مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۹، آذر ۱۳۹۵
صفحه: ۷۳۵-۷۲۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.9, Dec 2016
Pages: 724-735

تأثیر ترکیبات فلاونوئیدی حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون عصاره گیاه سماق(Rhus coriaria L) بر اکسیداسیون LDL

عالیه عبدالرضایی[۱]، هاشم نیری*[۲]، غلامعلی نادری[۳]

چکیده

مقدمه: اکسیداسیون LDL با ایجاد پلاک‌های چربی در دیواره اندوتلیال، یک رویداد مهم در آتروژنز محسوب می‌شود. سماق گیاهی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و پلی‌فنولی بوده و فلاونوئیدها نیز از جمله این ترکیبات آنتی اکسیدانی به شمار می‌روند که با مهار اکسیداسیون LDL قادر است بیماری آترواسکلروز را مهار یا کند کنند. لذا، این تحقیق به منظور تعیین اثر اجزاء فلاونوئیدی حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون عصاره سماق بر اکسیداسیون LDL ناشی از سولفات مس انجام گرفت.

روش بررسی: در این پژوهش آزمایشگاهی LDL با استفاده از دستگاه اولتراسانتریفیوژ و به روش شیب غلظتی متوسط جداسازی شد. محتوی فلاونوئیدی عصاره سماق توسط تکنیک ژل فیلتراسیون و با رزین سفادکس LH-20 جدا گردید. سپس کینتیک مربوط به اکسیداسیون LDL در حضور اجزاء فلاونوئیدی عصاره سماق بررسی شد. مالون دی آلدهید ناشی از مسیر اکسیداسیون، در حضور و عدم حضور عصاره به روش TBARS (تیوباربیتوریک اسید) اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد که محتوی فلاونوئیدی عصاره سماق سبب افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) زمان تأخیری (Lag time) در منحنی کینتیک اکسیداسیون LDL می‌شود. همچنین میزان مالون دی‌آلدهید حاصل شده از اکسیداسیون LDL، در حضور عصاره به طور معنی‌داری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان می‌دهد که محتوی فلاونوئیدی عصاره سماق تأثیر مثبتی بر کاهش میزان اکسیداسیون LDL دارد و می‌تواند کاندید مناسبی جهت مطالعات بعدی و همچنین عامل مؤثری برای رفع عواقب ناشی از خطرات اکسیداسیون LDL، از جمله آترواسکلروز باشد.

واژه‌های کلیدی: اکسیداسیون LDL، آترواسکلروز، فلاونوئید، ژل فیلتراسیون، سماق

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان
۲- استادیار، گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان
۳- دانشیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۱-۳۷۴۲۰۱۳۴، پست الکترونیکی: hnaieri@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

آترواسکلروزیس یک ناهنجاری مهم شریانی قلمداد و نوعی ناهنجاری عروقی پیچیده است که همگام با ایجاد و توسعه پلاک آترواسکلروتیک و سلول‌های کف آلود، منجر به تخریب ساختمان طبیعی دیواره شریان‌ها می‌شود که به طور کلی با بیماری‌های قلبی عروقی مانند سکته، حمله قلبی و بیماری‌های عروق محیطی همراه است (۱،۲). مواد اکسیدان موجود در مواد غذایی با اکسیداسیون LDL منجر به ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز می‌شود (۳) و این عارضه توسط اختلال عملکرد اندوتلیال، التهاب عروق و تجمع چربی، کلسترول، کلسیم و بقایای سلولی در دیواره‌های رگ نمایان می‌گردد (۴). اثرات درمانی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در تمامی مواد غذایی گیاهی، توجه مصرف کنندگان را به خود جلب کرده است و از ویژگی‌های ساختاری مشترک تمام پلی فنل‌ها، حضور گروه فنلی هیدروکسیل است که این ساختار اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است (۵،۶). از جمله گیاهانی که دارای ترکیبات پلی فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی قوی است می‌توان به گیاه سماق اشاره کرد (۷).

سماق معمولاً به‌عنوان نام شناخته شده از "sumaga"، به معنی قرمز در زبان سریانی سرچشمه می‌گیرد. سماق با نام علمی (Rhus Coriaria L.) از تیره پسته به صورت درختی یا درختچه‌ای کوچک به ارتفاع ۱ تا ۵ متر که متعلق به خانواده Anacardiaceae است. گل‌های این گیاه به صورت خوشه‌های مجتمع در انتهای ساقه اصلی قرار دارد که تبدیل به میوه‌های نسبتاً کروی و کوچک می‌شوند. میوه آن کوچک (به اندازه عدس) و از نوع شفت می‌باشد (۸).

مهم‌ترین خاصیت سماق خواص آنتی‌اکسیدانی آن است که مصرف دراز مدت آن موجب کاهش میزان کلسترول می‌شود (۹). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در این گیاه باعث تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو نظیر سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شده و با اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد (ROS) ناشی از مصرف غذاهای پرچرب مقابله کرده که نشان دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه این گیاه است (۱۰،۱۱).

فلاونوئیدهای موجود در گیاه سماق، متشکل از ۲ حلقه آروماتیکی A و B مرتبط با ۳ کربن است که معمولاً در یک حلقه pyran یا حلقه C، اکسیژن مرکزی وجود دارد (۱۲). این ترکیبات قادرند طیف گسترده‌ای از گونه‌های واکنشی (رادیکال‌های هیدروکسیل، پروکسیل، هیپوکلرواسید و سوپراکسید) را اشغال کرده و به عنوان یک شلاتور، بسیاری از یون‌های فلزی مانند آهن و مس را منتقل و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی خود باعث کاهش خطر بروز بیماری‌های التهابی و آترواسکلروز شود (۱۳). ساختمان این ترکیبات دارای گروه‌های هیدروکسیل است که نشان‌دهنده ارتباط عملکرد و مهار رادیکال‌های آزاد است (۱۴).

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۴ در شهر اصفهان به منظور بررسی تغییرات روند اکسیداسیون LDL با تأثیر ترکیبات فلاونوئیدی تخلیص شده از عصاره گیاه سماق بر روی نمونه سرم یک فرد سالم انجام پذیرفت.

عصاره‌گیری گیاه سماق: گیاه سماق از مزارع شهرستان خرم‌آباد، در استان لرستان جمع‌آوری و مشخصات و نام علمی آن با کد هرباریوم ۰۶۳/۰۰۳/۰۰۱ مورد تایید قرار گرفت. به منظور عصاره گیری از میوه گیاه سماق از دو روش سوکسله و خیساندن استفاده شد. مرحله اول عصاره گیری به منظور استخراج چربی گیاه سماق، با استفاده از حلال پترولیوم اتر و روش سوکسله انجام شد؛ به این ترتیب که حدود ۱۰ گرم نمونه پودر شده درون کارتوش سیستم سوکسله منتقل و در بخش استخراج کننده دستگاه قرار گرفت. حدود ۱۵۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر درون بالن ریخته شد و به منظور عمل استخراج از دمای ۵۰°C استفاده و ترکیبات چرب موجود در گیاه پس از مدت ۶ ساعت جدا و کنار گذاشته شد. در ادامه استخراج عصاره به روش خیساندن با استفاده از حلال متانول و نمونه گیاه سماق که در مرحله اول عصاره گیری چربی زدایی شد، انجام گرفت; به این ترتیب که پودر گیاه بدون چربی حاصل از مرحله اول با حلال مخلوط گردید و این اختلاط به مدت ۲۴ ساعت در دمای

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

محیط روی شیکر انجام شد. سپس عصاره متانولی با استفاده از کاغذ صافی جمع‌آوری شد و در انتها پس از دو مرحله عصاره‌گیری متناوب، به منظور حذف حلال، عصاره حاصل در دستگاه روتاری تحت عملیات تقطیر در خلأ قرار گرفت (۱۵).

جداسازی اجزاء فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سماق: در این روش از کروماتوگرافی ستونی با ژل سفادکس LH-20 مطابق با روش هگرمن استفاده شد. در این تکنیک کروماتوگرافی، مولکول‌ها با وزن مولکولی متفاوت در زمان‌های مختلف از یکدیگر تفکیک می‌شوند. این سیستم شامل پمپ پریستالتیک (Peristaltic pump)، ستون ۱x۶۰ سانتی‌متر، لوله‌های جمع‌آوری نمونه، اتانول، متانول و استون آبی به عنوان بافر و ژل سفادکس LH-20 (Sigma-Aldrich) (Sephadex LH-20 است که این ژل مولکول‌های با وزن مولکولی ۱۰-۱۵۰۰ کیلودالتون را به خوبی تفکیک می‌کند. پس از افزودن نمونه بر سطح ژل و جمع‌آوری فراکشن‌ها، جذب نوری هر یک در طول موج ۳۶۵ نانومتر محاسبه و نمودار آن رسم گردید (۱۶،۱۷) و با توجه به بالاترین جذب آن نمونه در نمودار، ترکیبات فلاونوئیدی تام توسط رنگ سنجی آلومینیوم کلرید شناسایی شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی تام حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون عصاره سماق: میزان فلاونوئید تام به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ۲۵۰ میکرو لیتر از فراکشن با ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪، ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار و ۱۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان شد (۱۸).

جهت رسم منحنی استاندارد کوئرستین، محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. سپس از این محلول پایه غلظت‌های مختلف (۱۰،۲۰،... و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آماده گردید و پس از انجام مراحل ذکر شده، مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین، با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فلاونوئید تام موجود در فراکشن محاسبه شد. درنهایت، داده‌ها معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بیان گردید.

جمع‌آوری نمونه خون: ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه خون از یک فرد مذکر جوان سالم (معاینه‌های بالینی پزشکی و آزمایش‌های کلینیکی مانند پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی نرمال) بعد از یک شب ناشتایی گرفته شد و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ سرم آن جدا گردید.

جداسازی LDL: سرم LDL در مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با روش ناپیوسته شیب غلظتی با استفاده از اولتراسانتریفیوژ جدا شد. این تکنیک با استفاده از روش Bronzert با اضافه کردن برمید سدیم به سرم، چگالی آن به ۱/۱۸۲(g/cm^3) رسانیده و توسط دستگاه اولتراسانتریفیوژ بکمن Backman Coulter Optima L-100XP، با دور ۶۰۰۰۰ و دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. این آزمایش طی فرآیندی دو مرحله‌ای و با مدت زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت تحت پروتکل himac روی سرم انجام و به ترتیب در پایان مرحله اول شیلومیکرون‌ها و VLDL و در پایان مرحله دوم LDL به صورت لایه زرد رنگ جداسازی شدند (۱۹). سپس به منظور تخلیص نهایی LDL حاصله و خارج ساختن موادی مانند EDTA که در هنگام اکسیداسیون ایجاد مشکل می‌کند، سوپرناتانت حاوی LDL با استفاده از کیسه دیالیز با cut off معادل ۱۲۰۰۰ (کیلو دالتون) و بافر فسفات سالین ۱۰mM (فسفات سدیم ۱۰ mM و کلرید سدیم ۱۵۰ میلی‌مولار) در pH= ۷/۴ (PBS) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تحت عمل دیالیز قرار گرفت (۲۰). سپس با استفاده از روش لوری میزان پروتئین LDL جداسازی شده مشخص شد (۲۱).

اکسیداسیون LDL: سینتیک اکسیداسیون LDL با استفاده از روش استاندارد اسپکتروفتومتری و پیروی از تشکیل دی‌ان‌های کنژوگه (CD) تعیین شد. به این ترتیب نمونه شاهد حاوی ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر LDL اکسیدشده با سولفات مس (۵ میکرومولار) و بافر PBS (۱۰ میلی مولار) با pH=۷/۴ در کووت

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

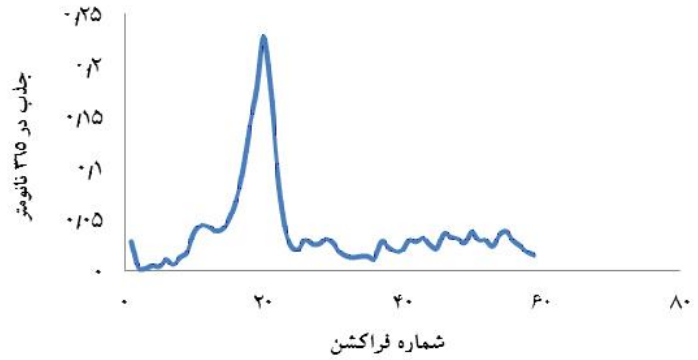
کوارتز(۱ میلی لیتری) قرار گرفت. سپس برای تهیه نمونه مورد آزمایش، ۵ میکرولیتر فراکشن حاوی فلاونوئید بر محتوای یادشده برای نمونه شاهد افزوده گردید. تغییرات اکسیداتیو LDL در نمونه و تحت تأثیر فراکشن با اندازه‌گیری جذب ماوراءبنفش در ۲۳۴ نانومتر هر ده دقیقه یک‌بار به مدت ۵ ساعت اندازه‌گیری شد. (نمونه با ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت) منحنی مربوط به آن بر اساس جذب‌های به دست آمده از آزمایش بر حسب زمان رسم شد و زمان تأخیری (Lag time) و غلظت پایانی دی‌ان‌های کنژوگه که متناسب است با اختلاف بالاترین و پایین‌ترین میزان جذبی که در منحنی اکسیداسیون لیپوپروتئین در طول موج ۲۳۴ نانومتر پس از ۵ ساعت مشاهده می‌شود، بر ضریب خاموشی مولی (۲۹۵۰۰ لیتر بر مول بر سانتی‌متر) محاسبه گردید (۲۲).

اندازه‌گیری MDA به روش تشکیل TBARS: مالون دی آلدهید به عنوان محصول پایانی اکسیداسیون چربی‌ها بر اساس روش Aust و Buege اندازه گیری شد. نمونه LDL پس از انکوبه شدن با سولفات مس و فراکشن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ ساعت، واکنش اکسیداسیون با اضافه کردن EDTA با غلظت پایانی ۲ میلی‌مولار متوقف شد. برای اندازه‌گیری مالون دی آلدهید حاصل از پراکسیداسیون چربی‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه، ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۶ درصد اضافه شد. این ترکیبات به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰(rpm)، پروتئین‌ها رسوب کرده و محلول رویی جداسازی و در جذب ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار جذب‌های به دست آمده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری به عنوان مالون دی‌آلدئید تشکیل شده بر حسب nm/mg–LDL protein محاسبه گردید (۲۳).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام پذیرفت. در ابتدا داده‌ها از نظر نرمال بودن با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار n=۳ انجام شد و نتایج به دست آمده به صورت میانگین±انحراف معیار بیان و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون T مستقل در سطح P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

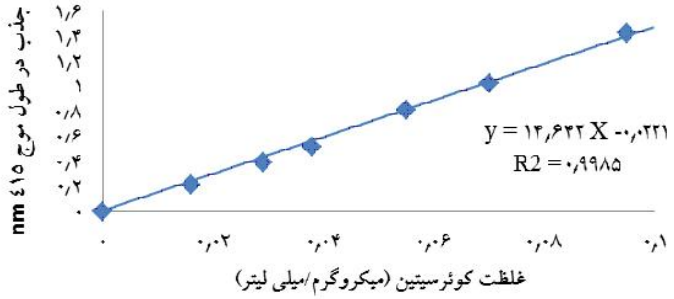
نتایج

به منظور تعیین غلظت و جذب ترکیبات فلاونوئیدی فراکشن‌های عصاره سماق از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۳۶۵ نانومتر استفاده شد که نتایج در نمودار ۱ ارائه شده است.



نمودار ۱: راندمان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی تام حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون عصاره سماق در طول موج ۳۶۵ نانومتر

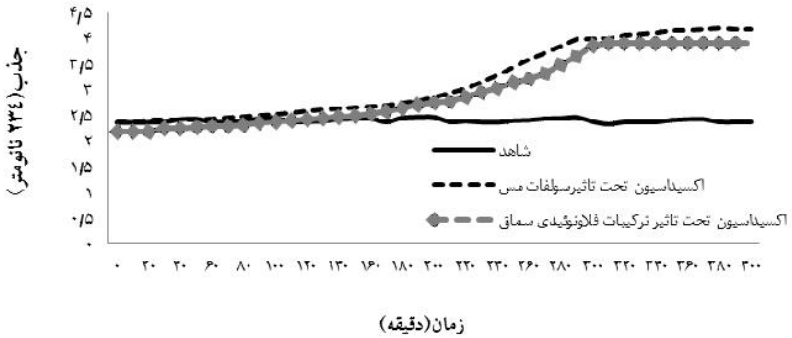
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار ۲: منحنی استاندارد کوئرسیتین جهت اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی تام عصاره گیاه سماق

مقدار تام ترکیبات فلاونوئیدی استخراج‌شده از عصاره گیاه سماق برابر ۰/۳۵۹±۱۹/۶۲۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره اندازه‌گیری شد. این فراکشن جداشده حاوی بالاترین میزان غلظت ترکیبات فلاونوئیدی نسبت به سایر فراکشن‌ها بود.

در مقایسه فاز تأخیری به دست آمده از نمودار اکسیداسیون LDL نمونه کنترل با نمودار حاصل از روند اکسیداسیون حاصل از تأثیر ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سماق نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۱). نمودار ۳ نشان‌دهنده نتایج حاصل از مقایسه زمان تأخیری نمونه کنترل با Lag time اکسیداسیون LDL در حضور اجزاء فلاونوئیدی عصاره سماق تغییرات معنی‌داری را نشان می‌دهد به طوری که این تغییرات با افزایش فاز تأخیری همراه بود.

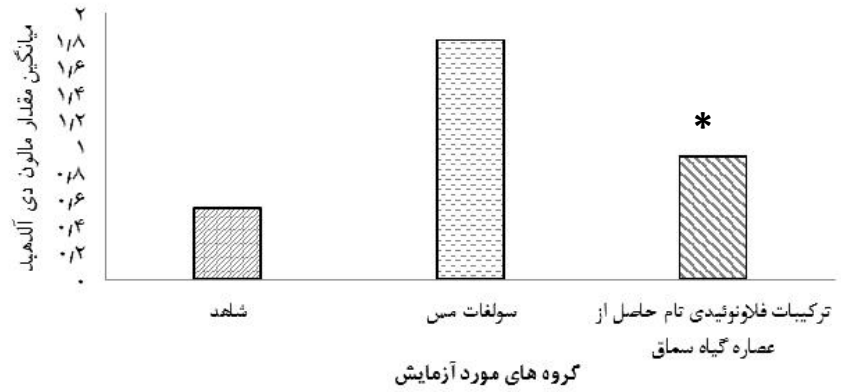


نمودار۳: کینتیک اثر ترکیبات فلاونوئیدی عصاره گیاه سماق بر مهار اکسیداسیون LDL

نمودار اکسیداسیون LDL دارای سه فاز است که مرحله اول شامل فاز تأخیری (lag phase) یا مصرف آنتی‌اکسیدان‌های درون ذره می‌باشد، فاز انتشار (propagation phase) یا اکسیداسیون سریع اسیدهای چرب غیراشباع و همچنین فاز خاتمه (Decomposition phase) که نشان‌دهنده تولید محصولات اکسیداسیون از جمله مالون دی آلدهید است.

نمودار ۴ نشان‌دهنده نتایج حاصل از بررسی میزان مالون‌دی‌آلدهید تولیدشده طی فرآیند اکسیداسیون LDL تحت تأثیر اجزاء فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سماق است که این کاهش مقدار MDA در مقایسه با نمونه کنترل معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۱).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار۴: مقایسه اثر ترکیبات فلاونوئیدی عصاره گیاه سماق بر مهار تشکیل مالون دی آلدهید ناشی از اکسیداسیون LDL

نمودار ۵ نشان‌دهنده میزان مهار دی‌ان‌های کنژوگه تولیدشده طی فرایند اکسیداسیون LDL تحت تأثیر اجزاء فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سماق است که در مقایسه با نمونه کنترل حاوی سولفات مس کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

نمودار۵: مقایسه اثر ترکیبات فلاونوئیدی عصاره گیاه سماق بر مهار تشکیل دی ان کنژوگه ناشی از اکسیداسیون LDL

بحث

بر اساس مطالعات انجام شده، به روند سخت شدن و باریک شدن سرخرگ‌ها آترواسکلروز گویند که به طور کلی فرآیند اکسیداسیون LDL عامل اصلی بروز این عارضه است (۲۴،۲۵). تاکنون فعالیت ضد آترواسکلروزیس ترکیبات گیاهی زیادی به منظور کاهش خطر ابتلا به آترواسکلروز به اثبات رسیده است و استفاده از این ترکیبات جایگزین مناسبی برای داروهای صناعی است(۲۶). بنابراین مواد آنتی‌اکسیدان موجود در جیره غذایی می‌تواند با مهار اکسیداسیون LDL از ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز جلوگیری نماید که سماق به عنوان یک ادویه غذایی و همچنین یک محصول مهم در طب سنتی به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود که این ترکیبات فنلی طبیعی موجود در عصاره سماق نقش مهمی در پیشگیری از آترواسکلروز و درمان سرطان داشته و همچنین دارای خاصیت ضدالتهابی، آنتی موتاژنیک و اثر آنتی‌سپتیک است (۲۷،۲۸).

از ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان رفتگران رادیکال‌های آزاد نام برده می‌شود (۲۹) به طوری که این ترکیبات با اتصال به ذره LDL، با اهدای یک اتم هیدروژن به ذره α توکوفرول موجود در ساختمان لیپوپروتئین‌ها، باعث احیا آن شده و از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

طریق بازیافت و تقویت عملکرد مولکول‌های α توکوفرول، باعث طولانی‌تر شدن و به تأخیر انداختن زمان شروع پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود. از طرفی این ترکیبات فلاونوئیدی با به دام انداختن یون‌های فلزی مؤثر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها، باعث کاهش اکسیداسیون می‌شود (۳۰،۳۱) که بیانگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان حاوی ترکیبات فلاونوئیدی، از جمله گیاه سماق است. هرچند که مکانیسم دقیق اثر ترکیبات فلاونوئیدی بر اکسیداسیون LDL مشخص نیست اما در تحقیقات انجام شده مشخص شد که این ترکیبات با افزایش میزان فعالیت آنزیم پاراکسوناز که دارای اثر محافظتی در فرآیند آتروژنز است، ممکن است ماده مؤثری برای کاهش اکسیداسیون LDL باشد (۳۲). در پژوهشی دیگر، ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان یک شلاتور فلزی معرفی گردید که از طریق اثرات مهار ROS باعث کاهش اکسیداسیون LDL شده و از این طریق ممکن است پاتوژنز آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی عروقی را به تعویق بیاندازد (۳۳). با بررسی ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره عسل از جمله کاتچین مشخص شد که این ترکیبات با مهار ROS، مهار عوامل دخیل در رونویسی آپوپتوز و القای فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو، به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانت بر مهار اکسیداسیون LDL و مهار توسعه آترواسکلروز مؤثر می‌باشند (۳۴). همچنین بررسی تأثیر انواع ترکیبات فلاونوئیدی مانند مورین، کوئرستین، جنیستئین و نارنژین بر تغییرات اکسیداسیون LDL نشان داد که غلظت‌های مختلف فلاونوئیدها بر میزان اکسیداسیون تأثیرگذار بوده و با کاهش روند اکسیداسیون، احتمال بروز تصلب شرایین کاهش می‌یابد (۳۵). از طرفی با آزمایش‌های انجام‌گرفته بر تأثیر ترکیبات فلاونوئیدی بر اکسیداسیون LDL و اختلال عملکردی اندوتلیال عروق در شرایط in vivo، مشخص شد که این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از طریق گروه هیدروکسیل موجود در حلقه B ساختمان خود، باعث به دام انداختن ROS شده و میزان اکسیداسیون را در عروق کاهش می‌دهد (۳۶). ترکیبات فلاونوئیدی موجود در پیاز نیز از جمله کوئرستین و کاتچین دارای خاصیت ضد آترواسکلروزی می‌باشند به گونه‌ای که با تنظیم فعالیت PON1، تأثیر زیادی بر کاهش اکسیداسیون LDL و همچنین کاهش میزان مالون دی آلدهید دارد (۳۷). دیگر مطالعات نشان داد که القای آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال توسط OX-LDL از طریق تجمع گونه اکسیژن فعال در این سلول‌ها و نیز با فعال کردن ژن‌های JAC2 رخ می‌دهد که فرآیند آپوپتوز یک نیروی محرکه برای توسعه آترواسکلروز است. با بررسی تأثیر فلاونوئیدها بر این سیستم، مشخص شد که ترکیبات فلاونوئیدی علاوه بر غیرفعال کردن ROS، مهار اکسیداسیون LDL، باعث فسفریلاسیون و مهار MAPK وابسته به مسیر JAC2 نیز می‌شود که نشان‌دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی آتروژنیکی ترکیبات فلاونوئیدی است (۳۸). لذا بر اساس مطالعات انجام‌گرفته و مکانیسم‌های فوق‌الذکر برای سیستم عملکردی ترکیبات فلاونوئیدی، می‌توان این‌گونه اظهار داشت که مصرف این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی همراه با مواد غذایی پرچرب، باعث مهار اثرات آتروژنیک چربی‌ها شده و می‌تواند از آسیب‌های اختلال عملکردی اندوتلیال به واسطه پلاک‌های آترواسکلروز ممانعت نماید. در مقایسه با نتایج به دست آمده از بررسی اثرات اسید رزمارینیک بر کاهش اکسیداسیون LDL (۳۹) و همچنین با نتایج حاصل از بررسی اثر مهاری عصاره پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL (۴۰) و نیز یافته‌های حاصل از مطالعه ترکیبات فلاونوئیدی گیاه سماق بر بیماران دیابتی و بررسی تأثیر این ترکیبات بر کاهش میزان انسولین و مالون‌دی‌آلدهید (۴۱)، همه مطالعات انجام شده نتایج معنی‌داری را بر کاهش میزان مالون دی آلدهید و نیز کاهش سطح دی‌ان‌های کنژوگه نشان می‌دهد که تطابق نتایج مورد بحث با یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر بیان می‌دارد که اجزاء فلاونوئیدی عصاره سماق قادر به کاهش میزان مالون دی آلدهید و مهار دی‌ان‌های کنژوگه بوده و نقش بسزایی در مهار روند آترواسکلروز دارد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر نتایج حاصل از بررسی تأثیر اجزاء فلاونوئیدی عصاره سماق بر اکسیداسیون LDL نشان داد که این ترکیبات به طور مؤثری باعث مهار اکسیداسیون LDL در محیط برون‌تنی می‌شوند. نتایج بیانگر آن است که در سیستم اکسیداسیون که مس از طریق واکنش فنتون و هابرویس باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد شده و از این طریق LDL را اکسید کرده و به دنبال آن میزان لیپید پراکسیدها و دی‌ان‌های کونژوگه را افزایش و باعث تند شدن روند اکسیداسیون می‌شود، اجزاء فلاونوئیدی عصاره سماق، با تأثیر بر روند اکسیداسیون و با توجه به ساختمان مولکولی خود و هریک از مکانیسم‌های احتمالی، می‌تواند روند اکسیداسیون را کند کرده و همچنین باعث کاهش خطر آتروژنیک ناشی از LDL اکسیده شود. نتایج آماری به دست آمده از مقایسه زمان تأخیری حاصل از نمودار تحت تأثیر اجزاء فلاونوئیدی با زمان تأخیری حاصل از نمودار اکسیداسیون نمونه شاهد بیان می‌دارد که اختلاف معنی‌داری بین زمان‌های تأخیری آن‌ها وجود دارد ($P<۰/۰۱$)؛ بدین معنی که ترکیبات فلاونوئیدی از طریق برهمکنش با αتوکوفرول‌های درون ذره LDL، باعث به تأخیر انداختن زمان شروع اکسیداسیون (lag phase) شده که در مقایسه با گروه شاهد بدون ترکیبات فلاونوئیدی، این زمان تأخیری بیشتر است که نشان‌دهنده اثر مهاری بر سیستم اکسیداسیون است. مقایسه اختلاف مالون دی آلدهید تولید شده به عنوان محصول فرعی اکسیداسیون LDL نمونه شاهد با نمودار اکسیداسیون LDL تحت تأثیر ترکیبات فلاونوئیدی و کاهش دی‌ان‌ای کنژوگه نمونه مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$) و این بدین معنی است که ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سماق می‌تواند تأثیر زیادی بر مهار تولید MDA به عنوان محصول فرعی پراکسیداسیون داشته باشد.

هرچند که در آزمایش‌های بالینی که تاکنون انجام‌شده، بیماری‌های عروق کرونر، فراتر از فرضیه اکسیداسیون و تشکیل ضایعه چربی در رگ‌هاست، اما از نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که گیاه سماق به دلیل دارا بودن ترکیبات پلی فنلی متنوع و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی از جمله فلاونوئیدها، قادر است با اعمال اثر آنتی‌اکسیدانی اجزاء فلاونوئیدی موجود در عصاره خود، با انجام هریک از مکانیسم‌های ذکرشده، اثر خود را بر LDL اکسیدشده القاء نموده و با خواص فیتوشیمیایی مربوطه، بر کاهش روند اکسیداسیون اثر گذاشته و مقاومت LDL را در برابر فشار اکسیداتیو اعمال شده از طرف مس در شرایط in vitro بالا ببرد.

سپاسگزاری

با سپاس از مدیریت و کارکنان پژوهشکده قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که امکانات و تسهیلات آزمایشگاهی را برای این تحقیق فراهم آوردند.

References:

1- Kooi ME, Van Engelshoven JM, Daemen MJ, Nelemans PJ. ***Is There More Than C-Reactive Protein and Fibrinogen? The Prognostic Value of Soluble CD40 Ligand, Interleukin-6 and Oxidized Low-Density Lipoprotein with Respect To Coronary and Cerebral Vascular Disease.*** Atherosclerosis 2006; 187(1): 18-25.

2- Steinberg D. ***Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance.*** J Biol Chem 1997; 272(34): 20-63.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

3- Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. ***Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease: Key Lessons from Epidemiologic Studies.*** Am J Cardiol 2008; 101(10A): 75-86.

4- Yoshida H, Kisugi R. ***Mechanisms of LDL oxidation.*** Clinica Chimica Acta 2010; 411(23): 1875-82. (Abs)

5- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. ***Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine.*** Lancet 1993; 341(8843): 454-57.

6- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. ***Antioxidant properties of phenolic compounds.*** Trends Plant Sci 1997; 2(4): 152-59.

7- Islambekov S, Mavlyanov SM, Karimdzhanov AK, Imailov AI. ***Anthoctans and Organic Acids of the Fruits of Some Species of Sumac.*** Chemistry of Natural Compounds 1997; 33(2): 279-80.

8- Kossah R, Nsabimana C, Zhao J, Chen H, Tian F, Zhang H, et al. ***Comparative Study on the Chemical Composition of Syrian Sumac (Rhus coriaria L.) and Chinese Sumac (Rhus typhina L.) Fruits.*** Pakistan J Nutrition 2009; 8(10): 1570-74.

9- Marcela C, Kamaran A, Adriana K. ***Effect of sumac on cholesterol and triglycerides content of rabbits.*** Mimoriadne C 2010; 4: 133-37.

10- Hassanpour M, Zarban A, Malekaneh M, Najari MT, Abad M. ***Evaluation of antioxidant properties of 28 medicinal plants.*** J Birjand Univ Med Sci 2004; 11(1): 3.

11- Candan F, Sökmen A. ***Effects of Rhus coriaria L (Anacardiaceae) on lipid peroxidation and free radical scavenging activity.*** Phytother Res 2004; 18(1): 84-6.

12- Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, et al. ***The Biological Relevance of Direct Antioxidant Effects of Polyphenols for Cardiovascular Health in Humans Is Not Established1–4 The Journal of Nutrition Supplement: Antioxidant Activity of Polyphenols and Cardiovascular Risk Application of the PASSCLAIM Criteria.*** J Nutr 2011; 141(5): 989_S–1009_S.

13- Lee MK, Bok SH, Jeong TS, Moon SS, Lee SE, Park YB, et al. ***Supplementation of naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats.*** Bioorg Med Chem 2002; 10(7): 2239-44.

14- Chung SK, Chen CYO, Blumberg JB. ***Flavonoid-Rich Fraction from Sageretia theezans Leaves Scavenges Reactive Oxygen Radical Species and Increases the Resistance of Low-Density Lipoprotein to Oxidation.*** J Med Food 2009; 12(6): 1310-15.

15- Kosar M, Bozan B, Temelli F. ***Baser Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (Rhus coriaria L.) extracts.*** Food Chemistry 2007; 103(3): 952-59.

16- Asquith T, Butler L. ***Purification of Quebracho Tannin.*** J Chem Ecol 1985; 11(11): 1535-44.

17- Inoue KH, Hagerman AE. ***Gallotannin Determination with Rhodanine.*** Anal Biochem 1988; 169(2): 363-69.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

18- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. ***Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods.*** Food and Drug Analysis 2002; 10(3): 178-82.

19- Bronzert TJ, Brewer HB. ***New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fractions.*** Clin Chem 1977; 23(11): 2089-98.

20- Rufail ML, Ramage SC, van Antwerpen R. ***C-reactive protein inhibits in vitro oxidation of low-density lipoprotein.*** FEBS Lett 2006; 580(22): 5155-60.

21- Rudling M, Vitols S, Masquelier M, Peterson C. ***Cryopreserve LDL in the presence of sucrose to protect the biologic properties.*** J Lipid Res 1996; 37: 2266-67.

22- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. ***Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein.*** Free Radic Res Commun 1989; 6(1): 67-75.

23- Buege JA, Aust SD. ***Microsomal lipid peroxidation.*** Methods in Enzymology 1978; 52: 302-10.

24- Ross R. ***Atherosclerosis is an inflammatory disease.*** Am Heart J 1999; 138: 419-20.

25- Leopold JA, Loscalzo J. ***Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease.*** Free Radic Biol Med 2009; 47(12): 1673-706.

26- Souri E, Amin G, Dehmobed-Sharifabadi A, Nazifi A, Farsam H. ***Antioxidative activity of sixty plants.*** Iranian J of Pharmaceutical Res 2010; 3: 55-59.

27- Fazeli MR, Ashtiani HA, Ataari AA. ***Investigation of anti-microbial effects of sumac extracts on different dermal microbial strain.*** Med Plants J 2005; 5(17): 27-31.

28- Ozcan M. ***Antioxidant Activities of Rosemary, Sage and Sumac Extracts and Their Combinations on Stability of Natural Peanut Oil.*** J Med Food 2003; 6(3): 267-70.

29- Liu ZQ, Ma LP, Zhou B, Yang L, Liu ZL. ***Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein.*** Chem Phys Lipids 2000; 106(1): 53-63.

30- Capcarova M, Slamecka J, Abbas K, Kolesarova A, Kalafova A, Valent M, et al. ***Effects of dietary inclusion of Rhus coriaria on internal milieu of rabbits.*** J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2012; 96(3): 459-65.

31- Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM. ***Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans1–3.*** Am J Clin Nutr 2001; 74(5): 596-602.

32- Hamidia Z, Nayeri H, Naderi G, Boshtam M, Shokoohi-Nahrkhalaji A. ***The effect of some flavonoids on paraoxonase-1 activity.*** J Shahrekord Univ Med Sci 2014; 16(4): 71-6.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

33- Chung SK, Chen CYO, Blumberg JB. ***Flavonoid-Rich Fraction from Sageretia theezans Leaves Scavenges Reactive Oxygen Radical Species and Increases the Resistance of Low-Density Lipoprotein to Oxidation.*** J Med Food 2009; 12(6): 1310-15.

34- Afroz R, Tanvir E, Little PJ. ***Honey-derived Flavonoids: Natural Products for the Prevention of Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases.*** Clin Exp Pharmacol 2016; 6(3).

35- Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Shirvany H. ***Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation.*** Mol Cell Biochem 2003; 246(1-2): 193-96.

36- Yi L, Jin X, Chen CY, Fu YJ, Zhang T, Chang H, et al. ***Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction.*** Int J Mol Sci 2011; 12(9): 5471-89.

37- Jaiswal N, Rizvi SI. ***Onion extract (Allium cepa L.), quercetin and catechin up-regulate paraoxonase 1 activity with concomitant protection against low-density lipoprotein oxidation in male Wistar rats subjected to oxidative stress.*** J Sci Food Agric 2014; 94(13): 2752-57.

38- Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Li J, Kang SW, Bae JY, et al. ***Dietary flavonoids differentially reduce oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells: role of MAPK- and JAK/STAT-signaling.*** J Nutr 2008; 138(6): 983-90.

39- Ahmadvand H, Khosrowbeygi A, Nemati L, Haj hosseini R. ***Inhibitory Effects of Rosmarinic Acid on LDL Oxidation In vitro.*** J Guilan Univ Med Sci 2012; 8: 1-6.

40- Ahmadvand H, Abdolahpour F, Bagheri S, Rashidipour M, Beyranvand K, Chash S. ***Inhibitory effects of Oak fruit Husks hydroalcoholic extract on serum LDL oxidation in vitro.*** JQUMS 2012; 15(4): 38-44.

41- Rahideh ST, Shidfar F, Khandozi N, Rajab A, Hosseini SP, Mirtaher SM. ***The effect of sumac (Rhus coriaria L.) powder on insulin resistance, malondialdehyde, high sensitive C-reactive protein and paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic patients.*** J Res Med Sci 2014; 19(10): 933-38.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Effect of Flavonoid Compounds Sumac (Rhus Coriaria L) Extract by Gel Filtration on the Oxidation Serum LDL

Alieh Abdolrezaie (MSc Student)[1], Hashem Nayeri (PhD)[*2], GholamAli Naderi (PhD)[3]

[1,2] Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[3] Department of Biochemistry, Isfahan Cardiovascular Research Center, University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Received: 11 May 2016 ***Accepted:*** 6 Oct 2016

Abstract

Introduction: LDL oxidation by forming and growth of the fatty plaques on the walls of endothelial is an important event in atherogenesis. Sumac plant are rich in polyphenols and flavonoids compounds, with antioxidant effects that inhibit the LDL oxidation could inhibit atherosclerosis. The aim of this study was to determine the effect of flavonoid components sumac extract by gel filtration chromatography on LDL oxidation induced-$CuSo_4$.

Methods: In this experimental study, LDL was isolated by ultracentrifugation system and gradient medium. The flavonoid fractions were separated from the sumac extract using Sephadex LH-20 gel filtration technic. The LDL oxidation kinetics in the presence of sumac components flavonoid extract were investigated. The formation of oxidation induced malondialdehyde were measured by TBARS (thiobarbituric acid) method.

Results: The results showed that the flavonoid content of sumac extract significantly increased Lag time ($P < 0.001$) on LDL oxidation kinetics curves, and the malondialdehyde resulting of the oxidation of LDL, in the presence of the extract significantly reduced.

Conclusion: The findings show that flavonoid content sumac extract has a positive effect on reducing LDL oxidation and they are can be a good candidate for further study as well as an effective factor to remove the consequences of oxidation of LDL, such as atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis; Low Density Lipoprotein (LDL); oxidation; Flavonoid; Gel Filtration; Sumac

This paper should be cited as:
Alieh Abdolrezaie, Hashem Nayeri, GholamAli Naderi. ***The effect of flavonoid compounds sumac (Rhus coriaria L) extract by gel filtraition on the oxidation serum LDL.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(9): 724-35.

****Corresponding author: Tel: +983137420134, email: hnaieri@gmail.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]