sina-pub.ir

عصاره گل قاصدک (Taraxacum officinale) هر دو گونه اکسیژن فعال و اکسید نیتریک را سرکوب کرده و از اکسیدان برون تنی لیپید جلوگیری می کند

چکیده :

فلاونویید ها و مشتقات اسید کوماریک در گل قاصدک (Taraxacum officinale) شناسایی شده اند. ویژگی های آنتی اکسیدان های زنجیر شکن نظیر طولانی شدن مرحله تاخیر و کاهش نرخ انتشار، در اکسیداسیون امولسیون اسید لینولئیک با افزودن عصاره گل قاصدک(DFE) مشاهده شده است. DFE موجب سرکوب و مهار رادیکال هیدروکسیل و سوپر اکسید می شود، در حالی که رادیکال هیدروکسیل از طریق هر دو فرایند بازدارندگی اختصاصی و غیر اختصاصی رادیکال هیدروکسیل، سرکوب می شود. فعالیت تنظیف کنندگی رادیکال DPPH و اثر هم افزایی با آلفا- توکوفرول به فعالیت کاهندگی ناشی از محتوی اسید فنولیک عصاره گل قاصدک نسبت داده شد. تولید اکسید نیتریک وابسته به غلظت و معنی دار($P<0.05$) از سلول های ماکروفاژ RAW264.7 موش تحریک شده با لیپوساکارید باکتریال با افزودن عصاره گل قاصدک مشاهده شد. به علاوه، اکسیداسیون درون سلولی ناشی از رادیکال پروکسیل سلول های RAW264.7 به طور معنی داری ($P<0.05$) با افزودن عصاره گل قاصدک در طیف وسیعی از غلظت ها،متوقف شد. این نتایج حاکی از آن است که عصاره گل قاصدک دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه ای در مدل های بیولوژیکی و شیمیایی است. به علاوه، کارایی عصاره گل قاصدک در بازدارندگی و سرکوب گونه های اکسیژن فعال و اکسید نیتریک به مقدار فنولیک آن نسبت داده شد.

کلمات کلیدی: گل قاصدک، (Taraxacum officinale)، اکسیداسیون، آنتی اکسیدان ها، گونه های اکسیژن فعال، اکسید نیتریک

مقدمه

sina-pub.ir

آنتی اکسیدان های طبیعی نه تنها از لیپید های غذایی در برابر اکسیداسیون محافظت می کنند، بلکه در عین حال مزایای سلامتی در رابطه با پیش گیری از آسیب ناشی از تجزیه زیستی(دیویس 1995) را فراهم می کنند. به علاوه، پستانداران هوازی از اکسیژن برای حفظ کارکرد ها و وظایف بیولوژیکی نرمال استفاده می کنند و بیش از 2 درصد مصرف اکسیژن در نهایت به فرم گونه های اکسیژنی فعال(ROS) در می آید(دیویس 1995، یوان و کیتس 1996). گونه های اکسیژنی فعال، مشتقات اکسیژنی با الکترون های اوربیتال جفت نشده بوده و در نتیجه ناپایدار و به شدت واکنشی هستند. ROS شامل هیدروکسیل رادیکال، سوپر اکسید رادیکال، پروکسیل رادیکال و اکسیژن یگانه(هالیول 1995) می باشد. اگرچه مقدار ROS بخشی از متابولیسم طبیعی می باشند(دیویس 1995، هالیول 1995)، سیگار کشیدن و مواجهه با تنش اکسیداتیو محیطی(هالیول و اروما 1997) می تواند منجر به تولید منابع برون زای ROS شود که در نهایت به ایجاد چندین نوع سرطان در انسان منتهی می شود(مورس و استونر 1993). آنتی اکسیدان های برونزا مکمل با آنتی اکسیدان های اصلی درون زا نظیر آلفا توکوفرول در مبارزه با آسیب سلولی ناشی از رادیکال های اکسیژن مکمل می باشند. علاوه بر ROS، گونه های نیتروژن فعال(RNS) نظیر نیتریک اکسید و پروکسی نیتریک نیز دارای واکنش پذیری بالایی است که از اهمیت بیولوژیکی و زیستی قابل توجهی برخوردار است(هالیول 1995).

عصاره های طبیعی گیاهان ، به خصوص عصاره های با مقدار زیاد پلی فنولیک، از نظر پتانسیل آنتی اکسیدانی خود در هر دو مدل های غذایی و زیستی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته اند(کالیور و همکاران 1994، تسیرد و همکاران 1996، مارکوی و همکاران 1994، هو وکیتس 2000، لیو و یین 2000). رابطه ساختار- عملکرد در آنتی اکسیدان های پلی فنولیک در سیستم های مختلف مدل بررسی شده اند و عوامل تعیین کننده فعالیت آنتی اکسیدانی شامل مقدار و محل جایگزینی هیدروکسیل است(اریس- ایوانز 1995).

گل قاصدک(Taraxacum officinale) به عنوان یک گیاه دارویی به خاطر ویژگی های افزایش دهنده ترشحات صفرا، ادرار آور، ضد روماتیسمی و ضد التهاب استفاده شده است(بیزت 1994). وجود اجزای فلاونویید ها و فنولیک در گل قاصدک اثبات شده است(ویلیامز و همکاران 1996)، با این حال فعالیت های تنظیف کنندگی رادیکال آزاد و آنتی اکسیدانی گل قاصدک اخیرا مورد بررسی قرار نگرفته است. ما نشان دادیم که عصاره گل

sina-pub.ir

قاصدک مانع از برش DNA و اکسیداسیون LDL ناشی از پروکسی رادیکال ها شد، با این حال، ویژگی پروکسیدانی ناشی از کاهش یون فلز واسطه برای شروع واکنش فنتون بود(هو و کیتس 2003). هدف این مطالعه ، بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره خام استاندارد گل قاصدک در برابر سایر رادیکال های اکسیژن یعنی سوپر اکسید رادیکال و هیدروکسید رادیکال ، می باشد. به علاوه، اثر عصاره گل قاصدک(DFE) در تنظیف نیتریک اکسید و سرکوب اکسیداسیون درون سلولی ناشی از پروکسیل رادیکال نیز با استفاده از رده سلولی ماکروفاژ ارزیابی شد.

مواد و روش ها

نیترو بلو تترازولیوم کلرید(NBT)، زانتین اکسیداز (EC1.1.3.22)، دئوکسیریبوز، اسید لینولئیک، اسید 2-تیوباربیتوریک، دئوکسیریبوز، لیپوپلی ساکارید باکتریایی(LPS، اکولای، سروتیپ 0111:B4)، سوپر اکسید دیسمیوتاز(SOD, EC1.15.1.1)،2-2- دی فنیل-1- پیکریل هیدرازیل(DPPH)،2-7- دیکلروفلورسین دی استات(DCFH-DA)، محیط ایگل اصلاح شده با دلبکو(DMEM)، معرف فولین- سیولاتو(2N) و اسید گالیک از شرکت سیگما کمیکال(سنت لوییس MO) خریداری شد. 2-2- ازوبیس(2- امیدینو پروپان) دی هیدرکلرید(AAPH) از شرکت واکو کمیکال امریکا خریداری شد. لوتئولین و لوتئولین-7-O-گلوکوزید گرید HPLC از شرکت ایندوفین کمیکال خریداری شد. سایر معرف ها دارای گرید تحلیلی یا بالاتر بودند.

عصاره گیری گل قاصدک

گل های قاصدک از مزرعه قاصدک(نوا اسکوشیا، دارتموث) در طی اوایل تابستان جمع اوری شد. گل ها به طور دستی از اندام های هوایی جدا شده و قبل از انجماد و خشک سازی، شسته شدند. کل قاصد خشک و منجمد سپس با 40 بار ریفلاکس با 70 درصد عصاره اتانول به مدت 8 ساعت عصاره گیری شد. عصاره اتانول 70 درصد به یک سوم حجم اصلی(در دمای کم تر از 40 درجه تبخیر) شده و سپس در دمای 4 درجه در طی شب ذخیره شده و پس از آن تحت فیلتراسیون قرار گرفت(کاغذ صافی واتمن شماره 4). مواد فیلتر شده در محیط خلاء خشک شد. ماده خشک(DFE) بدست آمده برای کل مطالعه استفاده شد.

مقدار کل ترکیبات فنولیک

sina-pub.ir

مقدار کل ترکیبات فنولیک با تست فولین-سیوکالتو(شهیدی و نازک 1995) با اصلاح اندازه گیری شد. یک نمونه 100 میکرو لیتری با 500 میکرو لیتر معرف(واکنشگر) فولین-سیوکالتو 10 برابر رقیق شده و 400 میکرو لیتر Na2CO3 7.5 درصد ترکیب شد. جذب در 765 نانومتر ده دقیقه بعد در دمای اتاق اندازه گیری شد(مولتی اسکن اسپکتروم، ترمو لب سیستم). منحنی استاندارد به صورت معادل اسید گالیک بیان شد(میکرو گرم اسید گالیک/ میلی گرم DFE)

قدرت کاهندگی

قدرت کاهندگی DFE(هو و کیتس 2000) با استفاده از اسید اسکوربیک واکنشگر کاهنده استاندارد به عنوان مرجع اندازه گیری شد. قدرت کاهندگی گل قاصدک به صورت معادل اسید اسکوربیک بیان شد(میکرو گرم اسید اسکوربیک/ میلی گرم DFE).

آنالیز HPLC

یک تست پروفیل فنولیک با استفاده از ماژول تفکیک واترز الیانس 2690 مجهز به دتکتور(شناساگر) آرایه فتودیود 996(شرکت واترز، فرانکلین MA) انجام شد. یک ستون Xterra MS C18(2.5 میکرو متر، 50 2.1 mm)(شرکت واترز) در دمای 40 درجه با یک فاز متحرک گرادیان خطی حاوی حلال A(آب)، حلال B(استونیتریل) و حلال C(5 درصد اسید فورمیک در آب) با سرعت جریان در 0.2 میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد. برنامه گرادیان خطی با 88 درصد A، 10 درصد B: 2 درصد c شروع شده و در 73 درصد A، 25 درصد B و 2 درصد C در 25 دقیقه به پایان رسید. جذب در 350 نانومتر ثبت شد. شناسایی لوتئولین، لوتئولین-7-گلوکوزید، اسید کافئیک و اسید کلروژنیک بر طبق زمان نگهداشت بدست آمده از استاندارد های واقعی در شرایط مشابه تعیین شد.

تاثیر DFE بر روی بازدارندگی رادیکال سوپراکسید

ترکیب اکسیداز گزانتین-گزانتین برای تولید سوپر اکسید رادیکال استفاده شد(اروما و همکاران 1988). ترکیب واکنش حاوی یک میلی مول EDTA، 0.1 میلی مول گزانتین و 0.94 میلی مول NBT درحجم نهایی به 3 میلی

sina-pub.ir

لیتر با 50 میلی مول بافر فسفات تعدیل شد(اسیدیته 7.4). واکنش با افزودن 0.1 میلی لیتر 0.5 واحد بر میلی لیتر گزانتین اکسیداز شروع شد. جذب در 560 نانومتر پس از 10 دقیقه در دمای اتاق در برابر بلانک فاقد اکسیداز گزانتین بدست امد. درصد بازدارندگی بر طبق معادله زیر محاسبه شد.

درصد بازدارندگی= جذب در شاهد- جذب در نمونه/ جذب در شاهد ضرب در 100

تاثیر عصاره گل قاصدک بر روی اکسیداز گزانتین با اندازه گیری تشکیل اسید اوریک در 295 نانومتر تعیین شد(هاشتین و همکاران 1984).

تاثیر DFE بر روی تنظیف هیدروکسیل رادیکال و هیدروکسیل رادیکال اختصاصی سایت

یک روش دئوکسیریبوز مبتنی بر لوله ازمایشی برای ارزیابی مهار هیدروکسیل رادیکال استفاده شد(هالیول و همکاران 1987). به طور کلی، سیستم هیدروکسی رادیکال غیر اختصاصی، ترکیب واکنش حاوی 3.6 میلی مول دزوکسی ریبوز، 0.1 میلی مول FeCl3،0.1 میلی مول اسید اسکوربیک،0.1 میلی مول EDTA و 1 میلی مول پروکسید هیدروژن در 10 میلی مول محلول بافر فسفات(با اسیدیته 7.4) بود. برای سیستم هیدروکسیل رادیکال اخصاصی، EDTA با بافر فسفات جایگزین شد. نرکیب واکنش(1 میلی لیتر) با مواد ازمایشی ترکیب شده و در 37 درجه به مدت یک ساعت انکوبات شده و پس از آن 1 میلی مول اسید تری کولواستیک 10 درصد و 1 میلی لیتر 0.5 درصد 2- تیوباربیتوریک اسید افزوده شد. رنگ در دمای 100 درجه به مدت 15 دقیقه در حمام آب جوش توسعه یافت. جذ در 532 نانومتر در دمای اتاق اندازه گیری شد. تاثیر بر روی تنظیف هیدروکسیل رادیکال به صورت درصد بازدارندگی محاسبه شده از معادله مشابه با معادله فوق بیان شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی DFE در امولسیون اسید لینولئیک

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گل قاصدک در امولسیون اسید لینولئیک با استفاده از روش آمونیوم تیوسینات(ازماری و همکاران 1996) با کمی اصلاحات تعیین شد. یک مایع پیش امولسیون با ترکیب 3 گرم اسید لینولئیک و 3 گرم توئین-20 با 200 میلی لیتر، اتانول سی درصد(کیتس و همکاران 2000) تهیه شد. نمونه های 10 میلی لیتری از امولسیون فوق به فلاسک 125 میلی لیتری انتقال داده شده و با 10 میلی لیتر آب مقطر و غلظت

sina-pub.ir

های متفاوت عصاره گل قاصدک ترکیب شد. حجم نهایی تا 25 میلی لیتر با استفاده از آب مقطر تعدیل شد. ترکیبات واکنش در دمای 50 درجه در تاریکی انکوبات شده و فلاسک ها با پارافیلم پوشیده شدند. نمونه های 0.1 میلی لیتری از ترکیب واکنش انکوبات شده با 5 میلی لیتر اتانول 75 درصد، 0.1 میلی لیتر NH4SCN 30 درصد و 0.1 میلی لیتر FeCl2 20 میلی مول(در 0.1 مول HCL) ترکیب شد. جذب در 500 نانومتر(طیف سنج نوری UV-160 شیمیدزو) تعیین شده و نمودار تغییرات زمانی جذب در 500 نانومتر ترسیم شد.

تاثیر عصاره گل قاصدک بر روی تنظیف رادیکال DPPH و اثر هم افزایی آن با آلفا- توکوفرول

یک روش DPPH(هو و کیتس 2001) با اصلاحات انجام شده برای اندازه گیری با یک ریدر میکروپلات استفاده شد. 200 میکرو لیتر متانول حاوی 0.1 میلی مول DPPH با مقادیر متعدد نمونه های آزمایشی در یک پلیت 96 چاهکی ترکیب شد. برای کاهش تبخیر متانول این پلیت پوشش دهی شد. جذب در 519 نانومتر 30 دقیقه بعد در دمای اتاق با ریدر پلیت مرئی- فرا بنفش(طیف مولتی اسکن، ترمولب سیستم) تعیین شد. هر دو عصاره گل قاصدک و آلفا توکوفرول و ترکیبات هر یک با این روش برای تعیین این که ایا اثر هم افزایی بین عصاره گل قاصدک و آلفا توکوفرول وجود دارد یاخیر اندازه گیری شد. یک اثر هم افزایی به صورت بازدارندگی نمونه های ترکیب شده تعریف می شود که به طور قابل ملاحظه ای بالاتر از مجموع ریاضی بازدارندگی از نمونه های تست شده به صورت جداگانه است.

تاثیر عصاره گل قاصدک بر روی پیشگیری از تولید نیتریک اکسید در سلول های RAW264.7

یک رده سلول ماکروفاژ موش RAW264.7(مجموعه کشت های نوع آمریکایی TIB-71 ،، مناسس) در DMEM مکمل سازی شده با 10 درصد سروم گاوی و آنتی بیوتیک ها(100 U/ml پنی سیلین و 100 میکرو گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین) در 37 درجه زیر هوای مرطوب با 5 درصد دی اکسید کربن کشت شد. سلول ها در تراکم 2×10^5 سلول بر میلی لیتر در پلیت 96 چاهکی کشت شدند. پس از انکوباسیون شبانه، نمونه ها و یک میکرو گرم بر میلی لیتر LPS افزوده شده و کشت به مدت 24 ساعت دیگر انکوبات شد(هو و همکاران 2003). نمونه های محیط کشت(100 میکرو لیتر) به پلیت 96 چاهکی دیگر انتقال داده شد که در آن 100 میکرولیتر واکنشگر گریس(50 میکرو لیتر سولفانیل امید یک درصد در 5 درصد اسید فسفوریک و 50 میکرو لیتر نفتیل

sina-pub.ir

اتیلن دیامین دی هیدرو کولید در آب) افزوده شدند. جذب در 540 نانومتر با استفاده از یک ریدر میکرو پلیت تعیین شد. غلظت نیتریت از یک منحنی استاندارد بدست امده با روش مشابه با سدیم نیتریت محاسبه شد. بازدارندگی نیتریک اکسید بر طبق معادله زیر محاسبه شد:

درصد بازدارندگی= جذب $_{\text{مثبت}}$- جذب $_{\text{نمونه}}$/ جذب $_{\text{مثبت}}$- جذب $_{\text{منفی}}$ ضربدر 100

در این جا، جذب $_{\text{مثبت}}$ ، جذب $_{\text{منفی}}$ ، . جذب $_{\text{نمونه}}$ بیانگر جذب محیط های کشت حاوی LPS، بدون LPS و نمونه با PLS است.

تست زنده مانی سلول

تست زنده مانی سلول بر طبق پروتکل کیت I تکثیر سلول (روشه دیاگنوستیک کانادا، لاول، کوبک) انجام شد. 10 میکرو لیتر متیل ترا تیازول اترازولیوم MTT 5 میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاهک افزوده شد. پس از 4 ساعت انکوباسیون در 37 درجه در زیر 5 درصد دی اکسید کربن، 100 میکرو لیتر 10 درصد SDS افزوده شده و شب هنگام انکوبات شد. جذب در 570 نانومتر با ریدر میکروپلات با طول موج مرجع در 690 نانومتر انجام شد. زنده مانی سلول بر طبق معادله زیر محاسبه شد.

درصد زنده مانی سلول= جذب نمونه/جذب شاهد ضرب در 100

تاثیر DFE بر روی اکسیداسیون درون سلولی القا شده با پروکسیل رادیکال در سلول های RAW264.7

سلول های RAW264.7 در پلیت 96 چاهکی در یک تراکم 2×10^5 سلول بر میلی لیتر پلیت شده و سپس عصاره گل قاصدک، 1 mM DCFH-DA و 1 mM AAPH به آن افزوده شد. قرائت های فلورسنس با طول موج برانگیختگی در 480 نانومتر و طول موج گسیلی در 527 نانومتر با استفاده از ریدر فلورسنت گرفته شد(فلورسکن اسنت FL، ترمولب سیستم).

آماره ها

sina-pub.ir

داده ها به صورت میانگین+ انحراف معیار در ازمایش دارای سه تکرار بیان شدند(SPSS، شیکاگو). آزمون تی استیودنت برای ارزیابی تفاوت معنی دار در سطح $p<0.05$ استفاده شد.

نتایج

ترکیبات فنولیک کل، پروفیل ترکیبات فنولیک و قدرت کاهندگی

ترکیبات کل فنولیک و قدرت کاهندگی DFEدر جدول 1 نشان داده شده است. مقدار ترکیبات فنولیک DFE برابر با 20 درصد اسید گالیگ محاسبه شده و فعالیت کاهندگی معادل با 40 درصد اسید اسکوربیک بود. علاوه بر ترکیبات فنولیک کل، HPLC وجود لوتئولین، لوتئولین-7-گلوکوزید، اسید کافئیک و اسید کلروژنیک را تایید کرد(شکل 1).

اثر بازدارندگی بر روی سوپر اکسید رادیکال

سیستم اکسیداز گزانتین-گزانتین در این مطالعه برای تولید سوپر اکسید رادیکال استفاده شد. کاهش جذب در 560 نانومتر، حذف سوپر اکسید رادیکال را نشان داد. تولید سوپر اکسید رادیکال با افزودن سوپر اکسید دیسمیوتاز تایید شد که رادیکال سوپر اکسید را تنظیف می کند. تحت شرایط ازمایشی مشابه، فلاونویید ها نظیر روتین و کورستین اگلیکون ، یک بازدارندگی مشابه رادیکال سوپر اکسید را نشان داد(جدول 2).

DFE، فعالیت بازدارندگی رادیکال سوپر اکسید $p<0.05$ وابسته به غلظت (جدول2) را نشان داد. تشکیل اسید اوریک که محصول واکنش انزیمی می باشد، تا کم تر از 10 درصد کاهش یافت به خصوص زمانی که غلظت DFE تا بیش از 166.7 میکرو گرم بر میلی لیتر افزایش یافت. این نتیجه نشان می دهد که فعالیت بازدارندگی رادیکال سوپر اکسید مشاهده شده ناشی از تداخل در فعالیت انزیمی نبوده است. از این روی بازدارندگی رادیکال سوپر اکسید DFE با تنظیف رادیکال سوپر اکسید ارتباط داشت.

اثر بازدارندگی بر روی هیدروکسیل رادیکال

DFE موجب خنثی سازی دزوکسی ریبوز القا شده با هیدروکسی رادیکال غیر اختصاصی در یک حالت وابسته به دوز شد (جدول 3). هیدروکسیل رادیکال وقتی که با جایگزینی EDTA با بافر تولید شود به صورت هیدروکسیل

sina-pub.ir

رادیکال اختصاصی سایت تعریف می شود و در این صورت دزوکسی ریبوز به عنوان شلاته کننده یون آهن عمل می کند(هالیول و همکاران 1987).DFE یک فعالیت تنظیف کنندگی رادیکال هیدروکسیل اختصاصی(جدول 3) را نشان داد و این در حالی است که این فعالیت ضعیف تر از فعالیت رادیکال هیدروکسیل غیر اختصاصی در همان غلظت است($p < 0.05$).

اثرات لوتئولین و لوتئولین-7-گلوکوزید بر روی هر دو نوع رادیکال هیدروکسیل در شکل 2 نشان داده شده است. بازدارندکی وابسته به غلظت بالای هیدروکسیل رادیکال غیر اختصاصی با هر دو لوتئولین و لوتئولین-7-گلوکوزید دیده شد. بین این دو فلاون ها از حیث بازدارندگی هیدروکسیل رادیکال غیر اختصاصی وجود نداشت و این نشان می دهد که گلیزداسیون در موقعیتC-7 اثری بر روی ظرفیت تنظیف کنندگی رادیکال هیدروکسیل لوتوئلین نداشت. در رابطه با تست هیدروکسیل رادیکال اختصاصی سایت که در آن EDTA با بافر جایگزین شد، بازدارندگی معنی دار هیدروکسیل رادیکال غیر اختصاصی سایت مستقل از غلظت هر دو لوتئولین و لوتئولین-7-گلوکوزید بود(شکل 2).

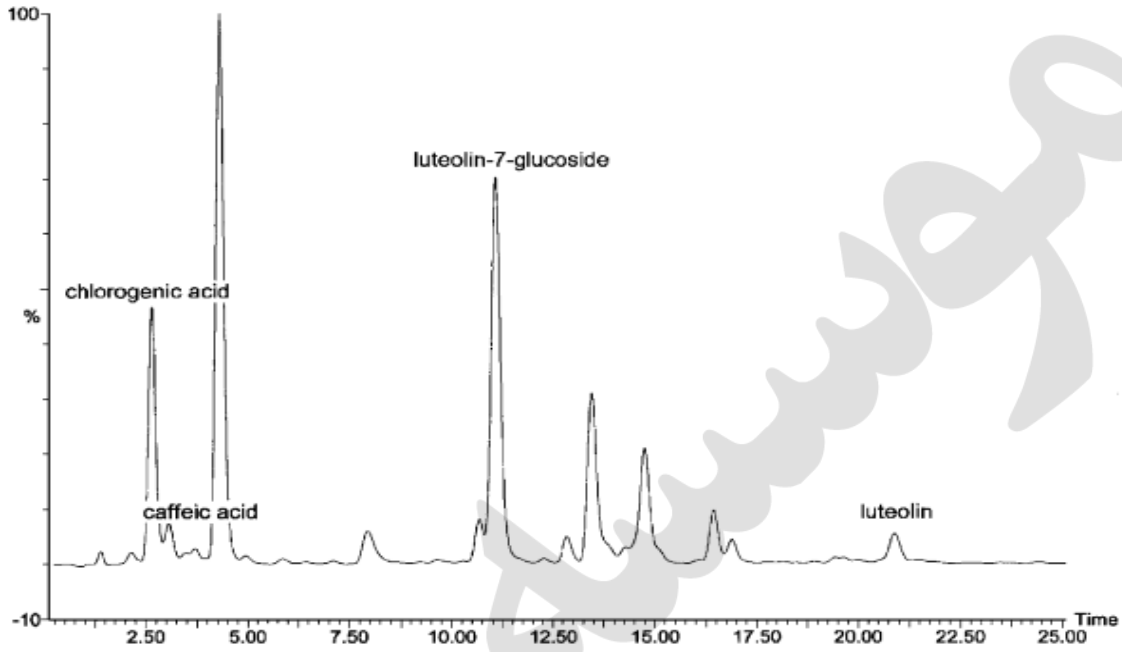
اثر بازدارندگی بر روی اکسیداسیون امولسیون اسید لینولئیک

یک پروفایل اکسیداسیون اسید چرب اشباع شده (برای مثال اسید لینولئیک) از جمله مراحل واکنش بازدارندگی، آغاز، تکثیر و پایان در شکل 3 نشان داده شده است. افزودن 400 پی پی ام DFE موجب کاهش اتواکسیداسیون اسید لینولئیک با افزایش مدت زمان مرحله آغاز شد، در حالی که موجب کاهش سرعت تکثیر نیز شد. افزودن 100 پی پی ام عصاره گل قاصدک موجب افزایش فاز تاخیر در مقایسه با نمونه شاهد شد، با این حال، سرعت تکثیر به طور معنی داری در مقایسه با شاهد پایین تر بود. در مقایسه با این، BHT یک بازدارنده نسبتا قوی اکسیداسیون اسید لینولئیک در این سیستم امولسیون است.

جدول 1: مقدار کل فنولیک و قدرت کاهندگی عصاره گل قاصدک استاندارد(DFE)

مقدار کل ترکیبات فنولیک(میکروگرم بر میلی گرم)	195.4 ± 3.6
قدرت کاهندگی(میکروگرم بر میلی گرم)	417.0 ± 8.3

sina-pub.ir



اسید کلروژنیک، لوتئولین-7- گلوکوزید ، اسید کافئیک، لوتئولین

شکل 1: پروفیل ترکیبات فنولیک عصاره گل قاصدک استاندارد(DFE) از طریق HPLC

جدول 2: اثر تنظیف کنندگی استاندارد های انتی اکسیدانی و DFE بر روی رادیکال سوپر اکسید

نمونه	درصد بازدارندگی
SOD 0.67 unit/ml	63.9 ± 3.9**
SOD 0.067 unit/ml	25.0 + 3.2*
کوئرستین 3.4 µg/ml	42.0 ± 4.8**
کوئرستین 0.34 µg/ml	21.6 ± 0.6*
روتین 6.2 µg/ml	34.1 ± 1.4**
روتین 0.62 µg/ml	17.7 ± 2.6*
عصاره گل قاصدک 50 µg/ml	22.4 ± 0.6**
عصاره گل قاصدک 100 µg/ml	44.2 ± 0.7**
عصاره گل قاصدک 150 µg/ml	63.6 + 1.2***

جدول 3: درصد اثر تنظیف کنندگی عصاره گل قاصدک استاندار DFE بر روی رادیکال هیدروکسیل اختصاصی و غیر اختصاصی در تست دزوکسی ریبوز

غلظت(میکرو گرم بر میلی لیتر)	درصد هیدروکسیل رادیکال غیر اختصاصی	درصد هیدروکسیل رادیکال اختصاصی

sina-pub.ir

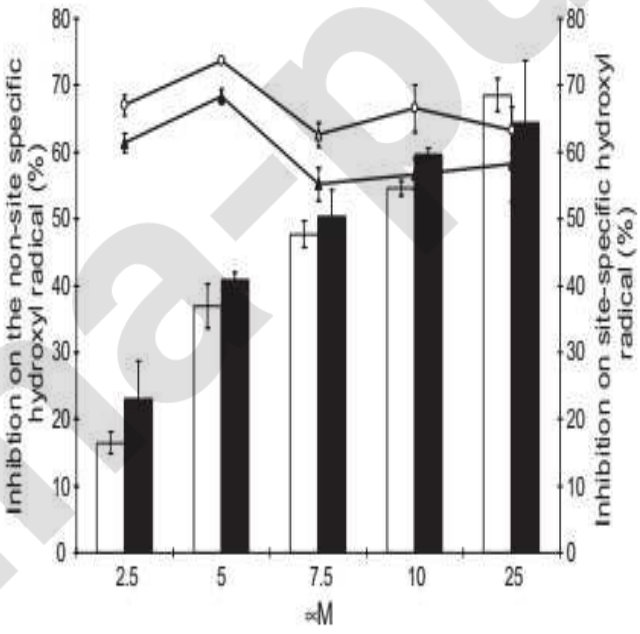
25	$36.4 \pm 0.9^{**a}$	$23.4 \pm 1.8^{**a}$
50	$49.9 \pm 1.3^{**b}$	$28.6 \pm 2.5^{*b}$
100	$62.5 \pm 0.3^{**c}$	$35.4 \pm 1.7^{**c}$
200	$71.0 \pm 0.6^{***d}$	$54.6 \pm 1.7^{**d}$

اثر تنظیف کنندگی رادیکال DPPH و اثر هم افزایی با آلفا توکوفرول

علاوه بر تنظیف هیدروکسیل رادیکال و سوپر اکسید رادیکال و پیش گیری از لینولئیک اسید از اکسیداسیون،DFE نیز مانع از رادیکال DPPH پایدار به شکل وابسته به دوز شد(جدول 4). به علاوه، DFE نیز اثر هم افزایی معنی دار را با آلفا توکوفرول در تنظیف رادیکال DPPH در این مطالعه، نشان داد(جدول 4).

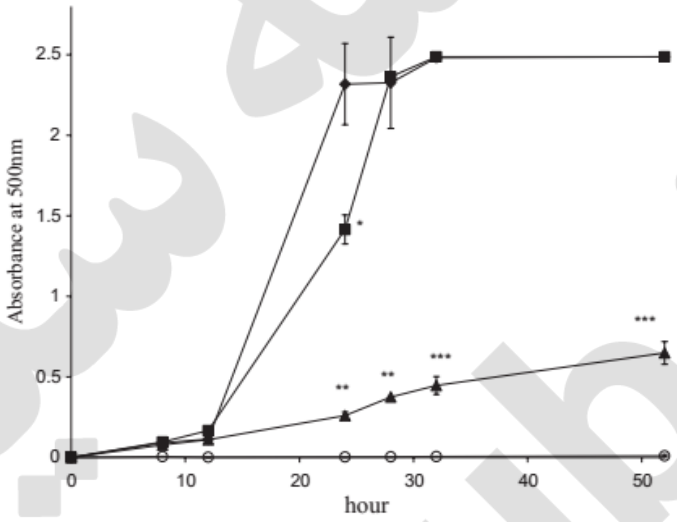
تاثیر DFE بر روی اکسیداسیون القا شده با هیدروکسیل رادیکال سلول های ماکروفاژ RAW264.7

اکسیداسیون درون سلولی با فلورسانس بالاتر($P<0.01$) تایید شد به خصوص زمانی که AAPH وارد محیط کشت سلول شد(شکل 4). اکسیداسیون درون سلولی با افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافت. بازدارندگی معنی دار با افزایش DFE در RAW264.7 مشاهده شده بود که با رادیکال پروکسیل در طی انکوباسیون تحریک شد(شکل 4). بازدارندگی وابسته به غلظت نیز برای Dfe اتاندارد در مدل اکسیداسیون سلول تحریک شده با رادیکال پروکسیل مشاهده شد.



sina-pub.ir

شکل 2: اثرات لوتئولین و لوتئولین-7-گلوکوزید بر روی بازدارندگی هیدروکسیل رادیکال: خطوط باز: لوتئولین بر روی رادیکال هیدروکسیل غیر اختصاصی، خط چین: لوتئولین-7-گلوکوزید بر روی رادیکال هیدروکسیل ویژه غیر اختصاصی، △ = لوتئولین بر روی رادیکال هیدروکسیل غیر اختصاصی ، ▲ = لوتئولین-7-گلوکوزید بر روی رادیکال هیدروکسیل غیر اختصاصی.



شکل 3: اثر بازدارندگی عصاره گل قاصدک استاندارد بر روی اکسیداسیون امولسیون اسید لینولئیک انکوبات شده در دمای 50 درجه، ◆ = شاهد، ■ =100 پی پی ام عصاره قاصدک، ▲ = 400 پی پی ام عصاره گل قاصدک، ○ = 100 پی پی ام BHT، $*p<0.05,\ **p<0.01\ p<0.001$ در مقایسه با شاهد.

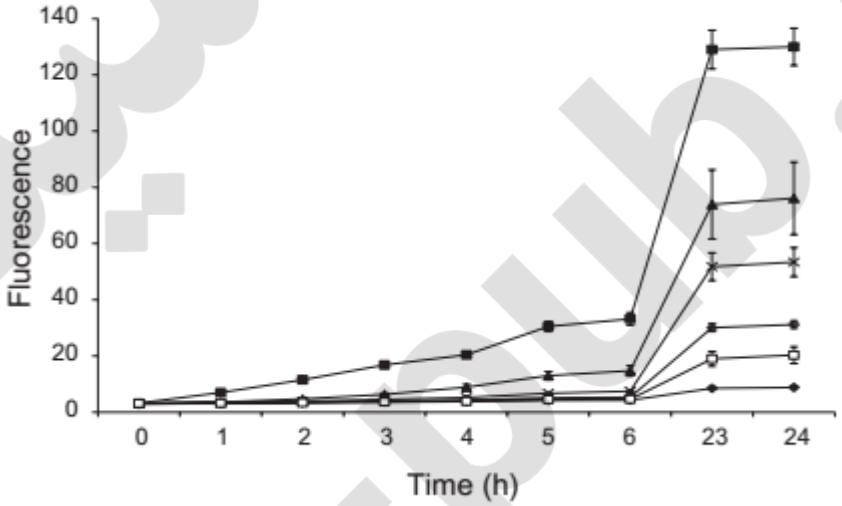
اثر بازدارندگی عصاره گل قاصدک بر روی تولید اکسید نیتریک در سلول های ماکروفاژ تحریک شده با LPS

عصاره گل قاصدک یک اثر باز دارنده را بر روی تولید اکسید نیتریک در سلول های ماکروفاژ موش تحریک شده با LPS باکتریایی داشت(جدول 5). غلظت نیمه بازدارنده، 130 میکرو گرم بر میلی لیتر برای عصاره گل قاصدک بود. تست زنده مانی سلول نشان داد که غلظت های موثر در بازدارندگی تولید اکسید نیریک در محیط کشت منجر به القای اثر سیتو تکسیک بر روی سلول های کشت شده تا 500 میکرو گرم بر میلی لیتر شد(جدول 5). سمیت سلولی ضعیف در 500 میکرو گرم بر میلی لیتر منجر به کاهش کارایی بازدارندگی اکسید نیتریک نشد.

sina-pub.ir

جدول 4: قدرت تنظیف کنندگی عصاره گل قاصدک استاندارد و آلفا توکوفرول بر روی رادیکال DPPH

عصاره گل قاصدک (میکرو گرم بر میلی لیتر)	آلفا توکوفرول(میکرو گرم بر میلی لیتر)	درصد بازدارندگی
20	/	14.5±2.0*
40	/	35.6±3.0*
60	/	56.0±1.8**
80	/	80.1±2.7***
100	/	90.2±0.5***
/	2.2	18.2±2.0*
/	4.3	50.8±4.9**
/	6.5	74.9±4.5***
/	8.6	96.1±0.4***
20	2.2	45.9±2.8**[a]
40	2.2	71.5±2.1***[a]
60	2.2	90.6±0.5***[a]



فلورسنس، زمان(ساعت)

شکل 4: اثر عصاره گل قاصدرک استاندارد(DFE) در پیش گیری از اکسیداسیون درون سلولی RAW264.7 القا شده با یک میلی مول AAPH در دمای 37 درجه، ◆=AAPH منفی، ■= APPH مثبت، ▲= AAPH + 7.8 میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره قاصدک،X=AAPH+ 15.6 میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره گل قاصدک، ○ =AAPH+ 31.3 میکروگرم بر میلی لیتر DFE،□ =AAPH+62.5 میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره گل قاصدک

sina-pub.ir

جدول 5: اثر عصاره گل قاصدک استاندارد در بازدارندگی از تولید اکسید نیتریک در سلول های RAW264.7 تحریک شده با LPS

غلظت(میکرو گرم بر میلی لیتر)	درصد بازدارندگی	زنده مانی سلول
31.3	7.5±2.8	95.7±3.1
62.5	15.4±4.2*	105.1±9.4
125	44.0±4.9***	108.3±2.4
250	74.3±8.4***	109.2±1.3
500	86.5±4.2***	84.1±3.9*

سوپر اکسید، هیدروکسیل و پروکسیل رادیکال ها اشکال متفاوت ROS می باشند(مورس و استانر 1993)، و این در حالی است که سوپر اکسید رادیکال یک کاهنده ضعیف است(دیویس 1995). سوپر اکسید رادیکال تحت دیسمیوتاسیون انزیمی و غیر انزیمی برای تولید هیدروژن پروکسید و رادیکال هیدروکسیل فعال در زمان وجود فلز واسطه قرار می گیرد. برای مثال، سوپر اکسید رادیکال تولید هیدروکسیل رادیکال از طریق واکنش هابر-ویس $(H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + HO^{\bullet} + HO^{-})$ می کند، این در حالی است که یون آهن این واکنش را از طریق مکانیسم واکنش فنتون کاتالیز(هالیول 1995). به علاوه، واکنش های بین آنیون سوپر اکسید و اکسید نیتریک می تواند منجر به تولید رادیکال پروکسی نیتریت فعال شود(هالیول 1995). از این روی، حذف رادیکال سوپر اکسید مازاد برای پیش گیری از آسیب به مولکول های بیولوژیکی از ROS سمی مهم است. اثر بازدارندگی عصاره گل قاصدک بر روی رادیکال سوپر اکسید در این مطالعه تایید شد. این بازدارندگی را می توان به محتوی فنولیک نسبت داد. همان طور که گفته شد(کاس و همکاران 1998)، ترکیبات فنولیک شامل کوئرستین و روتین هر دو سوپر اکسید رادیکال را تنظیف می کنند. در این مطالعه، ما نشان دادیم که بازدارندگی رادیکال سوپر اکسید لزوما ناشی از بازدارندگی فعالیت اکسیداز گزانتین نیست زیرا تشکیل اسید اوریک(محصول اکسیداز گزانتین و گزانتین) ثابت باقی ماند. از این روی، می توان نتیجه گرفت که عصاره گل قاصدک در تنظیف مستقیم سوپر اکسید رادیکال موثر است.

رادیکال هیدروکسیل یک ROS بسیار فعال با طول عمر کوتاه است(هالی ول 1995). هر دو رادیکال هیدروکسیل اختصاصی و غیر اختصاصی(هالیول و همکاران 1987) بر اساس واکنش فنتون ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow$

sina-pub.ir

$\bar{Fe}^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$) در این مطالعه تولید شد. میزان پیش گیری بستگی به هر دو نسبت غلظت انتی اکسیدان به دزوکسی ریبوز و ثابت سرعت درجه دوم برای واکنش با هیدروکسیل رادیکال(هالیول و همکاران 1987) دارد. در این مطالعه، ما نه تنها اثر بازدارندگی عصاره گل قاصدک را بر روی هیدروکسیل رادیکال مشاهده کردیم، بلک نشان داده شد که غلظت نیمه بازدارندگی عصاره گل قاصدک برای رادیکال هیدروکسیل غیر اختصاصی پایین تر از رادیکال هیدروکسیل اختصاصی سایت بود. این نتیجه نشان می دهد که عصاره گل قاصدک، توانایی بالایی برای مهار رادیکال هیدروکسیل غیر اختصاصی نشان داد، اگرچه هر دو منبع رادیکال هیدروکسیل، به طور معنی داری مهار شدند(جدول 2). این نتیجه نشان می دهد که عصاره گل قاصدک به عنوان یک شلات کننده یون فلز واسطه بالقوه محسوب می شود. فعالیت شلاته کنندگی فلاونویید ها در مطالعه دیگر(رایس ایوانز 1995) با ساختار 3- هیدروکسیل و گروه های ارتو- دی- هیدروکسیل گزارش شده است. وجود ترکیبات فنولیک در عصاره گل قاصدک نظیر اسید کافئیک، اسید کلروژنیک، لوتئلین و لوتئولین-7-گلوکوزید با HPLC تایید شد(شکل 1). گفته می شود که همه این ترکیبات حاوی گروه ارتو دی هیدروکسیل می باشند که بازدارندگی مستقل از غلظت مشاهده شده را بر روی فعالیت رادیکال هیدروکسیل اختصاصی با لوتئولین نشان دادند. با توجه به همین، اثر مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل عصاره گل قاصدک در این مطالعه را می توان به حضور ترکیبات فنولیک نسبت داد که شامل فلاونویید ها و اسید کوماریک می باشد.

انکوباسیون اسید لینولیئک در یک امولسیون در دمای بالا منجر به دوره آغاز کوتاه برای اتو اکسیداسیون و سرعت انتشار سریع اسید چرب اکسید شده گردید(شکل 3). با استفاده از غلظت پایین 100 پی پی ام، عصاره گل قاصدک موجب افزایش فاز شروع نشد، بلکه موجب کاهش سرعت انتشار برای اکسیداسیون شد. به علاوه، حضور عصاره گل قاصدک در غلظت های بالاتر مانع از اکسیداسیون با طولانی شدن فاز تاخیر اکسیداسیون لیپید شده و این منعکس کننده ویژگی های آنتی اکسیدان های زنجیره شکن نظیر BHT است. پیش گیری در برابر اکسیداسیون اسید لینولئیک ناشی از حرارت با سایر عصاره های گیاه غنی از ترکیبات فنولیک گزارش شده است(اسماری و همکاران 1996). بوردا و ازلیک(2001) فعالیت پروکسیدانت لوتئولین-7-گلوکوزید را در یک اکسیداسیون هم زمان بتا کاروتون و مدل ناهمگن لینولیک اسید گزارش کرده و نشان دادند که یک تعادل بین

sina-pub.ir

آب دوستی و آب گریزی، می تواند برای فعالیت انتی اکسیدانی مهم باشد(هو کیتس 2001). علاوه بر ویژگی اب گریزی، رفتار انتی اکسیدانی و پروکسیدانی مواد فیتو شیمیایی بر شرایط محیطی بستکی دارد. برای مثال، ما یک فعالیت پروکسیدانی لوتئولین-7-گلوکوزید را در پروکسیداسیون لیپوزوم تحریک شده با یون به دلیل تشکیل یون مس مطلوب برای اکسیداسیون مشاهده کردیم(هو و کیت 2003). در این مطالعه، حضور یون فلزی با استفاده از تیمار رزین شلاته کننده فلز (Chelax 100) به بافر های مورد استفاده به حداقل رسید و پتانسیل پروکسیداسیون کاهش یافت.

هم افزایی بین آنتی اکسیدان ها نظیر ویتامین E و اسید اسکوربیک نیز شناخته شده است(اسکارپیا و همکاران 1984). اثر هم افزایی بین اسید اسکوربیک و الفا توکوفرول به قدرت کاهندگی نسبت داده شد که موجب تسهیل بازیابی توکوفرول از رادیکال های توکوفرول می شود(نیکی و همکاران 1982). قدرت کاهندکی عصاره گل قاصدک استاندارد همراه با فعالیت تنظیف کنندگی رادیکال DPPH لوتئولین-7-گلوکوزید نشان داده شد(بوردا و الزسک 2000). نتایج فعلی یک اثر تنظیف کنندگی عصاره گل قاصدک را بر روی رادیکال DPPH و نیز اثر هم افزایی را با الفا توکوفرول در تنظیف رادیکال DPPH نشان داد. ما نتیجه می گیریم که فلاونویید ها و ترکیبات فنولیک دیگر موجود در عصاره فوق به تولید مجدد الفا توکوفرول علاوه بر ترسیب رادیکال های آزاد کمک می کند که با رادیکال DPPH نیز مشاهده شده بود. 40 درصد معادل اسید اسکوربیک عصاره گل قاصدک، مسئول اصلی اثر هم افزایی با الفا توکوفرول می باشد در مطالعه قبلی ما، یک اثر هم افزایی کاتچین چای با الفا توکوفرول گزارش شد(هو و کیتس 2001). به طور مشابه، لیائو و ین 200، فلاونویید ها و اسید های فنولیک هم افزایی شده با الفا توکوفرول در حفاظت از غشای اریتروسیت انسان و سیستم های لیپوزوم از پروکسیداسیون القا شده با یون آهن را نشان دادند. روی هم رفته، می توان گفت که علاوه بر فعالیت مستقیم تنظیف کنندگی، عصاره گل قاصدک پتانسیل هم افزایی با الفا توکوفرول را برای سرکوب رادیکال DPPH دارد.

پیش ساز فلورسانت غیر یونی غیر قطبی DCFH-DA می تواند از غشای سلول عبور کرده و با استراز درون سلولی به دی کلرو فلورسین 2-7 غیر فلورسانت(DCFH) هیدرولیز شود.. این محصول واسطه سپس به مشتق دی کلرو فلورسین 2-7 فلورسانت DCF اکسید می شود(لبل و همکاران 1992). از این روی استفاده از این پروب فلورسانت

sina-pub.ir

برای مطالعه واکنش پروکسیداسیون در سلول های زنده ایده ال است(ما و همکاران 1998، وانگ و جوزف 1999). ما از AAPH به عنوان آغاز گر رادیکال پروکسیل در مطالعات قبلی برون تنی استفاده کردیم(هو و کیتس 2000، 2001، 2003) که در آن فلاونویید ها، اثرات کاهندگی آسیب برون تنی زیست مولکولی ناشی ازپروکسیل رادیکال را نشان داد. در این مطالعه، ما از AAPH برای تولید رادیکال پروکسیل برای سلول ماکروفاژ RAW264.7 استفاده کردیم. فلورسنس سلولی پایه بدون تیمار AAPH در طی 24 ساعت انکوباسیون پایین باقی ماند و این نشان می دهد که مقدار اکسیداسیون درون سلولی پایین است(DCFH نیازمند یک معرف اکسیداتیو قوی نظیر ROS می باشد). از سوی دیگر، این نتیجه که سلول های تیمار شده با AAPH، فلورسنس بالاتری را نشان دادند، یک شاهد قوی مبنی بر این است که رادیکال پروکسیل از غشا عبور کرده و موجب اکسیداسیون DCFH شده و در نهایت این اثر به شکل وابسته به دوز بدون تحریک سمیت سلولی کاهش می یابد. همان طور که قبلا گفته شد، فلاونویید ها و سایر عصاره های غنی از ترکیبات فنولیک مانع از اکسیداسیون لیپوزوم تحریک شده با رادیکال پروکسیل و شکستن برون تنی دی ان ای می شود(هیو و کیتس 2001، 2003). داده های منتشر نشده ما نشان داده است که لوتئولین و لوتئولین-7-گلوکوزید در غلظت های کم تر از 20 میکرو مول موجب کاهش اکسیداسیون درون سلولی تحریک شده با پروکسیل رادیکال در سلول های RAW264.7 شد. از این روی در این مطالعه تایید شد که عصاره غنی از ترکیبات فنولیک مشتق شده از DFE، در خفاظت از سلول های زنده از اکسیداسیون درون سلولی موثر بود. مکانیسم این پیش گیری با فعالیت تنظیف رادیکال های پروکسیل درون و بین سلولی با ترکیبات انتی اکسیدانی عصاره گل قاصدک ارتباط دارد.

LPS باکتریایی موجب تحریک ماکروفاژ نظیر RAW264.7 برای بیان نیتریک اکسید با تنظیم افزایشی اکسید نیتریک قابل القا می شود(Inos). نتایج نشان داد که عصاره گل قاصدک استاندارد مانع از اکسید نیتریک در سلول های ماکروفاژ کشت شده موش تحریک شده با LPS باکتریایی می شود(جدول 5) بدون این که موجب ایجاد سمیت سلولی شود. فعالیت های بازدارندگی مشابه با سایر غذا های غنی از ترکیبات فنولیک استاندارد (هیو و همکاران 2003) و عصاره های گیاهی نظیر عصاره Ginkgo biloba گزارش شده است(وادسومورت و کوپ 2001). در مثال دوم، عصاره غنی از فلاونویید موجب مهار اکسید نیتریک در ماکروفاژ فعال با کاهش سطح mRNA Inos شده و بازدارندگی میتوژن p38 منجر به تحریک فعالیت کیناز پروتین می شود که یک پیش نیاز

sina-pub.ir

اصلی برای بیان iNOS در سلول های RAW264.7 تحریک شده با lps می باشد(وادسورت و کوپ 2001). اگرچه ما این موضوع را تایید نکرده ایم که مسیر انتقال سیگنال تحت تاثیر DFE یا اجزای آن است، ولی نتایج نشان داد که لوتئولین و لوتئولین-7-گلوکوزید به جای اسید کافئیک و اسید کلروژنیک، مانع از تولید نیتریک اکسید شده و در واقع موجب مهار تولید اکسید نیتریک در سلول های ماکروفاژ فعال شده با LPS می شود(داده های منتشر نشده هیو و کیتس). سایرین فعالیت های خنثی کنندگی اسید کافیئیک و اسید کلروژنیک را بر روی تولید اکسید نیتریک(وانگ و مازا 2002) نشان دادند.

نتیجه گیری

مزیت حفاظت از قلب و عروق در میوه ها و سبزیجات به فعالیت های آنتی اکسیدانی مواد فیتوشیمیایی مختلف و به خصوص آنتی اکسیدان های طبیعی نظیر فلاونویید ها، کارتنویید ها، ویتامین E و C نسبت داده شده است. میانگین 20 تا 23 میلی گرم بر روز فلاونول و فلاون غذایی در رژیم غذایی غربی از منابعی نظیر چای، پیاز و سیب مصرف می شود سامسون و همکاران 2002). افزایش مصرف فلاونویید ها با وقوع پایین بیماری قلبی ایسکمی همراه است(هولمن و کاتان 1999، گلتجینس و همکاران 2002) و این ناشی از حفاظت انتی اکسیدانی است. از این روی، نیاز به افزایش مصرف روزانه فلاونویید ها از سبزیجات و میوه ها یا از مکمل ها، تشخیص داده شده است. بر اساس داده های این مطالعه می توان این طور نتیجه گرفت که یک عصاره گل قاصدک استاندارد موجب سرکوب ROS و RNS در مدل های شیمیایی و زیستی می شود. توانایی تنظیف رادیکال آزاد و اثر هم افزایی با الفا توکوفرول برای عصاره قاصدک به محتوی ترکیبات فنولیک نسبت داده شد. پیش گیری از سلول های زنده از اکسیداسیون ناشی از پروکسیل رادیکال در حضور عصاره قاصدک نشان می دهد که اکسیداسیون در حضور عصاره گل قاصدک دارای فعالیت انتی اکسیدانی زیستی است. برای بررسی متابولیسم و فراهمی زیستی ترکیبات آنتی اکسیدان های مشتق شده از عصاره گل قاصدک و مکانیسم های بازدارنده تولید نیتریک اکسید ، مطالعات بیشتری لازم است.