Archive of SID

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 علوم‌زیستی
تلفن: ۰۹۱۸۸۷۱۰۶۳۲، نمابر: ۳۳۶۲۲۷۰۲ (۰۸۷)
پست الکترونیک: mazarei@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۹ **تاریخ پذیرش:** ۹۷/۱۰/۲ doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.227

چکیده

مقدمه: از آنجا که آنزیم آلفا گلوکوزیداز باعث تجزیه کربوهیدرات‌های غذایی و به دنبال آن جذب و افزایش سطح گلوکز خون می شود، 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 ***Campanula involucrata*** **Auch .ex DC.**، ***Hypericum scabrum*** **L.**، ***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.

گل‌واژگان: آلفاگلوکوزیداز، دیابت، عصاره گیاهی، مهارکننده

www.SID.ir

Archive of SID

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 نفراز مردم سراسر دنیا به دیابت مبتلا هستند و پیش بینی می‌شود که این تعداد تا سال ۲۰۲۵ به۳۰۰ 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 پلی‌ساکارید 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 میگلیتول 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 [۱۰، ۹]. 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، سوبسترای پارانیترو فنیل آلفا دی‌گلوکو پیرانوزید (pNPG)، آکاربوز (مهارکننده استاندارد آنزیم آلفا گلوکوزیداز)، آلبومین سرم گاوی (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 اواپریتر 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 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.

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{شیب نمودار کنترل منفی} - \text{شیب نمودار عصاره}}{\text{شیب نمودار کنترل منفی}} \times ۱۰۰ \quad \text{فرمول (۱)}$$

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 سنتیک مهارآنزیمی

به منظور تعیین نوع مهار اعمال شده توسط عصاره‌های دارای بیشترین درصد مهار، نمودار معکوس مضاعف لینویور- 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 لینویور- 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.

www.SID.ir

Archive of SID

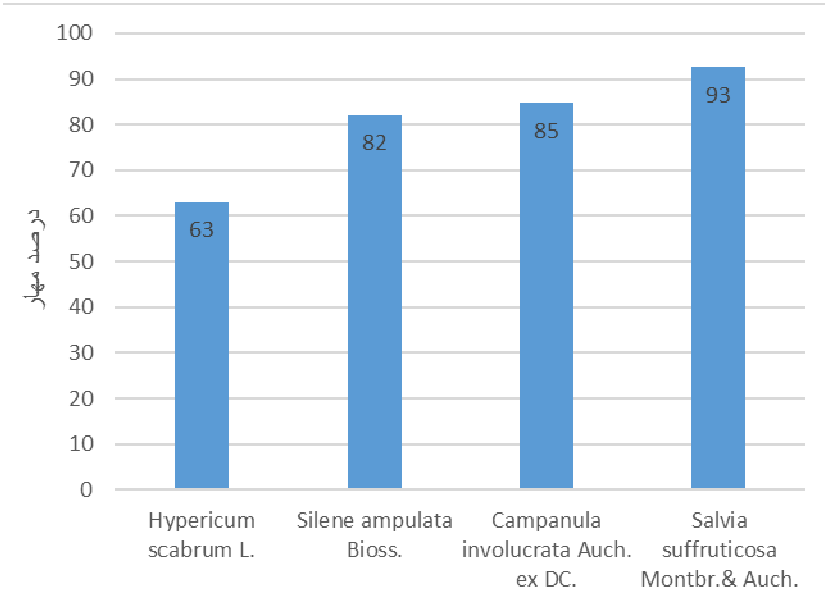
نتایج

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. IC_{50} 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 IC_{50} را به ثبت رسانیدند (۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). 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

www.SID.ir

Archive of SID

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

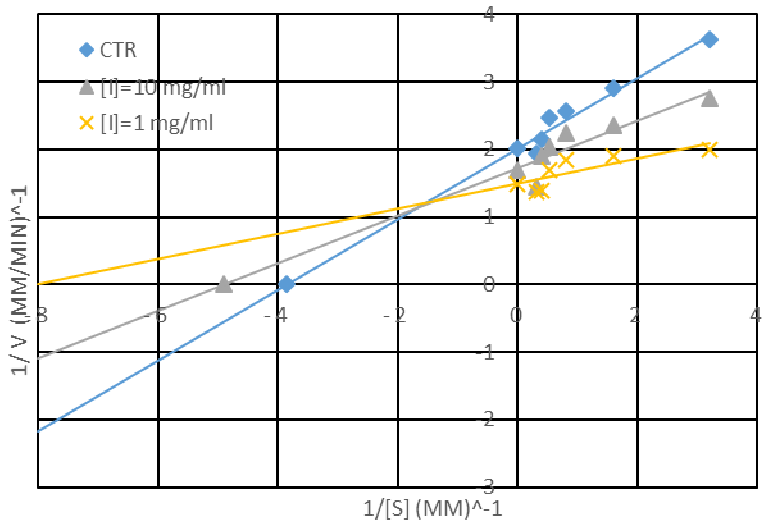
ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریمی	خانواده	۱ mg/ml		۰/۱ mg/ml		۰/۰۱ mg/ml		۰/۰۰۱ mg/ml	
				I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD
۱	*Campanula involucrata* Auch .ex DC.	۱۱۱۳۲	Campanulaceae	۸۴/۷۹۵۳	۰	۵۹/۱	۰/۰۵	۴۶/۷۴	۰/۰۲	۳/۴۴	۰/۲۰
۲	*Crambe orientalis* L.	۱۱۰۶۰	Brassicaceae	-۹۴/۸۵۲	۷/۲۷۹	-۴۱/۹۱۱	۱/۰۳۹	-۲۳/۵۲۹	۲/۰۷۹	-۱۳/۲۳۵	۰۴/۴۱۱
۳	*Chaerophyllum macropodum* Boiss.	۶۵۵۸	Apiaceae	۱۳/۹۷۰	۷/۲۷۹	-۱۶/۹۱۱	۵/۱۹۹	۱۱/۲۷۴	۱۳/۵۱۸	۲۱/۵۶۸	۴/۷۲۷
۴	*Clastopus erubescens* Hausskn.	۱۵۶۵	Brassicaceae	-۳۰/۹۶۴	۰	-۲۷/۱۵۷	۱۶/۱۵۲	-۲۳/۳۵۰	۶/۶۳۷	-۲۵/۶۳۴	۵/۳۸۴
۵	*Cruciata taurica (Pall.ex Willd) Ehrend subsp. Persica* (DC.) Ehrend.	۱۲۰۱۷	Rubiaceae	-۹/۱۵۴	۶/۹۷۱	-۲۶/۷۶۰	۷/۷۹۱	۲/۸۱۶	۸/۴۵۰	۱۰/۷۹۸	۱۶/۳۲۴
۶	*Colchicum kotschyi* Boiss.	۱۰۸۶۱	Colchicaceae	۷/۴۸۸	۱۱/۲۱۴	۴/۸۴۵	۱/۸۶۹	-۴/۴۰۵	۵/۶۰۷	۱۲/۳۳۴	۱۲/۲۷۹
۷	*Eremostachys laevigata* Bunge	۴۸۴۳	Lamiaceae	۱۴/۸۷۶	۳/۵۰۶	-۱۴/۸۷۶	۳/۵۰۶	۷/۴۳۸	۲/۳۳۷	۳/۳۰۵	۳/۵۰۶
۸	*Eremostachys macrophylla* Montbr. & Auch	۹۴۳۶	Lamiaceae	۸/۸۱۰	۷/۴۷۶	۵/۲۸۶	۷/۷۴۳	-۳/۵۲۴	۲/۰۱۸	۹/۴۷۱	۰/۹۳۴
۹	*Euphorbia denticulate* Lam.	۶۹۱۶	Euphorbiaceae	-۵/۶۳۳	۷/۸۴۱	۷/۷۴۶	۸/۹۶۳	-۴/۹۲۹	۶/۹۷۱	۵/۱۶۴	۹/۳۷۷
۱۰	*Gundelia Tournefortii* L.	۴۱۸۶	Asteraceae	-۷۸/۱۴۰	۱۹/۶۴۱	-۱۲/۳۱۸	۵/۱۲۳	۱۹/۸۸۷	۳/۶۸۹	۱۶/۰۶۲	۰/۸۵۳
۱۱	*Haplophyllum acutifolium* (DC.)G.Don	۲۹۶۴	Rutaceae	-۳۶/۰۸۸	۳/۵۰۶	-۶۰/۳۳۰	۲/۳۳۷	-۲۲/۸۶۵	۱/۱۶۸	-۱۹/۰۰۸	۱/۷۷۶
۱۲	*Hypericum scabrum* L.	۵۴۱۶	Guttiferae	۶۲/۹۷۶	۰	۳۷/۲۹۴	۱/۲۳۰	۲۳/۶۳۹	۳/۲۷۲	۹/۰۱۳	۳/۲۱۱
۱۳	*Isatis cappadocica* Desv.	۶۱۶۳	Brassicaceae	-۲۵/۶۱۹	۷/۲۸۹	-۴۱/۰۴۶	۳/۴۴۰	-۱۱/۲۹۴	۴/۱۵۹	-۹/۶۴۱	۱/۹۰۸
۱۴	*Linum album* Ky .ex Boiss.	۱۱۷۶۸	Linaceae	-۶/۸۳۷	۴/۰۳۸	-۱۰۱/۴۶۵	۱۰/۷۹۲	۱/۳۰۲	۳/۵۲۴	-۹/۸۹۰	۳/۵۱۷
۱۵	*Onobrychis megataphros* Boiss.	۵۴۳۲	Papilionaceae	۴۶/۷۹۴	۲/۷۱۹	۲۱/۷۹۴	۳/۶۲۶	-۱۰/۲۵۶	۱/۸۱۳	۲/۵۶۴	۵/۴۳۹
۱۶	*Oxytropis kotschyana* Boiss. & Hohen.	۳۷۴۶	Papilionaceae	-۲۴/۳۲۴	۳/۸۲۲	-۱۱/۴۸۶	۶/۶۸۴	-۱/۳۵۱	۲/۷۰۲	۱۰/۳۶۰	۸/۱۴۵
۱۷	*Peganum harmala* L.var. harmala	۵۲۱۴	Zygophyllaceae	-۴۱/۲۰۳	۱/۰۹۱	-۳۸/۱۱۷	۵/۴۵۶	-۲۳/۴۵۶	۱۰/۹۱۲	-۷/۲۵۳	۵/۴۵۶
۱۸	*Rindera lanata* (Lam.) Bge.	۱۱۱۴۱	Boraginaceae	۷/۷۴۶	۰/۹۹۵	۹/۸۵۹	۵/۹۷۵	۱۷/۶۰۵	۱۰/۹۵۵	۲۱/۸۳۰	۱۲/۹۴۷
۱۹	*Salvia multicaulis* Vahl.	۶۸۹۷	Lamiaceae	-۲/۶۲۳	۱/۰۹۱	۸/۹۵۰	۲/۱۸۲	-۲/۶۲۳	۳/۲۷۳	۳۶/۲۱۳	۷/۹۱۹
۲۰	*Salvia poculata* Nab.	۷۶۳۳	Lamiaceae	۴/۸۲۲	۳/۲۳۰	-۱۲/۶۹۰	۱۲/۹۲۱	۵۲/۰۳۰	۱/۰۷۶	۵۵/۸۳۷	۸/۶۱۴
۲۱	*Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch.	۱۲۰۵۵	Lamiaceae	۹۲/۶۲۵	۸/۷۷۲	۵۹/۱۴۴	۴/۱۷۱	۱۶/۳۴۲	۵/۲۱۴	۳/۲۴۴	۲/۰۸۵
۲۲	*Salvia svriaca* L.	۵۴۷۰	Lamiaceae	-۱۳/۵۱۳	۷/۶۴۴	-۹/۴۵۹	۸/۸۶۰	-۳/۱۵۳	۵/۶۲۶	۷/۶۵۷	۶/۳۸۶
۲۳	*Scrophularia nervosa* Benth.in DC. *subsp.boissierana* (Jaub. & Spach) Grau.	۹۱۷۹	Scrophulariaceae	۲۴/۲۶۴	۷/۲۷۹	۱۹/۱۱۷	۱۰/۳۹۸	-۵/۸۸۲	۲/۰۷۹	۱۱/۰۲۹	۱/۰۳۹
۲۴	*Scorzonera calyculata* Boiss.	۷۳۵۰	Asteraceae	-۸۹/۵۹۳	۵/۳۸۴	-۲۷/۹۱۸	۴/۳۰۷	-۲۲/۵۸۸	۷/۵۲۷	-۸/۱۲۱	۴/۳۰۷
۲۵	*Silene ampulata* Bioss.	۴۱۹۸	Caryophyllaceae	۸۲/۱۲۵	۳/۰۴	۶۲/۲۳	۰/۰۲	۴۵/۲۱	۲/۲۲	۳۹/۲۲	۱/۱۲
۲۶	*Silene aucheriana* Boiss.	۱۱۰۰۹	Caryophyllaceae	۰/۷۲۰	۱/۷۸۱	-۱۲/۶۵۴	۸/۷۲۹	۱۲/۰۳۷	۲/۱۸۲	۲۸/۲۴۰	۱۶/۳۶۸
۲۷	*Silene commelinifolia* Boiss.	۱۱۳۸۲	Caryophyllaceae	۴۱/۸۹۱	۲۲/۹۳۳	-۲۰/۹۴۵	۶/۶۸۸	-۹/۴۵۵	۱/۹۱۱	-۱۰/۸۱۰	۴/۶۸۱
۲۸	*Solenanthus circinatus* Ledeb.	۶۴۹۸	Boraginaceae	۳۸/۲۹۴	۴/۳۶۳	-۰/۲۷۱	۴/۳۶۳	۱۳/۶۱۲	۴/۳۶۳	۱/۲۷۱	۶/۵۴۴
۲۹	*Stachys lavandulifolia* Vahl	۵۴۳۰	Lamiaceae	۱۵/۲۹۳	۳/۲۳۷	-۱۹/۸۱۰	۳/۲۳۷	۱۲/۲۴۰	۵/۳۹۶	۷۹۳۰	۵/۲۸۷
۳۰	*Tragopogon vaginatus* M. Ownbey & Rech. F.	۹۸۴۴	Asteraceae	۱۱/۴۵۳	۳/۷۳۸	-۳۵/۲۴۲	۶/۵۴۱	-۴/۸۴۵	۲/۰۱۸	۱/۷۶۲	۰/۷۶۳
۳۱	*Valeriana sisymbriifolia* Vahl	۱۱۹۴۸	Valerianaceae	۲۳/۳۸۲	۱۰/۲۷۱	۱۳/۰۹۸	۱/۷۸۱	۳۰/۵۸۱	۲/۱۸۱	۲۲/۶۸۸	۴/۳۶۳
۳۲	*Vicia hyrcanica* Fisch. & C. A. Mey.	۹۲۹۵	Papilionaceae	-۳۹/۵۹۳	۱/۷۵۸	-۸/۱۲۱	۲/۱۵۳	۱۳/۴۵۱	۹/۶۹۱	-۲/۷۹۱	۳/۲۳۰

www.SID.ir

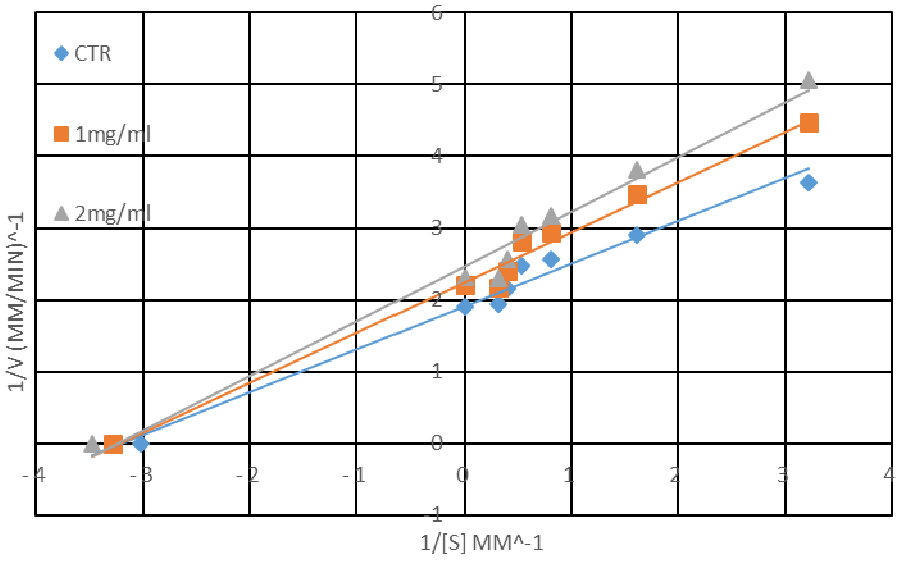
Archive of SID

جدول شماره ۲ – نتایج تعیین **IC50** عصاره گیاهان دارای فعالیت مهارکنندگی بالاتر از ۶۰ درصد

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



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



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

www.SID.ir

Archive of SID

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} (ΔOD.405 nm/min) $^{-1}$	$V_{max\ app}$ (ΔOD.405 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} (ΔOD.405 nm/min) $^{-1}$	$V_{max\ app}$ (ΔOD.405 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

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.، *Hypericum scabrum* L.، *Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch. و *Silene ampulata* Bioss.، 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 مهاری 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 وزبر 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 involucrate*) 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

www.SID.ir

Archive of SID

گونه دارد و مرکز انتشار آن تقریباً نواحی مدیترانه‌ای است. گونه‌های *Codonopsis tangshen* و *Hedraeanthus graminifolius* به ترتیب دارای اثرات درمانی پایین آورنده فشار خون و درمان هیستری می‌باشند [۱۷].

مطابق نتایج حاصل از بررسی سنتیکی با استفاده از رویکرد لینویو – برک، عصاره متانولی گیاه گل استکانی برگه‌دار الگوی مهار مرکب غیررقابتی و نارقابتی و عصاره متانولی گیاه سیلن‌حبابی الگوی مهاری غیررقابتی و نارقابتی را از خود نشان دادند. با توجه به نوع الگوی مهار (مرکب) در گل‌استکانی برگه‌دار و گیاه سیلن حبابی انتظار می‌رود که مهارکننده موجود در عصاره با تمایل متفاوت به آنزیم (E) و مجموعه آنزیم-سوبسترا (ES) متصل شوند.

نتیجه‌گیری

می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که گیاهان غربال شده در این مطالعه به طور عام و دو گیاه گل استکانی برگه‌دار (*Campanula involucrata*) و سیلن حبابی (*Silene ampulata*) به طور خاص می‌توانند به طور جدی موضوع مطالعات بعدی جهت خالص‌سازی عوامل مهارکننده آنزیم آلفاگلوکوزیداز بوده و درنهایت مهارکننده‌های 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 ضددیابتی عصاره متانولی گونه‌های گیاهی فوق نخستین مورد در نوع خود می‌باشد.

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 ChiassonRhabasa-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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 Ţ, 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.

www.SID.ir