

## اثر نارنجین و کوئرستین بر اکسیداسیون LDL از طریق تاثیرشان در اتصال مس به LDL در محیط آزمایشگاهی (In Vitro)

سید محمد علی غفاری\*، طیبه قیاسوند<sup>۱</sup>

### چکیده

مقدمه: اکسیداسیون لیپوپروتئین با دانسیته پائین (LDL) احتمالاً نقش مهمی در ایجاد آتروز بازی می نماید. شناخت سازوکار اکسیداسیون LDL و عواملی که موجب حساسیت آن به این فرایند می شوند هنوز کامل نمی باشد. یون مس به عنوان یکی از عوامل دخالت کننده در اکسیداسیون LDL طی آترواسکلروز معرفی شده و تصور بر آن است که اتصال یون های مس به LDL از شرایط لازم برای این اکسیداسیون است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر دو فلاونوئید نارنجین و کوئرستین روی اتصال مس به LDL و بنابراین اکسیداسیون آن می باشد.

روش ها: LDL از پلاسمای محتوی EDTA توسط اولتراسانتریفوژ به صورت گرادیانی جدا گردید. اکسیداسیون LDL توسط یون های مس در غیاب و حضور نارنجین و کوئرستین به روش تیوباربیتوریک اسید (TBARS) ارزیابی شد. در نهایت اثر نارنجین و کوئرستین بر تشکیل کمپلکس مس-LDL توسط ژل فیلتراسیون مطالعه گردید.

یافته ها: این مطالعه نشان داد که نارنجین تشکیل TBARS و کمپلکس مس-LDL را مهار نموده در حالی که کوئرستین موجب افزایش تشکیل TBARS و کمپلکس مس-LDL می شود.

نتیجه گیری: نتایج فوق مشخص می نمایند که نارنجین با مهار اتصال مس به LDL ممکن است حساسیت این لیپوپروتئین را به اکسیداسیون در مقابل یون مس کاهش دهد و به این طریق احتمالاً در پیشگیری از عوارض آترواسکلروز نقش دارد، در حالی که کوئرستین با تحریک اتصال مس به LDL احتمالاً موجب افزایش حساسیت LDL به اکسیداسیون شده و بدین طریق ممکن است موجب پیشرفت فرایند آترواسکلروز شود.

واژگان کلیدی: لیپوپروتئین با دانسیته پائین، نارنجین، کوئرستین، مس

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

\*نشانی: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، پست الکترونیک: ghaffarima@yahoo.com

## مقدمه

لیپوپروتئین با دانسیته پائین (LDL) ذره‌ای است کروی، که وزن ملکولی حدود  $3 \times 10^6$  دالتون، قطری حدود ۲۲ تا ۲۸ نانومتر و دانسیته‌ای حدود  $1/019$  تا  $1/063$  گرم بر میلی لیتر دارا می‌باشد [۱-۳]. هرگونه تغییر در ساختمان LDL موجب افزایش خاصیت ایجاد آتروز توسط آن می‌شود، یکی از مهمترین و شایع‌ترین تغییرات LDL، اکسیداسیون آن است که در این حالت میل ترکیبی این لیپوپروتئین برای گیرنده‌های کلاسیک موجود بر سطح سلول‌ها کاهش یافته و بر عکس تمایل آن به گیرنده‌های موجود بر سطح ماکروفاژها افزایش می‌یابد، که نتیجه آن تشکیل سلول‌های کف آلود<sup>۱</sup> مملو از قطرات چربی خواهد بود [۴]. سلول‌های کف آلود سپس به رگه‌های چربی<sup>۲</sup>، پلاک فیبری<sup>۳</sup> و در نهایت به ضایعات عارضه‌دار<sup>۴</sup> تبدیل می‌گردند و بدین طریق موجب پیدایش و توسعه ضایعات آترواسکلروز می‌شود [۵]. واکنش اکسیداسیون LDL نوعی واکنش پراکسیداسیون لیپید بوده که یکی از عوامل موثر در این فرایند حضور یون‌های فلزات واسطه (همانند یون مس) است [۶]. بر اساس گزارش‌های ارائه شده، اکسیداسیون LDL توسط یون‌های مس مستلزم اتصال یون مس به قطعات لیپوپروتئینی است که این اتصال از طریق پیوند یون‌های مس با هیستیدین موجود در apo-B<sub>100</sub> صورت می‌گیرد [۶، ۷]. نارنجین و کوئرستین جزء ترکیبات فلاونوئیدی است که ترکیبات پلی فنلیکی هستند که در میوه‌ها، سبزیجات، گل، دانه، برگ و پوست درختان یافت می‌شوند [۸]. برای فلاونوئیدها آثار بیولوژیکی متعددی همانند خواص ضد سرطانی، ضد ایسکمی، ضد آلرژی و ضد التهاب بیان شده است که غالب این اثرات به خاطر نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فوق می‌باشد [۹-۱۱]. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده است که مصرف خوراکی فلاونوئیدها موجب کاهش بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود [۱۲]، به علاوه بر اساس گزارشی دیگر مشخص شده که نقش آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها به خاطر

عملکرد آنها در حذف رادیکال‌های آزاد است [۱۳]. با توجه به نقش اتصال مس در اکسیداسیون LDL و اهمیت فلاونوئیدها در مهار اکسیداسیون LDL، مطالعه حاضر به صورت *In vitro* اثر دو فلاونوئید کوئرستین و نارنجین را بر اکسیداسیون LDL از طریق اتصال مس به آن مورد مطالعه قرار می‌دهد. از آن جایی که فلاونوئیدهای فوق دارای منشأ گیاهی بوده و به میزان بالایی در رژیم‌های غذایی گوناگون وجود دارند (کوئرستین به مقدار فراوان در پیاز، چای سبز و سیب یافت شده و نارنجین به میزان فراوان در مرکبات همانند گریپ فروت و پرتقال وجود دارد) بنابراین در مطالعه فوق این دو فلاونوئید انتخاب گردیدند.

## روش‌ها

کوئرستین، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سولفات مس و سفادکس G<sub>25</sub> از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردیدند. نارنجین، آگارز، تیوباربتوریک اسید، تریس، دی متیل سولفوکساید، برومید پتاسیم و آلومین سرم گاوی از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. محلول‌ها در زمان آزمایش تهیه گردیدند و محلول مس از محلول ذخیره ۱۰ میلی مولار سولفات مس تهیه شد.

### ۱- جداسازی LDL از پلاسمای انسان

برای جداسازی LDL (با دانسیته  $1/019$  تا  $1/063$  گرم بر میلی لیتر) از یک فرد مذکر سالم، ۳۰ ساله که برای مدت ۱۴ ساعت ناشتا بود ۴۰ میلی لیتر خون تهیه شد، به ازای هر میلی لیتر خون یک میلی گرم ماده ضد انعقاد (EDTA) اضافه گردید. نمونه خون به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و بدین طریق پلاسمای آن جدا گردید. به ازای هر میلی لیتر پلاسمای ۰/۵ میلی لیتر محلول EDTA (۱ mg/ml، PH=۷/۴) اضافه شد و سپس دانسیته آن توسط برومید پتاسیم جامد به  $1/020$  رسید (جهت تأیید دانسیته فوق از رفرتومتر استفاده شد). در مرحله بعد نمونه‌ها توسط اولتراسانتریفوژ (مدل Damond B-60) به مدت ۲ ساعت در ۶۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردیدند، لایه شیری رنگ بالای لوله‌ها جمع‌آوری شد و دانسیته محلول زیری

- 1-Foam cells
- 2- Fatty streak
- 3- Fibrous plaques
- 4- Complicated lesions

Substances (TBARS) مورد سنجش قرار گرفت [۱۸]، در این روش ابتدا نمونه ها با ۰/۵ml تری کلرواستیک اسید (۲۰٪) و ۱ml محلول تیوباربیتریک اسید (۶۷٪) مخلوط گردیدند و در دمای ۱۰۰°C برای مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند، پس از انکوباسیون، نمونه ها برای مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردیدند. بخش رویی جدا گشته و میزان جذب آن در طول موج ۵۳۲nm در مقابل شاهد (تری کلرواستیک اسید و تیوباربیتریک اسید) قرائت شد. با استفاده از ضریب جذب ۱۶۵۰۰۰ mol/cm غلظت TBARS به صورت نانومول مالون دی آلدئید بر میلی گرم پروتئین LDL گزارش گردید [۱۸].

### ۳- اثر کوئرسیتین و نارنجین بر اکسیداسیون LDL

بررسی اثر دو فلاونوئید نارنجین و کوئرسیتین بر اکسیداسیون LDL طی دو مرحله انجام شد. در مرحله اول، ۸ لوله آزمایش انتخاب نموده و به هر یک ۵۰ μlit LDL (۵۰ μg protein/ml)، ۲۰۰ μlit کوئرسیتین (۱۰ μM) و ۲۰۰ μlit دی متیل سولفوکساید (۱۰٪) اضافه شد (کوئرسیتین در دی متیل سولفوکساید ۱۰٪ که توسط بافر فسفات نمکی با pH برابر ۷/۴ تهیه شده بود، حل گردید). محلول ها برای مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردیدند و پس از پایان انکوباسیون به هر لوله ۲۰۰ μlit سولفات مس به ترتیب از غلظت صفر تا ۵۰ میکرومولار اضافه گردید و حجم تمام لوله ها توسط بافر فسفات نمکی (PH=۷/۴) به ۱ml رسانده شد. محلول ها برای مدت ۳ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. مشابه روش ذکر شده، برای غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کوئرسیتین نیز تکرار شد و به علاوه همین مراحل برای نارنجین نیز در سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار انجام گرفت. در پایان اکسیداسیون LDL نمونه ها با روش TBARS اندازه گیری شد [۱۸].

در مرحله دوم، چهار لوله آزمایش انتخاب نموده و به هر یک ۵۰ μlit LDL (۵۰ μg protein/ml)، ۲۰۰ μlit دی متیل سولفوکساید (۱۰٪) و به ترتیب غلظت های صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کوئرسیتین اضافه شد، لوله ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند و سپس

توسط برومید پتاسیم جامد به ۱/۰۵۰ رسانده شد و همانند مرحله قبل به مدت ۲ ساعت در ۶۰۰۰ rpm عمل سانتریفوژ تکرار گردید، در این مرحله در بالای لوله یک لایه نارنجی رنگ و شفاف که در واقع LDL است، پدید می آید، این بخش به دقت جدا و جمع آوری گردید [۱۴]. برای حذف یون فلزات (به ویژه مس) از محلول LDL، نمونه استخراج شده در مقابل بافر فسفات نمکی محتوی EDTA با pH برابر ۷/۴ (این بافر محتوی NaCl ۱۴۰ میلی مولار، Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ۸/۱ میلی مولار، NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ۱/۹ میلی مولار و EDTA ۱۰۰ میکرومولار می باشد) به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد توسط کیسه دیالیز (Cut off=۱۲-۱۴ KDa) دیالیز گردید. در مرحله بعد جهت حذف EDTA از نمونه LDL استخراج شده، مجدداً محلول LDL به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مقابل بافر فسفات نمکی بدون EDTA با PH برابر ۷/۴ دیالیز شد [۱۵]. محلول LDL از نظر مقادیر پروتئین (توسط روش لوری) [۱۶] و لیپید (کلسترول، تری گلیسرید، کلسترول-LDL و کلسترول-HDL) توسط کیت های پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت و جهت تأیید جداسازی LDL، نمونه مورد نظر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر باریتال (PH=۸/۶، ۰/۰۵ M) الکتروفورز گردید و سپس این ژل توسط رنگ سودان بلاک B رنگ آمیزی شد [۱۷]. LDL استخراج شده در تاریکی و تحت تأثیر گاز نیتروژن در دمای ۴ درجه سانتی گراد ذخیره گردید و طی مدت ۴ هفته مورد مصرف قرار گرفت.

### ۲- اکسیداسیون LDL و سنجش پراکسیداسیون لیپید

جهت اکسیداسیون LDL، ۸ لوله آزمایش انتخاب گردید، درون هر لوله ۵۰ میکرولیتر LDL (۵۰ μg protein/ml) ریخته شد، سپس ۲۰۰ μlit سولفات مس با غلظت های صفر تا ۵۰ میکرومولار به لوله ها اضافه گردید و حجم تمام آنها توسط بافر فسفات نمکی (PH=۷/۴) به یک میلی لیتر رسانده شد. محتویات لوله ها به خوبی توسط همزن مخلوط گردیدند و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، اکسیداسیون LDL با استفاده از روش Thiobarbitoric Reactive

ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید، سپس محلول مس ( $50 \mu\text{M}$ ) به آن افزوده شد و مجدداً برای مدت ۳ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. در یک مرحله عمل کروماتوگرافی نمونه‌ها بدون دیالیز و در مرحله بعد کروماتوگرافی پس از دیالیز نمونه‌ها (در مقابل بافر فسفات به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ) انجام شد و سپس مقادیر پروتئین و مس هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

هر داده معرف سه بار اندازه‌گیری مستقل بوده که به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  نشان داده شده‌اند.

### یافته‌ها

در این مطالعه جداسازی LDL از پلاسما توسط اندازه‌گیری غلظت لیپیدی در هر مرحله استخراج مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱)، به علاوه این جداسازی توسط الکتروفورز، نمونه‌های مراحل مختلف استخراج روی ژل آگارز نیز تأیید شد (شکل ۱). نتایج حاصل از انکوباسیون LDL ( $50 \mu\text{g protein/ml}$ ) جدا شده از پلاسما با غلظت‌های مختلف مس ( $0-50 \mu\text{M}$ ) در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳ ساعت نشان داد که مس قادر به اکسیداسیون LDL بوده که شدت این اکسیداسیون وابسته به غلظت مس موجود در محیط است (اشکال ۲ و ۳). مطالعه اثر اکسیداسیون LDL توسط مس در غیاب

به هر یک از آنها  $200 \mu\text{lit}$  سولفات مس ( $10 \mu\text{M}$ ) اضافه گردید و حجم تمام لوله‌ها توسط بافر فسفات نمکی ( $\text{pH}=7/4$ ) به  $1 \text{ml}$  رسانده شد، محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط گشته و برای مدت ۳ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردیدند. مشابه روش ذکر شده برای نارنجین نیز انجام گرفت. در پایان اکسیداسیون LDL توسط روش TBARS [۱۸] اندازه‌گیری شد.

### ۴- ژل فیلتراسیون LDL اکسید شده

LDL ( $1/5 \text{ mg protein/ml}$ ) اکسید شده با مس ( $50 \mu\text{M}$ ) در مقابل بافر فسفات نمکی ( $\text{PH}=7/4$ ) به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  دیالیز شد. در مرحله بعد  $1 \text{ml}$  نمونه دیالیز شده با  $1 \text{ml}$  بافر فسفات نمکی ( $\text{PH}=7/4$ ) رقیق گردید و روی ستون سفادکس  $G_{25}$  ( $600 \times 9 \text{ mm}$ , K<sub>9</sub>-pharmacia) قرار داده شد و توسط بافر فسفات نمکی شسته شد (مشابه مراحل بالا، عمل کروماتوگرافی روی نمونه بدون دیالیز LDL اکسید شده با مس نیز انجام گرفت) [۱۹]. نمونه‌ها در حجم‌های  $2 \text{ml}$  جمع‌آوری گردیدند و مقدار پروتئین هر نمونه توسط روش لوری [۱۶] و مقدار مس هر نمونه نیز از طریق دستگاه اتمیک ابزوربشن (Varian model 220) اندازه‌گیری شد [۲۰].

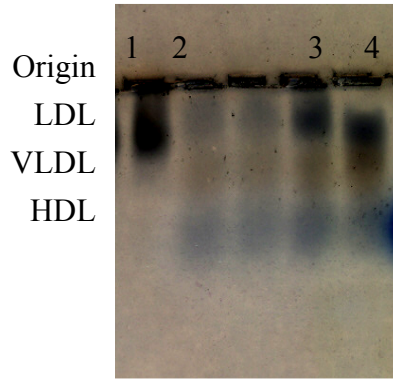
تمام مراحل بالا یک بار در حضور کوئرسیتین ( $1 \text{ mM}$ ) و بار دیگر در حضور نارنجین ( $1 \text{ mM}$ ) تکرار گردید، به طوری که در ابتدا LDL ( $1/5 \text{ mg protein/ml}$ ) با کوئرسیتین ( $1 \text{ mM}$ ) و یا نارنجین ( $1 \text{ mM}$ ) برای مدت ۱

جدول ۱- مقایسه غلظت لیپید در پلاسما و نمونه استخراج شده LDL

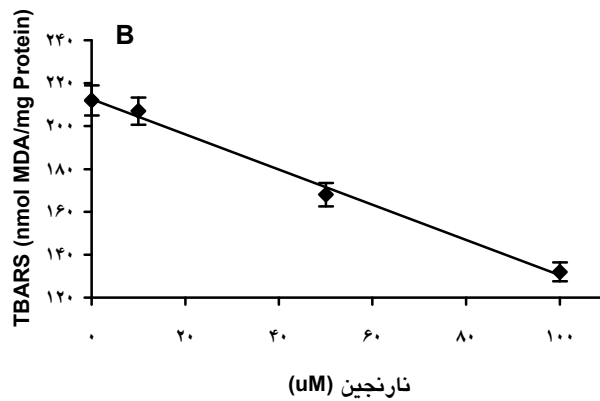
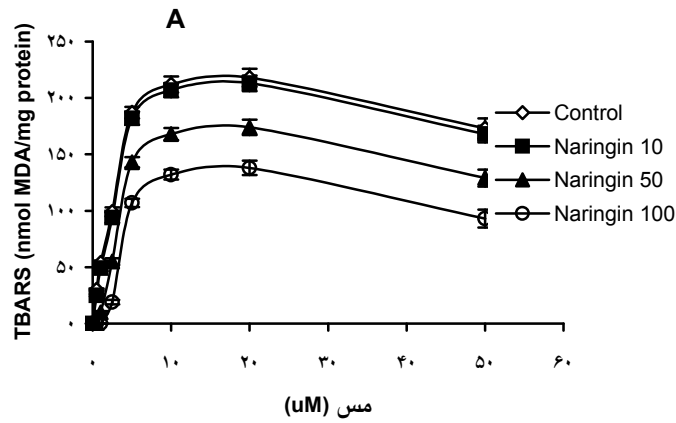
| لیپید*      | پلاسما        | LDL استخراج شده |
|-------------|---------------|-----------------|
| کلسترول     | $199 \pm 1/6$ | $520 \pm 1/9$   |
| تری گلیسرید | $90 \pm 0/9$  | $87 \pm 0/8$    |
| LDL-کلسترول | $151 \pm 1/2$ | $495 \pm 1/7$   |
| HDL-کلسترول | $48 \pm 0/5$  | $25 \pm 0/3$    |

مقادیر معرف سه بار اندازه‌گیری مستقل است که به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  نشان داده شده است.

\* واحد همه مقادیر  $\text{mg/dl}$  می‌باشد.



شکل ۱- حرکت الکتروفورزی محلول LDL (۲۰۱) و پلاسما (۴۰۳) روی ژل آگارز ۰/۸ درصد. LDL=لیپروتئین با دانسیته پائین، VLDL=لیپروتئین با دانسیته خیلی پائین، HDL=لیپروتئین با دانسیته بالا



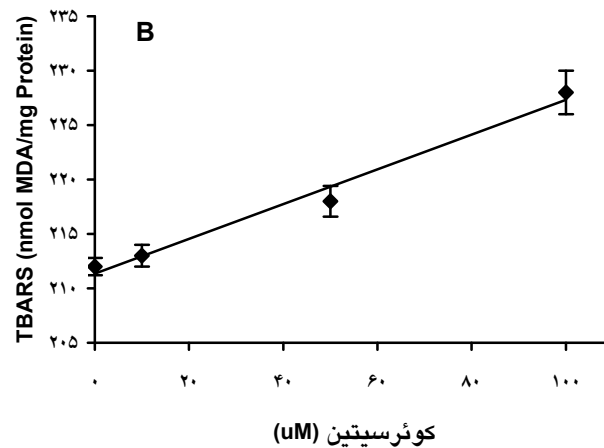
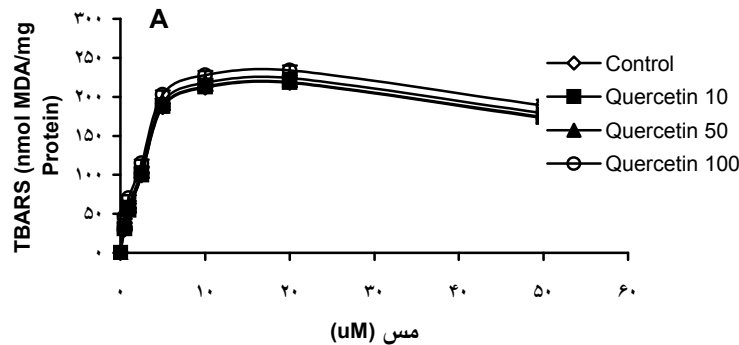
شکل ۲- (A) اثر غلظت های مختلف مس (۵۰-۰ μM) روی اکسیداسیون LDL (۵۰ μg protein/ml) در غیاب (◇) و حضور نارنجین ۱۰ میکرومولار (■)، ۵۰ میکرومولار (▲) و ۱۰۰ میکرومولار (○).

(B) اثر غلظت های مختلف نارنجین (۱۰۰-۰ μM) روی اکسیداسیون LDL (۵۰ μg protein/ml) توسط مس (۱۰ μM).

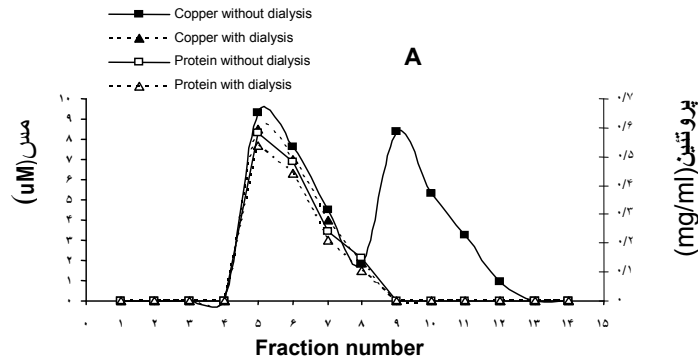
هر نقطه معرف سه بار اندازه گیری مستقل است که به صورت Mean±SD مشخص شده است.

نتایج حاصل از ژل فیلتراسیون LDL (۵۰ mg protein/ml) با مس ۱/۵ میکرومولار در غیاب و حضور غلظت ۱ میلی مولار نارنجین و یا کوئرسیتین نشان داد که غلظت پروتئین در نمونه های دیالیز شده و همچنین دیالیز نشده مشابه است به طوری که حضور پروتئین در نمونه های جمع آوری شده شماره ۴ تا ۹ را می توان در هر دو حالت مشاهده نمود، در حالی که حضور مس در نمونه های جدا شده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای نمونه های

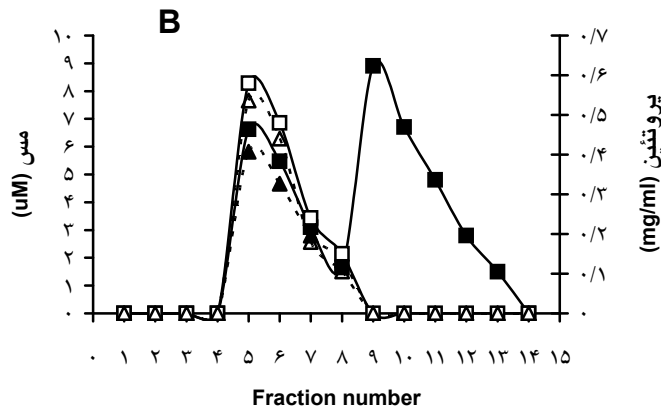
و حضور غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نارنجین و یا کوئرسیتین مشخص نمود که حضور نارنجین موجب کاهش تشکیل Thiobarbitoric Reactive Substances (TBARS) می شود (شکل ۲A) که شدت کاهش نیز وابسته به غلظت نارنجین به کار رفته است (شکل ۲B)، در حالی که حضور کوئرسیتین نه تنها موجب کاهش TBARS نمی شود بلکه در افزایش تشکیل TBARS نیز موثر است (شکل ۳A) به طوری که افزایش غلظت کوئرسیتین میزان تولید TBARS را افزایش می دهد (شکل ۳B).



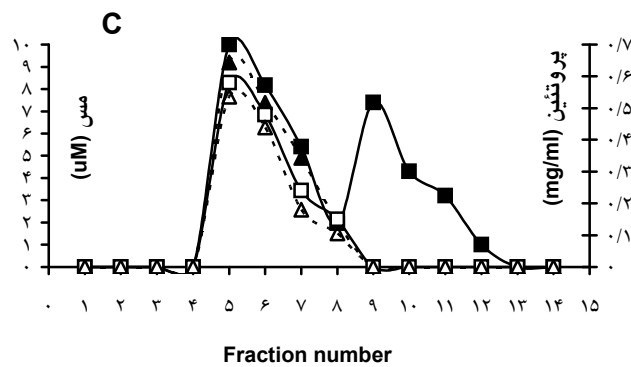
شکل ۳- (A) اثر غلظت های مختلف مس (۵۰-۱۰۰ µM) روی اکسیداسیون LDL (۵۰ µg protein/ml) در غیاب (◇) و حضور کوئرسیتین ۱۰ میکرومولار (■)، ۵۰ میکرومولار (▲) و ۱۰۰ میکرومولار (○). (B) اثر غلظت های مختلف کوئرسیتین (۱۰-۱۰۰ µM) روی اکسیداسیون LDL (۵۰ µg protein/ml) توسط مس (۱۰ µM). هر نقطه معرف سه بار اندازه گیری مستقل است که به صورت Mean ±SD مشخص شده است.



■ Copper without dialysis    ▲ Copper with dialysis  
 □ Protein without dialysis    △ Protein with dialysis

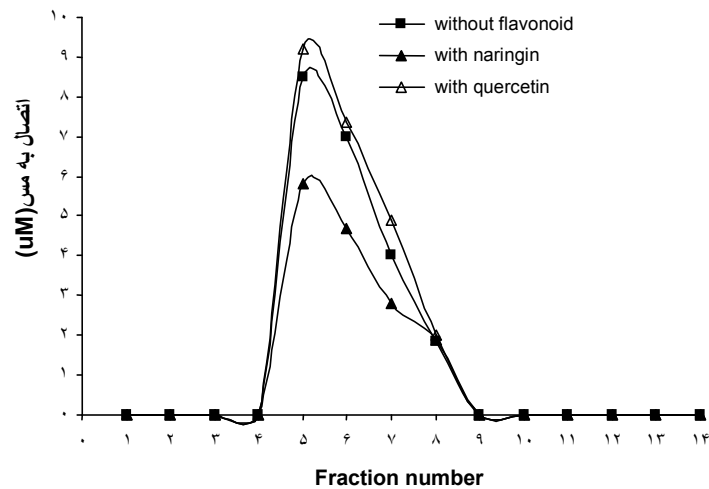


■ Copper without dialysis    ▲ Copper with dialysis  
 □ Protein without dialysis    △ Protein with dialysis



شکل ۴- ژل فیلتراسیون LDL اکسید شده با مس در غیاب (A) و حضور نارنجین (B) و کوئرسیتین (C).

LDL (۱/۵ mg protein/ml) با سولفات مس (۵۰ μM) در غیاب و حضور دو فلاونوئید برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (■) و سپس در مقابل بافر فسفات نمکی (PH=۷/۴) برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز شد (▲). نمونه ها توسط بافر فسفات نمکی (PH=۷/۴) رقیق شدند (به نسبت حجمی ۱ به ۱) و سپس ۲ میلی لیتر آن روی ستون سفادکس G<sub>25</sub> (۶۰۰×۹mm) قرار داده شد و توسط بافر فسفات نمکی شسته گردید. فراکشن ها در حجم ۲ میلی لیتر جمع آوری شد و مقدار مس (■، ▲) و پروتئین (□، △) هر فراکشن مورد سنجش قرار گرفت. سرعت جریان بافر از ستون = ۱ میلی لیتر بر دقیقه



شکل ۵- اثر نارنجین (۱ mM) و کوئرستین (۱ mM) بر اتصال مس به LDL

آپوپروتئین B است که نتیجه چنین تغییراتی افزایش برداشت LDL توسط ماکروفاژها و در نتیجه تشکیل سلول‌های کف آلود خواهد بود [۲۲، ۴]. اکثر مطالعات نشان داده است که فلاونوئیدها قادرند به صورت *In vitro* موجب مهار اکسیداسیون LDL شوند [۲۳]، همچنین گزارش‌های اپیدمیولوژیکی نیز ثابت کرده است که حضور فلاونوئیدها در رژیم غذایی موجب کاهش بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود [۲۴]. اگر چه ارتباط بین اکسیداسیون LDL و آترواسکلروز و نقش فلاونوئیدها در این زمینه تا حدودی مشخص شده است اما سازوکارهای اکسیداسیون LDL و همچنین عواملی که حساسیت LDL را به اکسیداسیون تغییر می‌دهد، چندان شناخته شده نمی‌باشد. گزارش‌های ارائه شده نشان می‌دهد که هر چهار نوع سلول درگیر در لیز آترواسکلروز (سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های عضلات صاف، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها) به صورت *In vitro* قادر به اکسیداسیون LDL هستند [۲۵]، به علاوه حضور یون‌های فلزات واسطه همانند مس نیز احتمالاً برای این اکسیداسیون ضروری است [۲۶]. با توجه به مطالب فوق، در این مطالعه حساسیت اکسیداسیون LDL توسط یون‌های مس در غیاب و حضور دو فلاونوئید نارنجین و کوئرستین مورد بررسی قرار گرفت. انکوباسیون LDL جدا شده از پلاسما

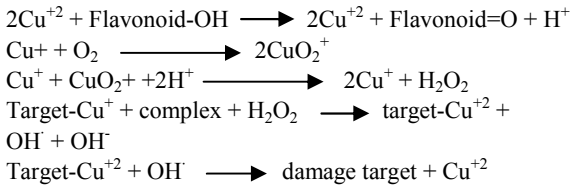
دیالیز شده و دیالیز نشده مشابه نیست که در این حالت برای نمونه‌های دیالیز نشده حضور مس علاوه بر نمونه محتوی پروتئین در نمونه‌هایی که پروتئین نیز وجود ندارد، مشاهده می‌گردد، در حالی که در نمونه‌های دیالیز شده مس فقط در محدوده فراکشن‌هایی دیده می‌شود که پروتئین حضور دارد (منحنی ۴A)، این نتایج مشخص می‌نماید که مس قادر است به LDL متصل شود. حضور نارنجین در محیط قبل از انکوباسیون LDL با مس موجب افزایش مقدار مس آزاد و کاهش مقدار مس باند شده به LDL می‌شود (منحنی ۴B)، در حالی که حضور کوئرستین در محیط موجب کاهش مقدار مس آزاد و افزایش مقدار مس باند شده به LDL خواهد شد (منحنی ۴C). بدین طریق نتایج فوق نشان می‌دهند که نارنجین موجب کاهش اتصال یون‌های مس به LDL شده در حالی که کوئرستین این اتصال را افزایش می‌دهد (منحنی ۵).

## بحث

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد، اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها به‌ویژه LDL نقش مهمی را در فرایند ایجاد آتروزی می‌نماید [۱، ۲ و ۲۱]. اکسیداسیون LDL شامل پراکسیداسیون اسیدهای چرب و تغییرات کووالان



است، در حالی که در غلظت های بالاتر آن خاصیت پرواکسیدانی دارد به طوری که در این غلظت ها از طریق احیاء مس دوظرفیتی به مس یک ظرفیتی (مطابق واکنش زیر) موجب افزایش واکنش های پراکسیداسیون لیپیدی می گردد [۳۰].



یون های فلزی، واکنش های زنجیره ای فوق را احتمالاً از طریق سازوکارهای مختلف آغاز می نمایند، به طوری که موجب تجزیه هیدروپراکسیدها و یا پراکسید هیدروژن به رادیکال های آلکوکسیل<sup>۱</sup>، پروکسیل<sup>۲</sup> و هیدروکسیل می شوند، بنابراین یون های کوپروس ( $\text{Cu}^{+1}$ ) در مقایسه با یون های کوپریک ( $\text{Cu}^{+2}$ ) تمایل بیشتری جهت این گونه واکنش ها دارند و به عبارت دیگر ترکیبی که موجب احیاء  $\text{Cu}^{+2}$  به  $\text{Cu}^{+1}$  می گردد به عنوان یک پرواکسیدانت عمل می نماید [۳۰]. از آن جایی که در مطالعه حاضر سه غلظت مورد استفاده کوئرسیتین بیشتر از  $100 \text{ ng/ml}$  بوده است، بنابراین خاصیت پراکسیدانی مشاهده شده در نتایج را می توان به این مسئله نسبت داد. در ادامه این مطالعه ما نشان دادیم که یون های مس قادرند به LDL متصل شوند، به طوری که اندازه گیری مقدار مس در فازهای لیپوپروتئینی و آبی حاصل از ژل فیلتراسیون ثابت کرد که اکثر یون های مس به LDL متصل شده اند. افزودن نارنجین به LDL قبل از انکوباسیون با یون های مس مشخص نمود که این فلاونوئید موجب افزایش مس آزاد در فاز آبی شده و تشکیل کمپلکس مس-LDL را در حدود ۳۲٪ کاهش می دهد. طبق مطالعات گزارش شده حضور عوامل هیدروکسیل در ساختمان فلاونوئیدها موجب می شود تا آنها با یون های فلزات واسطه تشکیل شلات دهند [۳۱] بنابراین می توان پیشنهاد داد که نارنجین احتمالاً از طریق ایجاد شلات با یون های مس مانع از اتصال این فلز به LDL شده و به این طریق شدت اکسیداسیون این

با نارنجین و بررسی اکسیداسیون آن توسط یون های مس نشان داد که شدت اکسیداسیون LDL (از طریق سنجش مقدار مالون دی آلدئید به روش TBARS) در حضور غلظت های مختلف نارنجین به صورت وابسته به دوز کاهش می یابد، به طوری که حضور غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نارنجین به ترتیب موجب کاهش تولید مالون دی آلدئید در حدود ۳، ۲۱ و ۴۰ درصد می گردد. سازوکار دقیق عمل فلاونوئیدها در مهار اکسیداسیون LDL به خوبی روشن نشده است اما این احتمال وجود دارد که ترکیبات فوق با اکسیداسیون خود مانع از اکسید شدن آلفا-توکوفرول موجود در ساختمان LDL شده و یا این که با مهار تشکیل رادیکال های آزاد این فرایند را متوقف نمایند. نارنجین فلاونوئیدی است که به خاطر وجود گروه هیدروکسیل و کربونیل به ترتیب در کربن های شماره ۳ و ۴، حضور پیوند دوگانه بین کربن های ۲ و ۳ و پلی هیدروکسیله بودن حلقه های آروماتیک A و B در ساختمان آن دارای نقش آنتی اکسیدانی است [۲۷]. انکوباسیون LDL با کوئرسیتین و بررسی اکسیداسیون آن توسط یون های مس نشان داد که بر خلاف نارنجین این فلاونوئید در غلظت های مورد استفاده نه تنها اثری در شدت اکسیداسیون نداشته بلکه موجب افزایش حساسیت LDL به اکسیداسیون نیز می گردد، به طوری که حضور غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کوئرسیتین به ترتیب موجب افزایش تولید مالون دی آلدئید به میزان حدود صفر، ۳ و ۸ درصد می شود. باوجود نقش آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها، طبق برخی گزارش های مشخص شده است که این ترکیبات قادرند به عنوان موتاژن و کارسینوژن عمل نموده و همچنین در ایجاد بیماری های قلبی-عروقی نیز موثر باشند به طوری که در واقع به صورت یک پرواکسیدان عمل نمایند [۲۸]. مطالعات نشان داده است که فعالیت آنتی اکسیدانی و پراکسیدانی فلاونوئیدها وابسته به غلظت فلاونوئید و تعداد گروه های هیدروکسیل موجود در ساختمان آنها می باشد [۲۹]. مطالعات گزارش شده در رابطه با کوئرسیتین مشخص نموده است که این فلاونوئید در غلظت های کمتر از  $100 \text{ ng/ml}$  در میلی لیتر دارای خاصیت آنتی اکسیدانی

1- Alkoxy  
2- Peroxy

پیشرفت بیماری های قلبی - عروقی باشد. مطالعه ما روی دو فلاونوئید نارنجین و کوئرسیتین نشان داد که در غلظت های مورد استفاده برای نارنجین، این فلاونوئید با جلوگیری از اتصال مس به LDL حساسیت LDL را به اکسیداسیون کاهش می دهد، در حالی که کوئرسیتین در غلظت های مورد استفاده نه تنها نقش آنتی اکسیدانی نداشت بلکه به عنوان پرواکسیدان، اکسید شدن LDL را از طریق افزایش اتصال یون های مس تحریک نمود. بنابراین چنین می توان بیان داشت که در مصرف فلاونوئیدها بسته به نوع آنها باید از دوزهای مصرفی خاصی استفاده نمود، که البته در این زمینه به تحقیقات بیشتری نیاز می باشد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که هزینه این تحقیق را تقبل نموده اند تشکر و قدردانی می شود.

لیپوپروتئین را کاهش می دهد. افزوده شدن کوئرسیتین به LDL قبل از انکوباسیون با یون های مس موجب کاهش مس آزاد در فاز آبی شده و تشکیل کمپلکس مس - LDL را در حدود ۹٪ افزایش می دهد. اگر چه در ساختمان کوئرسیتین نیز تعداد زیادی عوامل هیدروکسیل وجود دارد اما احتمالاً به دلیل استفاده از غلظت های بالای این فلاونوئید در مطالعه فوق، کوئرسیتین از طریق احیاء مس ممکن است تمایل یون های مس را به LDL افزایش داده و همین احتمالاً عاملی در افزایش اکسیداسیون LDL توسط این فلاونوئید است. با توجه به گزارش های قلبی و نتایج بدست آمده از این تحقیق، مشخص می گردد که تغییرات اکسیداتیو LDL نقش مهمی در پیشرفت آترواسکلروز در انسان ایفا می نماید، که از جمله علل این فرایند حضور یون های فلزات واسطه و اتصال آنها به LDL است. حمایت LDL در مقابل اتصال یون های مس و در نتیجه اکسیداسیون آن توسط ترکیباتی همانند فلاونوئیدها ممکن است راهبردی موثر جهت جلوگیری از

### مآخذ

- Gotto AM. Lipid lowering regression and coronary events. A review of the interdisciplinary council on lipid and cardiovascular risk prevention, seventh council meeting. *Circulation* 1995; 92: 646-656.
- Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 20963-20966.
- Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall SC. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 1986; 323: 734-738.
- Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062-1071.
- Havala T, Pakenen P. Lipoprotein and atherosclerosis. *J of Clinic Basis and Cardiol* 2003; 3: 87-88.
- Xing XY, Baffic J, Sparrow CP. LDL oxidation by activated monocytes characterization of the oxidized LDL and requirement for transition metal ions. *J of Lipid Research* 1998; 39: 2201-2208.
- Chen, K. and Frei, B., "The effect of histidine modification on copper dependent lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Redox Repair* 1997; 3: 175-181.
- Cook NC, Samman S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effect and dietary sources. *J of Nutr Biochem* 1996; 7: 66-76.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J of Clinic Nutr* 2002; 76: 560-568.
- Clifton PM. Effect of Grape Seed Extract and Quercetin on Cardiovascular and Endothelial Parameters in High-Risk Subjects. *J of Biomed Biotechn* 2004: 272-278.
- Lin J, Zhang SM, Wu K, Willett WC. Flavonoid intake and colorectal cancer risk in men and women. *Am J of Epidemiol* 2006; 164: 644-651.
- Bayard V, Chamorro F, Motta J, Hollenberg NK. Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in panama. *Internat J of Medic Science* 2007; 4: 53-58.

13. Catapano AL. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 1997; 48: 39-44.
14. Giese SP, Esterbauer H. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS* 1994; 343: 188-194.
15. Roland R, Patterson A, Leake DS. Measurement of copper binding sites on low density lipoprotein. *Arterioscl Thromb Vascul Biol* 2001; 21: 594-602.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement using the folin phenol reagent. *J of Biolog Chem* 1951; 193: 265-275.
17. Noble RP. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J of Lipid Research* 1968; 9: 693-701.
18. Scoccia AE, Molinuevo MS, McCarthy AD, Coortizo AM. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoprotein. *BMC Clinical Pathology* 2001; 1: 1-5.
19. Kuzuya M, Yamada K, Hayashi T, Funaki C, Natio, M, Asai K, Kuzuya F. Role of lipoprotein copper complex in copper catalyzed peroxidation of low density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992; 1123: 334-341.
20. Ichida T, Nobuka M. Determination of serum copper with atomic absorption spectrophotometry. *Clinical Chiropractic Acta* 1969; 24: 299-303.
21. Leake DS. Oxidized low density lipoproteins and atherogenesis. *British Heart J* 1993; 69: 476-478.
22. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annals of Review Biochemistry* 1983; 52: 223-261.
23. Viana M, Barbas C, Bonet B, Bonet MV, Castro M. In vitro effects of a flavonoid rich extract on LDL oxidation. *Atherosclerosis* 1996; 123: 83-91.
24. Cook NC, Samman S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J of Nutr Biochem* 1996; 7: 66-76.
25. Lamb DJ, Wilkins GM, Leake, DS. The oxidative modification of low density lipoprotein by human lymphocytes. *Atherosclerosis* 1992; 92: 187-192.
26. Croft KD, Williams P, Dimmitt S, Abu-Amsa R, Beilin LJ. Oxidation of low density lipoproteins: Effect of antioxidant content, fatty acid composition and intrinsic phospholipase activity on susceptibility to metal ion induced oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1254: 250-256.
27. Mojzisova G, Kuchta M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiological Research* 2001; 50: 529-535.
28. Leake DS. Flavonoids and the oxidation of low density lipoprotein. *International J of Applied Basic Nutr Science* 2001; 28: 313-320.
29. Lebeau J, Furman C, Bernier JL, Duriez P, Teissier E, Cotelle N. Antioxidant properties of di- and tri- butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biological Medicine* 2000; 29: 900-912.
30. Filipe P, Haigle J, Silva JN, Freitas J, Fernandes A, Maziere JC. Anti- and pro-oxid effects of quercetin in copper induced low density lipoprotein oxidation. Quercetin as an effective antioxidant against pro-oxidant effects of urate. *Europ J of Biochem* 2004; 271: 1991-1999.
31. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biological Medicine* 1996; 20: 720-727.