Archive of SID

اثر مهاری عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL سرم برون تنی

دکتر حسن احمدوند* فواد عبداله پور** شاهرخ باقری** مرضیه رشیدی پور***
خدیجه بیرانوند**** سمیرا چاش*****

* استادیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
*** دانشجوی کارشناسی شیمی محض دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد
**** کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
***** کارشناس علوم آزمایشگاهی مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

آدرس نویسنده مسؤول: خرم آباد، کیلومتر ۵ جاده خرم آباد بروجرد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی
تلفن ۰۹۱۳۲۲۶۷۸۹۳ و ۰۶۶۱-۶۲۰۰۱۳۳
Email: hassan_a46@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۳

چکیده

زمینه: اکسیداسیون چربی‌ها و از جمله LDL در ایجاد آترواسکلروز نقش مهمی دارد. با استفاده از مواد آنتی اکسیدان در جیره غذایی مانند ویتامین E و عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط می‌توان از اکسیداسیون LDL جلوگیری و در نتیجه باعث جلوگیری از ایجاد آترواسکلروز شد.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL سرم برون تنی ناشی از سولفات مس انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در شهرستان خرم آباد انجام شد. نمونه خون افراد سالم بعد از یک شب ناشتایی تهیه و LDL سرم آن جدا شد. نمونه‌های LDL به پنج گروه تقسیم شدند: گروه اول شاهد، گروه دوم در معرض عامل اکسیدان سولفات مس و درمان نشده و گروه‌های سوم، چهارم و پنجم در معرض عامل اکسیدان سولفات مس و درمان شده با عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به ترتیب با غلظت‌های ۰/۲، ۲ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر. جهت بررسی اکسیداسیون LDL مقدار دی‌ان‌های کونجوگه، زمان تأخیری (Lag time) و مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) تشکیل شده اندازه‌گیری شد و اثرات غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار اکسیداسیون LDL سرم بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS۱۳ و آزمون من ویتنی تحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان زمان تأخیری براساس غلظت عصاره به ترتیب ۲/۲، ۳ و ۴/۳ برابر افزایش یافت. همچنین میزان دی ان کونجوگه براساس غلظت عصاره به ترتیب ۱۳/۳۳، ۴۶/۶۶ و ۸۰/۰۰ درصد کاهش یافت. اثر مهاری عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL متناسب با غلظت بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط باعث جلوگیری از اکسیداسیون LDL می‌شود و این ترکیب ممکن است اثرهای مشابهی در درون تنی داشته باشد.

کلیدواژه ها: عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط، اکسیداسیون لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDL)

مقدمه:

اکسیداسیون LDL در ایجاد آترواسکلروز نقش مهمی دارد. استفاده از مواداکسیدان در مواد غذایی باعث ایجاد اکسید LDL و در نتیجه ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز می‌شود.[۱] وقتی LDL اکسید می‌شود، تمایل آن به گیرنده‌اش کاهش می‌یابد. جمع شدن LDL اکسیده در ماکروفاژها موجب پیدایش سلول‌های کف‌آلود و ایجاد آترواسکلروز می‌شود.[۲و۳] با استفاده از مواد آنتی اکسیدان مانند ویتامین E و گیاهانی مانند پوست بلوط که غنی از مواد آنتی اکسیدان هستند می‌توان از اکسیداسیون LDL و در نتیجه از ایجاد آترواسکلروز جلوگیری نمود.[۴-۷]

بلوط با نام علمی Quercus از گیاهان بومی ایران و مناطق معتدله است که به طور گسترده‌ای در جنگل‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کردستان، لرستان و کهکیلویه بویراحمد می‌روید. بلـوط از نظر طب قدیم ایران گرم و خشک است و از آن به عنوان غذا استفاده می‌کردند. دم کرده بلوط کم خونی، بواسـیر، درد معده و نرمی استخوان را درمـان مـی‌کنـد. همچنـین پوست بلوط در تقویـت عمـومی بـدن و معالجـه اسـهال کودکان مؤثر است و به عنوان ضد درد و آرام بخـش نیـز استفاده می‌شود.[۸] پوست و برگ درخت بلوط دارای تانن، اسـید گالیـک، اسـید مالیـک، کوئرسـین(Quercine)، موسیلاژ، پکتین و مشتقات هگزاهیدروکسـی دی فنویـل اسـت کـه خـواص آنتـی اکسـیدانی دارنـد.[۹و۱۰] تـاکنون مطالعه‌ای با هدف تعیین اثر مستقیم پوست میوه بلوط بـر کاهش اکسیداسیون LDL سرم به صورت بـرون تنـی و درون تنی انجام نشده است.

با توجه به شـواهد نظـری تـنش اکسـیداتیو یکـی از مهم‌ترین عوامل در ایجاد بعضـی از بیمـاری‌هـا از جملـه آترواسکلروز، دیابت، سرطان و آلزایمر اسـت.[۶] در نتیجـه می‌توان از موادی که به هر نحو در مهار تنش اکسـیداتیو مؤثر باشند، جهت درمان استفاده کرد. شاید درمان با ایـن عصاره یا سایر آنتـی اکسـیدان‌هـا بتوانـد در مهـار تـنش اکسیداتیو و سایر مکانیسم‌های آسیب‌زا مؤثر واقـع شـود. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثـر عصـاره هیـدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL سرم بـرون تنـی ناشی از سولفات مس است.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال۱۳۸۹ درشهرستان خرم آباد بر روی نمونه سرم گرفته شده از افراد سالم که بـه آن‌هـا اطلاعـات لازم داده شـد و بـه تصـویب کمیتـه اخـلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان رسید انجام شد.

دی سدیم اتیلن دی آمین ترا استات(Na2EDTA) ، پتاسیم برمید، سدیم کلرید و دی سدیم هیدروژن فسـفات (Na2HPO4) از شرکت سیگما خریداری شدند.

عصـاره هیـدروالکلی پوسـت میـوه بلـوط از مرکـز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علـوم پزشـکی لرسـتان تهیه شد. برای تهیه عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط، ابتدا پوست سبز میوه بلوط در سایه خشک و سپس پـودر شدند مقدار ۱۰۰ گرم پـودر بـه دسـت آمـده بـه مـدت ۹ ساعت در الکل ۵۰ درصد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه سوکسله قرار داده شد. عصاره به دسـت آمـده بعد از صاف شدن، خشک و ماده مومی به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری و خشک شد که بازده به دست آمده ۴۵/۷ درصد بود. سـپس نمونـه‌هـای خـون افراد سالم که ۸ تا ۱۲ ساعت ناشتا بودند، گرفته و سـرم آن‌ها با اسـتفاده از سـانتریفیوژ (دور ۳۰۰۰ بـه مـدت ۱۰ دقیقه)جدا شد. برای جلوگیری از اکسیداسیون، سدیم آزید با غلظت نهایی(۰/۰۶ درصد وزنی- حجمی) به نمونه‌های سرم اضافه شد.[۱۱و۱۲]

LDL سرم در مرکز تحقیقات قلب و عـروق دانشـگاه علوم پزشکی اصفهان با روش ناپیوسته شـیب غلظتـی بـا استفاده از اولتراسانتریفیوژ جدا شد. چگالی سرم بـا اضـافه کردن برمید پتاسیم ۰/۳۶۵ گرم بر میلی‌لیتر به ۱/۲۱ گرم بر میلی‌لیتر رسـانده شـد. ۳/۵ میلـی‌لیتـر سـدیم کلریـد (۰/۱۵۴ مول بر لیتر) و ۱/۵ میلی لیتر از سرم‌های غلـیظ شده داخل لوله‌های سانتریفیوژ ریخته شد و با اسـتفاده از اولتراسانتریفوژ بکمنL7-55 با دور rpm ۴۰۰۰۰ به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شـد. LDL جدا شده بـه مـدت ۴۸ سـاعت در دمـای ۴ درجـه سانتی‌گراد در بافر PBS کلرید سدیم (۰/۱۶ مول بر لیتر)، فسفات منوهیدروژن دی سدیک (۰/۰۱ مول بـر لیتـر) بـا PH ۷/۴، اکسـیژن زدا شـده، حـاوی آزیـد سـدیم (۰/۰۱ درصد) و EDTA (۰/۰۱ درصد) دیالیز شد و بافر در زمان دیالیز سه بار تعویض شد.[۱۳] سپس غلظت پروتئین LDL با استفاده از روش برادفورد انـدازه‌گیـری شـد[۱۴] و جهـت بررسی اکسیداسـیون LDL بـا PBS ۱۰ میلـی مـولار و PH= ۴/۷ به ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید.

LDL سرم تهیه شده به پنج گروه مختلف تقسیم شد: گروه اول شاهد حاوی LDL ، گروه دوم در معرض عامل اکسیدان و درمان نشده حاوی سولفات مس۱۰میکرومولار

www.SID.ir

Archive of SID

فاقد عصاره، گروه‌های سوم، چهارم و پنجم در معرض عامل اکسیدان و درمان شده حاوی سولفات مس ۱۰ میکرومولار و عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به ترتیب با غلظت‌های ۰/۲، ۲و۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر. معادل حجم عصاره‌های استفاده شده حلال به نمونه شاهد و درمان نشده اضافه شد. تغییرات اکسیداتیو LDL با اندازه‌گیری جذب ماوراء بنفش محلول در ۲۳۴ نانومتر هر ده دقیقه یک بار به مدت ۸ ساعت انجام شد.[۱۵] جهت ارزیابی کینتیک اکسیداسیون LDL منحنی جذب ، جذب‌های به دست آمده ، برحسب زمان نمونه‌ها رسم شد و با استفاده از منحنی رسم شده زمان تأخیری (Lagtime) و غلظت پایانی دی ان‌های کونجوگه بعد از ۸ ساعت با استفاده از ضریب خاموشی مولی (۲۹۵۰ لیتر بر مول بر سانتی‌متر) به دست آمد.

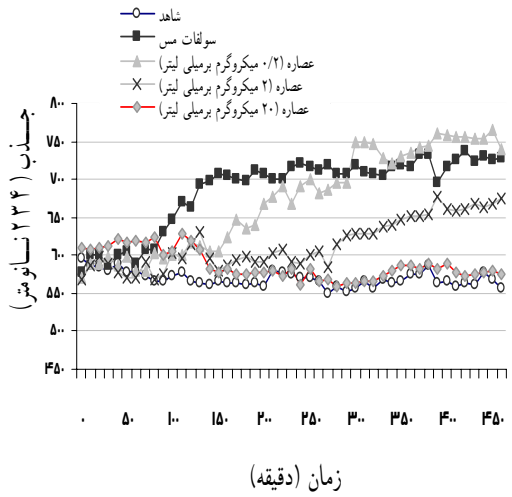
محصول پایانی پراکسیداسیون چربی مالون دی آلدئید براساس روش Burge و Aust اندازه گیری شد.[۱۶و۱۷] نمونه‌های LDL بعد از اضافه کردن املاح سولفات مس و عصاره‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و در پایان با اضافه کردن EDTA با غلظت پایانی میلی مولار، واکنش اکسیداسیون متوقف شد. برای اندازه گیری پراکسیداسیون چربی ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک اسید ۰/۶ درصد و یک میلی‌لیتر تری اسید کلرواستیک ۱۰ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد. بعد از سرد شدن، ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و جذب محلول‌های رویی در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار جذب‌های به دست آمده با استفاده از ضریب مولی به عنوان مالون دی‌آلدئید تشکیل شده برحسب nm/mg–LDL protein گزارش شد.[۱۶و۱۷]

نتایج به دست آمده از ۳ آزمایش به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری و اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS۱۳ و آزمون من ویتنی ارزیابی شد.

*** یافته‌ها:**

عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور معنی‌داری اکسیداسیون LDL برون‌تنی را کاهش داد ($P<0/05$) به طوری که میزان غلظت پایانی دی ان‌های کونجوگه به ترتیب متناسب با غلظت‌های ۰/۲، ۲ و۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط کاهش یافت (۱۴±۱۳۰و ۹±۸۰ و ۶±۳۰). اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار اکسیداسیون LDL با غلظت عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط متناسب بود این وابستگی با غلظت خطی بود (نمودار شماره۱).

نمودار ۱- کینتیک اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار اکسیداسیون LDL

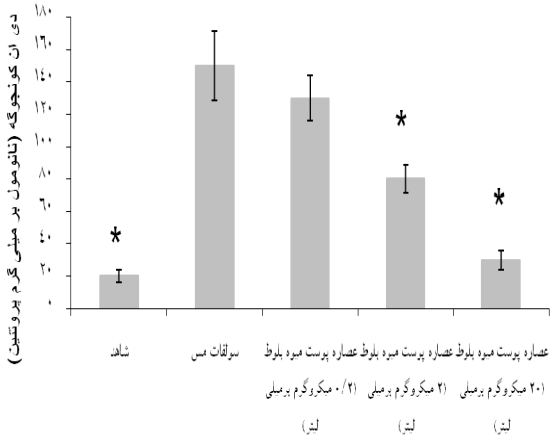


براساس نتایج به دست آمده اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط معنی‌دار است. همچنین با استفاده از منحنی عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور معنی‌داری باعث کاهش دی ان کونجوگه شد (نمودار شماره ۲) و همچنین با استفاده از منحنی کینتیک، زمان تأخیری به دست آمد (نمودار شماره ۳).

www.SID.ir

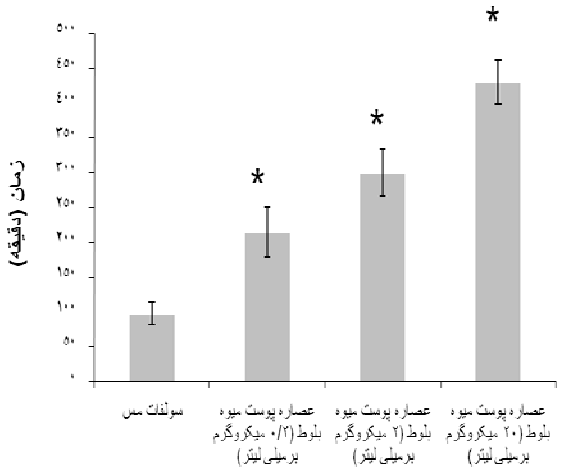
Archive of SID

نمودار ۲- مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار تشکیل دی ان کونجوگه ناشی از اکسیداسیون LDL



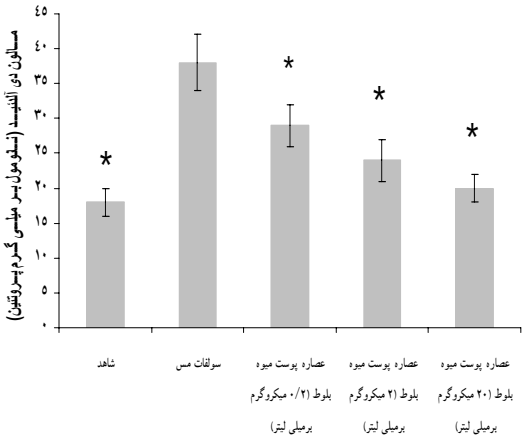
*P<۰/۰۵ نسبت به مس

نمودار ۳- اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر زمان تأخیری



اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط در کاهش مالون دی آلدئید تشکیل شده نسبت به نمونه حاوی سولفات مس فاقد عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط معنی‌دار بود (نمودار شماره ۴).

نمودار ٤- مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار تشکیل مالون دی آلدئید ناشی از اکسیداسیون LDL



* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور مؤثری باعث مهار اکسیداسیون LDL برون تنی می‌شود. براساس مطالعه‌های انجام شده اکسیداسیون LDL در دیواره عروق به عنوان عامل اصلی در پیدایش و توسعه آترواسکلروز مطرح است و در افراد مبتلا به آترواسکلروز، مقادیر کم‌تری مواد آنتی‌اکسیدان (نسبت به افراد سالم) وجود دارد.[۲] مس از طریق واکنش فنتون و هابرویس باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد و احتمالاً از این طریق باعث اکسید شدن LDL می‌شود. به دنبال این امر، میزان پراکسید چربی و دی ان‌های کونجوگه افزایش می‌یابد و میزان آنتی اکسیدان‌های موجود در ساختمان LDL مانند ویتامین E به دلیل تعامل با رادیکال‌های آزاد به وجود آمده توسط مس کاهش می‌یابد. [۱۸]

در این مطالعه عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور معنی‌داری باعث کاهش دی ان‌های کونجوگه و مالون دی آلدئید شد. همچنین زمان تأخیری تحت اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط افزایش یافت. براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط یک آنتی اکسیدان قوی

www.SID.ir

Archive of SID

است، هر چند تاکنون تحقیقات کمی در مورد عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط انجام شده است، ولی در مطالعه‌های دیگر نقش محافظتی عصاره برگ بلوط در بیماری‌های قلبی و همچنین نقش ضد باکتریایی عصاره برگ و پوست درخت بلوط نشان داده شده است.[۱۹و۲۰] همچنین مطالعه‌هایی با اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی اکسیدان مانند قدرت احیاکنندگی، قدرت حذف رادیکال‌های آزاد و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی برگ بلوط نشان داده‌اند که نقش آنتی اکسیدانی برگ بلوط قابل قیاس و در مواردی بهتر از آنتی اکسیدان نهایی مانند ویتامین E و بتاکاروتن و (Hydroxyanisole Butylated) در غلظت‌های مشابه بوده است.[۲۰-۲۳]

به طور کلی نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور مؤثری باعث مهار اکسیداسیون LDL برون تنی می شود. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان مطالعه‌های مشابه درون تنی و همچنین مطالعه‌هایی در زمینه اثر آن در بیماران قلبی- عروقی و دیابتی پی‌ریزی نمود.

* مراجع:

1. Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. Am J Cardiol 2008 May 22; 101 (10A): 75D-86D

2. Lobbes MB, Lutgens E, Heeneman S, et al. Systematic review, 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 Jul; 187 (1): 18-25

3. Ahmadvand H, Khosrowbeygi A, Ghasemi M. Inhibitory effect of Allium ascalonicom hydroalcoholic extract on low-density lipoprotein (LDL) oxidation induced by CuSO4 in vitro. J Med Plants Res 2011; 5 (6): 1012-7

4. Ani M, Moshtaghie AA, Ahmadvand H. Comparative effects of copper, iron, vanadium and titanium on low density lipoprotein oxidation in vitro. Iran Biomed J 2007 Apr; 11 (2): 113-8

5. Ahmadvand H, Khosrobeigi A, Bagheri S, et al. Comparision of Inhibitory effects of Satureja Khozistanica oil extract, vitamin E and Coenzyme Q10 on LDL oxidation in vitro. Yafteh 2008; 11 (4): 25-31

6. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. Free Radic Biol Med 2009 Dec 15; 47 (12): 1673-706

7. Yekini I, Hammoudi F, Martin-Nizard F, et al. Antioxidant activity of benzoxazolinonic and benzothiazolinonic derivatives in the LDL oxidation model. Bioorg Med Chem 2009 Nov 15; 17 (22): 7823-30

8. Rakic S, Petrovic S, Kukic J, et al. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. Food Chemistry 2007; 104: 830-4

9. Rakić S , Povrenović D, Tešević V, et al. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. Journal of Food Engineering 2006; 74 (3): 416-23

10. Rivas-Arreola MJ, Rocha-Guzman NE, Gallegos-Infante JA, et al. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of Quercus resinosa leaves. Food Chemistry 2009; 115 (4): 1320-5

11. Almeida IF , Valentão P, Andrade PB, et al. Oak leaf extract as topical antioxidant: Free radical scavenging and iron chelating activities and in vivo skin irritation potential. Biofactors 2008; 33 (4): 267-79

www.SID.ir

Archive of SID

12. Ávila-Reyes JA, Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, et al. Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels. Food Res Int 2010; 43 (1): 296-300
13. Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, et al. Antibacterial activity of twenty iranian plant extracts against clinical isolates of Helicobacter pylori. Iran J Basic Med Sci 2009; 12 (2): 105-11
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976 May 7; 72: 248–54
15. Androulakis N, Durand H, Ninio E, Tsoukatos DC. Molecular and mechanistic characterization of platelet-activating factor-like bioactivity produced upon LDL oxidation. J Lipid Res 2005 Sep; 46 (9): 1923-32
16. Romeu M, Nogues R, Marcas L, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. BMC Res Notes 2010 Jan 25; 3: 20
17. Sheu JY, Chen PH, Tseng WC, et al. Spectrophotometric determination of a thiobarbituric acid-reactive substance in human hair. Anal Sci 2003 Jun; 19(6): 958-60
18. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev 2004 Oct; 84 (4): 1381-478
19. Rivas-Arreola MJ, Roha-Guzman NE, et al. Antioxidant activity of oak (Quercus) leaves infusions against free radicals and their cardioprotective potential. Pak J Biol Sci 2010 Jun 1; 13 (11): 537-45
20. Andrenšek S, Simonovska B, Vovk I,et al. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (Quercus robur) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom. Int J Food Microbiol 2004 Apr 15; 92 (2): 181-7
21. Hansen U, Schneiderheinze J, Stadelmann S, Rank B. The alpha-tocopherol content of leaves of pedunculate oak (Quercus roburL.) - variation over the growing season and along the vertical light gradient in the canopy. J Plant Physiol 2003 Jan; 160 (1): 91-6
22. Stanely Mainzen Prince P, Priscilla H, Devika PT. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. Eur J Pharmacol 2009 Aug 1; 615 (1-3): 139-43
23. Priscilla DH, Prince PS. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. Chem Biol Interact 2009 May 15; 179 (2-3): 118-24

www.SID.ir