

فعالیت مهارکنندگی آلفا گلوکوزیداز در عصاره‌ی متانولی برخی گیاهان استان کردستان

محمدعلی زارعی*، حسن طه‌زاده

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران
*آدرس مکاتبه: سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه علوم زیستی
تلفن: ۰۹۱۸۸۷۱۰۶۳۲، نمابر: ۳۳۶۲۲۷۰۲ (۰۸۷)
پست الکترونیک: mazarei@uok.ac.ir

[doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.227](https://doi.org/10.29252/jmp.4.72.S12.227)

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۹

چکیده

مقدمه: از آنجا که آنزیم آلفا گلوکوزیداز باعث تجزیه کربوهیدرات‌های غذایی و به دنبال آن جذب و افزایش سطح گلوکز خون می‌شود، از مهارکننده‌های این آنزیم به عنوان دارو جهت درمان برخی از اشکال بیماری دیابت استفاده می‌شود. داروهایی که امروزه برای کنترل میزان گلوکز خون مصرف می‌شوند دارای عوارض جانبی متعددی هستند. لذا از آنجا که گیاهان منبع بسیار مناسبی از لحاظ ترکیبات فعال زیستی هستند.

هدف: هدف از این مطالعه یافتن مهارکننده‌های قوی و جدید آنزیم آلفاگلوکوزیداز با استفاده از منابع گیاهی می‌باشد. روش بررسی: عصاره‌های متانولی ۳۲ گونه گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مرکزی استان کردستان، به منظور بررسی فعالیت مهاری آنها بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز در غلظت‌های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. از آکاربوز محلول در بافر فسفات به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. همه سنجش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

نتایج: مطابق نتایج این مطالعه عصاره گیاهان *Hypericum scabrum* L.، *Campanula involucrata* Auch. ex DC.، *Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch. و *Silene ampulata* Bioss. فعالیت مهارکنندگی بالای ۶۰ درصد بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز از خود نشان دادند. در این میان فعالیت مهاری عصاره گیاهان گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata*) و سیلن حبابی (*Silene ampulata*) به طور چشم‌گیری بالا، و IC_{50} آنها ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاهان گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata*) و سیلن حبابی (*Silene ampulata*)، به دلیل درصد مهار بالا و شاخص IC_{50} پایین می‌توانند جهت مطالعات دقیق‌تر موضوع جالبی باشند.

کل‌واژگان: آلفاگلوکوزیداز، دیابت، عصاره گیاهی، مهارکننده



مقدمه

بیماری قند یک بیماری مزمن است که در اثر نقص ارثی یا اکتسابی در ترشح انسولین و همینطور در نتیجه‌ی پاسخ‌دهی کاهش یافته‌ی اندام‌ها به انسولین ترشح شده بوجود می‌آید. چنین نقصی باعث افزایش سطح گلوکز خون می‌شود که این وضعیت به نوبه‌ی خود می‌تواند بسیاری از سیستم‌های بدن شامل عروق خونی و اعصاب را تخریب کند [۱]. دیابت در حدود ۵ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و مدیریت دیابت بدون هر گونه اثرات جانبی هنوز هم یک چالش برای علم پزشکی است [۲]. در سال ۲۰۰۸ تخمین زده شد که ۱۵۰ میلیون نفر از مردم سراسر دنیا به دیابت مبتلا هستند و پیش بینی می‌شود که این تعداد تا سال ۲۰۲۵ به ۳۰۰ میلیون نفر برسد [۳]. یک روش درمانی برای درمان دیابت جلوگیری از افزایش قند خون بعد از وعده غذایی است. این راهکار بوسیله‌ی به تأخیر انداختن جذب گلوکز از طریق بازداشتن آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کربوهیدرات آلفاگلوکوزیداز و آلفاآمیلاز در مجرای گوارشی میسر می‌شود [۴]. بازدارنده‌های این آنزیم‌ها هضم کربوهیدرات را به تأخیر می‌اندازند و سبب کاهش در سرعت جذب گلوکز شده و در نتیجه مانع از افزایش میزان گلوکز بعد از مصرف غذا می‌شوند [۵]. در میان تنوع وسیع آنزیم‌هایی که بر پیوندهای گلیکوزیدی مؤثر هستند، گلوکوزیدازها به طور بدیهی به دلیل اینکه شکست پیوندهای گلیکوزیدی را کاتالیز نموده و گلوکز را از انتهای غیر احیا کننده زنجیره‌های الیگو یا پلی ساکارید رها می‌کنند، یک هدف درمانی قدرتمند در نظر گرفته می‌شوند. بازدارنده‌های گلوکوزیدازی اخیراً به دلیل پتانسیل درمانی آنها در درمان ناهنجاری‌های متابولیکی همچون دیابت مورد توجه قرار گرفته‌اند [۶]. بازدارنده‌های آلفاگلوکوزیدازی همچون آکاربوز، ووگلیبوز و میگلینول به مقدار وسیعی به تنهایی یا در ترکیب با دیگر داروهای آنتی‌دیابتی یا انسولین در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مورد استفاده قرار می‌گیرند [۷].

در بسیاری از کشورهای در حال توسعه همچون نپال، طب سنتی بویژه طب گیاهی، گاهی تنها منبع مؤثر برای مراقبت از سلامتی است [۸]. داروهای گیاهی به مقدار زیادی به دلیل

تأثیرگذاری آنها، اثرات جانبی کمتر و قیمت نسبتاً پایین‌تر تجویز می‌شوند. طب سنتی هندی و طب سنتی چینی از بیشتر گیاهان و عصاره‌های گیاهی به عنوان عوامل آنتی‌دیابتی استفاده کرده‌اند [۹، ۱۰]. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت مهارکنندگی عصاره متانولی تعدادی از گیاه استان کردستان بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز، به منظور یافتن گیاهانی است که عصاره آنها بر روی فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز اثر مهارکنندگی قابل توجهی داشته و موضوع مناسبی برای مطالعات دقیق‌تر بعدی باشند.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و بیوشیمیایی

آنزیم آلفاگلوکوزیداز مخمری، سوپسترای پارانیتر و فنیل آلفا دی‌گلوکو پیرانوزید (pNPG)، آکاربوز (مهارکننده استاندارد آنزیم آلفا گلوکوزیداز)، آلبومین سرم گاو (BSA) از نمایندگی‌های شرکت سیگما خریداری شدند. حلال متانول، کربنات سدیم و نمک‌های فسفات پتاسیم جهت تهیه بافر فسفات، از نمایندگی‌های شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

جمع‌آوری، تهیه پودر و تهیه عصاره متانولی از نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی در فصل بهار از نواحی مختلف استان کردستان جمع‌آوری شدند و توسط کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان شناسایی شدند. در مرحله‌ی بعدی برای تهیه ی پودر از نمونه‌ها، گیاهان خشک شده توسط دستگاه آسیاب خانگی به صورت پودر نرم درآمدند. سپس به منظور تهیه عصاره متانولی ۳۵ گرم پودر گیاهی در ۱۵۰ میلی‌لیتر حلال متانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. در مرحله‌ی بعدی، در دستگاه روتاری اوپریتر با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و پس از تخلیه از مخزن دستگاه بر روی بشقاب‌های شیشه‌ای پخش شدند. بشقاب‌های شیشه‌ای حاوی عصاره به منظور خشک شدن کامل، به مدت ۷۲ ساعت در زیر هود شیمیایی و دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. عصاره‌های خشک شده از روی پلیت‌های شیشه‌ای جمع‌آوری شده و در میکروتیوب تا زمان انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



مزاحم سنجیده و از جذب چاهک آزمون کسر می‌شود. بدین صورت جذب نهایی فقط در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم می‌باشد.

تحلیل داده‌ها

پس از اتمام سنجش، جذب پلیت خالی از جذب چاهک های متناظرش کسر شده و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از چاهک آزمون، جذب نهایی اندازه‌گیری می‌شود. سپس نمودار جذب نهایی چاهک‌ها بر علیه زمان رسم شده و شیب نمودار محاسبه شد. با مقایسه‌ی شیب نمودار عصاره و کنترل منفی با استفاده از فرمول (۱) درصد مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز محاسبه می‌شود. درصد مهار برای سه تکرار هر عصاره محاسبه و در نهایت میانگین گرفته شد و انحراف استاندارد محاسبه شد. تمامی مراحل مذکور با استفاده از نرم افزار اکسل انجام شده است.

$$\text{فرمول (۱)} \times 100 = \frac{\text{شیب نمودار عصاره} - \text{شیب نمودار کنترل منفی}}{\text{شیب نمودار کنترل منفی}} = \text{درصد مهار}$$

تمام مراحل گفته شده در ۴ غلظت مختلف عصاره انجام گرفت و میانگین درصد مهار به دست آمد. از طریق رسم نمودار درصد مهار بر علیه غلظت عصاره شاخص IC_{50} ، که بیان کننده غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد مهار می‌دهد، تعیین شد.

آنالیز سستیک مهار آنزیمی

به منظور تعیین نوع مهار اعمال شده توسط عصاره‌های دارای بیشترین درصد مهار، نمودار معکوس مضاعف لینیور-برک بر اساس واکنش آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده و بدون حضور عصاره (کنترل) در هشت غلظت مختلف سوبسترا، رسم شد. غلظت‌های تهیه شده سوبسترا بر اساس ضرایب تصحیح کننده نمودار لینیور-برک انتخاب، و عملاً محلول سوبسترا در شش غلظت مختلف تهیه شد. برای کنترل و هر یک از غلظت‌های مهارکننده V_{max} و K_m تعیین شد، همچنین مقدار K_i برای عصاره با استفاده از نمودارهای ثانویه در غلظت‌های مختلف مهارکننده به دست آمد.

سنجش مهار فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز

در اثر هیدرولیز سوبسترا (pNPG) توسط آنزیم آلفاگلوکوزیداز، ماده‌ی رنگی پارا- نیتروفنل تولید می‌شود که زرد رنگ است و دارای جذب حداکثری در طول موج ۴۰۵ نانومتر است. هرچه فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز بیشتر باشد، شدت رنگ تولیدی و به دنبال آن جذب نوری نیز بیشتر خواهد بود. حضور عصاره‌ی گیاهی به علت کاهش فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز باعث می‌شود که مقدار کمتری سوبسترا تجزیه شده و در نتیجه ماده رنگی کمتری تولید شود، که منجر به کاهش جذب نوری می‌شود.

پروتکل سنجش

در این پروژه به منظور سنجش تأثیرات عصاره‌های گوناگون بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز از روش اصلاح شده‌ی Pistia-Bruggeman استفاده شده است [۱۱]. سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۱۵۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان انجام شد. در هر چاهک به ترتیب بافر فسفات، آنزیم آلفاگلوکوزیداز و عصاره‌ی گیاهی ریخته و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سوبسترا (pNPG) اضافه شد آنگاه پس از ۳۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت توقف واکنش، سدیم کربنات به آن اضافه شد. به منظور همزمانی شروع واکنش‌ها، از سمپلر ۱۲ کاناله برای اضافه کردن سوبسترا و سدیم کربنات استفاده شد. سپس میکروپلیت در داخل دستگاه میکروپلیت ریدر قرار گرفته و پس از ۱ ثانیه شیک، جذب آن به مدت ۵ دقیقه هر یک دقیقه یک بار در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب میکروپلیت‌های خالی، در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شده و از جذب نهایی کم شد. سنجش عصاره‌های گیاهی در ۳ تکرار انجام شد. به دلیل امکان حضور برخی عوامل دیگر غیر از محصول واکنش، که دارای جذب در ۴۰۵ نانومتر بودند و یا هیدرولیز خود به خودی سوبسترا، برای هر کدام از عصاره‌ها یک چاهک بلانک نیز اختصاص داده شد. چاهک بلانک حاوی تمام مواد به غیر از آنزیم بوده، یعنی در واقع از طریق چاهک بلانک جذب عوامل



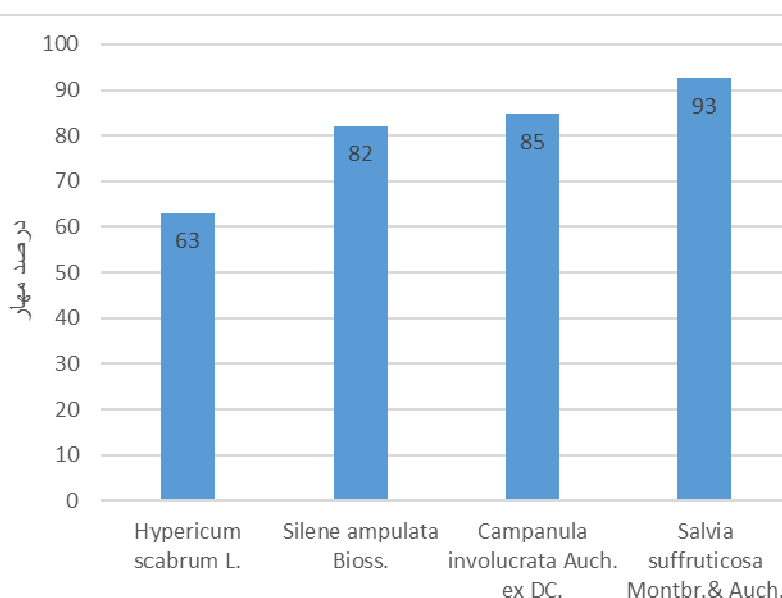
نتایج

نتایج درصد مهار

پس از انجام سنجش‌ها، تحلیل داده‌های هر سنجش که در سه تکرار انجام شده بود، با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، از میان سی و دو گیاه استان کردستان عصاره‌های گیاهان مریم گلی بوته‌ای (*Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch)، گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata* Auch. ex DC)، سیلن حبابی (*Silene ampulata* Bioss.) و گل راعی دیهیمی (*Hypericum scabrum* L.) مهار بالای ۶۰ درصد را بر روی آلفاگلوکوزیداز داشتند، (شکل شماره ۱). مقادیر درصد مهار و انحراف استاندارد به دست آمده برای تمامی گیاهان مورد مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده‌اند. IC₅₀ عصاره گیاهان فوق، از طریق رسم نمودار غلظت بر علیه درصد مهار محاسبه شد، که نتایج به دست آمده در جدول شماره ۲ آورده شده است.

نتایج بررسی سنتیکی آنزیم آلفاگلوکوزیداز

با توجه به نتایج، مشخص شد که عصاره‌های گیاهان گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata*) و سیلن حبابی (*Silene ampulata*) در ضمن اینکه اثر مهاری قابل توجهی بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشتند (به ترتیب ۸۵ و ۸۲ درصد مهار)، کمترین مقدار IC₅₀ را به ثبت رسانیدند (۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر). لذا ضمن مطالعه تغییرات سرعت اولیه واکنش در مقابل تغییرات غلظت سوبسترا، نمودار لاین ویور-برک برای عصاره گیاهان فوق در مقابل کنترل رسم شد، شکل شماره‌های ۲ و ۳. نوع مهار عصاره‌ها براساس نمودارهای فوق، برای عصاره گیاه گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata*) از نوع مهار مرکب رقابتی - غیر رقابتی و برای عصاره گیاه سیلن حبابی (*Silene ampulata*) از نوع مهار مرکب نارقابتی - غیررقابتی می‌باشد. به کمک نمودارهای فوق و نمودارهای ثانویه مربوطه، پارامترهای سنتیکی مربوط به هر یک از مهارها محاسبه شد (جداول شماره ۳ و ۴).



شکل شماره ۱ - نمودار درصد مهار گیاهان دارای فعالیت مهارکنندگی بالاتر از ۶۰ درصد



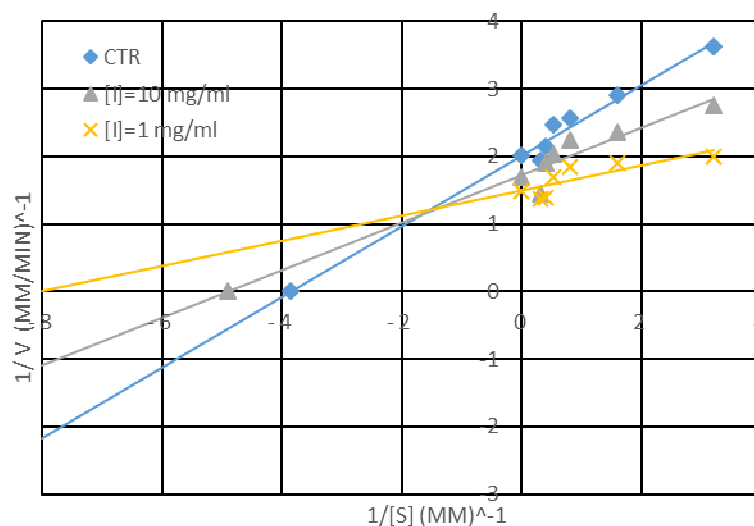
جدول شماره ۱- درصد مهار فعالیت آنتی اکسیدانز توسط عصاره متانولی گیاهان کردستان

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباری	خانواده	۱ mg/ml			۰/۱ mg/ml			۰/۰۱ mg/ml		
				I%	SD	I%	I%	SD	I%	I%	SD	SD
۱	<i>Campanula involucreta</i> Auch. ex DC.	۱۱۱۲۲	Campanulaceae	۸۶/۹۵۳	.	۵۹/۱	۰/۰۵	۶۶/۲۴	۰/۰۲	۳/۴۴	۰/۲۰	۰/۲۰
۲	<i>Crambe orientalis</i> L.	۱۱۰۶۰	Brassicaceae	-۹۴/۵۵۲	۷/۲۷۹	-۴۱/۹۱۱	۱/۰۳۹	-۳۳/۵۲۹	۲/۰۷۹	-۱۳/۳۳۵	۰/۴۱۱	۰/۴۱۱
۳	<i>Chaerophyllum macropodium</i> Boiss.	۶۵۵۸	Apiaceae	۱۳/۹۷۰	۷/۲۷۹	-۱۶/۹۱۱	۵/۱۹۹	۱۱/۲۷۴	۱۳/۵۱۸	۲۱/۵۶۸	۴/۷۲۷	۴/۷۲۷
۴	<i>Clastopus erubescens</i> Hausskn.	۱۵۶۵	Brassicaceae	-۳۰/۹۶۴	.	-۲۷/۱۵۷	۱۶/۱۵۲	-۳۳/۳۵۰	۶/۶۳۷	-۲۵/۶۳۴	۵/۳۸۴	۵/۳۸۴
۵	<i>Cruciata taurica</i> (Pall. ex Willd.) Ehrend. subsp. Persica (DC.) Ehrend.	۱۲۰۱۷	Rubiaceae	-۹/۱۵۴	۶/۹۷۱	-۲۶/۹۶۰	۷/۷۹۱	۲/۱۱۶	۸/۴۵۰	۱۰/۷۹۸	۱۶/۳۳۴	۱۶/۳۳۴
۶	<i>Colchicum kotschyi</i> Boiss.	۱۰۸۶۱	Colchicaceae	۷/۴۸۸	۱۱/۲۱۴	۴/۸۴۵	۱/۸۶۹	-۴/۲۰۵	۵/۶۰۷	۱۲/۳۳۴	۱۲/۳۳۴	۱۲/۳۳۴
۷	<i>Eremostachys laevigata</i> Bunge	۴۸۴۳	Lamiaceae	۱۶/۸۷۶	۳/۵۰۶	-۱۶/۸۷۶	۳/۵۰۶	۷/۴۲۸	۲/۳۳۷	۳/۳۰۵	۳/۵۰۶	۳/۵۰۶
۸	<i>Eremostachys macrophylla</i> Montbr. & Auch	۹۲۳۶	Lamiaceae	۸/۸۱۰	۷/۴۷۶	۵/۲۸۶	۷/۷۴۳	-۳/۵۲۴	۲/۰۱۸	۹/۴۷۱	۰/۹۳۴	۰/۹۳۴
۹	<i>Euphorbia denticulata</i> Lam.	۶۹۱۶	Euphorbiaceae	-۵/۶۳۳	۷/۸۴۱	۷/۷۴۶	۸/۹۶۳	-۴/۹۲۹	۶/۹۷۱	۵/۱۶۴	۹/۳۷۷	۹/۳۷۷
۱۰	<i>Gundelia Tournefortii</i> L.	۴۱۸۶	Asteraceae	-۷۸/۱۴۰	۱۹/۶۴۱	-۱۲/۳۱۸	۵/۱۲۳	۱۹/۸۸۷	۳/۶۸۹	۱۶/۰۶۲	۰/۸۵۳	۰/۸۵۳
۱۱	<i>Haplophyllum acutifolium</i> (DC.) G. Don	۲۹۶۴	Rutaceae	-۳۶/۰۸۸	۳/۵۰۶	-۶۰/۳۳۰	۲/۳۳۷	-۲۲/۸۶۵	۱/۱۶۸	-۱۹/۰۰۸	۱/۷۷۶	۱/۷۷۶
۱۲	<i>Hypericum scabrum</i> L.	۵۴۱۶	Guttiferae	۶۶/۹۷۶	.	۳۷/۲۹۴	۱/۲۳۰	۳۳/۶۳۹	۳/۳۷۲	۹/۰۱۳	۳/۳۱۱	۳/۳۱۱
۱۳	<i>Isatis cappadocica</i> Desv.	۶۱۶۳	Brassicaceae	-۲۵/۶۱۹	۷/۴۸۹	-۴۱/۰۴۶	۳/۴۴۰	-۱۱/۲۹۴	۴/۱۵۹	-۹/۶۴۱	۱/۹۰۸	۱/۹۰۸
۱۴	<i>Linum album</i> Ky. ex Boiss.	۱۱۷۶۸	Linaceae	-۶/۸۳۷	۴/۰۳۸	-۱۰/۱۴۵	۱/۰۹۹۲	۱/۳۰۲	۳/۵۲۴	-۹/۸۹۰	۳/۵۱۷	۳/۵۱۷
۱۵	<i>Onobrychis megataphros</i> Boiss.	۵۴۳۲	Papilionaceae	۴۶/۹۷۴	۷/۷۱۹	۲۱/۷۹۴	۳/۶۲۶	-۱۰/۳۵۶	۱/۸۱۳	۲/۵۶۴	۵/۴۳۹	۵/۴۳۹
۱۶	<i>Oxytropis kotschyana</i> Boiss. & Hohen.	۳۷۴۶	Papilionaceae	-۲۴/۳۴۴	۳/۸۲۲	-۱۱/۳۸۶	۶/۶۸۴	-۱/۳۵۱	۲/۷۰۲	۱۰/۳۶۰	۸/۱۴۵	۸/۱۴۵
۱۷	<i>Peganum harmala</i> L. var. harmala	۵۲۱۴	Zygophyllaceae	-۴۱/۰۲۳	۱/۰۹۱	-۳۸/۱۱۷	۵/۴۵۶	-۳۳/۴۵۶	۱/۰۹۱۲	-۷/۲۵۳	۵/۴۵۶	۵/۴۵۶
۱۸	<i>Rindera lanata</i> (Lam.) Bge.	۱۱۱۴۱	Boraginaceae	۷/۷۴۶	۰/۹۹۵	۹/۸۵۹	۵/۹۷۵	۱۷/۶۰۵	۱/۰۸۵۵	۲۱/۸۳۰	۱۲/۸۴۷	۱۲/۸۴۷
۱۹	<i>Salvia multicaulis</i> Vahl.	۶۸۹۷	Lamiaceae	-۲/۶۳۳	۱/۰۹۱	۸/۹۵۰	۲/۱۸۲	-۲/۶۳۳	۳/۳۷۳	۳۶/۲۱۳	۷/۹۱۹	۷/۹۱۹
۲۰	<i>Salvia puculata</i> Nab.	۷۶۳۳	Lamiaceae	۴/۸۲۲	۳/۳۳۰	-۱۷/۶۹۰	۱۲/۹۲۱	۵۲/۰۳۰	۱/۰۷۶	۵۵/۸۳۷	۸/۶۱۴	۸/۶۱۴
۲۱	<i>Salvia suffruticosa</i> Montbr. & Auch.	۱۲۰۵۵	Lamiaceae	۹۶/۶۲۵	۸/۷۷۲	۵۹/۱۴۴	۴/۱۷۱	۱۶/۳۴۲	۵/۲۱۴	۳/۲۴۴	۲۱۰۸۵	۲۱۰۸۵
۲۲	<i>Salvia svriaca</i> L.	۵۲۷۰	Lamiaceae	-۱۳/۵۱۳	۷/۶۴۴	-۹/۴۵۹	۸/۸۶۰	-۳/۱۵۳	۵/۶۲۶	۷/۶۵۷	۶/۳۸۶	۶/۳۸۶
۲۳	<i>Scrophularia nervosa</i> Benth. in DC. subsp. boissierana (Jaub. & Spach) Grau.	۹۱۷۹	Scrophulariaceae	۲۶/۱۶۴	۷/۲۷۹	۱۹/۱۱۷	۱/۰۳۹۸	-۵/۸۸۲	۲/۰۷۹	۱۱/۰۲۹	۱/۰۳۹	۱/۰۳۹
۲۴	<i>Scorzonera calyculata</i> Boiss.	۷۲۵۰	Asteraceae	-۸۹/۵۹۳	۵/۳۸۴	-۲۷/۹۱۸	۴/۳۰۷	-۲۲/۵۸۸	۷/۵۳۷	-۸/۱۲۱	۴/۳۰۷	۴/۳۰۷
۲۵	<i>Silene ampulata</i> Bioss.	۴۱۹۸	Caryophyllaceae	۸۲/۱۲۵	۳/۰۴	۶/۱۲۳	۰/۰۲	۴۵/۲۱	۲/۲۲	۳۹/۲۲	۱/۱۲	۱/۱۲
۲۶	<i>Silene aucheriana</i> Boiss.	۱۱۰۰۹	Caryophyllaceae	۰/۷۲۰	۱/۷۸۱	-۱۷/۶۵۴	۸/۷۲۹	۱۲/۰۳۷	۲/۱۸۲	۲۸/۲۲۰	۱۶/۳۶۸	۱۶/۳۶۸
۲۷	<i>Silene commelinifolia</i> Boiss.	۱۱۳۸۲	Caryophyllaceae	۴۱/۸۹۱	۲۲/۹۳۳	-۲۰/۹۴۵	۶/۶۸۸	-۹/۴۵۵	۱/۹۱۱	-۱۰/۸۱۰	۴/۶۸۱	۴/۶۸۱
۲۸	<i>Solenanthus circinatus</i> Ledeb.	۶۴۹۸	Boraginaceae	۲۸/۲۹۴	۴/۲۶۳	-۰/۲۷۱	۴/۲۶۳	۱۳/۶۱۲	۴/۳۶۳	۱/۲۷۱	۶/۵۴۴	۶/۵۴۴
۲۹	<i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl	۵۲۳۰	Lamiaceae	۱۵/۲۹۳	۳/۳۳۷	-۱۹/۸۱۰	۳/۳۳۷	۱۲/۲۴۰	۵/۳۹۶	۷۹۳۰	۵/۲۸۷	۵/۲۸۷
۳۰	<i>Tragopogon vaginatus</i> M. Ownbey & Rech. F.	۹۸۴۴	Asteraceae	۱۱/۵۵۳	۳/۳۸۸	-۳۵/۲۲۲	۶/۵۴۱	-۴/۸۴۵	۲/۰۱۸	۱/۷۶۲	۰/۷۶۳	۰/۷۶۳
۳۱	<i>Valeriana sisymbriifolia</i> Vahl	۱۱۹۹۸	Valerianaceae	۲۳/۳۸۲	۱۰/۳۷۱	۱۳/۰۹۸	۱/۷۸۱	۳۰/۵۸۱	۲/۱۸۱	۲۲/۶۸۸	۴/۳۶۳	۴/۳۶۳
۳۲	<i>Vicia hyrcanica</i> Fisch. & C. A. Mey.	۹۲۵۵	Papilionaceae	-۳۹/۵۹۳	۱/۷۵۸	-۸/۱۲۱	۲/۱۵۳	۱۳/۴۵۱	۹/۶۹۱	-۲/۷۹۱	۲/۳۳۰	۲/۳۳۰

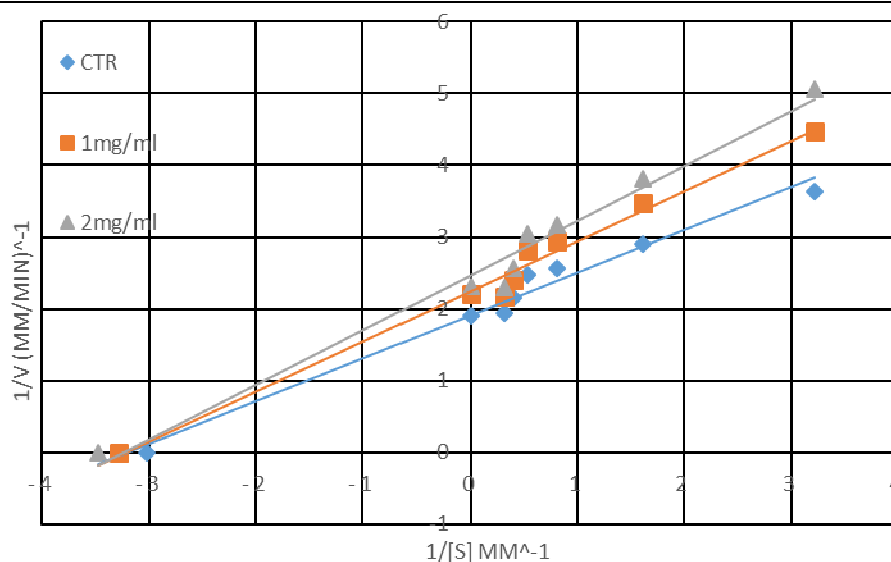


جدول شماره ۲ - نتایج تعیین IC_{50} عصاره گیاهان دارای فعالیت مهارکنندگی بالاتر از ۶۰ درصد

ردیف	نام علمی گیاه	خانواده	IC_{50} mg/ml
۱	<i>Campanula involucreta</i> Auch. ex DC.	<i>Campanulaceae</i>	۰/۰۲
۲	<i>Hypericum scabrum</i> L.	<i>Guttiferae</i>	۰/۳۲
۳	<i>Salvia suffruticosa</i> Montbr. & Auch.	<i>Lamiaceae</i>	۰/۰۶
۴	<i>Silene ampulata</i> Bioss.	<i>Caryophyllaceae</i>	۰/۰۲



شکل شماره ۲ - نمودار لاین ویور - برک برای مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز توسط عصاره گیاه گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucreta*)



شکل شماره ۳ - نمودار لاین ویور - برک برای مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز توسط عصاره گیاه سیلن حبابی (*Silene ampulata*)



جدول شماره ۳ - پارامترهای سنتیکی مربوط به مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز توسط عصاره‌ی گیاه گل استکانی برگه‌دار

(*Campanula involucrata*)

غلظت	K_m mg/ml	K_m app mg/ml	V_{max} ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	V_{max} app ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	K_i mg/ml
۱ mg/ml	۰/۲۵۶	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۵۷	۵۳
۱۰ mg/ml	۰/۲۵۶	۰/۲	۰/۵	۰/۶۷	۵۳

جدول شماره ۴ - پارامترهای سنتیکی مربوط به مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز توسط عصاره‌ی گیاه سیلن حبابی

(*Silene ampulata*)

غلظت	K_m mg/ml	K_m app mg/ml	V_{max} ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	V_{max} app ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	K_i mg/ml
۱ mg/ml	۰/۲۵۶	۰/۳۱	۰/۵	۰/۴۶	۲۰
۲ mg/ml	۰/۲۵۶	۰/۲۹	۰/۵	۰/۴۴	۲۰

بحث

Silene ampulata Bioss. و Montbr. & Auch. فعالیت

مهار کنندگی بالای ۶۰ درصد بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز از خود نشان دادند. این گیاهان می‌توانند منبع بالقوه‌ی جدیدی برای مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز باشند. در این میان عصاره‌های گیاهان گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata*) و سیلن حبابی (*Silene ampulata*) در ضمن اینکه اثر مهارتی قابل توجهی بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشتند (به ترتیب ۸۵ و ۸۲ درصد مهار)، کمترین مقدار IC_{50} را به ثبت رسانیدند (۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). گیاه سیلن حبابی (*Silene Ampullata* Bioss) از خانواده Caryophyllaceae و گیاهی یکساله است که اغلب در مکان‌های علفی و خشک می‌روید و مقاوم به خشکسالی و تنش گرمایی است. سیلن بومی حوزه مدیترانه است، سطح برگ‌های آن به طور خفیفی کرکدار، برگ‌ها بادامی یا بیضوی شکل و زیر خشن به رنگ سبز درخشان هستند و گل‌های آن ساده یا پرپر به صورت خوشه‌ای به رنگ صورتی یا سفید تند هستند این گیاه در فصل بهار و تابستان می‌روید [۱۶]. گیاه گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata*) از خانواده گل استکانی، گیاهانی علفی، یکساله، دوساله یا پایا هستند. به ندرت به صورت بوته‌های چوبی، به ارتفاع حدود ۱ متر مشاهده می‌شوند و گاهی دارای ساقه بالارونده هستند. این گیاهان در ۱۶۰۰ گونه و ۶۰ جنس تقریباً نزدیک به هم در سراسر جهان پراکنده شده‌اند. مهم ترین جنس تیره گل استکانی، کامپانولا می‌باشد که حدود ۲۵۰

بیماری دیابت یک اختلال متابولیکی مختلط است که با کمبود ترشح انسولین و حساسیت انسولین تشخیص داده می‌شود. نقص نسبی یا مطلق در ترشح انسولین منجر به هایپرگلیسمی در این بیماری می‌شود. به تأخیر افتادن ترشح انسولین پس از صرف غذا منجر به یک موج شدید در سطح گلوکز خون می‌شود که به قله هایپرگلیسمی معروف است [۱۲]. در صورتی که هایپرگلیسمی پس از صرف غذا به صورت مزمن ادامه یابد منجر به عوارض قلبی-عروقی در بیماران دیابتی می‌شود [۱۳]. با تجزیه شدن غذا بخصوص غذاهای حاوی کربوهیدرات بالا، آنها توسط آنزیم‌های مختلف به گلوکز شکسته می‌شوند. از جمله‌ی آنها، آلفاگلوکوزیداز روده‌ای است، که پیوند گلیکوزیدی را در الیگوساکاریدها تجزیه نموده و موجب تولید مونوساکاریدهای قابل جذب می‌شود [۱۴]. یکی از راهبردهای مهم در درمان بیماری دیابت، ارائه مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز جهت ممانعت از تجزیه و جذب کربوهیدرات‌ها به واسطه عملکرد آنزیم آلفاگلوکوزیداز است [۱۵].

در این پژوهش، در جستجوی ترکیبات فعال طبیعی برای مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز، عصاره‌ی متانولی ۳۲ گونه‌ی گیاهی بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، در میان ۳۲ عصاره‌ی گیاهی که مورد سنجش قرار گرفتند، عصاره‌ی متانولی گیاهان *Campanula involucrata* Auch. ex DC. *Salvia suffruticosa* *Hypericum scabrum* L.



نتیجه گیری

می توان چنین نتیجه گیری کرد که گیاهان غربال شده در این مطالعه به طور عام و دو گیاه گل استکانی برگه دار (*Campanula involucreta*) و سیلن حبابی (*Silene ampulata*) به طور خاص می توانند به طور جدی موضوع مطالعات بعدی جهت خالص سازی عوامل مهارکننده آنزیم آلفاگلوکوزیداز بوده و در نهایت مهارکننده های جدا شده از آنها به صورت بالقوه موضوع مطالعات فارماکولوژیک جهت درمان بیماری دیابت باشند. همچنین لازم به ذکر است، که گزارش حاضر برای اثرات بالقوه ضد دیابتی عصاره متانولی گونه های گیاهی فوق نخستین مورد در نوع خود می باشد.

گونه دارد و مرکز انتشار آن تقریباً نواحی مدیترانه ای است. گونه های *Hedraeanthus* و *Codonopsis tangshen* *graminifolius* به ترتیب دارای اثرات درمانی پایین آورنده فشار خون و درمان هیستری می باشند [۱۷].

مطابق نتایج حاصل از بررسی سنتیکی با استفاده از رویکرد لینویو - برک، عصاره متانولی گیاه گل استکانی برگه دار الگوی مهار مرکب غیر رقابتی و نارقابتی و عصاره متانولی گیاه سیلن حبابی الگوی مهار غیر رقابتی و نارقابتی را از خود نشان دادند. با توجه به نوع الگوی مهار (مرکب) در گل استکانی برگه دار و گیاه سیلن حبابی انتظار می رود که مهارکننده موجود در عصاره با تمایل متفاوت به آنزیم (E) و مجموعه آنزیم - سوبسترا (ES) متصل شوند.

منابع

1. Matsui T, Tanaka T, Tamura S, Toshima A, Miyata Y, Tanaka K and et al. Alpha glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J. Agricultural and Food Chem.* 2007; 55: 99 – 105.
2. Chakraborty R and Rajagopalan R. Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and therapy. *Current Science* 2002; 83: 1533 – 8.
3. Bhattarai NK. Folk medicinal use of plants for respiratory complaints in central Nepal. *Fitoterapia.* 1993; 64: 163 – 9.
4. Li Y, Wen S, Kota BP, Peng G, Li GQ, Yamahara J and et al. Punica granatum flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 99: 239 - 44.
5. Megh RB, Nilubon JA, Gao H and Jun K. A-Glucosidase and a-amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chem.* 2008; 106: 247 – 52.
6. Chen H, Feng R, Guo Y, Sun L and Jiang J. Hypoglycemic effects of aqueous extract of *Rhizoma polygonati odorati* in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 74: 225 – 9.
7. Melo EBd, Gomesb Ads and Carvalhob I. Alpha- and beta-glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron.* 2006; 62: 10277 - 302.
8. Grover JK, Yadav S and Vats V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 81: 81 – 100.
9. Leroux-Stewart J, Rabasa-Lhoret R and Chiasson Rhabasa-Lhoret JL. Alpha-glucosidase inhibitors (4th edition). In R. A. Defronzo, E. Ferrannini, H. Keen, & P. Zimmet (Eds.). International textbook of diabetes mellitus. John Wiley. UK. 2015, pp: 673-686.
10. Shim YJ, Doo HK, Ahn SY, Kim YS, Seong JK, Park IS and et al. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinesis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 85: 283 - 7.
11. Ankita BJ, Shihabudeen MS and Thirumurugan K. Screening of fifteen Indian ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. *Int. J. Pharma. Pharm. Sci.* 2011; 3: 267 - 74.
12. Bachhawat J, Shihabudeen M and Thirumurugan K. Screening of fifteen Indian Ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011; 3: 267 - 74.



13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414 (6865): 813 - 20.
14. Kim YM, Wang MH and Rhee HI. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Res.* 2004; 339 (3): 715 - 7.
15. Kwon Yi, Apostolidis E and Shetty K. Inhibitory potential of wine and tea against α -Amylase and α -Glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J. Food Biochem.* 2008; 32 (1): 15 - 31.
16. Viorela T, Elena GC and Radu S. Researches on the preparation and characterization of some tinctures from *Silene alba herba* and *Silene pendulae herba*. *Current Health Sciences J.* 2012; 38 (2): 80-83.
17. Shulkina TV, Gaskin JF and Eddie WMM. Morphological studies toward an improved classification of Campanulaceae s. str. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 2003; 90 (4): 576 – 591.

