(مقاله کوتاه)

بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و اثرضد دیابتیک عصاره برگ‌های گیاه دارویی *Trigonella foenumgraceum* L. در منطقه همدان

سیدمهرداد کسائی[۱]، محمدتقی گودرزی[۲*]، نسیم حیاتی رودباری[۱]، پریچهر یغمایی[۱]

[۱]گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲]مرکز تحقیقات مولکولی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۳/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۹/۱۹

چکیده

گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenumgraceum* L.) علاوه بر مصارف فراوان غذایی، به‌دلیل سنتزترکیبات پلی‌فنلی دارای اثر آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب موثردر درمان دیابت است. این تحقیق در سال ۱۳۹۳ با هدف بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتی عصاره آبی برگ‌های شنبلیله انجام گرفت. برگ‌های گیاه از مزرعه گیاهان دارویی همدان تهیه و عصاره آبی آن با استفاده از روش خیساندن استخراج گردید. ارزیابی فیتوشیمیایی (فنل و فلاونویید کل) در عصاره با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری و ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های FRAP، شلاته کنندگی یون آهن، سنجش میزان تیول و DPPH انجام گرفت. میزان مهار فروکتوزآمین، محصولات نهایی گلایکیشن پیشرفته و فراگمانتاسیون آلبومین، به‌ترتیب با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری، اسپکتروفلورومتری و الکتروفورز اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که عصاره گیاه دارای میزان فنل کل (۲۳/۸ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم وزن نمونه)، فلاونویید کل (۱۷/۲۹ میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن نمونه) و گروه تیول (۰/۲٦ میلی‌مول معادل سیستئین در میلی گرم) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۰/۳۳ میلی‌مول معادل سولفات آهن در میلی‌گرم) می‌باشد. درصد شلاته کنندگی آهن و درصد مهار رادیکال‌های آزاد در این عصاره وابسته به غلظت است. این عصاره در غلظت بالا می‌تواند موجب مهار فروکتوزآمین (۷۹ درصد) و همچنین مهار فراگمانتاسیون شود. از این جهت، عصاره شنبلیله می‌تواند به‌منظور جلوگیری از عوارض مرتبط با محصولات نهایی گلایکیشن پیشرفته AGEs در بیماران دیابتیک به کار رود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، دیابت، شنبلیله، فنل، فلاوونوئید، فراگمانتاسیون آلبومین

*نویسنده مسئول: mt.goodarzi@umsha.ac.ir

مقدمه

از گذشته‌های دور گیاهان دارویی به‌دلیل توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه (ترپنوییدها، پلی فنل‌هاو آلکالویید) از مهمترین منابع غذایی و دارویی در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان و دام مطرح بوده‌اند (Ghasemi et al., 2011). پلی‌فنول‌ها و فلاونوییدهای موجود در عصاره گیاهان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی و طبیعی از مهمترین عوامل محدودکننده آسیب‌ها و استرس‌های اکسیداتیو در بدن محسوب می‌شوند که با مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های شایع التهابی دارند که امروزه بیشتر مربوط به تغییر شیوه زندگی، افزایش سن و خصوصاً افزایش ارتباط به تشکیل گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر (ROS) و پراکسیداسیون لیپیدمربوط است ایفامی‌کنند. به همین دلیل استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مستخرج از گیاهان دارویی به‌عنوان مواد طبیعی ضدسرطان و ضدالتهاب مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (Mazandarani et al., 2011).

رادیکال‌های آزاد به‌دلیل داشتن الکترون آزاد فعال و در نتیجه ناپایدارند گونه‌های ROS شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می‌باشد (Nagendrappa, 2005) و تمایل به واکنش با سایر مولکول‌ها دارند و می‌توانند به سلول‌ها و بافت‌ها آسیب برسانند (Nordberg and Arner, 2001). این مولکول‌هادر غلظت‌های بالا موجب ایجاد وضعیتی به نام «استرس اکسیداتیو» می‌گردند. استرس اکسیداتیودراثربرهم خوردن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد از یک طرف و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ازسوی دیگر ایجاد می‌گردد (Nordberg and Arner, 2001). بسیاری از بیماری‌ها نظیر دیابت، سرطان، آترواسکلروز، آرتریت، اختلالات قلبی عروقی، صدمات فیزیکی و پیری، ارتباط اساسی با استرس اکسیداتیو دارند (Subhashini et al., 2011).

امروزه مواد غذایی حاوی فلزات واسطه بوده و یا در طول زمان فرایند تولید به آن آلوده می‌شوند. عناصر واسطه‌ی دو ظرفیتی نقش مهمی را به‌عنوان کاتالیزور در فرایندهای اکسیداتیو ایفا نموده و منجر به تشکل رادیکال‌های هیدروکسیل و واکنش‌های تخریبی هیدروپراکساید می‌شوند. یکی از مکانیسم‌های فعالیت آنتی‌اکسیداتیو شلاته کردن فلزات انتقالی است در حضور عوامل شلاته کننده، تشکیل کمپلکس آهن با فروزین مختل می‌گردد (Mathew and Abraham, 2006). کاهش گروه‌های تیول نیز یکی از مارکرهای آسیب رادیکال‌های آزاد می‌باشد. این عوامل به آسیب اکسیداتیو حساس بوده و در نتیجه این آسیب‌ها کاهش می‌یابند (Chaouche et al., 2013).

از آنجایی که فروکتوز آمین از مهمترین عوامل در ایجاد ضایعات عروقی می‌باشد. لذا کاهش آن یک روش درمانی برای به تأخیر انداختن ضایعات عروق در افراد مبتلا به دیابت می‌باشد و قدرت مهارکنندگی ترکیبات و جلوگیری از تولید فروکتوزآمین، می‌تواند به‌عنوان قدرت ضد دیابتی هر ترکیب محسوب گردد (Meeprom et al., 2013) مودیفیکاسیون پروتئین‌ها توسط گلایکیشن غیرآنزیمی شامل یک سری از واکنش‌های پیچیده است که مجموعاً واکنش‌های مایلارد نامیده می‌شوند که می‌تواند با بالا رفتن مزمن میزان قند خون اهمیت چشمگیری پیدا کند (Arena et al., 2014; Bhattacherjee and Chakraborti, 2013).

گیاهان دارویی و بومی قادرند با سنتز مواد موثره ثانوی و فعال از جمله پلی‌فنل‌ها تحت استرس‌های محیطی در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر واقع شوند و همچنین قدرت پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد و شلاته کنندگی فلزات دارند (Subhashini et al., 2011). بنابراین در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در بحث پیشگیری و درمان

بیماری‌های شایع انسان و دام قرار گرفته‌اند (Kaneko et al., 2007) و شناسایی سرنخ‌های کلیدی برای انجام مطالعات فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و بررسی خواص درمانی گیاهان در مهار رادیکال‌های آزاد و پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های شایع التهابی روز دنیا از جمله دیابت و کاهش عوارض ناشی از آنها امری ضروری است (Mazandarani et al., 2011) به همین دلیل است که انجام تحقیقات اتنوفارماکولوژیکی، فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی در مورد برسی خواص آنتی دیابتیک افزودنی‌های مواد غذایی، سبزیجات و گیاهان دارویی بومی در رژیم غذائی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است (Goodarzi et al., 2013).

گیاه شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenumgraecum* L. متعلق به تیره حبوبات (Fabaceae) می‌باشد که از میوه و برگ‌های آن به‌عنوان سبزی خوراکی و دارویی استفاده می‌شده است. محل رویش این گیاه در ایران، در مناطق مختلف از جمله آذربایجان، اصفهان، فارس، سمنان و دامغان می‌باشد. گزارش‌ها حکایت از خواص فارماکولژیک شنبلیله، شامل خواص ضددیابت، ضدقارچ، ضدچربی، تب بری، ضدالتهابی و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی دارد (Emami and Ahani, 2008; Mirza et al., 2011; Zargari, 1994). با این وجود مکانیسم این تاثیرات و جزئیات فرآیندهای بیوشیمیایی که منتهی به این اثرات می‌شود کاملاً شناخته شده نیست. بنابراین با توجه با استفاده‌های فزاینده این گیاه در تجربیات طب سنتی اغلب کشورها از جمله ایران به‌عنوان کاهش‌دهنده میزان قند خون در افراد دیابتیک، در این پژوهش خواص فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت آنتی‌گلایکیشن عصاره آبی برگ شنبلیله مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره: در این تحقیق برگ‌های گیاه شنبلیله از مزرعه گیاهان دارویی همدان جمع‌آوری و عصاره آبی گیاه با استفاده از روش خیساندن برای انجام مطالعات فیتوشیمیایی استخراج گردید، بدین‌صورت که ۵۰ گرم از این پودر با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد و سپس به‌مدت ٤٨ ساعت بر روی شیکر Shaker و به روش خیساندن در حرارت اتاق قرار داده شد. عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول به‌دست آمده در انکوباتور ٤٠ درجه تحت شرایط سترون خشک شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از رادیکال پایدار DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl) انجام گرفت (Kaviarasan et al., 2007). دی فنیل پیکریل هیدرازیلنوعی رادیکال آزاد پایدار است. ظرفیت عصاره‌های گیاهی در دادن هیدروژن برای پاک کردن DPPH، به‌عنوان میزان توانایی آنتی‌اکسیدان به‌کار می‌رود. ٤ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار DPPH در متانول (کنترل) به ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره اضافه شده و پس از تکان دادن شدید، به مدت نیم ساعت در اتاق تاریک انکوبه گردید. سپس جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. از آنتی‌اکسیدان‌های BHT و اسیدآسکوربیک به‌عنوان استاندارد استفاده شد. اثر آنتی رادیکالی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$RSA\% \text{ (radical scavenging activity)} = 100 \times [(A_{Control} - A_{sample}) / A_{Control}]$$

A_c جذب کنترل؛ As جذب محلول حاوی عصاره یا استاندارد می باشد.

روش سنجش فعالیت شلاته کنندگی آهن II: در اندازه گیری قدرت شلاته کنندگی آهن به روش دنیز، به عصاره، محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و

محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین یا قدرت شلاته کنندگی هر غلظت از عصاره با فرمول زیر معین می‌شود. از EDTA به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. گروه کنترل، محلول آهن-فروزین می‌باشد.

Chelating activity%=100 ($A_{control}$–A_{sample}) / $A_{control}$

A_c جذب کنترل؛ As جذب محلول حاوی عصاره یا استاندارد بود (Mathew and Abraham, 2006).

روش سنجش میزان گروه‌های تیول: برای اندازه گیری مقدار گروه‌های تیول، از روش رنگ‌سنجی DTNB (۲،۲ دی تیو نیتروبنزوئیک اسید) استفاده شد. DNTB با این گروه‌ها کمپلکس زرد رنگ ایجاد نموده که در طول موج ٤١٢ نانومتر حداکثر جذب را داراست.

به‌منظور انجام این آزمایش در روش المان Ellmans، ۱۰ میکرولیتر از عصاره (حاوی ۱ میلی‌گرم) را با ۹۰ میکرولیتر از DTNB ۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS، در pH=۷/٤ و در حرارت اتاق به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمودیم. سپس جذب محلول حاوی عصاره در ٤١٢ نانومتر قرائت شد. سطح گروه‌های تیول توسط منحنی استاندارد L- سیستئین (۰/۵۰ تا ۰/۰۱۵ میلی‌مولار) بر اساس میلی مول سیستئین در میلی گرم عصاره، محاسبه گردید (Jariyapamornkoon et al., 2013; Kaviarasan et al., 2007).

روش سنجش ظرفیت تام آنتی اکسیدان TAC: بدین‌منظور از روش دستی FRAP با اندکی تغییر، استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۱۰ میلی لیتر از محلول بافر ۰/۳ مولار از استات سدیم (pH=۳/٦)، ۱ میلی‌لیتر ۲، ٤ و ٦-تری پیریدیل S تری آزین (TPTZ) ۱۰ میلی‌مولار در HCl ٤٠ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر از $FeCl_3$ ۲۰ میلی‌مولار مخلوط گردیدند و ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰ میکرولیتر (۱ میلی‌گرم) از عصاره را به ۱/۵ میلی‌لیتر از واکنش‌گر FRAP افزودیم. ظرفیت آنتی‌اکسیدان عصاره، مطابق با منحنی حاصل از جذب نوری محلول سریال رقت استاندارد سولفات آهن در ۵۹۳ نانومتر، معادل «میلی‌مول سولفات آهن» محاسبه شد (Chaouche et al., 2013; Jariyapamornkoon et al., 2013).

روش سنجش مقدار تام فنل: مقادیر فنل کل عصاره به روش رنگ سنجی فولین و سیو-کالتیو Folin–Ciocalteu با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد (Chaouche et al., 2013). بدین‌منظور ۱۰ میلی‌گرم از پودر عصاره شنبلیله را در ۱ میلی‌لیتر آب حل نمودیم. سپس ۱۰۰ میکرولیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم) از آن را به ۲/۸ میلی‌لیتر آب و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر فولین ۵۰ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد و جذب آن را در ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و معادل میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم نمونه عصاره»، طبق معادله‌ی خطی منحنی استاندارد محاسبه گردید.

روش سنجش مقدار فلاوونوئید کل: بدین‌منظور ۱۰ میلی‌گرم از پودر عصاره را به‌طور جداگانه در ۵ میلی‌لیتر آب حل کرده و ۰/۵ میلی‌لیتر (۱ میلی‌گرم) از آن را برداشته و با اضافه کردن آن به ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر از $AlCl_3$ ده درصد و ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب، ٤٠ دقیقه در حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده و سپس جذب آن را در ٤١٥ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت نمودیم. نتیجه براساس منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه گردید. منحنی استاندارد با قرائت جذب غلظت‌های سریالی کوئرستین ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲ و ۱/۵٦ میلی‌گرم در لیتر، حاصل می‌شود (Meda et al., 2005).

روش سنجش میزان مهار فروکتوزآمین: فروکتوزآمین یک محصول آمادوری حاصل از مجاورت قند و پروتئین است و نقش مهمی در ایجاد ضایعات عروقی دارد. بنابراین کاهش فروکتوزآمین یک روش درمانی برای به تأخیر انداختن ضایعات عروق در افراد مبتلا به دیابت می‌باشد (Caengprasath et al., 2013).

براساس مطالعات قبلی، میزان مهارتشکیل آلبومین گلیکه (انکوباسیون مخلوط فروکتوز ۰/۲ مولار و آلبومین ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌مدت یک هفته در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) توسط غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از رنگ نیتروبلو تترازولیوم NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium)، پس از دیالیز جهت خارج نمودن فروکتوز اضافی، اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از محلول‌های گلیکه آلبومین، به‌صورت تنها و یا در حضور ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر (به‌ترتیب ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر) از عصاره، در ۹۰ میکرولیتر از ۰/۵ میلی‌مولار NBT (در بافر کربنات ۰/۱ مولار با pH=۱۰/٤) در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شد. جذب ترکیب را پس از قرار دادن در پلیت الایزا، توسط دستگاه الایزا ریدر در ۵۳۰ نانومتر ثبت نمودیم.با مقایسه‌ی جذب نوری آلبومین گلیکه بدون حضور و در حضور عصاره‌ها و آمینوگوانیدین(۲ میلی گرم در میلی لیتر) به عنوان یک مهارکننده‌ی استاندارد، میزان مهارکنندگی مشخص شد (Meeprom et al., 2013).

روش سنجش محصولات نهایی گلایکیشن پیشرفته: نمونه‌های آلبومین گلیکه تهیه شده در مرحله‌ی قبل(در حضور و عدم حضور عصاره در غلظت‌های ذکر شده و همچنین حضور آمینوگوانیدین) جهت سنجش میزان محصولا نهائی پیشرفته گلایکیشن با روش اسپکتروفلورومتری مورد استفاده قرار گرفت (Arena et al., 2014Caengprasath et al., 2013;).

این آزمایش با استفاده از دستگاه فلورومتر Jasco FP-6200 و در طول موج‌های ۳٤۰ نانومتر و ٤٤۰ نانومتر به ترتیب برای تحریک و نشر انجام گردید.

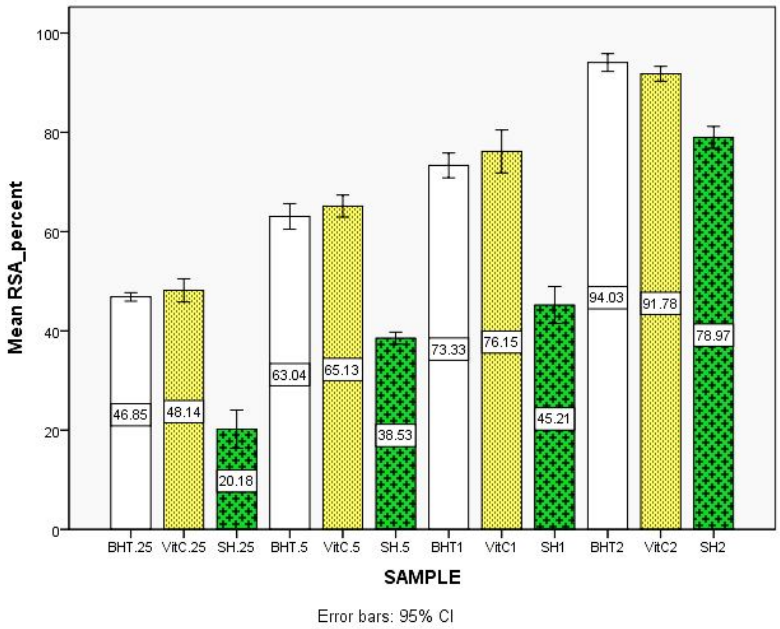
روش سنجش میزان مهار فراگمانتاسیون آلبومین: ابتدا آلبومین را با فروکتوز (۲۰۰ میلی‌مولار) و در حضور یون مس (۱۰۰ میکرومولار) مخلوط نموده و پس از تیمار یک هفته‌ای در حضور آمینو گوانیدین و یا عصاره تهیه شده، ترکیب حاصل توسط روش الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. الگوی الکتروفورزی حاصل پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو مورد آنالیز قرار گرفت.

آنالیز آماری

در این بررسی نتایج حاصل با سه بار تکرار در مورد هر سنجش گزارش شده است و نمودارها پس از محاسبه‌ی میانگین و انحراف معیار ارائه شده‌اند. برای تعیین اختلاف یا عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون ANOVA و تست Dunnett توسط نرم‌افزار SPSS version 11 استفاده شد ($P<۰/۰۵$). به‌عنوان سطح معنی‌دار نتایج در نظر گرفته شد.

نتایج

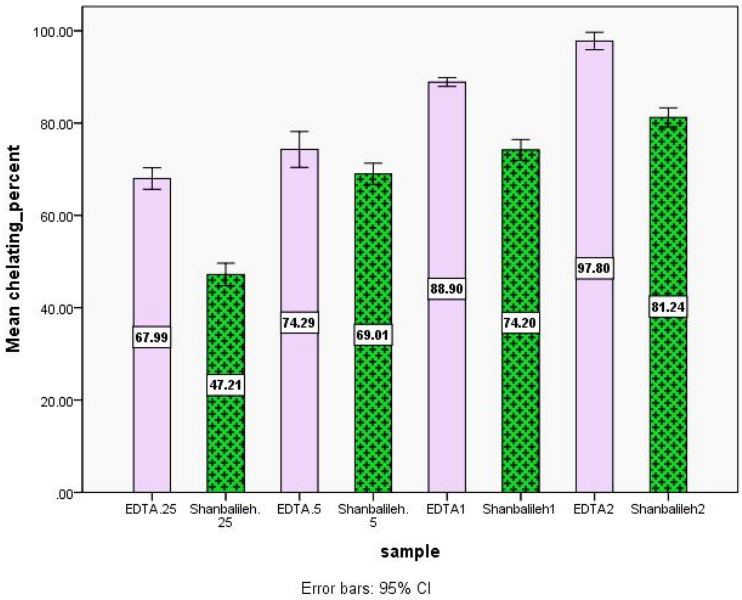
نتایج آزمایش سنجش مهارDPPH: در شکل ۱ میزان قدرت پاک کنندگی کنندگی رادیکال پایدار DPPH، توسط BHT، ویتامین C و غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره نشان داده شده است. عصاره شنبلیله در غلظت‌های فوق‌الذکر به‌ترتیب ۲۰/۱۸±۰/۸۹، ۳۸/۵۳±۰/۲۸، ٤٥/۲۱±۰/۸٦ و ۷۸/۹۷±۰/۵۱ درصد قدرت پاک کنندگی DPPH را نشان داد.



شکل ۱: میزان درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد **DPPH** توسط عصاره گیاه در مقایسه با آنتی اکسیدان‌های استاندارد: **BHT** و ویتامین **C** در غلظت‌های (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در میلی‌لیتر).

SH: **شنبلیله**

نتایج آزمایش شلاته‌کنندگی آهن II: درصد شلاته کنندگی، با استفاده ازEDTA به عنوان استاندارد در دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۶۷/۹۹±۰/۵۴، ۷۴/۲۸±۰/۸۹، ۸۸/۹۰±۰/۲۲ و ۹۷/۸۰±۰/۴۴ درصد بود. عصاره شنبلیله در غلظت‌های مشابه به‌ترتیب ۴۷/۲۱±۰/۵۶۶، ۶۹/۰۱±۰/۵۳۲، ۷۴/۲±۰/۵۲ و ۸۱/۲۳±۰/۴۸۱ درصد قدرت شلاته کنندگی داشت که در هر غلظت، نسبت به EDTA کمتر است (شکل ۲).



شکل ۲: درصد شلاته کنندگی آهن II. قدرت شلاته کنندگی توسطغلظت‌های مختلف EDTA و شنبلیله.

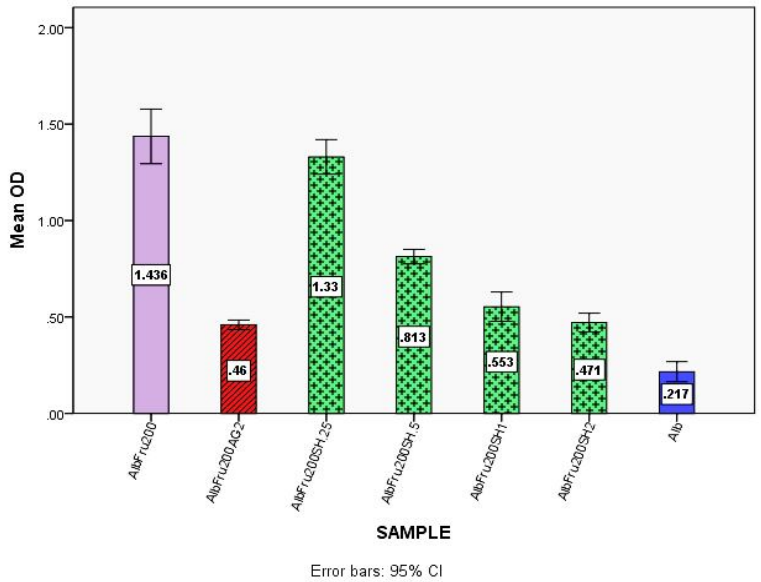
نتایج آزمایش سنجش میزان گروه‌های تیول: براساس تطبیق میانگین جذب‌های مختلف غلظت‌های متفاوت عصاره شنبلیله با نمودار حاصل از سریال رقت L-سیستئین در مقابل جذب، میزان تیول عصاره شنبلیله، ۰/۰۵± ۰/۲٦ معادل «میلی‌مول سیستئین در میلی‌گرم عصاره» تعیین شد.

نتایج آزمایش سنجش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان به روش FRAP: براساس تطبیق میانگین مقدار جذب عصاره شنبلیله با منحنی استاندارد، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان عصاره شنبلیله، ۰/۵۱± ۰/۳۳ معادل «میلی‌مول سولفات آهن در میلی‌گرم عصاره» تعیین شد.

نتایج آزمایش سنجش مقدار فنل کل: میزان فنل شنبلیله با انتقال میانگین جذب نمونه‌ها بر نمودار استاندارد اسید گالیک، معادل ۲/۹۳± ۲۳/۸۷ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم از عصاره به‌دست آمد.

نتایج آزمایش سنجش مقدار فلاوونوئید کل: با انطباق میانگین جذب‌های به‌دست آمده از عصاره بر نمودار حاصل از سریال رقت کوئرستین، میانگین مقدار فلاوونوئید شنبلیله، ۱/۹٤± ۱۷/۲۹ معادل «میلی گرم کوئرستین در هر گرم از عصاره» به‌دست آمد.

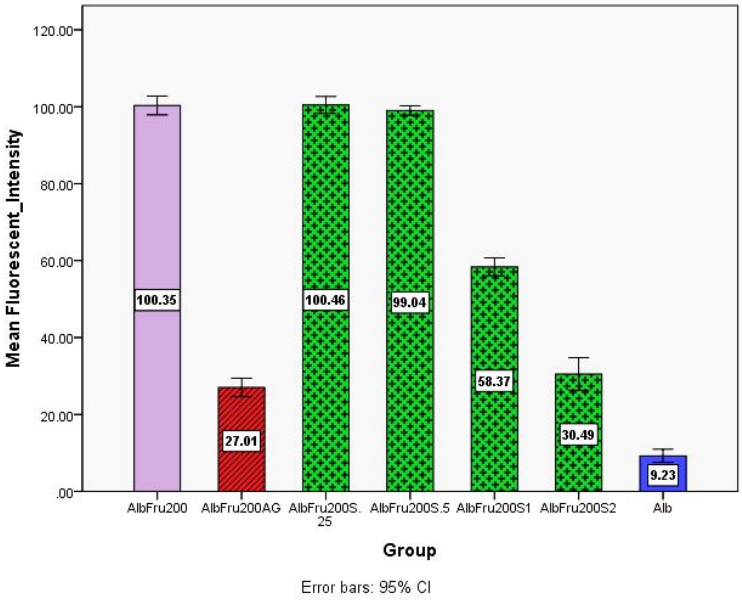
نتایج آزمایش تعیین درصد مهار تشکیل فروکتوزآمین: با استفاده از تست Dunnett مشاهده می‌شود میزان OD (جذب نوری) آلبومین گلیکه شده با فروکتوز ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با آلبومین غیر گلیکه (۰/۲۱۷±۰/۰۱۲)، افزایش معنی‌داری داشته است (افزایش ۸٤/۸ درصدی). به‌عبارت دیگر میانگین اختلاف در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار بوده است (شکل ۳). میزان جذب نوری در غلظت‌های مختلف عصاره، آمینوگوانیدین به‌عنوان استاندارد، آلبومین و آلبومین- فروکتوز در شکل ۳ مشاهده می‌شود. آمینوگوانیدین به‌عنوان یک مهارکننده استاندارد، سبب کاهش ٦۷/۹٦ درصدی تشکیل فروکتوز آمین شده است، غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره، به‌ترتیب ٤۳/۳، ٦۱/٤ و ۷۰/۹ درصد مهار تشکیل فروکتوز آمین را نشان داد. عصاره شنبلیله نتوانست در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در میزان فروکتوز آمین ایجاد کند.



شکل ۳: میزان جذب نوری حاصل از تیمار غلظت‌های مختلف عصاره شنبلیله (SH) و آمینوگوآنیدین (AG) با محلول آلبومین- فروکتوز (Alb-Fru).

نتایج تعیین میزان AGEs: چنانچه درشکل ٤ مشاهده می‌شود، یک هفته پس از انکوباسیون آلبومین با فروکتوز (۲۰۰ میلی‌مولار)، عصاره‌ی شنبلیله در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، توانایی مهار تشکیل این محصولات را نشان نداد (p=۰/۱ و p=۰/٤٤٥). لیکن در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر، توانست تشکیل AGE را به‌ترتیب ٤١/٨ و ٦٩/٦ درصد مهار کند و به مقادیر ۰/٥٤± ٥٨/٣٦ و ۰/٩٨± ٣٠/٤٩ تقلیل دهد.

آمینوگوانیدین به‌عنوان یک مهارکننده استاندارد در این شرایط، مهار ٧٣/٠٨ درصدی نشان داد و توانست فلوئورسانس ناشی از تشکیل AGEs را به ۰/٥٥±٢٧/٠١ تقلیل دهد و به‌طور مؤثری از تشکیل آن ممانعت به‌عمل آورد.



شکل ٤: میزان فلوئورسانس حاصل از تشکیل AGEs دو هفته پس از تیمار دوزهای مختلف عصاره شنبلیله (S) و آمینوگوآنیدین (AG) با محلول آلبومین-فروکتوز (AlbFru)

نتایج الکتروفورز SDS-PAGE آلبومین گلیکه: به‌علت اتصال مونوساکاریدهای احیاء کننده به تعداد مختلف به اسیدهای آمینه‌ی با بار مثبت در آلبومین، آلبومین‌های گلیکه با اوزان متفاوتی شکل می‌گیرد که در SDS-PAGE به‌صورت باندهای با پهنای متفاوت (به شکل اسمیر) مشاهده می‌گردند. آمینوگوانیدین مانع این اتصالات شده و لذا از فراگمانته شدن آلبومین در حضور فروکتوز می کاهد. غلظت‌های ۱۰ و ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصاره شنبلیله نیز با توجه به شکل ۵ موجب جلوگیری از پهن شدن باندها و در نتیجه ممانعت از فراگمانتاسیون شدند. چنانچه مشاهده می‌شود، قدرت مهاری در غلظت ۱۰ بالاتر از ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره است.

شکل ۵: باند الکتروفورتیک آلبومینA، آلبومین+فروکتوز AlbFru، شنبلیله ۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر TFG10، شنبلیله ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر TFG2.

بحث

در حال حاضر مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی علی‌رغم کارایی و پایداری بالا، ولی به‌دلیل بروز عوارض جانبی از جمله ایجاد بیماری‌های التهابی مثل دیابت، سرطان و... طی دو دهه اخیر بسیار کاهش یافته است (Huda et al., 2009). بنابراین شناسایی راه‌های موثر در حذف رادیکال‌ها و استرس‌های بیولوژیک از طریق شناسایی آنتی اکسیدانهای طبیعی، موثر و کم خطر از گیاهان دارویی پر مصرف در رژیم غذایی بسیار ضروری است (Ghasemi, et al., 2011).

ترکیب‌های ثانوی فنل و فلاونویید در اکثر اندام‌های گیاهان دارویی از جمله گیاه شنبلیله وجود دارند ولی ماهیت و غلظت آنها متفاوت بوده و بالطبع از عملکردهای متفاوت بیولوژیکی نیزبرخوردارند و علاوه بر پتانسیل سازش‌پذیری گیاه به استرس‌های اکولوژیکی (مخصوصاً پتانسیل دفاعی گیاه علیه علفخوار و پاتوژن‌ها)، ایجاد رنگ و طعم در گیاهان، جلب عوامل گرده‌افشان و پراکنش میوه، دارای اثرات مختلف دارویی بوده و از دیرباز در پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر بوده‌اند (Mazandarani et al., 2011). در تأیید موارد فوق نیز نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که کثرت میزان بالای ترکیبات فنل و فلاونوییدهای عصاره گیاه شنبلیله، نقش مهمی در عملکرد آنتی‌اکسیدانی آن داشته است. قدرت پاک‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH شنبلیله در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تقریباً با استانداردهای BHT و ویتامین C برابری می‌کند. لذا این گیاه قدرت بالایی در مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد دارد. افزایش قدرت آنتی رادیکالی وابسته به غلظت شنبلیله، با مطالعه (Chaouche et al., 2013; Sohrevardi and Sohrevardi, 2012) مطابقت دارد.

افزایش قدرت شلاته کنندگی یون فرو، با افزایش غلظت عصاره شنبلیله افزایش می‌یابد. این نتیجه با نتیجه حاصل از پژوهش (Subhashini et al., 2011) مطابقت دارد. نتایج آزمایش‌های آنتی اکسیدانی دلالت بر این دارد که عصاره آبی برگ شنبلیله، خواص آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت دارد که به ترکیبات فنلی آن مرتبط است. این موضوع با مطالعات سو باشین و همکاران (Subhashiniet al., 2011; Asadi et al., 2014) در هر دو محیط آزمایشگاهی و جاندار، منطبق است.

در سنجش درصد مهار فروکتوزآمین، میزان OD آلبومین گلیکه شده با فروکتوز ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با آلبومین غیر گلیکه، افزایش معنی‌داری داشته است (افزایش ۸٤/۸ درصدی). آمینوگوانیدین به‌عنوان یک مهارکننده استاندارد، سبب کاهش ٦۷/۹٦ درصدی در میزان فروکتوزآمین شده است، در حالی که فقط غلظت‌های بالاتر عصاره توانایی مهار قابل قیاس با این مهار کننده را دارند. براساس نتایج حاصله عصاره شنبلیله در غلظت‌های پایین، توانایی مهار تشکیل AGEs را ندارد؛ لیکن در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، می‌تواند تشکیل این محصولات را به‌ترتیب ٤۱/۸ و ٦۹/٦ درصد (در مقایسه با آمینوگوانیدین به عنوان مهارکننده استاندارد) مهار کند و به مقادیر ٥٨/٣٦±٠/٥٤ و ٣٠/٤٩ ±٠/٩٨ تقلیل دهد. لذا در این غلظت‌ها دارای آثار آنتی دیابتی می‌باشد. این یافته‌ها با یافته‌های حاصل از پژوهش مادار و همکاران (Madar et al., 1998) همخوانی دارد. تحقیقاتی که توسط شارما و همکاران (Sharma et al., 1996) بر روی بیماران دیابتی صورت گرفته و هموگلوبین، پروتئین مورد مطالعه بوده که پس از ۸ هفته مصرف خوراکی پودر شنبلیله، هموگلوبین گلیکوزیله به مقدار چشمگیری کاهش یافته است.

نتایج این تحقیق نیز علی رغم تفاوت محیط مطالعه، با تحقیق حاضر تطابق دارد.

در بررسی اثر مهاری عصاره شنبلیله بر فراگمانتاسیون پروتئین چنانچه در الگوی الکتروفورزی مشخص است، عصاره‌ی شنبلیله می‌تواند مانع فراگمانتاسیون آلبومین بر اثر تشکیل فروکتوزآمین گردد. به عبارت دیگر مانع صدمات ناشی از این پدیده بر پروتئین‌ها گردد و از عوارض دیابت جلوگیری می‌کند که این اثر در غلظت‌های بالا بارزتر است و با نتایج پژوهش‌های (Wijetunge and Perera, 2014) منطبق است. در این مطالعه غلظت‌های مختلف قندهای مختلف در شرایط آزمایشگاهی متفاوت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و بر عدم تأثیر آمینوگوانیدین بر مهاجرت آلبومین در غیاب قند و تأثیر آن بر مهاجرت آلبومین در حضور قند تأکید شده است. همچنین بر تأثیر بیشتر فروکتوز نسبت به گلوکز بر گلیکه شدن پروتئین‌ها تأکید دارد. در مطلعه گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات عصاره شنبلیله بر کاهش گلوکز خون در رت‌های دیابتی نوع ۲ نشان داده شده است و این تاثیر را ناشی از بهبود شرایط مقاوت به انسولین دانسته‌اند (Goodarzi et al., 2013; Hebschmann et al., 2006).

نتیجه‌گیری نهایی

گیاه شنبلیله دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتیکی است و می‌توان آن را به‌عنوان روشی کمکی در پیشگیری از بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و به‌ویژه جلوگیری از عوارض وخیم دیابت شیرین، به‌طور خوراکی مورد استفاده قرار داد.پیشنهاد می‌گردد که تمامی روش‌های یاد شده بر روی یکایک اجزاء موجود در عصاره این گیاه در محیط آزمایشگاهی و جاندار در شرایط یکسان انجام گرفته تا نتایج بتواند مورد استفاده‌ی شرکت‌های تولید داروهای گیاهی قرار گیرد و از این سرمایه‌های عظیم طبیعی استفاده بهتر گردد.

سپاسگزاری

این مقاله از رساله دکتری بیوشیمی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران استخراج شده است وبا حمایت مالی این دانشگاه انجام پذیرفته است که موجب نهایت امتنان است.از سرکار خانم دکتر معصومه مازندرانی و دکتر اصغر سیف، به خاطر راهنمایی‌های بسیار، سپاسگزاریم. همچنین از آقای ابراهیم عباسی عشاقی جهت همکاری و راهنمائی در تکنیک‌ها تشکر می‌نمائیم.

References

1. Emami, A., Ahani A. 2008. Medicinal Botany. Medical science of Iran University Press. Tehran, Iran. 514.
2. Mirzaei, A., Mohammadi J., Mirzaei, M. 2011. Antioxidant activity and phenolic content of hydroalchoholic extract of *Sisimbrion*, *Plantago*, *Corianderum* and *Trigonella*. Fassa Medical science University Journal. 3(2): 160-167.
3. Zargari, A. 1993. Medicinal plants (3th volume).Tehran University Press. Tehran, Iran.
4. Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, A. and Babji, A. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. African Journal of Biotechnology, 8: 484-489.
5. Nordberg, J,L., Arnér, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 31(11):1 287-312.
6. Arena, S,1., Salzano, A.M., Renzone, G., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. 2014. Non-enzymatic glycation and glycoxidation protein products in foods and diseases: an interconnected, complex scenario fully open to innovative

proteomic studies. Mass Spectrom Rev. 33(1):49-77.

7.Asadi, S., Sohrabi, M., Zarei, S., Ghyasvand, T., Rezaei Farimani, A., Goodarzi, M. 2014. Effects of *Curcuma Longa* and *Cinnamon* aqueous extracts on serum carbohydrates and lipids metabolism and oxidative status in high fructose fed rats. International Research Journal of Biological Sciences, 3(3): 78-82.

8. Bhattacherjee, A. and Chakraborti, A. 2013. Inhobitory Effect of Piper betle Linn. Leaf extract on protein glycation-quantification and characterization of the antiglycation components. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 50: 529-536.

9.Caengprasath, N., Ngamukote, S., Mäkynen, K. and Adisakwattana, S. (2013). The protective effect of pomelo extract (*citrus grandis* l. osbeck) against fructose mediated protein oxidation and glycation. Excli Journal, 12: 491-502.

10.Chaouche, T., Haddouchi, F., Ksouri, R., Medini, F., El-Haci, I., Boucherit, Z. 2013. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium majus* L. Free Radicals and Antioxidants, 3: 43-46.

11.Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, F., Ebrahimzadeh, A., and Pourmand, F. (2011). Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of walnut. J. Med. Plants Res. 5 (7): 1128-1133.

12.Goodarzi, M., Tootoonchi, A., Karimi, J., Abbasi Oshaghi, E. 2013. Anti-diabetic effects of aqueous extracts of three iranian medicinal plants in type 2 diabetic rats induced by high fructose diet. Avicenna Journal of Medical Biochemistry, 1(1): 7-13.

13.Hebschmann, A., Regensteiner, J., Vlassara, H. and Reusch, J. 2006. Diabetes and advanced glycoxidation end products. Diabetes Care, 29: 1420-1432.

14.Jariyapamornkoon, N., Yibchok-anun, S., Adisakwattana, S. 2013. Inhibition of advanced glycation end products by red grape skin extract and its antioxidant activity. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13: 13-17.

15.Kaneko, T., Tahara, S., Takayabashi, F. 2007. Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1,2–dimethylhydrazine in rat colons. Bio. Pharm Bull., 30: 2052-2057.

16.Kaviarasan, S., Naik, G., Gangabhagirathi, R., Anuradha, C., Priyadarsini, K. 2007. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. Food Chemistry, 103: 31–37.

17.Madar, Z., Abel, R., Samish, S., Arda, J. 1998. Glucose-lowering effect of fenureek in non insulin dependent diabetics. Europian Journal of Clinical Nutrition, 42(1): 51-54.

18.Mathew, S., Abraham, T. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. Food Chemistry, 94: 520–528.

19.Mazandarani, M., Makri, S., Bajian, G. 2011. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity in different parts of *Heracleumgor ganicumrech* F. in golestanprovince, north of Iran. Iranian Journal Plant Physiology, 2(2): 381-388.

20.Meda, A., Lamien, C., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry, 91: 571-577.

21.Meeprom, A., Sompong, W., Chan, C., Adisakwattana, S. 2013. Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose and glucose-mediated protein glycationin vitro. Molecules, 18: 6439-6454.

22.Nagendrappa, C. 2005. An appreciation of free radical chemistry- 3 free radicals in diseases and health. Resonance, 10(3): 67-73.

23.Sharma, R., Sarkar, A., Hazara, D., Mishra, B., Singh, J., Sharma, S. 1996. Use of fenuqreek seed powder in the management of non-insulin dependent

diabetes mellitus. *Nutrition* Research, 16(8): 1331-1339.

24. Sohrevardi, N. and Sohrevardi, F. 2012. Essential oil composition and antioxidant activity of trigonella *Foenum Graecum* L. plant. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4(12): 793-797.

25. Subhashini, N., Thangathirupathi, A., Lavanya, N. 2011. Antioxidant activity of trigonella foenum graecum using various In vitro and ex vivo models. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3(2): 96-102.

26. Wijetunge, D., Perera, H. 2014. A novel in vitro method to identify protein glycation inhibitors. Asian Journal of Medical Sciences, 5(3): 15-21.