مقایسه اثرات عصاره ساتوریا خوزستانیکا ، ویتامین E ،کوآنزیم Q10 بر پراکسیداسیون LDL درمحیط In vitro

حسن احمدوند[1]، علی خسروبیگی[2] ، شاهرخ باقری[3]، رضا حاجی حسینی[4]، فرشید غضنفری[5]، لیلانعمتی[5]

1- استادیار، مرکزتحقیقات داروهای گیاهی رازی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
2- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
3- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
4- دانشیار، گروه بیوشیمی، معاونت فن آوری دانشگاه پیام نور
5- دانشجوی کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران

یافته / دوره یازدهم / شماره 4 / زمستان 88 / مسلسل 42

چکیده

دریافت مقاله: 88/9/27، پذیرش مقاله: 88/11/2

Ø مقدمه: اکسیداسیون لیپیدها و ازجمله LDL نقش مهمی در ایجاد آترواسکلروز دارد. استفاده مواد اکسیدان در مواد غذایی باعث ایجاد LDL اکسید شده و این باعث ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز می‌شود. با استفاده از مواد آنتی اکسیدان مانند ویتامین E ، ساتوریا خوزستانیکا و کوآنزیم Q10 می توان از اکسیداسیون LDL جلوگیری کرده و از ایجاد آترواسکلروز پیشگیری نمود. دراین مطالعهاثرات عصاره ساتوریاخوزستانیکا، ویتامین E ،کوآنزیم Q10 بر پراکسیداسیون لیپید LDL سرم درمحیط In vitro مقایسه شده است.

Ø مواد و روش ها: از افراد سالم نمونه خون تهیه شد و LDL سرم جداشده را در گروههای کنترل، اکسید شده با مس و اکسید شده با مس و همزمان اینکوبه با عصاره ساتوریاخوزستانیکا، ویتامین E، کوآنزیم Q10 مطالعه شد. جهت بررسی اکسیداسیون LDL مقدار دی انهای کونجوگه و TBARS های تشکیل شده اندازه گیری شد. همچنین اثرات ویتامین E ، ساتوریاخوزستانیکا و کوآنزیم Q10 برمهار اکسیداسیون LDL سرم بررسی شد.

Ø یافته ها: نتایج بدست آمده نشان می دهد که ساتوریاخوزستانیکا، ویتامین E،کوآنزیم Q10 باعث کاهش اکسیداسیونLDL سرم می شود.

Ø بحث و نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان میدهد که ساتوریاخوزستانیکا، ویتامین E،کوآنزیم Q10 باعث جلوگیری ازاکسیداسیون LDL می شودواین ترکیبات ممکن است اثرات مشابهی در in vivo داشته باشد.

Ø واژه های کلیدی: اکسیداسیون LDL، ساتوریاخوزستانیکا، ویتامین E ،کوآنزیم Q10

آدرس مکاتبه: خرم آباد، کمالوند، مجتمع دانشگاهی پردیس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی
پست الکترونیک: hasan_a46@yahoo.com

مقدمه

اکسیداسیون LDL نقش مهمی در ایجاد آترواسکلروز دارد. استفاده مواد اکسیدان در مواد غذایی باعث ایجاد LDL اکسید شده و این باعث ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز می‌شود (1) . وقتی LDL اکسید می‌شود، تمایل آن به گیرنده اش کاهش می‌یابد. جمع شدن LDL اکسیده در ماکروفاژها منجربه پیدایش سلولهای کف آلود و تشکیل شدن آترواسکلروز می گردد. بااستفاده از مواد آنتی اکسیدان مانند ویتامین Eو ساتوریا خوزستانیکا میتوان از اکسیداسیون LDL جلوگیری ودر نتیجه باعث پیشگیری از ایجاد آترواسکلروز شد (2) . پاتوژنز آترواسکلروز پیچیده است. ولی شواهدی وجود دارد که نشان می دهد اکسیداسیون لیپیدها و LDL یکی از حوادث مهمی است که در تشکیل پلاکهای آترواسکلروز نقش دارد. از طرفی اترواسکلروز، به عنوان یک بیماری التهابی نیز مطرح است و گفته می شود عوامل اکسیداتیو و عوامل التهاب زا به صورت سیکلی معیوب در ایجاد و توسعه آتروسکلروز نقش دارند (1-3) .

گیاهی که در این تحقیق استفاده شده با نام علمی "ساتوریا خوزستانیکا" شناخته می شود که محل رویش طبیعی آن در استان‌های خوزستان و لرستان است و در گویش محلی به نام "مرزه خوزستانی" شناخته می شود. مرزه که از گیاهان خانواده نعناع به شمار می رود دارای خواص ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد درد است. مصرف مرزه موجب کاهش چربی خون می شود. گیاه مرزه خاصیت ضد انعقادی دارد و زمان انعقاد خون را طولانی تر می کند (4-6) . کوآنزیم Q10 به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی باعث مهار پراکسیداسیون لیپیدها و حذف رادیکالهای آزاد می شود. اثرا ت آنتی اکسیدانی کوآنزیم Q10 در جلوگیری از ایجاد آترواسکلروز بیشتر از ویتامین E است (7-9) .

با توجه به شواهد تئوری استرس اکسیداتیو اولین عامل مهم در ایجاد آترواسکلروز است. در نتیجه می توان از موادی که به هر نحو درمهار استرس اکسیداتیو موثر باشند استفاده کرد. شاید این روش درمانی با این عصاره یا سایر آنتی اکسیدانها بتواند در مهار استرس اکسیداتیو وسایر مکانیسمهای آسیب زا موثر واقع شود

مواد و روشها

دی سدیم اتیلن دی آمین تترااستات (Na2EDTA) ، پتاسیم برمید، سدیم کلرید، دی سدیم هیدروژن فسفات (Na2HPO4) از شرکت سیگما خریداری شد و عصاره مرزه درمرکزتحقیقات داروهای گیاهی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تهیه شد.

نمونه های خون از افراد سالم گرفته شد سرم آنها با استفاده از سانتریفوژ (دور 3000 به مدت 10 دقیقه) جداشد و برای جلوگیری از اکسیداسیون نمونه های سرم به آنها سدیم آزیدبا غلظت نهایی (0. 06% wt/vol) اضافه شد.

LDL سرم با روش ناپیوسته شیب غلظتی بااستفاده از اولتراسانتریفوژ جداشد. دانسیته سرم با اضافه کردن برمید پتاسیم (g/ml 0/365) به g/ml 1/21 رسانده شد. به لوله های سانتریفوژ 3/5 میلی لیترسدیم کلرید (0/154 mol/lit) و 1/5 میلی لیتر ازسرمهای غلیظ شده اضافه شد و از اولتراسانتریفوژ بکمن L7-55 با دورrpm 40000 به مدت 2/5 ساعت در دمای 10 درجه سانتیگراد استفاده شد. بعد از سانتریفوژ یک لایه زرد رنگ که LDL است جدا شد. LDL جدا شده به مدت 48 ساعت در دمای 4 درجه سانتیگراد در بافر PBS (PH 7/4، NaCl 0/16 mol/L، 0/01 mol/L Na^2HPO^4) اکسیژن زدا شده حاوی سدیم آزید 0/01% و

EDTA 0/01% دیالیز شد ودر زمان دیالیز سه بار بافر تعویض شد (10) .

بعد از جداسازی LDL غلظت پروتیئن آن اندازه گیری شد (11) و جهت بررسی اکسید اسیون LDL با PBS 10 میلی مولار و PH=7/4 به 150 میکروگرم بر میلی لیتر رسید. به دنبال آن کنترل که حاوی LDL و نمونه حاوی سولفات مس 10میکرومولار فاقد عصاره و نمونه های حاوی سولفات مس10میکرومولار و عصاره ساتوریا خوزستانیکا با غلظتهای 100 و200 میکروگرم بر دسی لیتر تهیه شد و یک نمونه حاوی ویتامین E با غلظت 100 میکرومولار وکوآنزیم Q10 با غلظت300 نانو مولار تهیه شد و معادل حجم عصاره های استفاده شده حلال به نمونه کنترل ومس اضافه شد. تغییرات اکسیداتیو LDL با اندازه گیری جذب ماوراء بنفش محلول در 234 نانومتر هر ده دقیقه یکبار به مدت 3 ساعت انجام شد (12) .

جهت ارزیابی کینتیک اکسید اسیون LDL منحنی جذب، جذبهای بدست آمده، بر حسب زمان نمونه ها رسم شد و با استفاده از منحنی رسم شده زمان تاخیری و غلظت پایانی دی ان های کونجوگه بعد از 3 ساعت بدست آمد (با استفاده از ضریب مولی (29500L/mol/cm))

اندازه گیری TBARS تشکیل شده:

براساس روش Burge و Aust محصول پایانی پراکسیداسیون لیپید که TBARS است اندازه گیری شد. بعد از اضافه کردن املاح سولفات مس و عصاره ها به نمونه های LDL برای مدت 6 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد اینکوبه شد و در پایان با اضافه کردن EDTA با غلظت پایانی 2 میلی مولار واکنش اکسیداسیون متوقف شد. جذب نمونه ها در 532 نانومتر اندازه گیری شد و مقدار جذبهای بدست آمده با استفاده از ضریب مولی به عنوان MDA تشکیل شده بر حسب nm/mg – LDL- protein گزارش شد (13 و 14) .

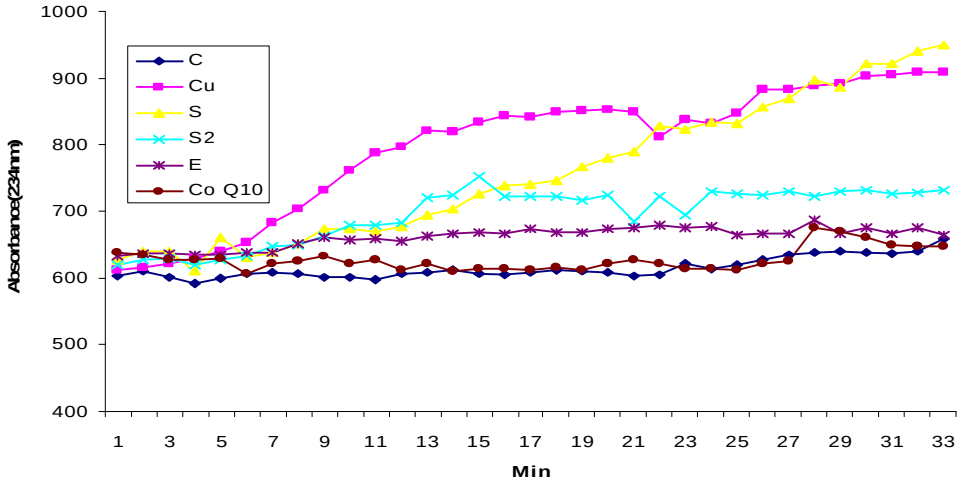
نتایج به دست آمده به صورت میانگین + انحراف معیار بیان شده اند. معنی دار بودن نتایج از نظر آماری و اختلاف بین گروهها با استفاده از نرم افزار SPSS وآزمون من ویتنی ارزیابی شد.

یافته‌ها

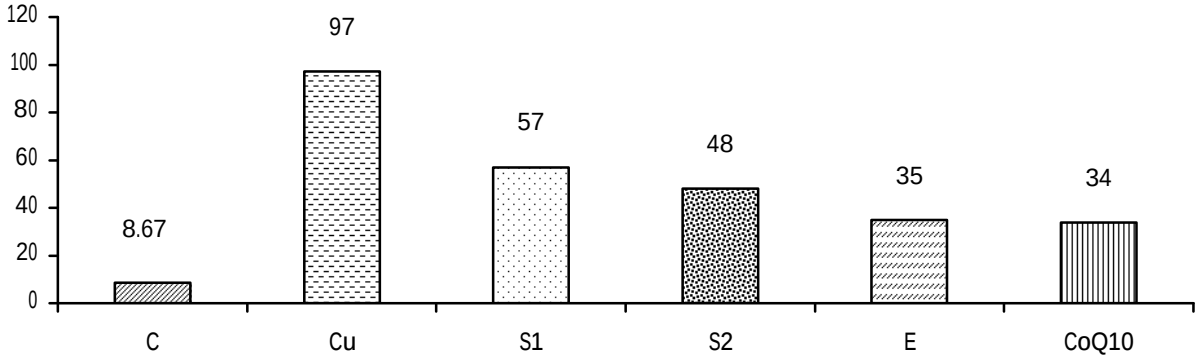
بعد از اضافه کردن مس و غلظتهای مورد نظر ساتوریا خوزستانیکا به نمونه ها و خواندن جذب نمونه ها به طور پیوسته هر ده دقیقه یکبار، منحنی کینتیک اکسیداسیون LDL رسم شد و مقدار دی انهای کونجوگه، TBARSهای تشکیل شده اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده نشان داد که ساتوریا خوزستانیکا بطور معنی داری اکسیداسیون LDL در محیط In vitro را کاهش می دهد ($p<0/05$) . اثر ساتوریا خوزستانیکا بر مهار اکسیداسیون LDLبا غلظت ساتوریا خوزستانیکا متناسب است (این وابستگی با غلظت خطی است) . جهت بررسی کینتیک اکسیداسیون LDL ، جذبهای بدست آمده در 234 نانومتر، بر حسب زمان رسم شد (نمودار 1) . در نمودار مذکور، 3 قسمت مجزا دیده می‌شود. Lag phase (فاز تأخیری) ، propagation phase که شدت اکسیداسیون LDL در این فاز افزایش می‌یابد و فاز decomposition که اتمام اکسیداسیون LDL می‌باشد.

تغییرات اکسیداتیو LDL از طریق اندازه گیری جذب ماوراء بنفش محلول در 234 نا نومتر بعد از 3 ساعت بدست آمد و بر اساس آن غلظت پایانی دی ان های کونجوگه (با استفاده از ضریب مولی (29500L/mol/cm)) بدست آمد (نمودار 2) . براساس نتایج بدست آمده اثر ساتوریا خوزستانیکا معنی دار است

جهت بررسی TBARS تشکیل شده، بعد از تهیه نمونه ها به مدت 5 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکو به شد و در پایان با اضافه کردن EDTA با غلظت پایانی 2 میلی مولار واکنش اکسیداسیون متوقف شد. جذب نمونه ها در 532 نانومتر اندازه گیری شد و مقدار جذبهای بدست آمده با استفاده از ضریب مولی به عنوان MDA تشکیل شده بر حسب nm/mg – LDL- protein بدست آمد. نتایج بدست آمده در نمودار شماره 3 نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده اثر غلظتهای مختلف ساتوریا خوزستانیکا در کاهش MDA تشکیل شده نسبت به نمونه حاوی سولفات مس فاقدساتوریا خوزستانیکا معنی دار است

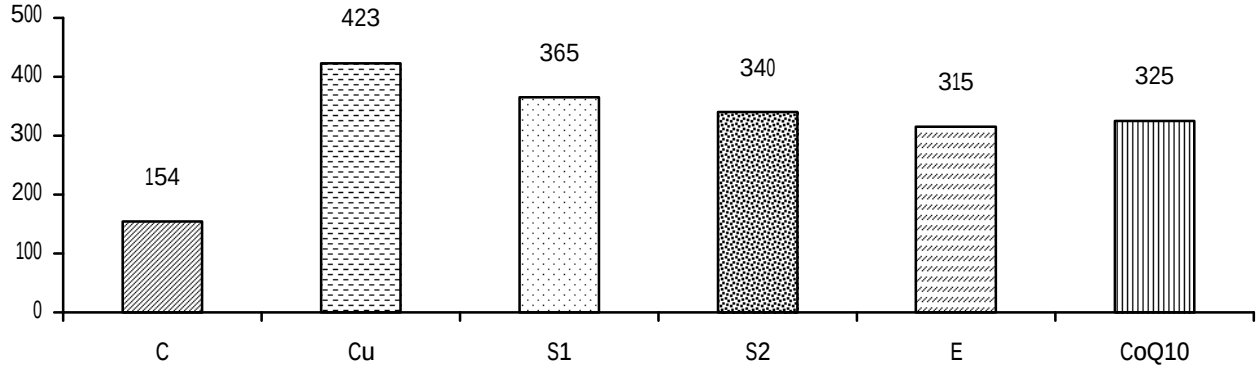


نمودار شماره1- کینتیک اثر ساتوریا خوزستانیکا بر مهار اکسیداسیون LDL در محلول PBS 10 میلی مولار، PH=7/4 در دمای 37 درجه سانتیگراد برای مدت 3 ساعت. هر نقطه میانگین بدست آمده از 3 آزمایش می باشد. (C)) n-LDL; (Cu) Copper + n-LDL ;(S1) +n- LDL ساتوریا خوزستانیکا باغلظت (100µg/dl) ; (S2) n-LDL + ساتوریا خوزستانیکا باغلظت (200µg/dl) ; (E) Vit E n-LDLباغلظت (100µM) ; (CoQ10) n-LDL + کوآنزیم Q10 باغلظت (300nM)



نمودار شماره 2- مقایسه اثر ساتوریا خوزستانیکا بر مهار تشکیل دی ان کونجوگه ناشی از اکسیداسیون LDL. هر نقطه از میانگین بدست آمده از 3 آزمایش می باشد. علامت * نشان دهنده آن است که اثرویبامین E وغلظبهای مخبلف ساتوریا خوزستانیکا نسبت به مس معنی دار است. (C

(n-LDL; Copper + n-LDL (Cu) n-LDL (S1)+ ساتوریا خوزستانیکا باغلظت (100µg/dl) ; n-LDL (S2) + ساتوریا خوزستانیکا باغلظت (200µg/dl) ; Vit E + n-LDL (E)باغلظت (100µM) ; (n-LDL (CoQ10) + کوآنزیم Q10 باغلظت (300nM)



نمودار شماره 3- مقایسه اثر ساتوریا خوزستانیکا بر مهار تشکیل MDA ناشی از اکسیداسیون. LDLهر نقطه از میانگین بدست آمده از 3 آزمایش می باشد. علامت * نشان دهنده آن است که اثرویبامین E وغلظبهای مخبلف ساتوریا خوزستانیکا با غلظت (200µg/dl) نسبت به مس معنی دار است. C)) ;n-LDL Copper + n-LDL (Cu) n-LDL (S1)+ ساتوریا خوزستانیکا باغلظت (100µg/dl) ; n-LDL (S2) + ساتوریا خوزستانیکا باغلظت (200µg/dl) ; Vit E n-LDL + (E)باغلظت (100µM) ; (n-LDL (CoQ10) + کوآنزیم Q10 باغلظت (300nM)

بحث و نتیجه‌گیری

اکسیداسیون LDL در دیواره عروق به عنوان عامل اصلی در پیدایش و توسعه آترواسکلروز می‌باشد (2) . بر اساس مطالعات انجام شده در افراد مبتلا به آترواسکلروز، مقادیر کمتری مواد آنتی‌اکسیدان (نسبت به افراد سالم) وجود دارد (3) . هدف از این مطالعه مقایسه اثر آنتی اکسیدانی ساتوریا خوزستانیکا وویتامین E و کوآنزیم Q10در محیط In vitro است. مس از طریق واکنش فنتون و هابرویس باعث ایجاد رادیکالهای آزاد می شود. احتمالا از این طریق باعث اکسید شدن LDL می شود. بدنبال آن میزان لیپید پراکسیدها و دی انهای کونجوگه افزایش می یابد ومیزان آنتی اکسیدانهای موجود در ساختمان LDL مانند ویتامین E به دلیل تعامل با رادیکالهای آزاد بوجود آمده توسط مس کاهش می یابد. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه ساتوریا خوزستانیکا مانند ویتامین E و کوآنزیم Q10 که آنتی اکسیدانهای شناخته شده ای هستند. به طور معنی دار باعث کاهش دی انهای کونجوگه و TBARSشد. همچنین زمان تاخیری (Lag time) تحت اثرساتوریا خوزستانیکا افزیش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده ساتوریا خوزستانیکا یک آنتی اکسیدان قوی است هر چند تا کنون تحقیقات کمی در مورد ساتوریا خوزستانیکا انجام شده است ولی مطالعاتی اثر ساتوریا خوزستانیکا را در کاهش وزن وچربی وخاصیت ضد انعقادی گزارش داده اند (15-12) . نتایج نشان داد که ساتوریا خوزستانیکا به طور موثری باعث مهار اکسیداسیون LDL می شود و می توان از آن به عنوان یک مکمل غذایی و یا حتی با بررسی بیشتر به عنوان دارو در کاهش ریسک ابتلا به بیماریهای قلبی و عروقی استفاده شود.

با توجه به آنتی اکسیداسیون کوآنزیم Q10 با نتایجی که از این تحقیق بدست می آید می توان مطالعاتی را در جهت بررسی اثر آن در انسان پی‌ریزی نمود، به نحوی که بتوان با استفاده از آن به درمان راحت تر و یا بهبود الگوی زندگی بیماران دیابتی دست یافت.

References

1. Kendler, BS. Garlic (Allium sativum) and onion (Allium cepa): a review of their relationship to cardiovascular disease. Prev Med. 1987; 16 (5): 670-685
2. Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. The journal of biological chemistry. 1997; 272 (34): 20963-20966
3. Ani, M; Moshtaghie, AA; and Ahmadvand, H. Comparative Effects of Copper, Iron, Vanadium and Titanium on Low Density Lipoprotein Oxidation in vitro. IBJ. 2007; 11 (2): 113-118
4. Abdollahi, M; Salehnia, A; Mortazavi, SH; Ebrahimi, M, Shafiee A, Fouladian F, et al. Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of Satureja khuzestanica in rat in vivo: a oxicopharmacological study. Med Sci Monit. 2003; 9: 331–5
5. Haeri, S; Minaie, B; Amin, G; Nikfar, S; Khorasani, R; Esmaily, H; et al. Effect of Satureja khuzestanica essential oil on male rat fertility. Fitoterapia. 2006; 77: 495–499
6. Skocibusic, M; Bezic, N. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two Satureja species essential oils. Phytother Res. 2004; 18: 967–70
7. Petra N, Thomas M, Werner A, Jurgen GO. Simultaneous analysis of coenzyme Q10 in plasma, erythrocytes and platelets: comparison of the antioxidant level in blood cells and their environment in healthy children and after oral supplementation in adults. Clinica Chimica Acta. 2004; 342 (I1-2): 219-226
8. Thomas M, Petra N, Stefan A, Michael W, Bernhard S, Werner A. Simultaneous detection of ubiquinol-10, ubiquinone-10, and tocopherols in human plasma microsamples and macrosamples as a marker of oxidative damage in neonates and infants. Analytical biochemistry. 2000; 282: 209–217
9. Pawan KS, Neelam K, Vince P, Dinender K. On the role of coenzyme Q in cardiovascular
10. Richard, SC; Sunder, RM; Robert, RH; Alan, C. Inhibition of LDL oxidation in vitro but not ex vivo by troglitazone. Diabetes. 1999; 48: 83-790
11. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72: 1/2. 248–254
12. Khursheed, PN; Enrique, B; Maria, AL; Charles, SL. Oxidation of LDL in baboons is increased by alcohol and attenuated by polyenlphosphatidylcholine. Journal of lipid research. 1999; 40: 983-987
13. Seven, A; Civelek, S; Inci, E; Inci, F; Korkut, N; Burccak, G. Biochemical evaluation of oxidative stress in patients with laryngeal carcinoma. Tuurk ORL Arflivi. 1997; 35 (3-4): 88-92
14. Sheu, LU; Chen, PH; Tseng, WC; Chen, CY; Tsai, LY; Huang, YL. Spectrophotometric determination of a thiobarbituric acid-reactive substance in human hair. Analytical sciences. 2003; 19: 958-960