مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی موسیر ایرانی (*Allium hirtifolium*) بر میزان تشکیل هموگلوبین گلایکه شده در حالت برون تنی

شیرین فتاح پور[۱]، فرزانه حسینی[۱]، محمد رضا حاجی زاده[۲]، محمد اسد پور[۳]، مژگان موگویی[۲]، غلام حسین حسن شاهی[۲]، محمد رضا میرزایی[۴]، مهدی محمودی[۲و۱*]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۲- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۳- گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۴- گروه بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۹/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۲/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: گلایکه شدن غیر آنزیمی، واکنش بین قندهای احیا کننده و گروه آمین پروتئین‌ها است. محصولات نهایی گلایکه شدن (AGE) در فرآیند پیری و پاتوژنز بیماری‌ها موثر است. مهار تشکیل AGEها یا شکستن پیوند قند-پروتئین، در کاهش روند بهبود عوارض بیماری‌ها از جمله اختلالات دیابت موثر خواهد بود. در این مطالعه تاثیر عصاره هیدروالکلی موسیر ایرانی بر تشکیل هموگلوبین گلایکه شده در شرایط برون تنی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: تاثیر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ گرم بر دسی لیتر عصاره موسیر ایرانی بر مهار تشکیل هموگلوبین A1c در این مطالعه تجربی بررسی شد. تشکیل هموگلوبین A1c با کروماتوگرافی تعویض یونی سنجش گردید. از روش‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی استفاده شد. $P<0/05$ نمایان گر اختلاف معنی دار بود.

نتایج: در غلظت ۴۰ میلی مولار گلوکز، عصاره موسیر با غلظت ۰/۵ گرم بر دسی لیتر باعث کاهش معنی دار در میزان تشکیل هموگلوبین A1c پس از ۷ و ۱۴ روز انکوباسیون گردید. عصاره موسیر در تمام غلظت‌ها باعث کاهش مقدار هموگلوبین گلایکه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد موسیر می‌تواند مانع از تشکیل هموگلوبین A1c در شرایط هایپرگلایسمیک شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که موسیر می‌تواند برای بهبود عوارض دیابت مفید باشد.

کلمات کلیدی: **دیابت ملیتوس، موسیر ایرانی، هموگلوبین A1c، هموگلوبین گلایکه شده**

مقدمه

طی سال‌های اخیر، دیابت یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامت در سرتاسر جهان بوده است (۱). تخمین زده می‌شود شیوع بیماری دیابت در جهان از حدود ۲/۸ درصد (۱۷۱ میلیون نفر) در سال ۲۰۰۰، به ۴/۴ درصد (بیش از ۳۵۰ میلیون نفر) تا سال ۲۰۳۰ برسد (۲). دیابت ملیتوس نقص متابولیکی مزمنی است که با افزایش مقدار قند خون (هایپرگلایسمی)، شناخته می‌شود. در بیماران دیابتی برای حفظ قند خون در محدوده طبیعی، پایش پیوسته مقدار قند خون لازم است (۳). اگر دیابت بدون درمان رها شود و یا به طور نادرست مدیریت شود، می‌تواند سبب عوارضی از جمله بیماری‌های قلبی، کلیوی، نوروپاتی، گانگرن، گاستروپارزی، کوری، ناتوانی جنسی و آسیب عصبی گردد؛ از این رو، کاهش قند خون بیماران دیابتی نیازمند اقدام فوری و جدی است (۴).

پروتئین‌ها طی فعالیت بیولوژیکی خود در معرض واکنش‌هایی قرار می‌گیرند که باعث تغییرات تدریجی مخربی در ساختار و

* **نویسنده مسئول: مهدی محمودی**، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۱۹۱۴۸۵۵ Email: mahmoodies@yahoo.com

خواص عملکردی آن‌ها می‌گردد. از این پدیده به عنوان پیری مولکولی پروتئین[1] یاد شده که فرایند پیچیده‌ای است. از عوامل ایجاد کننده این پدیده تغییرات مختلف پس از ترجمه‌ای مانند اکسیداسیون، کربونیلاسیو ن[2]، گلایکواکسیداسیو ن[3]، لیپواکسیداسیون[4] و کربامیلاسیون[5] که عمدتا شامل اتصال غیر آنزیمی مولکول‌های کوچک واکنش‌گر به گروه‌های عملکردی پروتئین است، می‌باشند. علاوه بر پدیده فیزیولوژیک پیری، پیری مولکولی پروتئین در بیماری‌های مزمن مانند دیابت و یا نارسایی مزمن کلیه و عوارض دراز مدت این بیماری‌ها دیده می‌شود (۵) به نظر می‌رسد عوارض طولانی مدت دیابت نتیجه تجمع ماکرومولکول‌های بافتی تغییر یافته توسط واکنش گلایکه شدن غیر آنزیمی میلارد باشد (۶). واکنش میلارد واکنشی غیر آنزیمی است که بر اثر اتصال گروه کربونیل قند احیاکننده به گروه آمین پروتئین‌ها ایجاد می‌شود و پروتئین‌های گلایکه ایجاد می‌نماید (۷).

گلایکه شدن در شرایط درون تنی دو محصول متفاوت ایجاد می‌کند. محصولات اولیه گلایکه شدن[6] و محصولات نهایی گلایکه شدن[7]. در مرحله ابتدایی مسیر گلایکه شدن، N گلوکوزیل آمین تولید می‌شود و مسیر واکنش دو طرفه و قابل برگشت می‌باشد و با گذشت زمان واکنش به تعادل می‌رسد. سپس N گلوکوزیل آمین دستخوش بازآرایی های درون مولکولی می‌گردد و ۱- آمینو ۱-داکسی کتوز پایدار یا محصولات آمادوری را ایجاد می‌کند. محصولات اولیه گلایکه شدن، پیش سازهای شیمیایی تشکیل دهنده محصولات نهایی هستند. پروتئینی که محصول اولیه است می‌تواند از طریق گروه کربونیل فعال شده‌اش با پروتئین‌های دیگر، لیپو پروتئین‌ها و یا دیگر سوبستراهای دارای آمینو واکنش دهد (۸). یافته‌ها نشان می‌دهد که HbA1c پیش سازی برای تشکیل شیمیایی Hb-AGE است.

شواهد به دست آمده ارتباط بالینی بین تجمع AGEها در بافت‌های بدن و پیشرفت بیماری‌های وابسته به سن را نشان داده‌اند. محصولات گلایکه شدن تمایل به تجمع در پروتئین‌ها با طول عمر بالا مثل پروتئین‌های سیستم عصبی دارند. مطالعات اپیدمیولوژی بیانگر تاثیر فلاونوئید و کاهش ریسک بیماری‌های نورودژنراتیو است (۹). مطالعات فراوانی برای شناسایی و کشف ترکیبات ضد گلایکه شدن پروتئین‌ها صورت گرفته است (۱۰)، اما به علت عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی اخیرا توجه محققان به استفاده از گیاهان خوراکی با فعالیت ضد گلایکه شدن معطوف گردیده که استراتژی کلیدی در جلوگیری و بهبود پیچیدگی‌های دیابتی ایجاد شده بر اثر گلایکه شدن می‌باشد. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که بسیاری از مواد غذایی سرشار از آنتی اکسیدان در جلوگیری از تشکیل پروتئین‌های گلایکه شده با قندها نقش دارند (۱۱). گیاهان، مجموعه شیمیایی پیچیده‌ای با خواص دارویی هستند که داروسازی مدرن امروزی هم نمی‌تواند مشابه آن‌ها را تولید کند (۱۲) و احتمال ایجاد عوارض جانبی توسط آن‌ها بسیار کمتر است. مطالعات اخیر خواص آنتی اکسیدانی، ضددیابتی و هایپوگلایسمیک را در گیاهان دارویی تایید کرده است (۱۳). گیاه موسیر گونه‌ای از خانواده بزرگ لاله سانان است. این خانواده متشکل از حدود ۵۰۰ گونه مختلف شناخته شده می‌باشد و علاوه بر موسیر، گونه‌های مهم و شناخته شده دیگری از قبیل سیر، پیازها و تره فرنگی در این خانواده قرار دارند که استفاده غذایی و دارویی دارند (۱۴). گیاه موسیر که از جنس آلیوم[8] محسوب می‌گردد از قدیم در بسیاری از کشورها از جمله ایران مصارف درمانی سنتی یا غذایی داشته است. این گیاه خواص شناخته شده‌ای مثل اثر بر روی شاخص‌های هماتولوژیکی، پتانسیل آنتی اکسیدانی، خواص ضد قارچ و ضد باکتریایی دارد که مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲). گونه‌های آلیوم منابع سرشاری از مواد غذایی فیتو[9] هستند که می‌توانند برای درمان و پیشگیری برخی بیماری‌ها مثل سرطان‌ها، بیماری‌های عروق کرونری، چاقی، هایپرکلسترولمیا و انواع دیابت مفید باشند. دی آلیل سولفید، دی آلیل دی سولفید، S- اتیل سیستئین و N- استیل سیستئین، چهار گروه مواد ارگانو سولفور هستند که از گیاهان گونه آلیوم مثل سیر پیاز و موسیر جدا شده‌اند و پیشنهاد

[1] Molecular Aging of Proteins
[2] Carbonylation
[3] Glycoxidation
[4] Lipoxidation
[5] Arbamylation

[6] Early Glycation Products (EGP)
[7] Advanced Glycation End Products (AGE)
[8] Allium
[9] Phyto

شده ممکن است این چهار ماده فعالیت آنتی اکسیدانی داشته باشند (۱۵). موسیر ایرانی از نظر طبی جزو گیاهان دارویی مهم بوده و قسمت‌های خوراکی موسیر ایرانی، برگ‌ها و پیازهای توپر آن است. ساپونین، ساپوجنین و ترکیبات سولفوری[10] و فلاوونوئیدها مثل کوئرستین و کامپفرول در موسیر یافت شده است. محققان نشان داده‌اند که حبه و گل موسیر حاوی غلظت بالایی از فلاوونول‌های گلیکوزیدی است. ترکیبات دی و تری سولفید مهمترین این ترکیبات هستند. گزارشاتی حاکی از خواص درمانی و دارویی موسیر ایرانی وجود دارد که شامل اثرات آنتی اکسیدانی، تنظیم سیستم ایمنی و خواص ضد سرطانی است (۱۶). با توجه به مطالب ذکر شده فوق، هدف از این مطالعه یافتن شواهدی مبنی بر نقش موسیر در واکنش گلایکه شدن هموگلوبین در شرایط برون تنی بود. اثر غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی موسیر بر تشکیل محصولات اولیه واکنش گلایکه شدن پروتئین هموگلوبین در مجاورت غلظت‌های قند احیا کننده بررسی گردید. ما در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثرات مفید این گیاه را بررسی کنیم. برای این کار تاثیر موسیر بر مهار واکنش گلایکه شدن هموگلوبین در محیط برون تنی با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی که روشی مرسوم برای تشخیص و سنجش میزان گلایکه شدن هموگلوبین است، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده که به طریق زیر انجام گرفت.

الف) تهیه عصاره هیدروالکلی موسیر: برای تهیه عصاره هیدروالکلی موسیر، ۱۰۰گرم حبه تازه تهیه شده را توزین نموده و با ۴۰۰ میلی لیتر از مخلوط آب و اتانول به نسبت ۲۵ به ۷۵، به مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه و بر روی شیکر انکوبه می‌کنیم. پس از ۴۸ ساعت محتویات را صاف نموده، محلول حاصله را در پتری دیش‌های استریل آزمایشگاهی ریخته و درون فریز درایر در برودت ۵۰- درجه سانتی گراد و تحت شرایط خلاء قرار می‌دهیم تا به طور کامل خشک شده و پودر کریستالی شکل به رنگ زرد ایجاد گردد. سپس با استفاده از کاردک‌های استریل این پودر را که به کف ظروف چسبیده است جدا کرده و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ گرم بر دسی لیتر را از آن تهیه نمودیم (۱۵). D –گلوکز از شرکت سیگما خریداری شد.

ب) آماده سازی نمونه‌ها: مقدار ۱۰ میلی لیتر خون از فرد سالمی که علائم دیابت را نداشت گرفته شد. نمونه خون درون لوله‌های مخصوص CBC دارای ضد انعقاد EDTA نگه داری گردید. سپس خون را به لوله‌های مخصوص سانتریفوژ منتقل کرده و برای بار اول به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. بخش رویی محصول (که شامل پلاسما است) دور ریخته و هم حجم خون درون لوله‌ها، نرمال سالین اضافه شد. پس از اضافه کردن نرمال سالین، نمونه‌ها را با دست چندین بار مخلوط کرده و دوباره در شرایط فوق سانتریفوژ انجام گردید. این عمل ۳ الی ۴ مرتبه تکرار شد تا گلبول‌های قرمز خون کاملا شسته شوند. سپس حجم RBCهای شسته شده را تعیین کرده، ۲ برابر حجم آن بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و نیم برابر حجم RBCهای شسته شده، CCL_4 به نمونه اضافه نموده و به مدت ۳۰-۱۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه انکوبه شد. سپس در ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی از اجزای لیز شده RBC جدا گردید. این بخش شامل هموگلوبین جدا شده از همولیزات (که به اختصار هموگلوبین نامیده شد) بود که برای انجام ادامه آزمایش از آن استفاده گردید (۸، ۱۷). غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار (مشابه شرایط هایپرگلایسمیک) از گلوکز ساخته شد.

ج) نحوه تاثیر عصاره: با توجه به غلظت‌های گلوکز و عصاره موسیر، گروه‌ها برای انجام آزمایش طبق جدول ۱ تعریف و ساخته شدند.

برای جلوگیری از آلودگی محلول‌ها به هر نمونه ۵۰ µL جنتامایسین با غلظت ۰/۰۱ مولار اضافه می‌گردید. جهت آزمایش و افزایش صحت و دقت، ۲ نمونه از هر گروه تهیه شد. لوله‌های آزمایش محتوی محلول‌های فوق در دمای ۳۷ درجه با pH ۷/۴ همراه با چرخش به مدت ۷ و ۱۴ روز در شرایط تاریکی انکوبه شدند (۸، ۱۵).

[1] Thiosulfinate

جدول ۱. گروه‌های آزمایش

گروه	گلوکز	عصاره	هموگلوبین
	۵۰۰ µL ، ۴۰ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۱گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۴۰ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۳گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۴۰ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۵گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
کنترل مثبت	۵۰۰ µL ، ۴۰ میلی مول در لیتر	-	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۲۰ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۱گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۲۰ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۳گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۲۰ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۵گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
کنترل مثبت	۵۰۰ µL ، ۲۰ میلی مول در لیتر	-	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۵ میلی مول در	۱۰۰ µL ، ۰/۱گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۵ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۳گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
	۵۰۰ µL ، ۵ میلی مول در لیتر	۱۰۰ µL ، ۰/۵گرم بر دسی لیتر	۵۰۰ µL
کنترل مثبت	۵۰۰ µL ، ۵ میلی مول در لیتر	-	۵۰۰ µL
کنترل منفی	-	-	۵۰۰ µL

اندازه‌گیری میزان گلایکه شدن هموگلوبین: با روش کروماتوگرافی تعویض یونی مقدار هموگلوبین A1c تعیین شد (۱۸). بدین صورت که با استفاده از ستون‌های شرکت بیوسیستم و پروتکل آن، پس ازجدا کردن اجزای A1a و A1b هموگلوبین، جز A1c به دست آمد؛ و جذب نوری آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. مقدار هموگلوبین توتال نیز با استفاده از µL ۵۰ هموگلوبین حاصل از هموليزات و ۱۲ میلی لیتر از معرف ۳ شامل بافر فسفات ۷۲ mmol/L، PH ۶/۵، سدیم آزاید ۰/۹۵ g/L در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از فرمول زیر درصد هموگلوبین A1c تعیین شد.

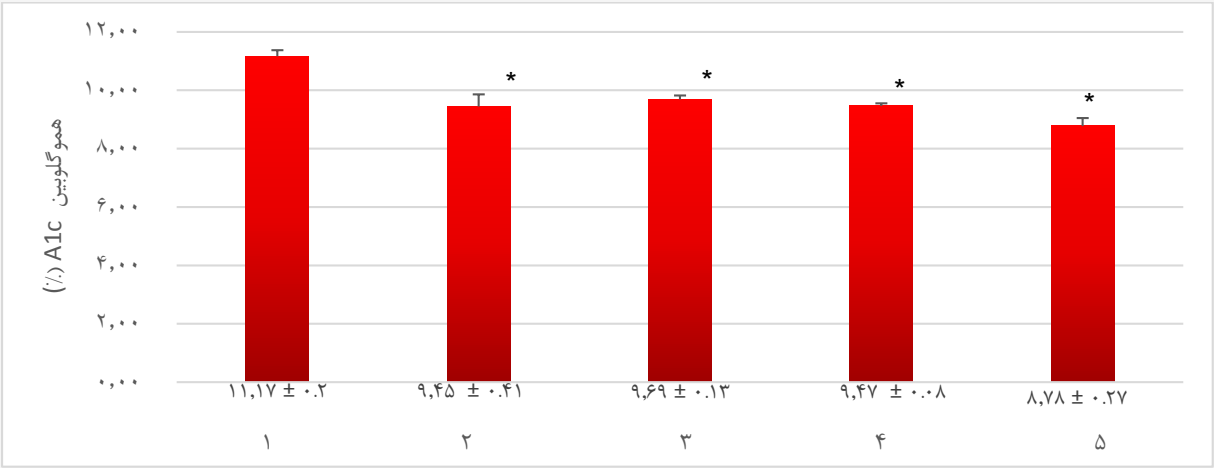
$$\%\ HbA1c = 100 \times \frac{\text{جذب نوری } HbA1c}{\text{جذب نوری هموگلوبین توتال}} \times \frac{\text{حجم } HbA1c}{\text{حجم هموگلوبین توتال}}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت انجام محاسبات آماری از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۸ استفاده گردید. اطلاعات پس از ورود به رایانه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (جهت مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره موسیر) و آزمون توکی بررسی شد. اختلاف در سطح ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

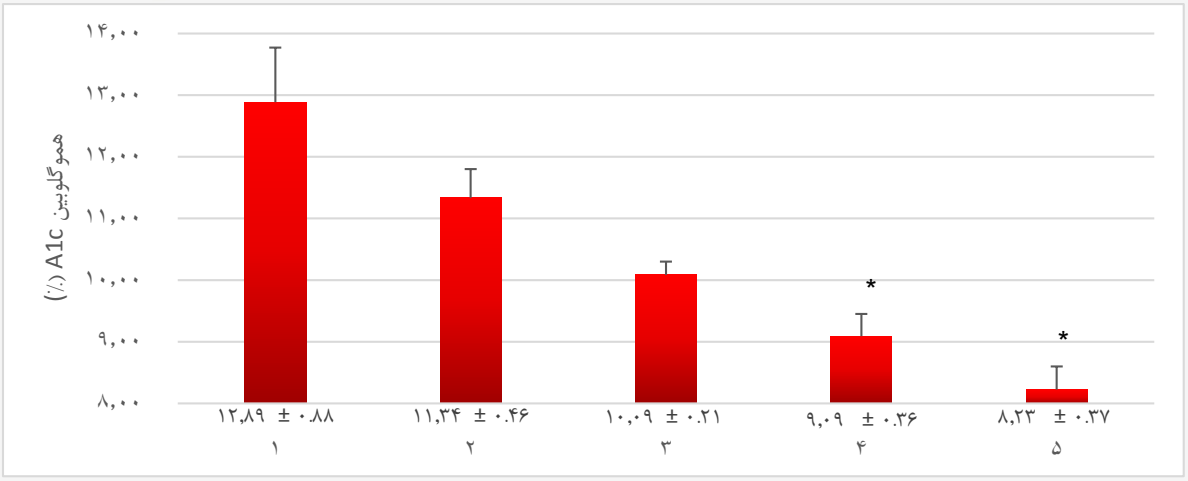
نتایج تاثیر عصاره هیدروالکلی موسیر بر میزان تشکیل هموگلوبین A1c پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز از آغاز آزمایش در نمودارهای ۱ تا ۴ نشان داده شده است. همان طور که از اطلاعات این نمودارها بر می‌آید، عصاره هیدروالکلی موسیر در شرایط هایپر گلایسمیک و با افزایش زمان در روز ۱۴ واکنش باعث کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c و در نتیجه مهار ایجاد پیوند قند پروتئین گردید. ۱۴ روز پس از آغاز واکنش عصاره موسیر با غلظت‌های ۰/۱ gr/dl، ۰/۳ gr/dl و ۰/۵ gr/dl کاهش معنی داری در میزان تشکیل هموگلوبین A1c نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<0/05$) که این کاهش وابسته به دوز بود. اما در روز ۷ با وجود کاهش درصد هموگلوبین A1c در حضور غلظت‌های ۰/۱ gr/dl، ۰/۳ gr/dl و ۰/۵ gr/dl تفاوتی

معنی دار و وابسته به دوز مشاهده نشد. در هفته اول انکوباسیون نمونه‌ها با غلظت‌های شبیه ساز شرایط هایپرگلایسمیک، درصد تشکیل HbA1c در نمونه‌های تیمار شده با تمام غلظت‌های عصاره هیدروالکی موسیر نسبت به نمونه کنترل مثبت کاهش یافته است. عصاره با غلظت ۰/۵ gr/dl در هر دو غلظت گلوکز (۴۰ و ۲۰ میلی مولار) اختلاف معنی دار نشان داده است ($P<0/05$). اما بین غلظت‌های مختلف عصاره نسبت به یکدیگر تفاوت معنی دار دیده نمی‌شود (نمودارهای ۱ و ۳). در هفته دوم انکوباسیون در شرایط هایپر گلایسمیک، کاهش درصد HbA1c در تمام نمونه‌ها دیده می‌شود. عصاره با غلظت gr/dl



نمودار۱: تشکیل هموگلوبین A1c در غلظت گلوکز ۴۰ میلی مولار پس از ۷ روز. ۱- نمونه کنترل مثبت (هموگلوبین + گلوکز ۴۰ میلی مولار)، ۲- هموگلوبین+گلوکز ۴۰ میلی مولار+ عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۱، ۳-هموگلوبین+گلوکز ۴۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۳، ۴- هموگلوبین+گلوکز ۴۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۵، ۵- نمونه کنترل منفی (هموگلوبین).

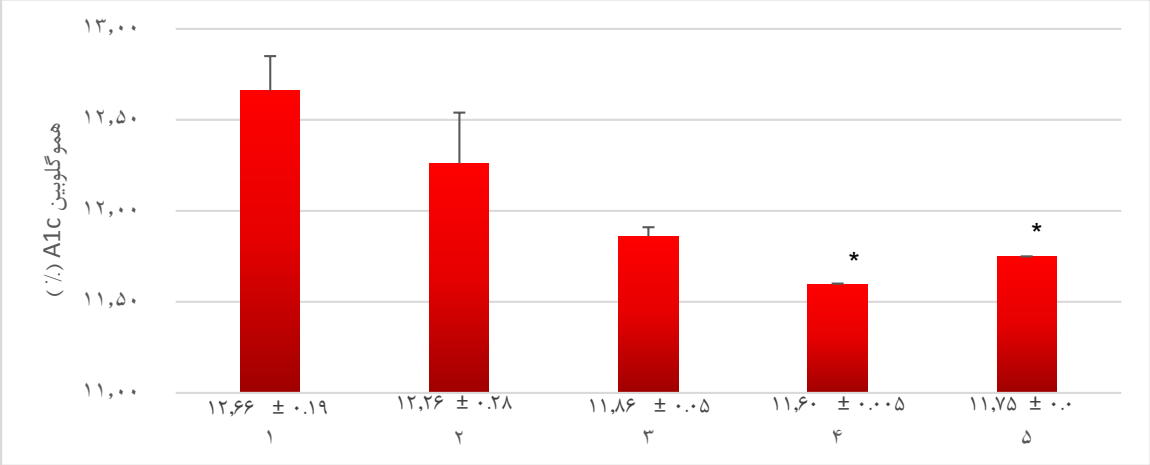
علامت * نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با نمونه کنترل مثبت است. اعداد زیر هر ستون بر اساس میانگین درصد تشکیل هموگلوبین ± SEM نشان داده شده‌اند.



نمودار ۲: تشکیل هموگلوبین A1c در غلظت گلوکز ۴۰ میلی مولار پس از ۱۴ روز. ۱- نمونه کنترل مثبت (هموگلوبین + گلوکز ۴۰ میلی مولار)، ۲- هموگلوبین+گلوکز ۴۰ میلی مولار+ عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۱ ، ۳- هموگلوبین+گلوکز ۴۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۳، ۴- هموگلوبین+گلوکز ۴۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۵ ، ۵- نمونه کنترل منفی (هموگلوبین).

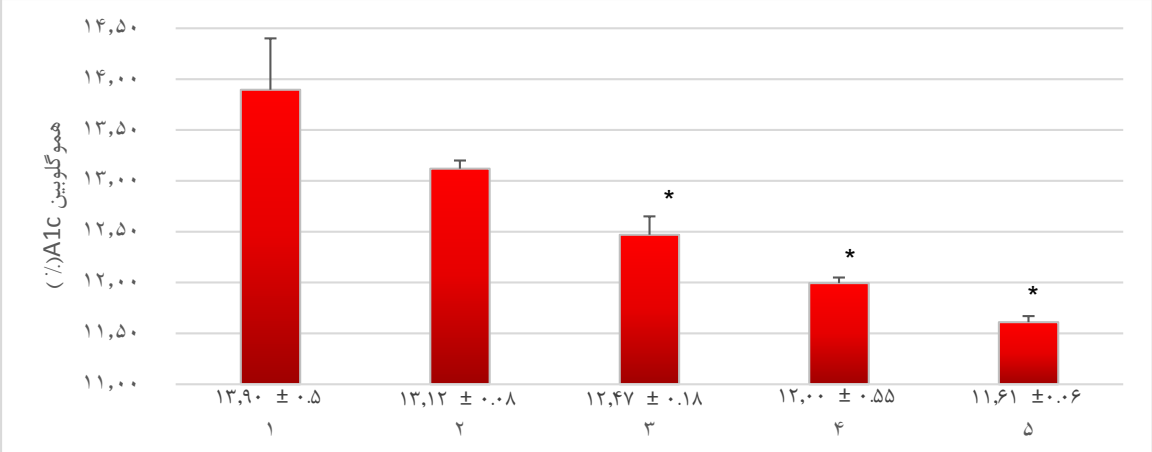
علامت * نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با نمونه کنترل مثبت است. اعداد زیر هر ستون بر اساس میانگین درصد تشکیل هموگلوبین ± SEM نشان داده شده‌اند.

۰/۵ در هر دو غلظت گلوکز (۴۰ و ۲۰ میلی مولار) اختلاف معنی دار نشان داده است (P <۰/۰۵) و عصاره با غلظت ۰/۳ gr/dl در غلظت گلوکز ۲۰ میلی مولار اختلاف معنی دار نشان داده است (P <۰/۰۵). پس از تیمار دو هفته‌ای نمونه‌ها با عصاره هیدروالکلی، بین غلظت‌های مختلف عصاره نسبت به یکدیگر تفاوت معنی دار دیده نمی‌شود (نمودار ۲ و ۴).



نمودار۳: تشکیل هموگلوبین A1c در غلظت گلوکز ۲۰ میلی مولار پس از ۷ روز. ۱- نمونه کنترل مثبت (هموگلوبین + گلوکز ۲۰ میلی مولار)، ۲- هموگلوبین+گلوکز ۲۰ میلی مولار+ عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۱ ، ۳- هموگلوبین+گلوکز ۲۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۳، ۴- هموگلوبین+گلوکز ۲۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۵، ۵- نمونه کنترل منفی (هموگلوبین)

علامت * نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با نمونه کنترل مثبت است. اعداد زیر هر ستون بر اساس میانگین درصد تشکیل هموگلوبین ± SEM نشان داده شده‌اند.



نمودار۴. تشکیل هموگلوبین A1c در غلظت گلوکز ۲۰ میلی مولار پس از ۱۴ روز. ۱- نمونه کنترل مثبت (هموگلوبین + گلوکز ۲۰ میلی مولار)، ۲- هموگلوبین+گلوکز ۲۰ میلی مولار+ عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۱ ، ۳- هموگلوبین+گلوکز ۲۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۳، ۴- هموگلوبین+گلوکز ۲۰ میلی مولار + عصاره موسیر با غلظت gr/dl ۰/۵، ۵- نمونه کنترل منفی (هموگلوبین).

علامت * نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با نمونه کنترل مثبت است. اعداد زیر هر ستون بر اساس میانگین درصد تشکیل هموگلوبین ± SEM نشان داده شده‌اند.

در غلظت ۴۰ میلی مولار گلوکز، با مقایسه میزان تشکیل هموگلوبین A1c در روزهای ۷ و ۱۴تحت تاثیر عصاره ۰/۵ gr/dl، مشاهده می‌شود که با افزایش طول مدت تیمار نمونه‌ها با این غلظت، تشکیل HbA1c کاهش یافته است.

بحث

واکنش میلارد تابع غلظت مواد و مدت زمان است. در دیابت به علت افزایش مقدار قند خون به مدت طولانی، واکنش میلارد با شدت بیشتری رخ می‌دهد. پروتئین‌های خون، مواجهه بیشتری با قند احیا کننده دارند و دچار تغییرات ساختاری و عملکردی بیشتری خواهند شد. مطالعات اخیر نشان داده است که در دیابت ملیتوس اختلال متابولیسم گلوکز وگلایکه شدن پروتئین‌ها نقش مهمی در ایجاد آتروسکلروز دارد و علت بسیاری از عوارض دیابت می‌باشد (۱۹).

گیاهان دارویی دارای مواد موثره فراوانی هستند که بعضی از آن‌ها از طریق مکانیزم‌های متنوع باعث کاهش قند خون می‌شوند. یکی از این روش‌ها ممانعت از تولید محصولات گلایکه شده است (۲۰). تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که مواد غذایی سرشار از آنتی اکسیدان‌ها در جلوگیری از تشکیل پروتئین‌های گلایکه شده از طریق قندها نقش دارند (۲۴-۲۱). امروزه به دلیل پتانسیل درمانی توجه زیادی به مهارکننده‌های واکنش گلایکه شدن شده است. ترکیبات آنتی گلایکه شدن احتمالاً با مهار کردن گروه‌های کربونیل روی قندهای احیاء شده و محصولات آمادوری مانع تشکیل محصولات اولیه و نهایی گلایکه شدن می‌شوند که احتمالاً در مطالعه حاضر عصاره موسیر نیز از این طریق عمل نموده است (۲۳، ۲۵، ۲۶).

در این مطالعه اثر طولانی مدت موسیر موجب کاهش و مهار تشکیل پیوند پروتئین- قند در واکنش میلارد گردید در این رابطه معلوم شده که گیاهانی با دارا بودن فلاونوئیدها، پلی فنل‌ها و ترکیبات گوگردی از جمله دی آلیل دی سولفید اثرات آنتی گلایکه شدن و آنتی اکسیدانی قابل توجه نشان می‌دهند و حتی معلوم شده است که میزان خواص هایپوگلایسمیک موسیر در مقایسه با گیاهان هم خانواده‌اش مانند سیر بیشتر است (۲۷). در مطالعاتی که تاثیر عصاره‌های گیاهی بر کاهش عوارض دیابت سنجیده می‌شود هموگلوبین A1c، قند ناشتا و قند دو ساعته شاخصه‌های مهم مورد بررسی هستند. طراحان این مطالعات سعی می‌کنند با ایجاد شرایط مشابه دیابت، تفسیر درستی از نتایج حاصله ارائه دهند. به علاوه مهار تشکیل هموگلوبین گلایکه را نشان‌گر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مورد استفاده می‌دانند. در مطالعه ما نیز، در غلظت‌های متفاوت گلوکز شبیه شرایط هایپرگلایسمی با افزایش زمان انکوباسیون، میزان تشکیل هموگلوبین A1c کاهش معنی داری داشت (۲۸, ۲۹).

علاوه بر قندهای احیا کننده شناخته شده، اجسام کتونی نیز قادر به گلایکه کردن هموگلوبین و سایر پروتئین‌ها هستند. پروتئین‌های (ساختمانی و عملکردی) فرد دیابتی به علت اختلال در متابولیسم گلوکز و همچنین افزایش مقادیر اجسام کتونی در گردش خون و در مجاورت سلول‌ها، به طور مضاعف دچار گلایکه شدن می‌شوند (۳۰). در این مطالعه ما به بررسی اثر آنتی گلایکیشنی عصاره‌ی موسیر پرداختیم و نتایج بیانگر این مطلب بود که افزایش زمان انکوباسیون با عصاره هیدروالکلی موسیر بر کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c نقش دارد. مطالعات بیشتری جهت تایید نقش پیش گیرانه عصاره موسیر در افراد در معرض دیابت نیاز می‌باشد.

در مطالعه‌ای قند خون ناشتا در موش‌های صحرایی دیابتی و کنترل تیمار شده با عصاره هیدروالکلی موسیر بررسی شد. گروه تیمار شده با ۲۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی موسیر در مقایسه با گروه تیمار شده با ۱۰۰ mg/kg، مقدار قند خون ناشتای کمتری داشتند (۳۱). در مطالعه انجام گرفته توسط ما نیز عصاره هیدروالکلی موسیر با غلظت ۰/۵ gr/dl نسبت به دو گروه دیگر (۰/۱ gr/dl و ۰/۳ gr/dl) کاهش بیشتری در میزان تشکیل هموگلوبین A1c نشان داد. به علت ماهیت شیمیایی فرآیندهای بیولوژیک (آنزیمی و غیر آنزیمی)، غلظت مواد موجود در محیط واکنش بر سرعت و جهت انجام واکنش موثر است. وجود مواد موثره‌ی فراوان در گیاهان از مزیت‌های درمانی آن‌ها محسوب می‌شود. در صورت استفاده از عصاره یا پودر یک گیاه، مجموعه‌ای از این مواد با خواص متنوع اثرات خود را اعمال می‌نمایند. بنابراین هر چه غلظت و یا مدت مواجهه با ماده موثره بیشتر باشد تاثیر بهتری مشاهده می‌شود.

نتایج حاصل از مجاورت هموگلوبین، قند احیا کننده و عصاره موسیر با غلظت‌های مذکور در آزمایش نشان می‌دهد در شرایط

ایجاد شده هایپرگلایسمیک (غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی مولار قند)، میزان تشکیل HbA1c بر اثر غلظت‌های مختلف عصاره موسیر نسبت به نمونه کنترل کاهش معنی دار داشت و پس از گذشت ۲ هفته از انکوباسیون نمونه‌ها در روز ۱۴، همچنان کاهش تشکیل و درصد HbA1c مشاهده شد اما فقط عصاره با غلظت ۰/۵ gr/dl کاهش معنی دار ایجاد کرد. سیر نزولی تشکیل HbA1c و اثر مهاری عصاره موسیر در روز ۱۴ وابسته به دوز و خطی بود. در ضمن بین مقدار تشکیل HbA1c با غلظت ۰/۵ gr/dl و کنترل منفی تفاوت معنی داری دیده نشد. می‌توان چنین استنباط کرد که کاهش در عصاره ۰/۵ gr/dl دارای تاثیر مفیدی است به حدی که حتی به میزان کنترل منفی نزدیک شده است.

همان گونه که زمان متغیر مهمی در تشکیل HbA1c است به همان نسبت هم افزایش مجاورت عصاره موسیر با هموگلوبین و قند احیا کننده مانع از تشکیل HbA1c می‌گردد و افزایش اثر مهاری موسیر مشهود خواهد بود. بنابراین افزایش زمان انکوباسیون می‌تواند نقشی دو گانه در تفسیر نتایج داشته باشد: (۱) افزایش تشکیل HbA1c ، (۲) افزایش اثر مهاری عصاره موسیر. جمع برداری دو اثر فوق الزاما به صورت کاهش خطی HbA1c نیست، زیرا ایجاد HbA1c در آزمایش ما، صرفا واکنشی غیر آنزیمی بوده و غلظت مواد، تاثیر مستقیم بر ایجاد محصولات آمادوری و گلایکه شده داشت. اما در مجموع نتایج حاکی از کاهش تشکیل HbA1c طی زمان انکوباسیون است.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر عصاره هیدروالکلی موسیر قادر به کاهش مقدار محصولات اولیه گلایکه شدن می‌باشد و مهارکننده تشکیل پیوند غیر آنزیمی قند- پروتئین است. با بررسی و مطالعات بیشتر در ارتباط با اثر کاهنده مقادیر AGE می‌توان پیشنهاد داد استفاده از این گیاه و مخصوصا مصرف روزانه در افراد دیابتی، موثر است.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح مصوب شورای پژوهشی مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به شماره ۳۹۸۰ است. که بدین وسیله از حمایت مالی این مرکز تقدیر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Williams G, Pickup JC. Handbook of diabetes. 3 ed. United States: Blackwell Pub.; 2004.P: 248.
2. Sultanpur CM, Deepa K, Kumar SV. Comprehensive review on HBA1C in diagnosis of diabetes mellitus. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2010;3(2):119-22.
3. Vinik AI, Vinik E. Prevention of the complications of diabetes. American Journal of Managed Care. 2003;9(3; SUPP): 63-80.
4. Pundir CS, Chawla S. Determination of glycated hemoglobin with special emphasis on biosensing methods. Analytical biochemistry. 2014;444:47-56.
5. Gillery P, Jaisson S. Usefulness of non-enzymatic post-translational modification derived products (PTMDPs) as biomarkers of chronic diseases. J Proteomics. 2013;92:228-38.
6. Muthenna P, Akileshwari C, Reddy GB. Ellagic acid, a new antiglycating agent: its inhibition of N-(carboxymethyl)lysine. Biochem J. 2012;442(1):221-30.
7. Tessier F. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. Pathologie Biologie. 2010;58(3):214-9.
8. Turk Z, Mesić R, Benko B. Comparison of advanced glycation endproducts on haemoglobin (Hb-AGE) and haemoglobin A for the assessment of diabetic control. Clinica chimica acta. 1998;277(2):159-70.
9. Dorsey PG. Inhibition of Non-enzymatic Protein Glycation by Pomegranate (Punica Granatum) Polyphenolics: University of Georgia; 2012.
10. Nagai R, Murray DB, Metz TO, Baynes JW. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE

inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. Diabetes. 2012;61(3):549-59.
11. Suantawee T, Wesarachanon K, Anantsuphasak K, Daenphetploy T, Thien-Ngern S, Thilavech T, et al. Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. Journal of Food Science and Technology. 2015; 52(6): 3843-3850.
12. Motlagh HRM, Mansouri K, Shakiba Y, Keshavarz M, Khodarahmi R, Siami A, et al. Anti-angiogenic effect of aqueous extract of shallot (Allium ascalonicum) bulbs in rat aorta ring model. Yakhteh Medical Journal. 2009;11(2):190-5.
13. Rout SP, Chowdary K, Kar D, Das L. Plants as source of novel anti-diabetic Drug: present scenario and future perspectives. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. 2009;3(1):37-55.
14. Sani MF, Kouhsari SM, Moradabadi L. Effects of Three Medicinal Plants Extracts in Experimental Diabetes: Antioxidant Enzymes Activities and Plasma Lipids Profiles inComparison with Metformin. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2012;11(3):897.
15. Ghafouri-Khosrowshahi A, Farzami B, Mohammadi-Bardbori A. The Inhibitory Effect of Garlic Extract on Formation of Glycated Hemoglobin and AGEPs. J Med Sci. 2007;7(6):1039-43.
16. Kazemi S, Asgary S, Moshtaghian J, Rafieian M, Adelnia A, Shamsi F. Liver-protective effects of hydroalcoholic extract of allium hirtifolium boiss. In rats with alloxan-induced diabetes mellitus. ARYA atherosclerosis. 2010;6(1):11.
17. Nair SSK, Vaibhavi . Mishra, Anshu Evaluation of In Vitro Anti diabetic Activity of Selected Plant Extracts. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. 2013;2(4):12-9.
18. Selvaraj N, Bobby Z, Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. Clinica chimica acta. 2006;366(1-2):190-5.
19. Rahbar S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005;1043(1):9-19.
20. Bathaie S, Mokarizade N, Shirali S. An overview of The Mechanisms of Plant Ingredients In The Treatment of Diabetes Mellitus. Journal of Medicinal Plants. 2012;11(44):1-24.
21. Douglas A.S, Donald M.W, James F.H, Stanley R.C. Fundamentals of analytical chemistry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2013;405(25):7903-4.
22. Kishabongo AS, Katchunga P, Van Aken EH, Speeckaert MM, Lagniau S, Husein D, et al. Glycated nail proteins: a new approach for detecting diabetes in developing countries. Trop Med Int Health. 2014;19(1):58-64.
23. Mahmoodi M, Hosseini J, Hosseini-zijoud S, Pooladvand V, Asadpour M, Eghbali H. The Effect of Citrullus Colocynthis Hydroalcoholic Extract on in vitro Albumin Glycation. Journal of Rafsenjan University of Medical Sciences. 2013;12(1):3-14.
24. Sayadi AM, M. Poladvand, V. Hassanshahi, GH. Shamsi zadeh, A. Study on the Different Concentrations of Citrullus colocynthis Fruit Powder on the Blood Biochemical Factors in Diabetic Rats. wulfenia. 2010;19(10):1-7.
25. Hou G-Y, Wang L, Liu S, Song F-R, Liu Z-Q. Inhibitory effect of eleven herbal extracts on advanced glycation end-products formation and aldose reductase activity. Chinese Chemical Letters. 2014;25(7):1039-43.
26. Ho S-C, Chang P-W, Tong H-T, Yu P-Y. Inhibition of Fluorescent Advanced Glycation End-Products and N-Carboxymethyllysine Formation by Several Floral Herbal Infusions. International Journal of Food Properties. 2014;17(3):617-28.
27. Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Rasuli MB. Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. Journal of clinical biochemistry and nutrition. 2007;41(3):218.
28. Perez Gutierrez RM, Flores Cotera LB, Gonzalez AMN. Evaluation of the Antioxidant and Anti-glication Effects of the Hexane Extract from Piper auritum Leaves in Vitro and Beneficial Activity on Oxidative Stress and Advanced Glycation End-Product-Mediated Renal Injury in Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. Molecules. 2012;17(10):11897-919.
29. Perez Gutierrez RM. Inhibition of advanced glycation end-product formation by Origanum majorana L. in vitro and in streptozotocin-induced diabetic rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012;2012.
30. Xie J, García-Pérez E, Méndez JD, Aminoguanidine G, Diabetes UP. In vitro Glycation of Hemoglobin by Acetone and-hydroxibutirate. World Applied Sciences Journal. 2007;2(2):099-106.
31. Mahmoodi M, Hosseini J, Hosseini-Zijoud S-M, Mirzaee M, Mirzajani E. The effect of Persian shallot (Allium hirtifolium Boiss (.extract on blood sugar and serum levels of some hormones in diabetic rats. Pak J Pharm Sci. 2013;26(2):397-402.

Original Article

Surveying the Effect of Hydroalcoholic Extract of *Allium hirtifolium* on Glycated Hemoglobin Formation in In-vitro Condition

Fattahpour Sh[1], Hosseini F[1], Hajizadeh M.R[2], Asadpour M[3], Moogooei M[2], Hassanshahi Gh.H[2], Mirzaii M.R[4], Mahmoodi M[2,1*]

1- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
2- Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
3- Department of Social Medicine, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
4- Department of Biophysics and Genetics, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

Received: 19 Dec 2014 Accepted: 18 May 2015

Abstract

Background & Objectives: Non enzymatic glycation is a reaction that occurs between reducing sugars and amino groups of proteins. Advanced Glycation End-products (AGE) have been accounted for principal biological processes like aging and pathogenesis of some diseases. Accumulation of AGE during hyperglycemia can cause structural and functional changes of long-lived proteins. Therefore, it will be effective to inhibit protein glycation formation in order to reduce or to improve diabetes complications. The aim of this study is to determine the effects of hydroalcoholic extract of Allium Hirtifolium on the formation of glycated hemoglobin.

Materials & Methods: In this experimental study, the effects of the various concentrations of 0.1, 0.3, and 0.5 gr/dl of hydroalcoholic extract of Allium Hirtifolium on the inhibition of hemoglobin glycation were examined. Hemoglobin A1c formation was assayed by ion exchange chromatography. The P-value < 0.05 was considered as the significant level.

Results: 10 and 14 days after incubation, at the concentration of 40 millimollar glucose, hemoglobin A1c formation decreased significantly by using 0.5 gr/dl of hydroalcoholic extract of Allium Hirtifolium.

Conclusion: The results revealed that Allium Hirtifolium can inhibit hemoglobin A1c formation in hyperglycemic condition. Therefore, it is suggested that Allium Hirtifolium can be useful for preventing the complications of diabetes.

Keywords: **Diabetes mellitus, Allium Hirtifolium, Hemoglobin A1c, Glycated hemoglobin**

* **Corresponding author: Mehdi Mahmoodi**, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
Tel: +989131914855
Email: mahmoodies@yahoo.com