این محلول به مدت یک ساعت با دور ۱۴۰۰ سانتریفیوژ و در نهایت محلول رویی حاوی هموگلوبین به کیسه دیالیز منتقل و دیالیز علیه بافر فسفات ۵۰ میلی مولار در pH ۴/۷ و دمای $^{\circ}C$ ۴ به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. محلول نهایی حاوی هموگلوبین خالص بوده که بوسیله کیت آزمایشگاهی، تعیین غلظت شد. از هموگلوبین تخلیص شده به این روش جهت بررسی میزان مهار گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی توسط عصاره‌های هیدروالکلی شوید و گل سرخ استفاده شد که در ادامه به شرح آن پرداخته می‌شود.

برای اندازه‌گیری هموگلوبین از روش سیانومت هموگلوبین که در کیت خریداری شده (*Zistchem* Diagnostics/Iran) استفاده شد. در این روش گلبول‌های قرمز در نمونه لیز شده و هموگلوبین آزاد می‌شود که توسط فری سیانید به مت هموگلوبین تبدیل و در ادامه فرایند توسط KCN تبدیل به سیانومت هموگلوبین می‌شود که شدت جذب نوری آن متناسب با مقدار هموگلوبین موجود در نمونه است.

تعیین شرایط بهینه جهت گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها

در این بخش به منظور یافتن بهترین غلظت و زمان برای گلیکوزیلاسیون از غلظت‌های مختلف گلوکز در زمان‌های مختلف استفاده شد که در ادامه به شرح کامل آن پرداخته می‌شود:

ابتدا از هموگلوبین استخراج شده پس از تعیین غلظت محلولی با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. از پروتئین آلبومین تهیه شده نیز محلولی با همین غلظت آماده شد. محلول گلوکز در غلظت‌های mg/dl ۰، ۴، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ در بافر فسفات M ۰/۰۱ pH=۷/۴ حاوی جنتامایسین (mg /۱۰۰ml ۲۰۰) تهیه شد. غلظت بهینه پروتئین و زمان انکوباسیون به طور جداگانه برای هر پروتئین تهیه شد. نمونه پروتئین هموگلوبین و آلبومین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت در محلول گلوکز تهیه شده در غلظت‌های مختلف انکوبه شد، که در نهایت با توجه به نتایج حاصله، زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت جهت انجام تحقیق انتخاب شد.

نحوه اندازه‌گیری میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها

پس از اتمام زمان انکوباسیون هر لوله آزمایش با یک میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد دوبار شست و شو و با استفاده از سانتریفیوژ در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند. ته‌نشین به دست آمده در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با یک میلی‌لیتر از بافر فسفات M ۰/۰۱ pH=۷/۴ و ۰/۵ میلی‌لیتر از اسید اگزالیک N ۰/۳ قرار گرفت. پس در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) با ۰/۵ میلی‌لیتر کلرواستیک اسید ۴۰ درصد توسط سانتریفیوژ در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه مجدداً رسوبات جدا شد. محلول رویی جدا شد و سپس در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با ۰/۵ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید M ۰/۰۵ مخلوط شد. محلول نهایی در nm ۴۴۳ با روش کالریمتری اندازه‌گیری شد.

گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و آلبومین

۱ میلی‌لیتر آلبومین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱ میلی‌لیتر هموگلوبین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات M ۰/۰۱ pH=۷/۴ به مدت ۷۲ ساعت به صورت جداگانه در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های هیدروالکلی شوید و گل سرخ و ۱ میلی‌لیتر از محلول گلوکز (برای آلبومین ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای هموگلوبین ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و جنتامایسین قرار گرفتند. همچنین در گروه کنترل که حاوی همه مواد به جز عصاره‌ها بودند آزمایش تکرار شد. سپس درجه گلیکوزیلاسیون در حضور عصاره‌ها و نیز در فقدان آنها طبق روش که عنوان شد، اندازه‌گیری شد.

به دست آوردن میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در حضور و غیاب عصاره‌ها

برای تعیین اثر هریک از عصاره‌های مذکور از تست تری باربیتوریک اسید استفاده می‌شود. به این صورت که، به محلول حاصل از گلیکوزیلاسیون، ۱ میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک اضافه می‌شود محلول سانتریفیوژ شده به رسوبات ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و اسید اگزالیک اضافه می‌شود. پس از اینکه به مدت یک ساعت در ۱۰۰ درجه قرار داده شد، ۰/۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرو استیک به آن اضافه می‌شود، سانتریفیوژ شده به محلول رویی ۰/۵ میلی‌لیتر TBA اضافه شده و جذب آن در ۴۴۳ نانومتر قرائت می‌شود و با نمونه‌ی شاهد مقایسه می‌شود.

آنالیز آماری

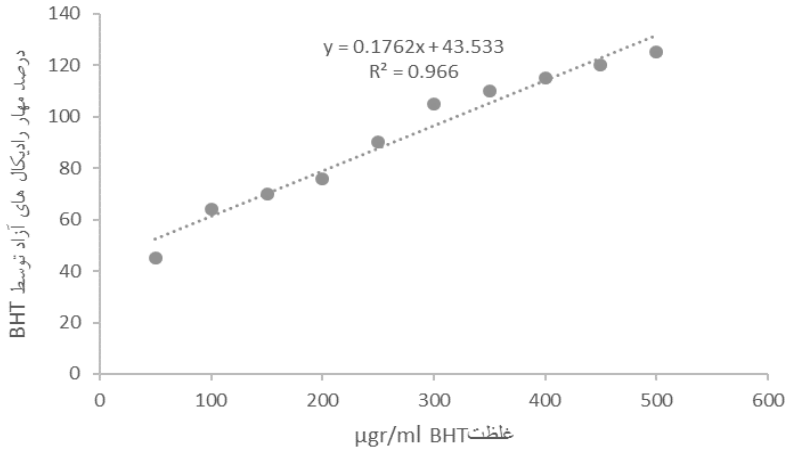
برای هر یک از آزمون‌های مورد بررسی بسته به نوع آن، آزمایش در ۳ تا ۴ تکرار انجام شد. نتایج به دست آمده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بودند. داده‌ها با کمک نرم‌افزار

SPSS ورژن ۲۱ مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. به این صورت که ابتدا از طریق آزمون کولموگروف اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت (در این پژوهش به دلیل بالا بودن تعداد تکرارهای هر آزمون تمامی داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند). پس از آن از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و آنالیز واریانس دوطرفه (Tow way ANOVA) داده‌ها مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند. مقادیر IC_{50} از طریق آنالیز رگرسیون خطی به دست آمد. برای مثال در تست بررسی فعالیت روبش رادیکال DPPH از روی معادله خط رگرسیون به دست آمده، غلظتی از عصاره یا آسکوربیک اسید که توانایی روبش ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH را دارا بودند، به دست آمد.

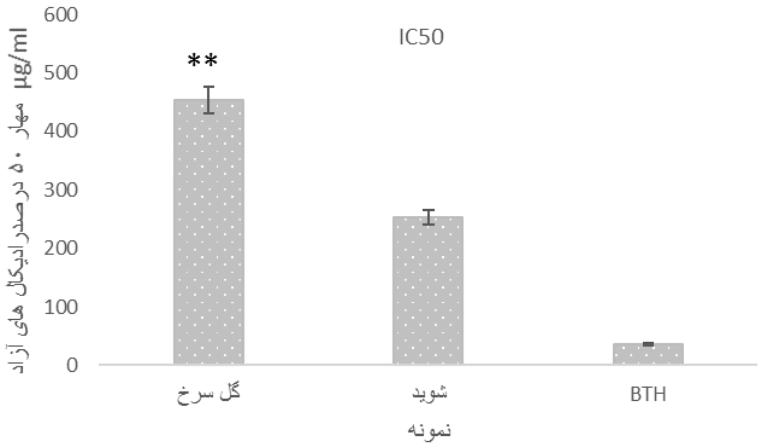
نتایج

نتایج حاصل از بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام:

نمودار شماره ۱ درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد توسط BTH را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۱- نمودار استاندارد BTH بر اساس غلظت و درصد بازدارندگی

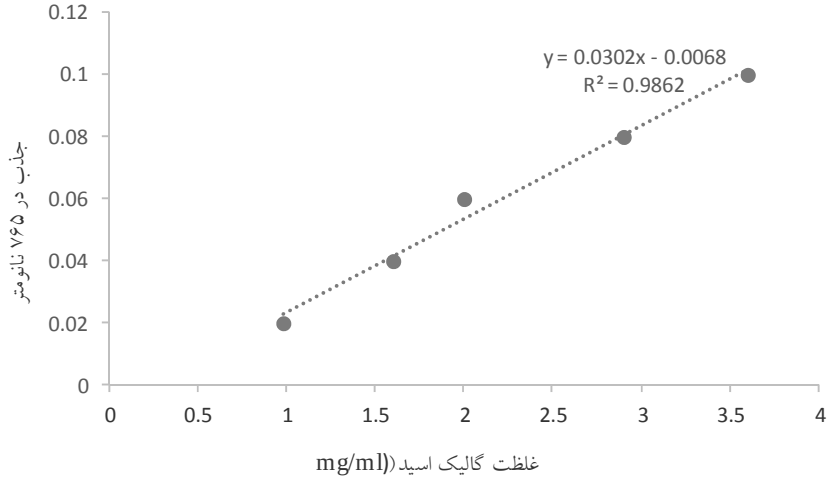


نمودار شماره ۲- مقایسه مهار۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد توسط نمونه‌های مختلف در حضور کنترل BHT

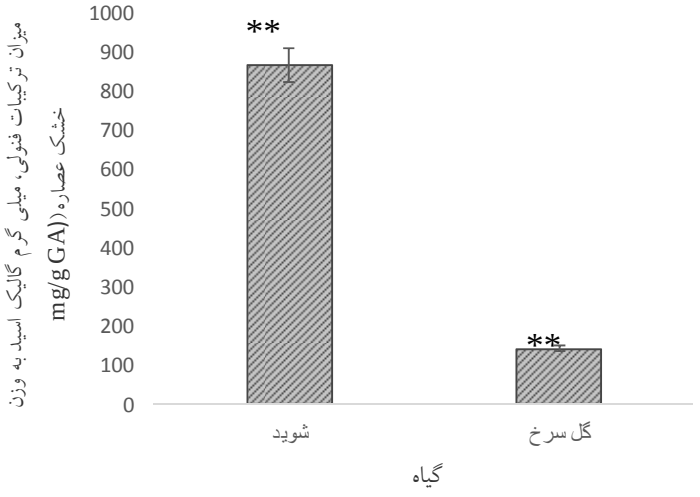
طبق نمودار شماره ۲ مهار۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد توسط عصاره‌های هیدروالکلی شوید و گل سرخ در کنار کنترل BHT، بر طبق آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و تحلیل Post Hoc دانکن و LSD بین نمونه‌ها دو به دو اختلاف معناداری از نظر آماری وجود دارد (P< ۰/۰۰۱). چنانچه میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی BTH بیشتر و عصاره هیدروالکلی گل سرخ از همه کمتر می‌باشد.

محتوای تام فنلی گیاه با استفاده از روش فولین- سیوکالتو با استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری شد (نمودار شماره ۳). نتایج حاصل از انجام این تست در نمودار شماره ۴ آورده شده است.

با توجه به نمودار شماره ۴، میانگین مقدار ترکیبات فنلی عصاره شوید به طور معناداری از عصاره گل سرخ بیشتر است که این اختلاف از نظر آماری معنادار می‌باشد (P< ۰/۰۰۱).



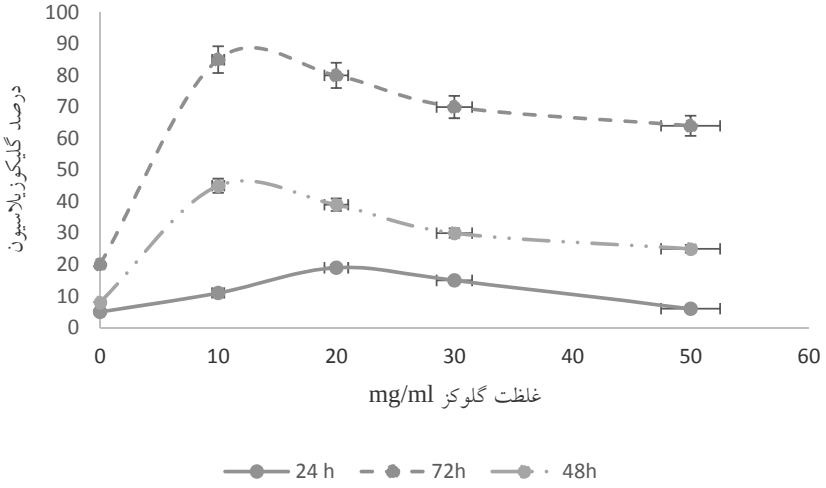
نمودار شماره ۳- منحنی استاندارد گالیک اسید بر اساس غلظت و جذب نوری



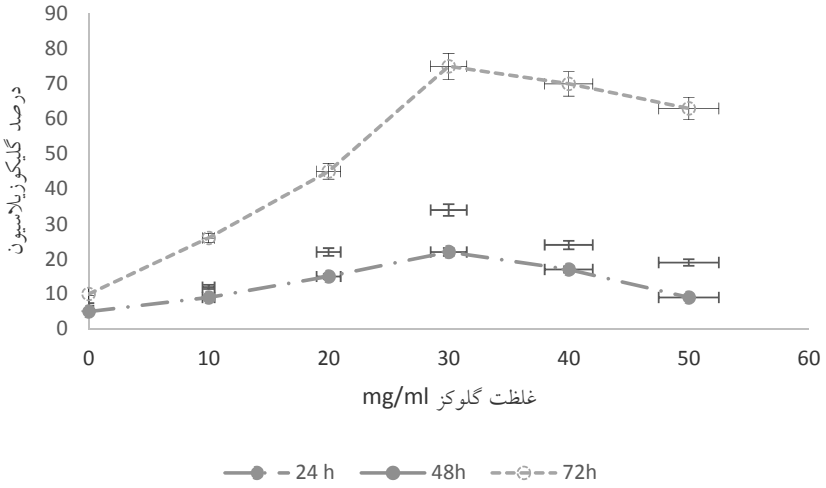
نمودار شماره ۴- میانگین میزان ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی دو گیاه شوید و گل سرخ

بر اساس نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Tow Way ANOVA) هم زمان و هم غلظت گلوکز بر روند گلیکوزیلاسیون هموگلوبین تأثیرگذار می‌باشد (P< ۰/۰۰۵) (نمودار شماره ۵). با توجه به نتایج به دست آمده بهترین غلظت و زمان برای گلیکوزیلاسیون هموگلوبین غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلوکز به مدت ۷۲ ساعت می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Tow Way ANOVA) هم زمان و هم غلظت گلوکز بر روند گلیکوزیلاسیون آلبومین تأثیرگذار می‌باشد (P< ۰/۰۰۵) (نمودار شماره ۶). با توجه به نتایج به دست آمده بهترین غلظت و زمان برای گلیکوزیلاسیون آلبومین غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلوکز به مدت ۷۲ ساعت می‌باشد.



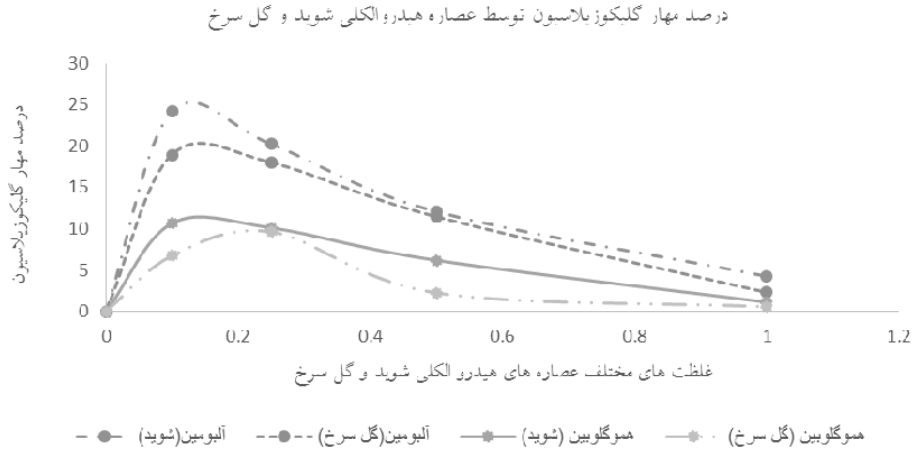
نمودار شماره ۵- بررسی اثر غلظت گلوکز و زمان انکوباسیون بر درصد گلیکوزیلاسیون هموگلوبین



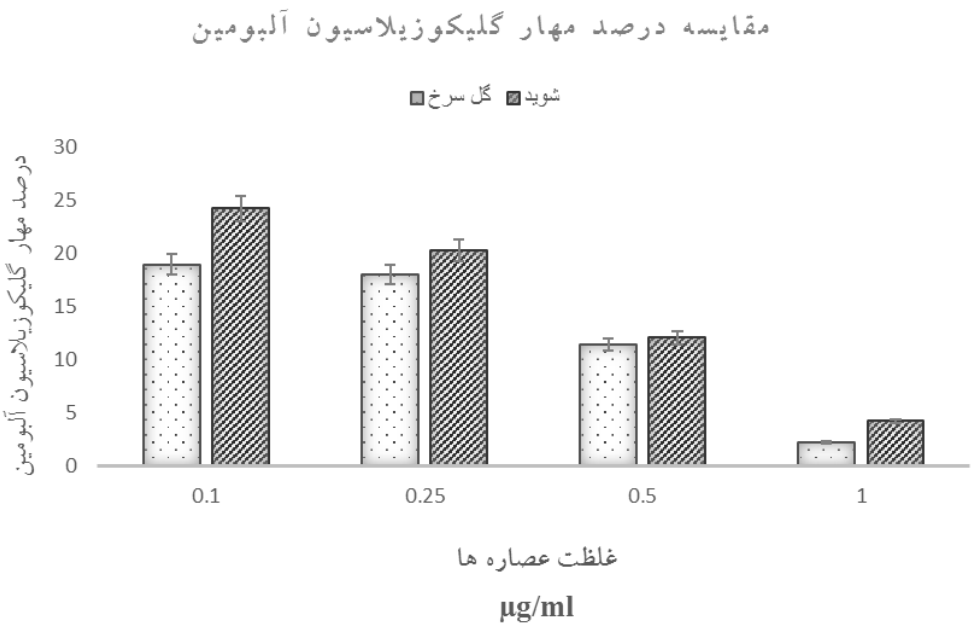
نمودار شماره ۶- بررسی اثر غلظت گلوکز و زمان انکوباسیون بر درصد گلیکوزیلاسیون آلبومین

نمودار شماره ۷ درصد مهاری دو عصاره را بر روی دو پروتئین آلبومین (ALB) و هموگلوبین (Hem) نشان می‌دهد. چنانچه مشخص است در هر دو عصاره درصد مهار آلبومین بیشتر بوده است.

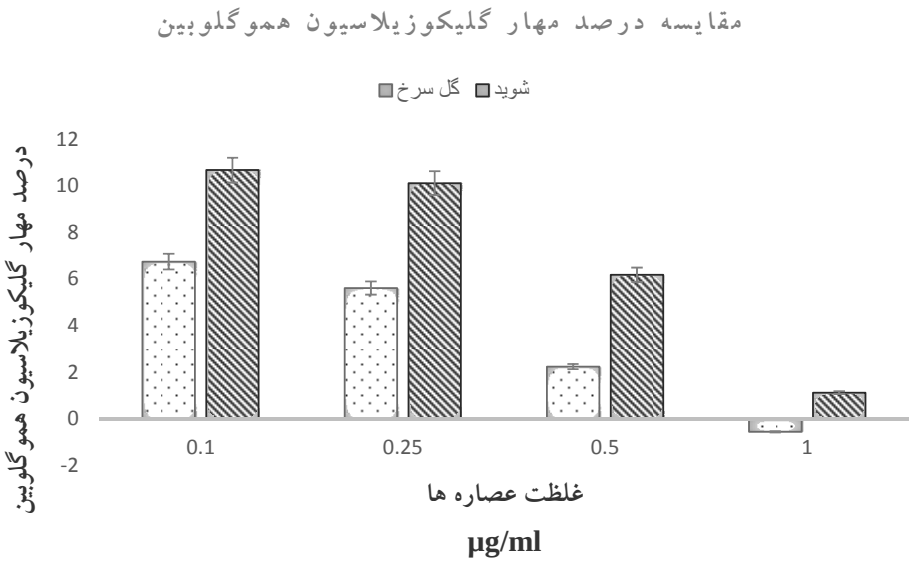
همان‌طور که در نمودارهای شماره ۸ و ۹ مشخص است و با توجه به نتایج حاصل از آزمون T زوج بین تمامی غلظت-های عصاره‌های هیدروالکلی شوید و گل سرخ معناداری وجود دارد (P < ۰/۰۰۱) که نشان‌دهنده متفاوت بودن اثر این دو عصاره می‌باشد، همچنین بیشترین فعالیت مهاری عصاره هیدروالکلی شوید مربوط به غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ارتباط با عصاره هیدروالکلی گل سرخ در غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. با توجه به اختلاف معنادار اثر غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر دو عصاره در مهار گلیکوزیلاسیون این گونه به نظر می‌رسد که فعالیت مهاری عصاره هیدروالکلی شوید در مقایسه با عصاره هیدروالکلی گل سرخ در ارتباط با گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و آلبومین بیشتر است (P < ۰/۰۰۱).



نمودار شماره ۷- درصد مهار گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی آلبومین و هموگلوبین توسط عصاره هیدرو الکلی شوید و گل سرخ



نمودار شماره ۸- مقایسه درصد مهار گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی آلبومین توسط عصاره‌های هیدروالکلی گل سرخ و شوید



نمودار شماره ۹- مقایسه درصد مهار گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی هموگلوبین توسط عصاره‌های هیدرو الکلی گل سرخ و شوید

بحث

در بیماری دیابت قندی با افزایش میزان قند خون پروتئین-های بدن به صورت غیرآنزیمی با اتصال به گلوکز به حالت گلیکوزیله درآمده و با گذشت زمان موجب تظاهرات دیررس این بیماری می‌شوند. در واکنش گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین، اتصال گروه آلدهیدی قند به عوامل آمین آزاد موجود در ساختار پروتئین صورت می‌گیرد [۱۵].

عوامل مختلفی روی میزان گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی یک پروتئین مؤثرند از جمله می‌توان به غلظت قند، میزان پروتئین، زمان مجاورت قند با پروتئین و عوامل محیطی اشاره نمود. در این پژوهش زمان انکوباسیون و غلظت گلوکز به عنوان دو فاکتور اصلی دخیل در گلیکوزیلاسیون پروتئین انتخاب شدند، با توجه به نتایج به دست آمده با افزایش زمان میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها بیشتر شد، اما با افزایش غلظت گلوکز فقط تا غلظت خاصی برای هر پروتئین گلیکوزیلاسیون افزایش یافت و بعد از آن تقریباً میزان گلیکوزیلاسیون ثابت مانده است. در ارتباط با میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین آلبومین در حضور میزان کمتری از گلوکز نسبت به هموگلوبین گلیکوزیله شده است، علاوه بر همخوانی داشتن این نتایج با مطالعات پیشین مانند عسگری و همکاران (۱۳۸۳) احتمالاً این اختلاف به تفاوت در ساختار و سایز دو پروتئین و میزان گروه‌های عاملی در دسترس در سطح پروتئین‌ها بستگی دارد. چنانچه هموگلوبین یک تترامر و نسبت به آلبومین درشت است که به نظر می‌رسد عمده ترین علت در تفاوت در میزان گلوکز جهت گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و آلبومین می‌باشد [۱۷، ۱۶].

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که هم مدت زمان افزایش قند خون و هم میزان قند خون بر روند گلیکوزیلاسیون دخیل می‌باشد و خطر گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی بیشتر آلبومین را تهدید می‌کند.

با توجه به نتایج به دست آمده در ارتباط با اثر عصاره هیدروالکلی شوید بر میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین آلبومین با افزایش غلظت عصاره میزان مهار گلیکوزیلاسیون کاهش یافته است، چنانچه بیشترین درصد مهار گلیکوزیلاسیون آلبومین در حضور عصاره هیدروالکلی شوید در غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اتفاق افتاده است. با افزایش غلظت میزان مهار

گلیکوزیلاسیون کاهش یافته است اما با این وجود بازهم نسبت به گروه کنترل گلیکوزیلاسیون در تمامی غلظت‌ها مهار شده است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت عصاره هیدروالکلی شوید بر مهار گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی آلبومین می‌باشد.

در ارتباط با میزان مهار گلیکوزیلاسیون با اثر عصاره هیدروالکلی شوید بر میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین هموگلوبین با افزایش غلظت عصاره میزان مهار گلیکوزیلاسیون کاهش یافته است، و نتایج حاصل از آلبومین تکرار شد ولی با این تفاوت که اثر مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی شوید در ارتباط با هموگلوبین نسبت به آلبومین کمتر بوده است. ولی با این وجود بازهم هموگلوبین در حضور غلظت‌های هموگلوبین در گروه کنترل کمتر گلیکوزیله شده است.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری کلی از این بخش نشان دهنده اثر مثبت عصاره هیدروالکلی شوید در میزان گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و آلبومین در جهت مهار گلیکوزیلاسیون می‌باشد که درصد مهار در پروتئین آلبومین بیشتر بوده است.

با توجه به نتایج به دست آمده در ارتباط با اثر عصاره هیدروالکلی گل سرخ بر میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین آلبومین با افزایش غلظت عصاره میزان مهار گلیکوزیلاسیون کاهش یافته است، چنانچه بیشترین درصد مهار گلیکوزیلاسیون آلبومین در حضور عصاره هیدروالکلی گل سرخ در غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اتفاق افتاده است. با افزایش غلظت میزان مهار گلیکوزیلاسیون کاهش یافته است اما با این وجود بازهم نسبت به گروه کنترل گلیکوزیلاسیون در تمامی غلظت‌ها مهار شده است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت عصاره هیدروالکلی گل سرخ بر مهار گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی آلبومین می‌باشد.

در ارتباط با میزان مهار گلیکوزیلاسیون در حضور عصاره هیدروالکلی گل سرخ بر میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین هموگلوبین با افزایش غلظت عصاره میزان مهار گلیکوزیلاسیون کاهش یافته است، و نتایج حاصل از آلبومین تکرار شد ولی با این تفاوت که اثر مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی شوید در ارتباط با هموگلوبین نسبت به آلبومین کمتر بوده است. ولی با این وجود بازهم هموگلوبین در حضور غلظت‌های هموگلوبین در گروه کنترل به جز ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر که درصد مهار منفی گزارش شده کمتر گلیکوزیله شده است. در ارتباط با عدم مهار گلیکوزیلاسیون در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی گل سرخ مطالعات مشابه نیز با این نتایج رو به رو شده‌اند.

به طور کلی در رابطه با توجیه این مسأله که در هر دو عصاره با افزایش غلظت مهار گلیکوزیلاسیون کاهش یافته است؛ چنین اثراتی در مورد برخی از ترکیبات طبیعی بخصوص هنگامی که عوامل چند ترکیبی مطرح می‌باشند، مشاهده می‌شود. در این رابطه می‌توان به دو احتمال اشاره نمود. این اثرات می‌تواند مربوط به وجود ترکیبات تسریع‌کننده گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها در داخل عصاره باشد که در غلظت‌های کم قادر به ایجاد اثر نیستند ولی با افزایش غلظت، می‌توانند اثرات سایر عوامل مهارکننده گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها را که در عصاره وجود دارند، بپوشانند [۱۹، ۱۸]. احتمال دیگر وجود ترکیباتی است که با توجه به غلظت خود می‌توانند دارای اثرات دوگانه باشند [۲۱، ۲۰].

از طرفی ترکیبات فنولی اثرات نامطلوب خود را از طریق اتصال بـه ماکرومولکول‌ها و آنـزیم‌ها و رسوب آنها اعمال می‌کنند به طوری که این ترکیبات با هضم و جذب ترکیبات مغذی نظیر پروتیین‌ها، کربوهیدرات‌ها، املاح و ویتامین‌ها مداخله ایجاد کرده و باعث کاهش ارزش تغذیه‌ای و قابلیت هضم مواد غذایی می‌شوند. از سایر آثار نامطلوب تانن‌ها و ترکیبات فنولی می‌توان به افزایش دفع پروتیین‌ها، آمینواسیدها و املاح ضروری از بدن و آسیب به لایه مخاطی دستگاه گوارش اشاره کرد.

منابع

1. Benzie I.F.F. and J.J. Strain. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 1996; 239 (1): 70 - 76.

2. Schumann and e. al, IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40 (7): 734 - 738.

3. Schumann and et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006; 44 (9): 1146-1155.

4. Schumann and et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40 (7): 718 - 724.

5. Schumann and et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2002; 40 (7): 725-733.

6. Dodge J.T., Mitchell C. and Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1963; 100 (1): 119-130.

7. Habeeb A.F.S.A. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellmans reagent. Method Enzymol 1972, 34: pp: 457-464.

8. Levine R.L. and et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, in Methods in Enzymology, A.N.G. Lester Packer, Editor. 1990, Academic Press. pp: 464-478.

9. Buege J.A. and Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation, in Methods in Enzymology, F. Sidney and P. Lester, Editors. 1978, Academic Press. pp: 302-310.

10. Beutler E., Duron O. and Kelly B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1963; 61: 882.

11. Paglia DE and V. WN, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70: 158-160.

12. Paolet F and Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemicals systems based on NAD(P)H oxidation. Method Enzymol, 1990. 186: p. 209-220.

13. Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structureactivity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002; 13 (10): 572 - 84.

14. Lam RY, Woo AY, Leung PS and Cheng CH. Antioxidant actions of phenolic compounds found in dietary plants on low-density lipoprotein and erythrocytes in vitro. *J. Am. Coll. Nutr.* 2007; 26 (3): 233 - 42.

15. Jamshidi M, Ahmadi Ashtiani HR, Rezazadeh Sh, Fatehi Azad F, Mazandarani M and Khaki A. Study on phenolics and antioxidant activity of some selected plant of mazandaran province. *J. Med. Plants* 2010; 34 (9): 177 - 83.

16. Miler JA, Gravallese E and Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. *J. Clin. Invest.* 1980; 65: 896-901.

17. Pahari B, Chakraborty S, Chaudhuri S, Sengupta B and Sengupta PK. Binding and antioxidant properties of therapeutically important plant flavonoids in biomembranes: Insights from spectroscopic and quantum chemical studies. *Chem. Phys. Lipids* 2012; 165 (4): 488-96.

18. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ and Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J. Biotechnol.* 2006; 5 (11): 1142-45.

19. Kondo T, Hirose M and Kageyama K. Roles of Oxidative Stress and Redox Regulation in Atherosclerosis. *J. Atheroscler Thromb*. 2009; 16: 532 - 8.

20. Rajurkar NS and Hande SM. Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian J. Phrm. Sci.* 2011; 146 - 51.

21. Peng J, Jones GL and Watson K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidants supplements. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28 (11): 1598-1606.

Hydroalcoholic Extracts Effect of *Rosa damascena* Mill and *Anethum graveolens* on the Proteins Glycosylation In Vitro

Soleimani Dehnavi M (M.Sc.), Shahanipour K (Ph.D.)*

Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
*Corresponding author: Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
Tel: +98-31-37653258, Fax: +98-31-7420140
Email: shahanipur_k@yahoo.com

Abstract

Background: One of the complications of diabetes mellitus is "proteins glycosylation in the body" causing the change in nature, structure and biochemical activity of them. Decreasing or inhibiting this reaction causes to improve diabetic symptoms. The use of antioxidant-rich herbs in this case, seems to be effective.

Objective: The purpose of this study is to investigate the albumin and hemoglobin glycosylation reaction in the presence of various concentrations of *Anethum graveolens* and *Rosa damascena* Mill hydroalcoholic extracts.

Methods: 1) plants collection, 2) extraction by maceration method, 3) evaluating the total antioxidant capacity and phenole amount respectively by DPPH and folin-Ciocalteu method, 4) specializing and measuring the amount of hemoglobin from human blood, 5) optimizing the stabilization, 6) investigating the glycosylation amounts, both in the presence and absence of extracts.

Results: According to results obtained, the phenol amount and the total antioxidant capacity of Anethum graveolens hydroalcoholic extract is significantly more than Roses's ($P<0.05$). The highest amount of hemoglobin glycosylation per time unit, has been at a concentration of 10 mgr glucose for 72 hours of incubation and about albumin was 30 mgr within 72 hours. For both extracts in concentration 0.1µg / ml of both proteins, the *Anethum graveolens* hydroalcoholic extract functions better compared to *Rosa damascena* Mill ($P <0.05$).

Conclusion: The two *Anethum graveolens* and *Rosa hydroalcoholic* extracts on average cause to reduce albumin and hemoglobin glycosylation. But more studies are needed to prove it.

Keywords: Albumin, Dill, Hemoglobin, Glycosylation, Roses