

مقاله پژوهشی

اثر اسانسهای فرار و ویتامین C بر روی تمایل LDL به رسپتور مربوطه مدلی برای جلوگیری از آترواسکلروز

محمد رضا صفری*، دکتر محسن آبی**، دکتر غلامعلی نادری***، دکتر صدیقه عسگری***

چکیده:

سالمی است که توجه محققین بر روی یافتن ترکیبات آنتی اکسیدانی که مانع از اکسیداسیون LDL شود بدون اینکه اثرات مخربی داشته باشد معطوف گردیده است. در برخی از ویتامینها مثل ویتامین های C و E خاصیت آنتی اکسیدانی علیه اکسیداسیون LDL کاملاً مشخص شده است. اسانسهای فرار از جمله فرآورده های گیاهی هستند که بدلیل خاصیت لیپوفیلیک توانایی وارد شدن بداخل ذره LDL را دارند و اثرات آنتی اکسیدانی این ترکیبات هنوز بخوبی روشن نشده است. هدف از این تحقیق بررسی امکان استفاده از فرآورده های گیاهی نظیر اسانسهای فرار به منظور پیشگیری یا درمان احتمالی آترواسکلروز میباشد. با توجه به اثر محتمل اسانسهای فرار بر روی تمایل LDL به رسپتورش میتوان این تمایل را تحت تأثیر قرار داد و از تغییرات LDL ممانعت کرد و در نتیجه با آنر وزنز مقابله نمود.

در این تحقیق خواص آنتی اکسیدانی غلظتهای مختلف ۳ نوع اسانس فرار بنامهای: تیمول و پاراسیمول و لیمونن و همچنین ویتامین C بر روی میزان تمایل LDL طبیعی و اکسیده (با یونهای Cu^{+2}) به رسپتور مربوطه در سلولهای بافت آدرنال گوسفند در حضور LDL نشاندار شده با یک ماده فلوروسنت بنام فلوروسنت ایزو تیوسیانات (FITC) مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور پس از جداسازی محلول LDL از سرم نرمال و انکوباسیون آن با ترکیبات فوق و واکنش اکسیداسیون بر روی آن انجام گرفت و مقداری محلول LDL با FITC نشاندار گردید و سپس همه محلولهای فوق به محیط شامل سلولهای بافت آدرنال (که حاوی رسپتور LDL هستند) اضافه شد و شدت فلورسانس محلول رویی مخلوط آزمایش پس از سانتریفوژ در اسپکتروفلوریمتر خوانده شد. همچنین اثرات توأم بهترین غلظت آنتی اکسیدانی ویتامین C (بدست آمده در این پروژه) با هر یک از غلظتهای مختلف سه اسانس فوق نیز ارزیابی گردیده است.

نتایج بدست آمده نشان میدهد که ویتامین C در غلظت ۱۰۰ میکرومولار دارای بیشترین اثر بر روی افزایش تمایل LDL به رسپتورش میباشد (برای LDL طبیعی ۱۸/۵ درصد و برای LDL اکسیده ۶۲ درصد) و از میان اسانسهای مورد آزمایش تیمول دارای بیشترین اثر است (برای LDL طبیعی ۲۷ درصد و برای LDL اکسیده ۵۰ درصد). همچنین در بررسی اثرات همزمان هر یک از این اسانسها با مؤثرترین غلظت ویتامین C (۱۰۰ میکرومولار) باز هم تیمول بالاترین اثر مثبت را بر روی تمایل LDL به رسپتورش داشته است.

این یافته ها بیانگر اینست که احتمالاً ترکیبات فوق با اثر بر روی اتصال LDL به رسپتور مربوطه میتوانند از ایجاد آترواسکلروز جلوگیری کرده و بعنوان آنتی اکسیدان مورد توجه قرار گیرند.

کلیدواژه ها: آترواسکلروز / اسانس فرار / اسید اسکوربیک / لیپوپروتئین کم تراکم

* عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

** استاد گروه بیوشیمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*** استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان

مقدمه:

LDL (Low density lipoprotein) بعنوان اصلی ترین لیپوپروتئین پلاسمایی حامل کلسترول در خون میباشد. سرنوشت عمده LDL جذب آن توسط رسپتور کلاسیک LDL میباشد. رسپتور LDL گلیکوپروتئینی است با وزن مولکولی ۱۶۰ کیلوالتون که تقریباً در سطح تمام سلولهای بافتهای بدن یافت میشود (۱).

آترواسکلروز یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در جوامع بشری است که در طی آن یک فرآیند دژنراتیو درگیر در انواع آسیبهای دیواره عروق روی میدهد. مقادیر بالای پلاسمایی و تغییرات LDL بخصوص اکسیداسیون آن از اصلی ترین فاکتورهای مؤثر در این بیماری هستند (۲).

اکسیداسیون LDL باعث کاهش تمایل آن به رسپتور مربوطه میشود و بعنوان یک عامل کلیدی در آتروژنز محسوب میگردد. حضور غلظتهای مختلفی از فلزات واسطه نظیر آهن و مس در عمل اکسیداسیون LDL اهمیت دارد (۲).

با تجهیز LDL به ترکیبات آنتی اکسیدان مثل ویتامین C میتوان از اکسید شدن LDL جلوگیری نمود (۳).

در سالهای اخیر اسانسهای فرار بعنوان ترکیبات آنتی اکسیدان مورد توجه قرار گرفته اند. این ترکیبات از آن جهت که دارای منشأ گیاهی هستند ممکن است که دارای اثرات بیولوژیکی گسترده و وسیعی باشند (۴). در این تحقیق خواص آنتی اکسیدانی ویتامین C و سه اسانس فرار بنامهای: تیمول (Thymol) و پاراسیمول (P-cymol) و لیمونن (Limonene) بر روی تمایل LDL طبیعی و اکسیده به رسپتورش در سلولهای بافت آدرنال گوسفند مورد بررسی قرار گرفته است.

هدف از این مطالعه بررسی امکان پیشگیری یا درمان آترواسکلروز توسط فرآورده های گیاهی از جمله اسانسهای فرار میباشد. با تجهیز LDL با این اسانسها که دارای خاصیت لیوفیلیک میباشد و میتوانند وارد ذره LDL شوند و حجم و اندازه آنرا تغییر دهند میتوان میزان تمایل LDL مربوطه را به رسپتورش تحت تأثیر قرار داد و در نتیجه مانع از تغییرات LDL (مثل اکسیداسیون) گردید و بدین ترتیب عملاً با آتروژنز مقابله نمود. البته لازم است که مطالعات وسیعی در

in vivo نیز صورت گیرد تا اثرات جانبی و دوز مناسب این ترکیبات کاملاً شناسایی گردد.

روش کار:

حیوان مورد استفاده: از گوسفند جهت تهیه بافت آدرنال استفاده شد.

مواد: تمامی مواد شیمیایی و همچنین اسانسهای مورد نیاز از نوع خالص از شرکت مرک (Merck) تهیه گردید. روش آزمایش:

(۱) جداسازی LDL: از سرم نرمال با استفاده از اولتراسانتریفوژ (g ۳۳۰۰۰ به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۶° c) جدا گردید (۵).

(۲) جداسازی سلولهای حاوی رسپتور LDL: سلولهای بافت آدرنال گوسفند بعنوان سلولهای دارای رسپتور LDL جدا گردید (۶).

(۳) نشاندار کردن LDL: محلول LDL (۳/۳ mg/ml) با ماده فلوروسنت فلئوروسنت ایزوتیوسیانات (FITC) (۱ mg/ml) در بافر بیکربنات سدیم دارای pH=۸/۵ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴° c انکوبه گردید و LDL نشاندار شده با FITC حاصل شد.

(۴) اکسیداسیون LDL: محلول LDL (۱۰۰ mg/ml) با محلول سولفات مس (۱۰ میکرومولار) در بافر فسفات (pH=۷/۴) در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت انکوبه شد (۷).

(۵) انکوباسیون محلول LDL با هریک از ترکیبات ویتامین C و تیمول و پاراسیمول و لیمونن: محلول LDL طبیعی بطور جداگانه با چهار غلظت مختلف (۰، ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) از هریک از این ترکیبات به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. (۶) انجام واکنش اکسیداسیون بر روی LDL طبیعی (که قبلاً در معرض هریک از ترکیبات فوق قرار گرفته بود) طبق روش شماره ۴.

(۷) انکوباسیون LDL طبیعی و اکسیده در معرض ویتامین C و اسانس با سلولهای حاوی رسپتور LDL و LDL نشاندار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه.

(۸) اندازه گیری شدت فلورسانس نمونه ها: انجام سانتیفریوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ و اندازه گیری شدت فلورسانس محلول رویی هر نمونه در طول موجهای EX= ۴۹۵ nm و EM= ۵۱۵ nm در دستگاه اسپکتروفلوریمتر و در نهایت رسم منحنی هیستوگرام برای هر یک.

مطابق جدول ۱ در غلظت ۲۰۰ میکرومولار ویتامین C عدد فلورسانس تست نسبت به شاهد برای LDL طبیعی برابر ۱۸/۵ درصد و در غلظت ۱۰۰ (و همچنین ۲۰۰) میکرومولار ویتامین C برای LDL اکسیده به مقدار ۶۲ درصد افزایش یافته است.

همچنین از بین سه اسانس مورد مطالعه معلوم شد که تیمول دارای بیشترین تأثیر مثبت بر روی افزایش اتصال LDL به رسپتور می باشد (برای LDL طبیعی ۲۷ درصد و در LDL اکسیده ۵۰ درصد). بعلاوه این اسانس در حضور مؤثرترین غلظت ویتامین C (۱۰۰ میکرومولار) بازم بیشترین اثر را بر روی افزایش تمایل LDL به رسپتور مربوطه داشته است.

۹) بررسی اثرات همزمان مؤثرترین غلظت ویتامین C بدست آمده در این مطالعه (۱۰۰ میکرومولار) و غلظتهای مختلف سه اسانس فوق: تمامی مراحل ۵ الی ۸ انجام گردید با این تفاوت که در مرحله ۵، محلول LDL طبیعی بطور جداگانه همزمان با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ویتامین C و چهار غلظت هریک از اسانسها انکوبه گردید.

نتایج:

نتایج اثرات ویتامین C در جدول ۱ و نتایج اثرات سه اسانس: تیمول و پاراسیمول و لیمونن به ترتیب در جداول ۲ و ۳ و ۴ نشان داده شده است. عدد فلورسانس برای LDL نشاندار برابر ۶۰۰ و برای خود سلولهای بافت آدرنال نیز برابر ۲۵ بوده است.

جدول ۱: نمایش مقایسه اثرات غلظتهای ویتامین C بر روی LDL طبیعی و اکسیده

| عدد فلورسانس (میانگین ± انحراف معیار) | | غلظت (میکرومولار) |
|---------------------------------------|-------------|-------------------|
| LDL طبیعی | LDL اکسیده | |
| ۳۵۰ ± ۱۲ | ۱۷۰ ± ۵ | ۰ |
| ۳۹۵ ± ۱۵/۵* | ۱۹۴ ± ۱۰/۴* | ۵۰ |
| ۴۰۷ ± ۸* | ۲۷۹ ± ۹/۵* | ۱۰۰ |
| ۴۲۹ ± ۱۰* | ۲۸۶ ± ۴* | ۲۰۰ |

* P < ۰/۰۵ معنی دار است (داده ها شامل ۵ بار آزمایش است)

جدول ۲: نمایش مقایسه اثرات غلظتهای تیمول بر روی LDL طبیعی و اکسیده

| عدد فلورسانس (میانگین ± انحراف معیار) | | | | غلظت (میکرومولار) |
|---------------------------------------|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| LDL طبیعی | | LDL اکسیده | | |
| بدون ویتامین C | در حضور ویتامین C | بدون ویتامین C | در حضور ویتامین C | |
| ۳۵۰ ± ۱۲ | ۳۹۵ ± ۹ | ۱۷۰ ± ۵ | ۲۷۵ ± ۸/۵ | ۰ |
| ۴۰۰ ± ۷/۵* | ۴۲۱ ± ۶/۶* | ۲۰۰ ± ۴/۵* | ۳۱۳ ± ۵/۷* | ۵۰ |
| ۴۰۷ ± ۶* | ۴۲۹ ± ۲/۵* | ۲۲۸ ± ۷/۶* | ۳۲۱ ± ۴* | ۱۰۰ |
| ۴۲۵ ± ۱۰/۵* | ۴۳۷ ± ۴/۷* | ۲۶۲ ± ۱۱* | ۳۴۶ ± ۴/۵* | ۲۰۰ |

* P < ۰/۰۵ معنی دار است (داده ها شامل ۵ بار آزمایش است)

جدول ۳: نمایش مقایسه اثرات غلظتهای پاراسیمول بر روی LDL طبیعی و اکسیده

| عدد فلورسانس (میانگین ± انحراف معیار) | | | | غلظت (میکرومولار) |
|---------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|----------------------|
| LDL اکسیده | | LDL طبیعی | | |
| در حضور ویتامین C | بدون ویتامین C | در حضور ویتامین C | بدون ویتامین C | |
| 275 ± 8/5 | 170 ± 5 | 395 ± 9 | 350 ± 12 | ۰ |
| 280 ± 2* | 176 ± 4/1* | 401 ± 3* | 390 ± 7* | ۵۰ |
| 301 ± 6* | 200 ± 3/8* | 420 ± 1/7* | 404 ± 6/4* | ۱۰۰ |
| 302 ± 2/1* | 234 ± 3/3* | 422 ± 2/5* | 428 ± 7/2* | ۲۰۰ |

* P < 0.05 معنی دار است (داده ها شامل ۵ بار آزمایش است)

جدول ۴: نمایش مقایسه اثرات غلظتهای لیمون بر روی LDL طبیعی و اکسیده

| عدد فلورسانس (میانگین ± انحراف معیار) | | | | غلظت (میکرومولار) |
|---------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|----------------------|
| LDL اکسیده | | LDL طبیعی | | |
| در حضور ویتامین C | بدون ویتامین C | در حضور ویتامین C | بدون ویتامین C | |
| 275 ± 8/5 | 170 ± 5 | 395 ± 9 | 350 ± 12 | ۰ |
| 277 ± 1/8* | 179 ± 2/4* | 400 ± 1/9* | 378 ± 2/7* | ۵۰ |
| 280 ± 2/9* | 201 ± 1/3* | 401 ± 2/1* | 389 ± 4* | ۱۰۰ |
| 283 ± 1* | 219 ± 2* | 402 ± 1* | 395 ± 1/7* | ۲۰۰ |

* P < 0.05 معنی دار است (داده ها شامل ۵ بار آزمایش است)

۱۰۰ میکرومولار بود که با یافته های B.Frei و

همکارانش مطابقت داشت (۸).

همچنین L.Retsky در تحقیقات خود غلظت ۶۰ میکرومولار ویتامین C را مناسبترین غلظت برای مهار اکسیداسیون LDL بوسیله مس گزارش داد(۹).

ویتامین C علاوه بر بازسازی آنتی اکسیدانهای موجود در LDL (مثل ویتامین E) که در واقع سبب افزایش مقاومت LDL در مقابل اکسیداسیون میشود باعث تجزیه هیدروپراکسیدهای اسیدهای چرب در LDL و تخریب جایگاههای اتصال یونهای فلزی به ذره LDL میگردد(۱۰،۱۱).

همچنین در مقایسه اثرات اسانسهای مورد مطالعه مشخص شد که تیمول دارای بیشترین اثر بر روی افزایش تمایل LDL اکسیده و طبیعی به رسپتورس میباشد(در LDL اکسیده برابر ۵۰٪ و در LDL طبیعی برابر ۲۷٪). ترتیب اثرات اسانسهای بکاررفته برای LDL اکسیده و طبیعی بدین قرار است:

بحث:

در این تحقیق اثرات غلظتهای مختلف ویتامین C واسانسهای تیمول و پاراسیمول و لیمون بر روی اتصال LDL طبیعی و اکسیده به رسپتور مربوطه در بافت آدرنال مورد بررسی قرار گرفته است. تمامی ترکیبات در چهار غلظت (۰ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) استفاده شد و در همه نمونه ها از LDL نشاندار شده (با FITC) برای تعیین میزان تغییرات عدد فلورسانس مورد استفاده قرار گرفت بدین ترتیب که افزایش عدد فلورسانس بیانگر بالا بودن میزان LDL نشاندار آزاد(غیر متصل به سلولها) در محیط و افزایش جذب LDL غیرنشاندار(طبیعی و اکسیده) توسط سلولهاست و برعکس کاهش عدد فلورسانس نشانگر افزایش جذب LDL نشاندار و عدم برداشت LDL غیرنشاندار(طبیعی و اکسیده) توسط سلولهاست.

مؤثرترین غلظت ویتامین C برای افزایش تمایل

به LDL اکسیده که در این تحقیق حاصل گردید برابر

- system and in a rat and human lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1257 : 279-87.
4. Jialai I, Deraraj S. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42(2) : 498-506.
 5. Graham JM, Joan A, Higgins T, et al . A novel method for the rapid separation of plasma lipoprotein using self-generating gradients of iodoxanal. *Atherosclerosis* 1996;124(1):125-134.
 6. Schneider WJ, Goldstein JL, Brown MS. Purification of the LDL-receptor. *Meth Enzym* 1995; 109 : 405-17.
 7. Lodgy JK, Salder PJ, Kus ML, et al . Copper- induced LDL peroxidation investigated by H-NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1256 : 130-40.
 8. Frei B, England L. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8377-83.
 9. Retsky KL, Frei B. Vitamine C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human LDL. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1257: 279-86.
 10. Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascorbic acid product(s) protect human LDL against atherogenic modification. *J Biol Chem* 1993; 268: 1304-9.
 11. Hetrog M, Kromher D, Aravanis C, et al. Dietary antioxidants and risk of coronary heart disease. *Lancet* 1993; 342 :1007-12.
 12. Darut K. Study of antioxidative activity of natural poly-phenolic using a model chain reaction oxidation. *Zdrawookher Kaz* 1995; 2: 40-4.
 13. Unelee D. Inhibition effect of gagamine asteriodal alkaloid from cynanchum on lipid peroxidation and aldehyde oxidase activity. *Planta Medica* 1996; 62: 486-7.

لیمونن > پاراسیمول > تیمول

در مطالعاتی که توسط دو گروه از محققین در سال ۱۹۹۵ انجام گرفت معلوم شد که تیمول موجود در گیاه آویشن دارای خاصیت آنتی اکسیدانی علیه اکسیداسیون LDL است که مؤید نتایج این پروژه است (۱۲). همچنین این یافته ها با مشاهدات D.Unelee در مورد خواص آنتی اکسیدانی اسانسهای گیاهی بر روی پراکسیداسیون لیپیدی در LDL هماهنگی داشت (۱۳). همچنین در بررسی اثرات توأم این سه اسانس با مؤثرترین غلظت ویتامین C بدست آمده در این تحقیق مشخص شد که باز هم اسانس تیمول دارای بالاترین اثر بر روی افزایش اتصال LDL به رسپتور مربوطه بوده است. ترتیب اثرات این اسانسها در حضور ویتامین C به صورت زیر است:

لیمونن > پاراسیمول > تیمول

(درحقیقت لیمونن هیچگونه تأثیری بر روی افزایش اتصال LDL به رسپتورش در حضور ویتامین C نداشت). نتایج این تحقیق نشان داده است که برخی از اسانسهای گیاهی و ویتامینها با خاصیت آنتی اکسیدانی خود سبب افزایش تمایل LDL طبیعی واکسیده به رسپتور مربوطه گردیده اند که این امر میتواند اثرات مفیدی در درمان بیماریهایی مثل آترواسکلروز و کاهش میزان کلسترول پلاسما داشته باشد. البته پیشنهاد میشود که این آزمایشات نیز در *in vivo* با دقت و شدت بیشتری دنبال شود تا اثرات جانبی این ترکیبات و دوز مناسب هر یک آشکار شود و راه برای استفاده های کلینیکی از این ترکیبات فراهم گردد.

منابع:

1. Getto AM, Pownal HY, Havel RA. Introduction to the plasma lipoprotein. *Meth Enzym* 1996;109 :3-7 .
2. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1991; 88 : 1785-91 .
3. Saurena C, Hood RL, Stocker R. Comparative antioxidants of tocoteriols and other natural lipid-soluble agents in a homogenous