اثر مهاری فراکسیون مؤثر گیاه کنگر (*Gundelia tournefortii* L.) و تعدادی از داروهای ضد دیابتی بر فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز لنز چشم

زینب عصاره و سیف‌الله بهرامی کیا*

خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۲

چکیده

دیابت شیرین در بسیاری از کشورها در سنین ۷۰-۲۰ سالگی علت اصلی کوری، قطع عضو و نارسایی مزمن کلیه محسوب می‌شود. افزایش سطح گلوکز خون و ورود آن به مسیر پلی‌ال یکی از عوامل دخیل در پاتوژنز عوارض مزمن دیابت است. از آنجایی که آنزیم کلیدی در این مسیر آلدوز ردوکتاز است استفاده از ترکیبات گیاهی یا شیمیایی که فعالیت این آنزیم را کاهش دهد، می‌تواند به‌عنوان یک راه درمانی برای جلوگیری از بروز این عوارض مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه اثر عصاره تام و فراکسیون مؤثر گیاه کنگر (Gundelai tourneforti) و هم‌چنین تعدادی از داروهای ضد دیابتی بر روی فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز مورد بررسی قرارگرفت. برای این منظور، ابتدا محتوای فنول و فلاوونویید و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف گیاه تعیین شد. در ادامه لنز چشم گاو استخراج و آنزیم آلدوز ردوکتاز از طریق روش Hayman-Kinoshita جداسازی شد و اثر مهاری ترکیبات مورد نظر روی فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. در آخر، با استفاده از بررسی کینتیک آنزیم، نوع مهار فراکسیون اتیل استاتی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که فراکسیون اتیل‌استاتی دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنول و فلاونوئیدی و بالاترین قدرت جمع کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشد. هم چنین، این فراکسیون دارای بالاترین اثرات مهاری روی فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز با IC50= 0.019 mg/ml است. این فراکسیون با گلیسرآلدهید که سوبسترای آنزیم می‌باشد مهار غیررقابتی و با NADPH مهار رقابتی داشت. مطالعه حاضر روی داروهای ضد دیابتی نشان داد که این داروها تأثیر زیادی بر مهار آنزیم ندارند و احتمالاً روی مکانیسم‌های دیگر درگیر در بیماری دیابت مؤثر هستند.

واژه‌های کلیدی: مسیر پلی ال، آلدوز ردوکتاز، عوارض مزمن دیابت، کنگر، فراکسیون اتیل استاتی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۶۱۴۰۸۲ ، پست الکترونیکی: Bahramikia.s@lu.ac.ir

مقدمه

دیابت شیرین یکی از بیماری‌های پرهزینه و پرخطر در جهان بوده و در بسیاری از کشورها علت اصلی کوری و سردسته‌ی علل قطع عضو و نارسایی مزمن کلیه محسوب می‌شود (۴ و ۲۵). مکانیسم یا مکانیسم‌های اصلی این بیماری هنوز به‌طور کامل و دقیق مشخص نشده است ولی هیپرگلیسمی یا افزایش قندخون به‌عنوان عامل اصلی شروع کننده این بیماری شناخته شده است. از طرفی، ارتباط بین هیپرگلیسمی و استرس اکسیداتیو که از آن به‌عنوان عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و یا نیتروژن و سیستم آنتی اکسیدانی مقابله کننده با آن نام برده می‌شود به اثبات رسیده است (۴). هایپرگلیسمی یا از طریق تولید مستقیم ROS و یا از طریق تغییر در تعادل احیا در استرس اکسیداتیو نقش دارد که مکانیسم این امر شامل: افزایش شار مسیر پلی ال، افزایش تشکیل درون سلولی محصولات انتهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته، فعال‌سازی پروتئین کیناز C و تولید بیش‌ازحد سوپراکسید توسط

زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی می‌باشد (۵و ۲۲). کاتاراکت به‌عنوان یکی از ضایعات ایجادشده در دیابت است و اساساً در اثر تجمع Polyol و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در اپی‌تلیوم و فیبرهای عدسی ایجاد می‌شود (۱۹). مسیر پلی‌ال یکی از مهم‌ترین علل هیپرگلیسمی دیابتی فرض می‌شود زیرا: ۱) این مسیر وقتی فعال می‌شود که غلظت داخل سلولی گلوکز بالا برود ۲) هر دو آنزیم این مسیر در بافت‌ها و اندامهای انسانی که محل بروز عوارض دیابت می‌باشند وجود دارند ۳) محصولات این مسیر و تغییر تعادل کوفاکتورهای آن نوعی استرس سلولی ایجاد می‌کند که این امر می‌تواند زمینه‌ساز و توضیح‌دهنده‌ی عوارض مزمن دیابت باشند (۱۵و ۲۵). در طی مسیر پلی‌ال، که یک فرایند دومرحله‌ای است گلوکز پلاسما به‌راحتی و بدون نیاز به انسولین وارد بافت عدسی شده و در آنجا طی مسیر Polyol و توسط آنزیم آلدوز ردوکتاز و با استفاده از $NADP^+$ به فروکتوز و سوربیتول تبدیل می‌شود. این پلی‌الها قادر به انتشار از غشا نبوده و در داخل عدسی تجمع پیدا می‌کنند. این تجمع باعث ایجاد فشار اسمزی و درنهایت باعث صدمه به این سلول‌ها می‌شود. به‌علاوه، استرس اکسیداتیو به دلیل این‌که پارامترهای اکسیداتیو ازجمله میزان اکسیداسیون پروتئین‌ها در بافت عدسی قابل‌ملاحظه است سهم عمده‌ای در ایجاد کاتاراکت دارد (۷و ۹). آلدوز ردوکتاز (AR2, E.C.1.1.1.21) اولین آنزیم و آنزیم محدود کننده‌ی سرعت در مسیر پلی‌ال است. این آنزیم سیتوزولی احیای گلوکز به سوربیتول را کاتالیز می‌کند (۱۵). در مطالعات مختلفی مشاهده‌شده که تعدادی از مهارکننده‌های آلدوز ردوکتاز، مصنوعی یا طبیعی، برخی از عوارض دیابت را در مدل‌های حیوانی به تأخیر می‌اندازند یا از بروز آن جلوگیری می‌کنند که برخی از آن‌ها در کارآزمایی‌های بالینی هم موردتوجه قرارگرفته‌اند، اما تا به امروز بیشتر مهارکننده‌ای آلدوز ردوکتاز با موفقیت محدودی همراه بوده‌اند برخی از مهارکننده‌های مصنوعی رایج در کارآزمایی‌های بالینی از یک طرف همراه با عوارض جانبی می‌باشند و از طرف دیگر نفوذپذیری کمی در بافتهای هدف مثل شبکیه و نورون دارند (۲۱، ۲۵، ۲۹و۳۰). دو کلاس رایج مهارکننده‌ای آلدوز ردوکتاز که مطالعات زیادی هم روی آن انجام‌شده است عبارتند از: مهارکننده‌های کربوکسیلیک اسیدی مانند ponalrestat، zopolrestat و tolerestat که نفوذپذیری کمی در بافت هدف دارند و مهارکننده‌ای اسپیروایمیدی که نفوذپذیری بیشتری در بافت هدف دارند اما همراه با ازدیاد حساسیت پوستی و سمیت کبدی می‌باشند (۲۱، ۲۵، ۲۹و ۳۰). باتوجه به مطالب ذکرشده، مهارکننده‌های زیادی برای آنزیم آلدوز ردوکتاز سنتز شده و در مراحل تحقیقاتی‌اند، اما باتوجه به اینکه مهارکننده‌ها در بسیاری از مطالعات کینتیکی دارای کارایی پایین، عملکرد مهاری غیرانتخابی در بافتهای مختلف حاوی آنزیم، اثرات نامطلوب فارماکوکینتیکی و عوارض جانبی می‌باشند هنوز نیاز به توسعه مهارکننده‌های جدید مخصوصاً مهارکننده‌هایی با منشأ گیاهی وجود دارد.

گیاه کنگر یک گیاه مقاوم و شیرابه‌دار پوشیده از کرک و با تیغ‌های فراوان است. این گیاه دارای برگهای پهن، ضخیم و متناوب، واجد تقسیمات شانه‌ای عمیق، دارای دندانه‌های منتهی به خاراست. ساقه دراین گیاه ضخیم، ساده و یا منشعب با شاخه‌های کم است. موسم گل‌دهی این گیاه اردیبهشت و خردادماه است و انتشار جغرافیایی وسیعی دارد که شامل مناطق غرب، شمال غرب، جنوب و جنوب شرق ایران می‌شود (۶). در طب سنتی برای ساقه این گیاه خواص محافظتی برای کبد و تصفیه خون ذکر شده است. همچنین خواص کنگر را شبیه کنگر فرنگی (*Synara scolymus*) ذکر نموده و معتقدند که برای کاهش چربی‌های خون به‌ویژه کلسترول مفید است (۱۱). در طب سنتی ترکیه از دانه‌ی خشک‌شده این گیاه برای درمان بیماری پیسی استفاده می‌شود، حال‌آنکه برگهای تازه آن ادرارآور است. همچنین در کشور ترکیه به‌صورت سنتی، از ساقه آن برای درمان اسهال، درد معده، برونشیت، سنگ

کلیه، آماس گردن و التهاب استفاده می‌شود (۲۳). در اردن نیز مردم محلی از گیاه کنگر برای درمان دیابت استفاده می‌کنند (۹). نتایج حاصل از یک پژوهش در ایران نظریه طب سنتی درباره اثرات محافظتی هپاتوسیت و اثرات مفید کنگر در درمان بیماری‌های کبدی را تأیید می‌نماید (۱۱). در پژوهش دیگری در ترکیه نشان داده‌شده است که عصاره متانولی قسمت‌های هوایی و دانه این گیاه خاصیت آنتی اکسیدانی قابل‌توجهی نسبت به آلفا توکوفرول دارد، علاوه براین عصاره دارای اثر مهاری بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز می‌باشد (۶). آنها نشان دادند محتوی پلی فنلیک دانه گیاه بیشتر از قسمت‌های هوایی آن است و درنتیجه خاصیت آنتی اکسیدانی دانه از سایر قسمت‌ها بیشتر است. تأثیر گیاه کنگر در کاهش خطر بیماری‌های قلبی عروقی به‌واسطه فاکتورهای بیوشیمیایی مؤثر در آترواسکلروزیس نظیر کلسترول و آپولیپوپروتئین‌ها به اثبات رسیده است پژوهشی دیگر اثرات ضد درد و ضدالتهابی گیاه کنگر اثبات‌شده است (۱۱). دراین تحقیق جهت بررسی بیشتر در ارتباط با مکانیسم یا مکانیسم‌های ضد دیابتی گیاه کنگر، تأثیر فراکسیون مؤثر این گیاه بر فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز تخلیص شده جزئی از عدسی گاو و تعیین مکانیسم مهاری مورد مطالعه قرارگرفت. درکنار این مطالعه تأثیر احتمالی چند داروی ضد دیابتی مورداستفاده در بیماران دیابتی نوع ۲ روی فعالیت آنزیم نیز موردبررسی قرارگرفت.

مواد و روشها

جمع‌آوری گیاه کنگر(*Gundelia tournefortii*): قسمت مورداستفاده گیاه دراین تحقیق ساقه زیرزمینی آن است که از زمینهای شهرستان نورآباد واقع در استان لرستان در اردیبهشت‌ماه و خردادماه سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری گردید و توسط دکتر خدایاری(دانشگاه لرستان، ایران) شناسایی و با کد Lu120 در هرباریوم دانشگاه لرستان ثبت شد. ساقه‌های جمع‌آوری شده به منظور رفع آلودگی و گل‌ولای چسبیده به آنها شسته شده و در سایه به دور از نور آفتاب خشک گردید پس از خشک شدن گیاه را آسیاب نموده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

عصاره گیری گیاه و تهیه عصاره تام و فراکسیون‌های آلی: جهت عصاره‌گیری این گیاه از روش خیساندن (maceration) استفاده شد.۲۵۰ گرم از گیاه خشک‌شده در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد خیسانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط نگهداری گردید سپس عصاره صاف شده و در یک ارلن نگهداری شد (۱). این عمل سه مرتبه دیگر تکرار شد. در پایان عصاره جمع‌آوری شده یک‌بار دیگر از صافی عبور داده شد و با دستگاه روتاری (IKA، آلمان) حلال آلی آن تبخیر شد. عصاره آبی باقیمانده توسط دستگاه فریز درایر (Christ، آلمان)، خشک گردید. عصاره خشک شده تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (عصاره تام). برای تهیه فراکسیونهای آلی از دو حلال دی اتیل اتر و اتیل استات استفاده گردید. عصاره تام بااستفاده ازاین دو حلال و به وسیله دکانتور فراکسیونه شد. هربار فراکسیون، سه مرتبه تکرار شد. در پایان فراکسیون‌های دی اتیل اتری، اتیل استاتی و باقیماندهی آبی به دست آمد که با حذف حلال آلی توسط دستگاه روتاری و قراردادن در انکوباتور کاملاً خشک شدند. فراکسیون‌های حاصله تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

تعیین مقدار کل فنول‌ها: محتوای کل ترکیبات فنولی در عصاره تام و فراکسیونهای گیاه *Gundelia tournefortii* با معرف فولین (FCR) مطابق روش‌های منتشر شده تعیین شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه گیاهی و گالیک اسید به‌عنوان استاندارد با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰) و بعد با ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد مخلوط کردیم. پس از ۹۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد.

نتایج بر اساس میزان میلی‌گرم گالیک اسید معادل هر گرم از عصاره یا فراکسیون خشک شده بیان شد (۳ و ۲۴).

تعیین محتوای کل فلاونوییدها: محتوای کل فلاونوییدهای عصاره تام و فراکسیونهای گیاه کنگر توسط روش کالریمتری توصیف شده در مقالات علمی سنجیده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه گیاهی و کاتچین به‌عنوان استاندارد با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و به دنبال آن با ۰/۱۵میلی‌لیتر محلول سدیم نیتریت ۱۵ درصد مخلوط گردید. پس از ۶ دقیقه، ۰/۱۵ محلول آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد اضافه شد. بعد از ۶ دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۴ درصد و پس‌ازآن بلافاصله ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و حجم نهایی به ۵ لیتر رسید. پس از ۱۵ دقیقه انکوبه کردن در دمای اتاق، جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر در مقابل بلانک (آب مقطر) خوانده شد. نتایج براساس میلی‌گرم کاتچین معادل هر گرم از عصاره یا فراکسیون خشک شده بیان شد (۳۱).

سنجش میزان فعالیت جمع‌آوری رادیکال‌های DPPH: دی فنیل پیکریل هیدرازیل DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر دارای حداکثر جذب نوری است. این ترکیب به رنگ بنفش بوده که در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان احیاشده و به رنگ زرد درمی‌آید و درنتیجه جذب آن کاهش می‌یابد که این امر بیانگر قدرت احیاکنندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدان است. آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق دادن الکترون یا پروتون باعث احیای DPPHمی‌گردند. سنجش فعالیت جمع‌آوری رادیکالهای آزاد توسط عصاره تام و فراکسیونها بر اساس روش Blios صورت گرفت (۴). به این منظور یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف داروها (۲۵۰-۵۰) میکروگرم بر میکرولیتر تهیه شد و به هر کدام، یک میلی‌لیتر محلول DPPH 2/0 میلی مولار که دراتانول حل شده بود افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه کاهش جذب نمونه‌ها به علت خاصیت پروتون دهندگی در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد.

تهیه نمونه‌های لنز و عصاره گیری: ۲۰ عدد چشم گوساله از کشتارگاه خرم‌آباد تهیه شد، بلافاصله بعد از تهیه، لنزها از آن خارج شد. لنزها را با آب مقطر شستشو داده سپس وزن کرده و تا موقع استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. برای تخلیص آنزیم، لنزها را در هاون چینی روی یخ کاملاً کوبیده شدند، سپس پنج برابر حجم اولیه آب مقطر اضافه و با پوتر کاملاً یکنواخت و هموژن شد. سپس به منظور جداسازی پروتئین‌های نامحلول به مدت ۲۰دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ گرم در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد مایع رویی جدا و از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ مجدداً سانتریفیوژ گردید (۱۰).

رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات و دیالیز: بیشتر پروتئین‌ها در غلظت بالای نمک حلالیت کمتری دارند. غلظتی از نمک که یک پروتئین در آن رسوب می‌کند معمولاً برای هر پروتئین متفاوت از سایر پروتئین‌هاست. ازاین‌رو، رسوب‌دهی بانمک می‌تواند سبب تفکیک پروتئین‌ها از یکدیگر گردد. برای رسوب‌دهی بیشتر از نمک‌هایی چون سولفات آمونیوم استفاده گردید. دراین مطالعه آمونیوم سولفات خشک تا غلظت اشباع ۴۰ درصد بتدریج به نمونه مرحله قبل اضافه شد و به مدت یک شبانه‌روز در یخچال گذاشته، سپس به مدت ۲۰دقیقه و سرعت ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شد. در این مرحله مایع رویی را برداشته و سپس آمونیوم سولفات خشک تا غلظت اشباع ۵۰ درصد اضافه کرده و به مدت یک شبانه‌روز روی استیرر در یخچال گذاشته، سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شد. در این مرحله مایع رویی را برداشته و توسط آمونیوم سولفات خشک به غلظت اشباع ۷۵ درصد رسانده شد. بعد مخلوط را به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفیوژ کرده، آنزیم مورد مطالعه در این مرحله رسوب کرد، رسوب در حجم کمی از همان بافر حل و برای دیالیز آماده شد (۱۰). برای این کار ابتدا کیسه دیالیز با آب مقطر چندین مرتبه شسته شد. سپس پنج دقیقه

در آب مقطر جوشانده شد و مجدداً چند مرتبه با آب مقطر شسته شدند. نمونه را در کیسه ریخته و در آن محکم بسته شد. سپس برای ۷۲ ساعت در مقابل حجم بالایی از بافر پتاسیم دیالیز گردید. برای دیالیز بهتر چندین مرتبه بافر دیالیز تعویض شد. بعد از اتمام کار کیسه مجدداً شسته شده و درون اتانول ۱۲ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. لازم به ذکر است که کیسه‌های دیالیز مورد استفاده در کل مراحل تخلیص، دارای قطر منافذ ۱۰ کیلو دالتون بودند (۷).

سنجش فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز: اساس سنجش فعالیت ردوکتازی آنزیم بدین‌صورت است که NADPH توسط آنزیم به $NADP^+$ تبدیل می‌شود. لذا با توجه به کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر فعالیت آنزیم سنجیده می‌شود (۹). در سنجش آنزیمی از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد. جهت انجام سنجش فعالیت آنزیم از گلیسرآلدهید با غلظت ۰/۱ میلی مولار و NADPH با غلظت ۰/۶ میلی مولار و بافر فسفات ۵۰۰ میلی مولار با pH=۶/۲ استفاده شد. و سپس محلول آنزیمی به سل حاوی مواد ذکرشده اضافه گردید و تغییرات در مقابل زمان در چند دقیقه اول مشاهده و ثبت شد. جهت بررسی درستی نتایج به‌دست‌آمده در سنجش فعالیت آنزیم در تستی دیگری آنزیم از مواد ذکر شده حذف شد که طبق انتظار این تغییر باعث شد هیچ‌گونه تغییری در جذب دیده نشود و در تستی دیگر سوبسترا یعنی گلیسرآلدهید حذف شد که در نتیجه‌ی این حذف نیز تغییر جذب به صفر رسید (۱۶).

بررسی اثر مهاری عصاره، فراکسیون‌های مختلف و داروهای ضد دیابتی بر فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز و تعیین IC50: جهت بررسی قدرت مهاری ترکیبات، در حضور غلظتهای اشباع از هر دو سوبسترای گلیسرآلدهید (۱۰۰میکرولیتر) و NADPH (۱۰۰ میکرولیتر) و رقت‌های مختلف (۰/۱ – ۰/۰۰۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) از ترکیبات، عصاره و فراکسیون‌های مختلف گیاه با آنزیم (۱۰۰میکرولیتر) مجاور شد و فعالیت آنزیم در مقایسه با کنترل که فاقد مهارکننده بود با سه بار تکرار اندازه‌گیری شد و به‌وسیله‌ی رسم نمودار غلظتی که ۵۰ درصد فعالیت آنزیم را مهار می‌کرد مقدار IC50 مشخص شد.

تعیین نوع مهار توسط فراکسیون اتیل استاتی: IC50 به‌دست‌آمده برای فراکسیون اتیل استاتی را به‌صورت ثابت در نظر گرفته و سپس یک‌بار غلظت افزایشی (۱–۰/۱ میلی مولار) NADPH در حضور غلظت اشباع گلیسرآلدهید (۰/۱ میلی مولار) و یک‌بار از غلظت افزایشی گلیسرآلدهید (۱– ۰/۱ میلی مولار) در حضور غلظت اشباع NADPH (۰/۶میلی مولار) فعالیت آنزیم محاسبه شد.

آنالیزهای آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از آزمونt تست انجام شدند. تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین±SD بیان شدند. داده‌ها زمانی معنی‌دار بودند که $P < ۰/۰۵$ به دست آمد.

نتایج

تعیین محتوای کل فنول و فلاونویید عصاره تام و فراکسیون‌ها: میزان محتوای کلی ترکیبات فنولی و فلاوونوییدی در عصاره و فراکسیون‌های مختلف گیاه *Gundelia tournefortii* معادل میزان میلی‌گرم گالیک اسید (به‌عنوان فنولیک استاندارد) و کاتچین (به‌عنوان فلاوونوئید استاندارد) در گرم ماده خشک عصاره و فراکسیون‌های گیاه بیان شده است. درمیان این فراکسیون‌ها و عصاره هیدروالکلی، فراکسیون اتیل استاتی بیشترین مقدار ترکیبات فنول و فلاونوئید را با ۳۰۳/۲۰ میلی‌گرم گالیک اسید به ازای هرگرم از فراکسیون خشک شده و ۳۳۵/۸۴ میلی‌گرم کاتچین معادل هر گرم از فراکسیون خشک شده را به ترتیب نشان می‌دهد (جدول ۱).

جدول ۱- تعیین محتوای فنولی و فلاونوئیدی عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف گیاه کنگر

نمونه	مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی‌گرم گالیک اسید معادل گرم وزن خشک گیاه)	مقدار کل ترکیبات فلاوونوییدی[b] (میلی‌گرم کاتچین معادل گرم وزن خشک گیاه)
عصاره تام	۱۰۷/۲ ± ۱/۳۱	۲۱/۸۲ ±۱/۰۶
فراکسیون دی اتیل اتر	۷۴/۱۵ ± ۰/۸۳	۲۲/۰ ±۱/۵۹
فراکسیون اتیل استات	۳۳۵/۸۴ ±۳/۴۷	۳۰۳/۲±۴/۷
فراکسیون آبی	۹۵/۰۸ ±۰/۷۱	۱۱/۷±۰/۵۳

نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD می‌باشد.

فعالیت جمع‌آوری کنندگی رادیکالهای DPPH: پایه و اساس این روش این است که رادیکال DPPH به‌عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول دهنده مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند که در نتیجه آن DPPH به $DPPH_2$ تبدیل می‌شود در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود بنابراین شدت جذب در ۵۱۵ نانومتر کاهش می‌یابد. ازروی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به وسیله طیف‌سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن پی برد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود فراکسیون اتیل استاتی در بین همه فراکسیون‌ها بیشترین میزان جمع‌آوری‌کنندگی رادیکال‌های DPPH را دارد. در بین داروهای ضد دیابتی گلی‌کلازید بیشترین درصد مهار DPPH را دارا می‌باشد که قابل‌مقایسه با فراکسیون اتیل استاتی و ویتامین ث می‌باشد. در زمان انجام این آزمایش به‌محض اضافه کردن گلی‌کلازید رنگ DPPH از بنفش به زرد تغییر کرد که نشانگر قدرت بالای آنتی اکسیدانی گلی‌کلازید می‌باشد.

محاسبه‌ی فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز: جهت انجام این تست، ابتدا آنزیم تخلیص گردید، مراحل تخلیص جزئی آنزیم آلدوز ردوکتاز طبق روش ذکر شده انجام شد. سپس آنزیم به روش لوری در سال ۱۹۵۱ (۱۵) تعیین غلظت گردید تا بتوان از این طریق فعالیت آنزیم را محاسبه نمود. فعالیت آنزیم با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده با سه بار تکرار به شرح زیر بود:

فعالیت آنزیم = ۰/۲۹۶۶ ± ۰/۰۲۰ mU

تعیین مقدار IC50 عصاره تام، فراکسیون‌های مختلف و داروهای ضد دیابتی برای مهار آنزیم آلدوز ردوکتاز: همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است در بین عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف گیاه کنگر، فراکسیون اتیل‌استاتی با IC_{50} ۰/۰۱۹ mg/ml بیشترین اثرات مهاری را روی فعالیت آلدوز ردوکتاز نشان داد. همه داروهای ضد دیابتی اثرات بسیار کمی را نسبت به گیاه‌نشان دادند. به همین علت آزمایشات در مورد داروها دراین مرحله متوقف شد. از شواهد به دست آمده می‌توان این نتیجه را گرفت که این داروها بر مکانیسم‌های دیگر دیابت مؤثر هستند و از آن طریق موجب جلوگیری از عوارض دیابت می‌شوند به دلیل اینکه فراکسیون اتیل استاتی دارای بیشترین محتوای فنولی و بیشترین قدرت جمع‌آوری کنندگی DPPH و کم‌ترین IC_{50} می‌باشد، جهت بررسی مکانیسم مهاری در مابقی آزمایشات، فقط فراکسیون اتیل استاتی مورد بررسی قرارگرفت.

تعیین نوع مهار آلدوز ردوکتاز توسط فراکسیون اتیل‌استاتی: نوع مهار با سوبسترای گلیسرآلدهید: نتایج نشان داد که در حضور غلظت ثابت از مهارکننده، افزایش غلظت گلیسرآلدهید نتوانست بر مهار آنزیم فایق آید و فعالیت آنزیم افزایش مجدد نشان داد. بنابراین مهار آلدوز ردوکتاز توسط فراکسیون اتیل‌استاتی از نوع غیررقابتی می‌باشد (جدول ۴).

جدول ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف فراکسیون‌های مختلف گیاه کنگر (µg/ml ۲۰۰-۵۰)در جمع‌آوری و خنثی کردن رادیکال‌های DPPH.

نوع فراکسیون	فعالیت جمع کنندگی رادیکال‌های DPPH (درصد مهار) غلظت‌ها (µg/ml) ۵۰	۱۰۰	۲۰۰	IC_{50} (µg/ml)
فراکسیون دی اتیل اتر	۱۲/۱ ± ۱/۹	۲۳,۷ ± ۱,۷	۴۹,۳ ± ۲/۱	۲۰۴ ±۳/۱
فراکسیون اتیل استات	۹۱,۷ ± ۱/۱	۹۳/۲ ± ۴/۲	۹۴/۸ ± ۲/۴	>۵
فراکسیون آبی	۴/۶ ± ۰/۲	۱۱/۵ ± ۰/۵	۲۶/۴ ± ۲/۰	۳۶۷±۳/۵
گلی کلازید	۸۶/۶۲±۲/۳	–	۸۹/۸۵±۱/۱	۱۱/۲±۱/۱
آکاربوز	۰/۰۹±۰/۰۱	–	۱۰/۷۹±۱/۰	۸۷۰±۱۵/۱
گلی بنکلامید	۸/۶۰±۱/۱	–	۱/۲±۰/۱	–
پیوگلیتازون	۱۱/۳۴±۲/۱	–	۲/۰۲±۰/۴	–
ویتامین ث	-	-	-	۳/۵ ±۱/۸

نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل ± SD می‌باشد

جدول ۳- مقایسه‌ی IC_{50} های عصاره تام، فراکسیونهای مختلف گیاه کنگر و تعدادی از داروهای ضد دیابتی برای مهار فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز

نمونه	IC_{50} µg/ml
فراکسیون اتیل استاتی	۱۹±۲/۱
عصاره تام	۹۵۰±۱۵/۴
فراکسیون دی‌تیل‌اتری	۱۱۴۰±۲۱/۲
گلی کلازید	۱۲۵۰±۱۲/۲
آکاربوز	۱۴۵۰±۱۰/۲
پیوگلیتازون	۱۵۲۰±۳۵/۱
گلی‌بنکلامید	۲۱۲۰±۱۱/۲

نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل ± SD می‌باشد

در این نوع مهار، مهارکننده توانایی اتصال به آنزیم آزاد و کمپلکس آنزیم–سوبسترا را دارد. چون مهارکننده به جایگاهی غیر از جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود، بنابراین افزایش غلظت سوبسترا تأثیری در برگشت مهار ندارد و باوجود اینکه کمپلکس آنزیم – سوبسترا در غلظت بالا تشکیل شده است، افزایش تولید محصول را نخواهیم داشت، زیرا اتصال مهارکننده سبب تغییر ساختمان آنزیم می‌شود. در این نوع مهار V_{max} کاهش می‌یابد و K_m ثابت می‌ماند.

جدول ۴- فعالیت آلدوز ردوکتاز[AR2] در حضور غلظت اشباع NADPH [0/6Mm] و غلظت‌های افزایشی گلیسرآلدهید در حضور غلظت ۰/۰۱۹ mg/ml (معادل IC_{50}) فراکسیون اتیل استاتی

فراکسیون اتیل‌استاتی(mg/ml)	غلظت گلیسرآلدهید (mM)	فعالیت آلدوز ردوکتاز (mU)
۰/۰۱۹	۰/۲	۰/۸۹±۰/۰۹
۰/۰۱۹	۰/۵	۰/۸۴±۰/۰۲
۰/۰۱۹	۱	۰/۶۸±۰/۰۵

نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل ± SD می‌باشد

نوع مهار با سوبسترای NADPH: همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، در حضور غلظت ثابت از مهارکننده، افزایش غلظت NADPH منجر به برگشت مهار شد. با افزایش غلظت NADPH فعالیت آنزیم افزایش نشان داد. بنابراین مهارکننده با NADPH در رقابت بوده و مهارکننده و NADPH برای اتصال به جایگاه فعال با یکدیگر رقابت می‌کنند. بنابراین با افزایش غلظت سوبسترا اثر مهارکننده کاهش می‌یابد. در این مهار رقابتی V_{max} ثابت و K_m افزایش می‌یابد.

جدول ۵- فعالیت آلدوز ردوکتاز [AR2] در حضور غلظت اشباع گلیسرآلدهید[Mm 0/1] و غلظت‌های افزایشی NADPH در حضور غلظت 0/019mg/ml (معادل IC_{50}) فراکسیون اتیل استاتی

فراکسیون اتیل‌استاتی(mg/ml)	غلظت NADPH (mM)	فعالیت آلدوز ردوکتاز (mU)
۰/۰۱۹	۰/۶	۰/۵۲±۰/۶
۰/۰۱۹	۱	۱/۱۰±۰/۱۰
۰/۰۱۹	۲	۲/۰۲±۰/۱۲

نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل ± SD می‌باشد

بحث و نتیجه‌گیری

کاتاراکت به‌عنوان یکی از ضایعات ایجادشده در دیابت بوده و اساساً بوسیله تجمع Polyol و گلایکه شدن پروتئین‌ها در اپی‌تلیوم و فیبرهای عدسی ایجاد می‌شود (۸و ۲۰). مسیر پلی‌ال به‌عنوان یکی از مهم‌ترین کاندیدهای علل عوارض مزمن و تأخیری دیابت مطرح می‌شود و همانگونه که بیان شد آنزیم آلدوز ردوکتاز آنزیم کلیدی و محدودکننده‌ی سرعت دراین مسیر محسوب می‌شود و مهار این آنزیم می‌تواند در جلوگیری از شروع یا در کند کردن مسیر پیشرفت عوارض مزمن دیابت نقش زیادی داشته باشد. از طرفی دیگر بین فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز و استرس اکسیداتیو که از آن به‌عنوان عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از یک سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مقابله کننده با آن یاد می‌شود ارتباط مستقیمی وجود دارد. افزایش فعالیت آلدوز ردوکتاز باعث استرس اکسیداتیو همراه با دیابت در لنز، عصب محیطی و قشر کلیه از طریق از بین بردن آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی عمده، آسکوربات، تائورین و تغییرات مربوط به سطح ردوکس گلوتاتیون می‌شود (۱۷و ۱۸). یکی دیگر از اهداف رادیکال‌های آزاد در بدن تأثیر آنها بر فعالیت آنزیم گلیسرآلدهید۳-فسفات دهیدروژناز می‌باشد، این آنزیم یکی از آنزیم‌های مهم مسیر گلیکولیز می‌باشد و تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد غیرفعال می‌شود و تحت این شرایط مسیر گلیکولیز متوقف می‌شود. در نتیجه، در افراد دیابتی در شرایط هیپرگلیسمی، گلوکز و مشتقات آن به سمت مسیرهای دیگر اشاره‌شده در مقدمه خواهند رفت و باعث ایجاد مکانیسم‌های مختلف درگیر در عوارض مزمن دیابت خواهند شد (۵ و ۲۶). یکی از مهم‌ترین مسیرهای درگیر، مسیر پلی‌ال می‌باشد دراین مسیر گلوکزی را که نتوانسته وارد مسیر گلیکولیز شود توسط آنزیم آلدوز ردوکتاز به سوربیتول تبدیل مس شود. که تجمع سوربیتول باعث عوارضی مثل کاتاراکت می‌شود. باتوجه به این واقعیات، یکی از استراتژی‌های مهم برای کاهش عوارض مزمن دیابت، استفاده از مهارکننده‌های آنتی اکسیدانی که هم بتواند تولید رادیکال‌های آزاد را در داخل سلول کاهش دهد و متعاقب آن آنزیم گلیسرآلدهید۳-فسفات دهیدروژناز و مسیر گلیگولیز مجدداً فعال شود و هم بتواند به‌طور مستقیم آنزیم آلدوزردکتاز را مهار نماید و ازاین طریق مکانیسم پلی‌ال را کاهش دهد می‌باشد. اولین مطالعات جهت مهار آنزیم آلدوز ردوکتاز در دهه‌ی ۱۹۶۰ با بررسیTMG آغاز شد. اما مطالعات و کارآزمایی‌های بالینی با مهارکننده‌های سنتتیک تاکنون با موفقیت کمی همراه بوده است (۱۸). لذا، مطالعات جدید در راستای نتایج مطالعه وارما و همکارانش در دهه ۱۹۸۰ با هدف دستیابی به سنتز مشتقاتی که با الگو گرفتن از مهارکننده‌های طبیعی آلدوز ردوکتاز به جهت عوارض کمتر استوار می‌باشند صورت می‌گیرد (۱۲، ۲۷و ۲۸). مهارکننده‌های آلدوز ردوکتاز به دو دسته‌ی گیاهی و سنتتیک تقسیم می‌شوند. در این تحقیق به بررسی و مقایسه تعدادی از این ترکیبات سنتزی که در داروخانه‌ها برای درمان بیماری دیابت مورد استفاده قرار می‌گیرند و عصاره

و فراکسیونهای مختلف گیاه کنگر به‌عنوان یک گروه از ترکیبات گیاهی پرداخته شد.

در ابتدا، برای بررسی توانایی آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف و عصاره و فراکسیون‌های مختلف گیاه کنگر از تست DPPH استفاده شد. در تستDPPH، توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها در جمع‌آوری رادیکال‌های DPPH طور مستقیمی در ارتباط باقدرت هیدروژن دهندگی(Hydrogen-donating ability) آنهاست (۴). همانطور که در نتایج نشان داده شده است در بین فراکسیون‌های مختلف گیاه *G. tournefortii*، فراکسیون اتیل استاتی دارای بالاترین پتانسیل جمع‌کنندگی رادیکالهای DPPH است. از طرفی این فراکسیون دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. باتوجه به توانایی ترکیبات فنولی در انتقال هیدروژن منطقی است که فراکسیون اتیل استاتی بیشترین پتانسیل را در جمع‌آوری این رادیکال‌های آزاد داشته باشد (۲). در بین داروهای سنتزی، گلی‌کلازید بیشترین درصد مهار DPPH را دارا می‌باشد که قابل‌مقایسه با فراکسیون اتیل استاتی و ویتامین ث می‌باشد. همان‌طور که بیان شد ویژگی اول مهارکننده‌های آنزیمی یعنی خاصیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله این ترکیبات و گیاه کنگر مورد تأیید قرارگرفت. در قسمت دوم مطالعه تأثیر فراکسیونهای مؤثر گیاه روی مهار آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از تأثیر همه فراکسیون‌های گیاه روی مهار آنزیم آلدوز ردوکتاز ولی با نسبت‌های مختلف داشت. فراکسیون اتیل استاتی با داشتن بیشترین ترکیبات فنولی و فلاوونوییدی و بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارای بیشترین اثرات مهاری بود. به همین دلیل، ادامه مطالعات به بررسی مکانیسم اثرات مهاری این فراکسیون محدود شد. در بین داروها، هیچکدام اثر قابل‌توجه و معناداری را روی مهار آنزیم از خود نشان ندادند.

تحقیقات مختلف در ارتباط با آنزیم آلدوز ردوکتاز نشان داده است که مکانیسم عمل آنزیم در احیاء آلدهیدها به کمک اتصال به NADPH و سوبسترا انجام می‌شود، اتصال به NADPH باعث ایجاد یک تغییر ساختاری در جایگاه فعال آنزیم می‌شود. سپس با انتقال هیدروژن NADPH به کربن کربونیل سوبسترا الکل تولید می‌شود، بعد از الکل تغییر ساختمانی دیگری در آنزیم به منظور آزادسازی $NADP^+$ انجام می‌شود (۱۳). همانطور که در بخش نتایج مشاهده شد فراکسیون اتیل‌استاتی دارای مهار رقابتی با NADPH می‌باشد و باتوجه به مطالعات انجام‌شده و آزمایشات به عمل آمده مشخص شد که این فراکسیون دارای بیشترین محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد. از طرفی دیگر، مطالعات مختلف نشان داده است که ترکیبات فلاوونوییدی اثرات مهاری شدیدی را در فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز دارند. احتمال داده شده است که ترکیبات فنولی به‌جای NADPH در جایگاه فعال قرار می‌گیرند و مانع از انتقال هیدروژن از NADPH به سوبسترا می‌شوند و از این طریق آنزیم آلدوز ردوکتاز غیرفعال می‌شود و مسیر پلی‌ال پیشروی نمی‌کند (۲۵). از طرفی دیگر، بررسی حاضر مشخص نمود که نوع مهار آنزیم آلدوزردوکتاز بوسیله‌ی فراکسیون اتیل استاتی کنگر در کنار مهار رقابتی با NADPH، مهار غیررقابتی با گلیسرآلدهید را نیز نشان می‌دهد. باتوجه به اینکه عوارض ناشی از فعالیت افزایش‌یافته مسیر پلی‌ال مربوط به شرایط هایپرگلیسمی می‌باشد و قندها به‌عنوان سوبسترای اصلی آلدوز ردوکتاز می‌باشند، این مهار غیررقابتی با گلیسرآلدهید یک مزیت برای این مهارکننده محسوب می‌شود زیرا حتی با افزایش شدیدتر قند خون این اثر مهاری برنمی‌گردد. در بین مهارکننده‌های آلدوز ردوکتاز نیز، مهارکننده‌های مؤثرتر مهارکننده‌های غیررقابتی بوده‌اند، روتین یک بیوفلاونویید طبیعی و مشتقاتی از تری آزولیدین دیون به‌عنوان مهارکننده‌های غیررقابتی مؤثر برای آلدوز ردوکتاز شناسایی شد (۱۳و ۱۴).

به‌طور کلی، تحلیل نتایج حاضر دو نتیجه‌گیری جالب را در پی داشت: ۱) عصاره و فراکسیونهای گیاهی با داشتن

بیشترین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قویتری هستند ۲) ارتباط مستقیمی بین توانایی آنتی اکسیدانی و مهار مکانیسم‌های ایجاد دیابت وجود دارد ولی این مطلب بدان معنی نیست که همه ترکیبات آنتی اکسیدانی دارای اثرات مهاری روی آنزیم آلدوزردوکتار می‌باشند همانطور که داروهای ضد دیابتی مورد مطالعه قرارگرفته در این تحقیق باوجود ویژگی آنتی اکسیدانی قوی، فاقد اثرات مهاری قابل‌توجهی بودند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان که با حمایت مالی امکان انجام این تحقیق را فراهم آورده‌اند تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

منابع

۱- کاروی، ع.، شاهانی پور، ک.، و منجمی، ر.، ۱۳۹۶. مقایسه اثر آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی و هیدروالکلی گیاه سداب (*Ruta graveolens*) بر رده سلولی سرطان پروستات (DU145)، مجله پژوهشهای جانوری، جلد ۳۰، شماره ۳، صفحات ۳۳۵-۳۴۵.

۲- خسروی، م.، خاکپور، ش.، جعفری مرندی، س.، و احدی عالی، م.، ۱۳۹۴. اثر ضدالتهابی اسانس مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L) درموش کوچک آزمایشگاهی نر، مجله پژوهشهای جانوری، جلد ۲۸، شماره ۲، صفحات ۱۵۴-۱۶۰.

3- Bahramikia, S., Yazdanparast, R., and Ardestani, A., 2009. Protective effects of some Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. Food. Chem, 115, PP: 37-42.

4- Blois, M. S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181, PP: 1199-1200.

5- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, 414, PP: 813–820.

6- Coruh, N., Sag hdicog lu Celep, A. G., Ozgpkce, F., and Iscan, M., 2007. Antioxidant capacities of G. Tournefortii L. extracts and inhibition on glutathione-s-transferase activity. Food. Chem, 100, PP: 1249-1253.

7- Dunn, M. J., 1992. Protein determination of total protein concentration, in protein purification methods. S. Angel , Editor, Oxford.

8- Egerman, R. L., and Kern, T. S., 1993. Aldose reductase inhibition fails to prevent retinopathy in diabetic gogoctosemic dogs. Diabetes, 42(6), PP: 820-825

9- Hamdan, I. I., and Afifi, F. U., 2004. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. J. Ethnopharmacol, 93, PP: 117-121.

10- Hayman, S., and Kinoshita, J. H., 1946. Isolation and properties of Lens Aldose Reductase, J Biol chem, 204, PP: 877-882.

11- Jamshidzadeh, A., Fereidooni, F., and Salehi Niknahad, H., 2005. Hepatoprotective activity of Gundelia tourenfortii. J. Ethnopharmacol, 101, PP: 233-237.

12- Kato, A., 2008. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. Food. Chem, 56 (17), PP: 8206- 8211.

13- Kim, J. K., 2011. Inhibition of aldose reductase by phenylethanoid glycoside isolated from the seeds of Paulownia coreana. Biol Pharm Bull, 34(1), PP: 160-163.

14- Lee, Y. S., 2005. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O-beta-D-glucoside from Salicornia herbacea on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. Biol Pharm Bull, 28(5), PP: 916-918.

15- Lee, Y. S., Kim, S. H., Jung, S. H., Kim, J. K., Pan, C. H., and Lim, S. S., 2010. Aldose reductase inhibitory compounds from Glycyrrhiza uralensis. Biol Pharm Bull, 33(5), PP: 917-921.

16- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., and Far, A. L., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem, 193, PP: 265-275.

17- Obrosova, I. G., 2002. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve, Int Rev Neurobiol, 50, PP: 33-35.

18- Obrosova, I. G., 2005. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in

tissue sites for diabetic complications. Antioxid Redox Signal, 7(11-12), PP: 1543-1552.

19- Obrosova, I. G., Chung, S. S., and Kador, P. F., 2010. Diabetic cataracts: mechanisms and management. Diabetes Metab Res Rev, 26(3), PP: 172-180.

20- Pfeifer, M. A., and Schumer, M. P., 1997. Aldose reductase inhibitors: the end of an era or the need for different trial designs, Diabetes, 46 Suppl 2, PP: S82-9.

21- Raskin, P., Rosenstock, J., 1987. Aldose reductase inhibitors and diabetic complications. Am J Med 83(2)PP: 298-306.

22- Rosen, P., Nawroth, P. P., King, G., Moller, W., Tritschlev, H. J., and Packer, L., 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complication. Diabetes, Metab, Res, Rev, 17, PP: 189-212.

23- Sarper, F., Akadin, G., Simsek, I., and Yesildad, E., 2009. An ethnobotanical field survey in the haymana district of Ankara Province in Turkey. Turk. J Biol, 33, PP: 79-88.

24- Slinkard, J., and Singleton, V. L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Viticult, 28, PP: 49-55.

25- Tang, W. H., Martin, K. A., and Hwa, J., 2012. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. Front Pharmacol, 3, PP: 1-8.

26- Tripath, B. K., and Srivastava, A. K., 2006. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Med Sci Monit, PP: 130-147.

27- Varma, S. D., and Kinoshita, J. H., 1976. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids - their possible role in the prevention of diabetic cataracts. Biochem Pharmacol, 25(22), PP: 2505-2513.

28- Varma, S. D., and Mizuno, A., 1977. Diabetic cataracts and flavonoids. Science, 195(4274), PP: 205-206.

29- Yabe-Nishimura, C., 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. Pharmacol Rev, 50(1), PP: 21-33.

30- Yoon, H. N., Lee, M. Y., Kim, J. K., Suh, H. W., and Lim, S. S., 2013. Aldose reductase inhibitory compounds from Xanthium strumarium. Arch Pharm Res, 36(9), PP: 1090-1095.

31- Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food. Chem, 64, PP: 555-559.

Inhibitory effect of the effective fraction of *Gundelia tournefortii* L and several anti-diabetic drugs on the aldose reductase activity isolated from cow lens eye: a comparative study

Asareh Z. and Bahramikia S.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

Abstract

Diabetes mellitus in many countries among adults aged 20–70 is the main cause of blindness, amputation and chronic renal failure. Increasing blood glucose and entering glucose into the polyol pathway, is one of the factors involved in the pathogenesis of chronic diabetes complications. Since the key enzyme in this pathway is aldose reductase, the use of plant or chemical compounds that reduce the activity of this enzyme can be used as a therapeutic strategy to prevent the onset of chronic complications of diabetes. In this study, the effect of *Gundela tournefortii* crude extract and its different fractions in Lorestan province and also several anti-diabetes drugs on inhibition of Aldose reductase enzyme were investigated. For this purpose, firstly, the phenolic and flavonoid content and antioxidant activity of crude extract and various fractions were determined. In the next step, the cow lenses were extracted, the aldose reductase enzyme was isolated by Hayman-Kinoshita method and the inhibitory effect of the compounds on the activity of the enzyme was determined. Then, using the kinetics of the enzyme, the type of inhibition of the ethyl acetate fraction was determined. The results showed that the ethyl acetate fraction has the highest amount of phenol and flavonoid compounds and the highest capacity for the DPPH radical scavenging. Also, this fraction has the highest inhibitory effect on aldose reductase enzyme activity with IC_{50} = 0.019 mg/ml. This fraction had uncompetitive inhibition with D-glyceraldehyde, but it showed competitive inhibition to NADPH. Anti-diabetic drugs have been shown do not significantly affect the inhibition of the enzyme and are likely to affect other mechanisms of diabetes.

Key words: polyol pathway, aldose reductase, chronic diabetes complications, *Gundela tournefortii*, ethyl acetate fraction