مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز ۱۳۸۶؛ دوره۷ (شماره ۱): ۳۳-۲۳

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

سید محمد علی غفاری*[۱]، طیبه قیاسوند[۱]

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

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 می‌شوند هنوز کامل نمی‌باشد. 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 کوئرسیتین 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 کوئرسیتین به روش تیوباربیتوریک اسید (TBARS) ارزیابی شد. در نهایت اثر نارنجین و کوئرسیتین بر تشکیل کمپلکس مس-LDL توسط ژل فیلتراسیون مطالعه گردید.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که نارنجین تشکیل TBARS و کمپلکس مس-LDL را مهار نموده در حالی که کوئرسیتین 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 کوئرسیتین 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، کوئرسیتین، 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

تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۱

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

مقدمه

لیپوپروتئین با دانسیته پائین (LDL) ذره‌ای است کروی، که وزن ملکولی حدود ۳×۱۰^{۶} دالتون، قطری حدود ۲۲ تا ۲۸ نانومتر و دانسیته ای حدود ۱/۰۱۹ تا ۱/۰۶۳ گرم بر میلی لیتر دارا می باشد [۳-۱]. هرگونه تغییر در ساختمان LDL موجب افزایش خاصیت ایجاد آتروز توسط آن می شود، یکی از مهمترین و شایع ترین تغییرات LDL، اکسیداسیون آن است که در این حالت میل ترکیبی این لیپوپروتئین برای گیرنده های کلاسیک موجود بر سطح سلول ها کاهش یافته و بر عکس تمایل آن به گیرنده های موجود بر سطح ماکروفاژها افزایش می یابد، که نتیجه آن تشکیل سلول های کف آلود[1] مملو از قطرات چربی خواهد بود [۴]. سلول های کف آلود سپس به رگه‌های چربی[2]، پلاک فیبری[3] و در نهایت به ضایعات عارضه‌دار[4] تبدیل می‌گردند و بدین طریق موجب پیدایش و توسعه ضایعات آترواسکلروز می شود [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 یون های مس مستلزم اتصال یون مس به قطعات لیپوپروتئینی است که این اتصال از طریق پیوند یون های مس با هیستیدین موجود در $apo\text{-}B_{100}$ صورت می گیرد [۶، ۷]. نارنجین و کوئرسیتین جزء ترکیبات فلاونوئیدی است که ترکیبات پلی فنلیکی هستند که در میوه ها، سبزیجات، گل، دانه، برگ و پوست درختان یافت می شوند [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 آنتی اکسیدانی ترکیبات فوق می باشد [۱۱-۹]. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده است که مصرف خوراکی فلاونوئیدها موجب کاهش بیماری های قلبی-عروقی می شود [۱۲]، به علاوه بر اساس گزارشی دیگر مشخص شده که نقش آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها به خاطر عملکرد آنها در حذف رادیکال های 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 کوئرسیتین و نارنجین را بر اکسیداسیون LDL از طریق اتصال مس به آن مورد مطالعه قرار می دهد. از آن جایی که فلاونوئیدهای فوق دارای منشاء گیاهی بوده و به میزان بالایی در رژیم های غذایی گوناگون وجود دارند (کوئرسیتین 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

کوئرسیتین، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سولفات مس و سفادکس G_{25} از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردیدند. نارنجین، آگارز، تیوباربیتوریک اسید، تریس، دی متیل سولفوکساید، بروميد پتاسیم و آلبومین سرم گاوی از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند.
محلول ها 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 ۱/۰۱۹ تا ۱/۰۶۳ 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 rpm ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد و بدین طریق پلاسمای آن جدا گردید. به ازای هر میلی لیتر پلاسما ۰/۵ میلی لیتر محلول EDTA (۱ mg/ml، PH=۷/۴) اضافه شد و سپس دانسیته آن توسط بروميد پتاسیم جامد به ۱/۰۲۰ رسید (جهت تائید دانسیته فوق از رفرکتومتر استفاده شد). در مرحله بعد نمونه ها توسط اولتراسانتریفوژ (مدل Damond B-60) به مدت ۲ ساعت در rpm ۶۰۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند، لایه شیری رنگ بالای لوله ها جمع آوری شد و دانسیته محلول زیری

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

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

توسط برومید پتاسیم جامد به ۱/۰۵۰ رسانده شد و همانند مرحله قبل به مدت ۲ ساعت در rpm ۶۰۰۰۰ 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 (به‌ویژه 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_2HPO_4 ۸/۱ میلی مولار، NaH_2PO_4 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 تائید جداسازی LDL، نمونه مورد نظر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر باربیتال (۰/۰۵ M، PH=۸/۶) الکتروفورز گردید و سپس این ژل توسط رنگ سودان بلاک B رنگ آمیزی شد [۱۷]. LDL استخراج شده در تاریکی و تحت تاثیر 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 ۲۰۰µlit سولفات مس با غلظت‌های صفر تا ۵۰ میکرومولار به لوله‌ها 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 Substances (TBARS) مورد سنجش قرار گرفت [۱۸]، در این روش ابتدا نمونه ها با ۰/۵ml تری‌کلرواستیک اسید (۲۰٪) و ۱ml محلول تیوباربیتوریک اسید (۰/۶۷٪) مخلوط گردیدند و در دمای ۱۰۰°C برای مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند، پس از انکوباسیون، نمونه‌ها برای مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند. بخش رویی جدا گشته و میزان جذب آن در طول موج ۵۳۲nm در مقابل شاهد (تری کلرواستیک اسید و تیوباربیتوریک اسید) قرائت شد. با استفاده از ضریب جذب ۱۶۵۰۰۰mol/cm، غلظت TBARS به صورت نانومول مالون دی آلدئید بر میلی‌گرم 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 ۵۰µlit LDL (۵۰ µg protein/ml)، ۲۰۰µlit کوئرسیتین (۱۰µM) و ۲۰۰µlit دی‌متیل‌سولفوکساید (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 ۲۰۰µlit سولفات مس به ترتیب از غلظت صفر تا ۵۰ میکرومولار اضافه گردید وحجم تمام لوله ها توسط بافر فسفات نمکی (PH=۷/۴) به ۱ml رسانده شد. محلول ها برای مدت ۳ ساعت در۳۷°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 ۵۰µlit LDL (۵۰ µg protein/ml)، ۲۰۰µlit دی‌متیل‌سولفوکساید (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

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

به هر یک از آنها ۲۰۰µlit سولفات مس (۱۰ µM) اضافه گردید و حجم تمام لوله ها توسط بافر فسفات نمکی (pH=۷/۴) به ۱ml رسانده شد، محتویات لوله ها به خوبی مخلوط گشته و برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه گردیدند. مشابه روش ذکر شده برای نارنجین نیز انجام گرفت. در پایان اکسیداسیون LDL توسط روش TBARS [۱۸] اندازه‌گیری شد.

٤- ژل فیلتراسیون LDL اکسید شده

LDL (۱/۵ mg protein/ml) اکسید شده با مس (۵۰ µM) در مقابل بافر فسفات نمکی (PH=۷/۴) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴^{o}C دیالیز شد. در مرحله بعد ۱ml نمونه دیالیز شده با ۱ml بافر فسفات نمکی (PH=۷/۴) رقیق گردید و روی ستون سفادکس G_{25} (K_9-pharmacia، ۹×۶۰۰ mm) 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]. نمونه ها در حجم های ۲ml جمع آوری گردیدند و مقدار پروتئین هر نمونه توسط روش لوری [۱۶] و مقدار مس هر نمونه نیز از طریق دستگاه اتمیک ابزوربشن (Varian model 220) اندازه گیری شد [۲۰].

تمام مراحل بالا یک بار در حضور کوئرسیتین (۱ mM) و بار دیگر در حضور نارنجین (۱ mM) تکرار گردید، به طوری که در ابتدا LDL (۱/۵ mg protein/ml) با کوئرسیتین (۱ mM) و یا نارنجین (۱ mM) برای مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷^{o}C انکوبه گردید، سپس محلول مس (۵۰ µM) به آن افزوده شد و مجدداً برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه گردید. در یک مرحله عمل کروماتوگرافی نمونه ها بدون دیالیز و در مرحله بعد کروماتوگرافی پس از دیالیز نمونه ها (در مقابل بافر فسفات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ ^{o}C) انجام شد و سپس مقادیر پروتئین و مس هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

هر داده معرف سه بار اندازه گیری مستقل بوده که به صورت Mean ±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، نمونه های مراحل مختلف استخراج روی ژل آگارز نیز تائید شد (شکل ۱). نتایج حاصل از انکوباسیون LDL (۵۰ µg protein/ml) جدا شده از پلاسما با غلظت های مختلف مس (۵۰-۰ µM) در دمای ۳۷ ^{o}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

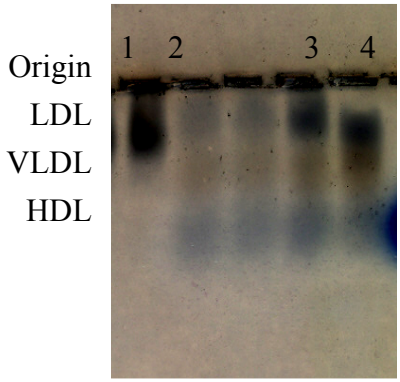
جدول ۱- مقایسه غلظت لیپید در پلاسما و نمونه استخراج شده LDL

لیپید*	پلاسما	LDL استخراج شده
کلسترول	۱۹۹±۱/۶	۵۲۰±۱/۹
تری گلیسرید	۹۰±۰/۹	۸۷±۰/۸
LDL-کلسترول	۱۵۱±۱/۲	۴۹۵±۱/۷
HDL-کلسترول	۴۸±۰/۵	۲۵±۰/۳

مقادیر معرف سه بار اندازه‌گیری مستقل است که به صورت Mean± SD نشان داده شده است.

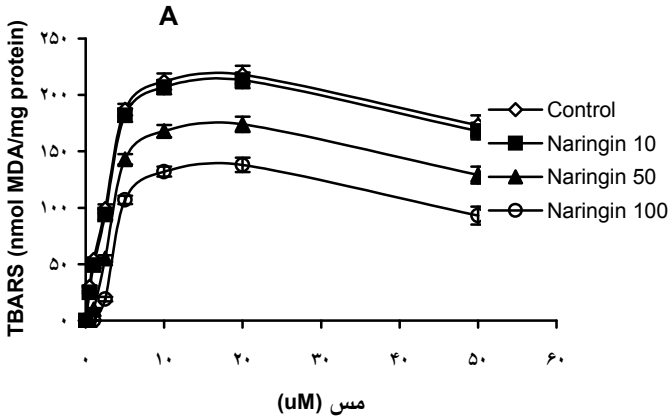
* واحد همه مقادیر mg/dl می‌باشد.

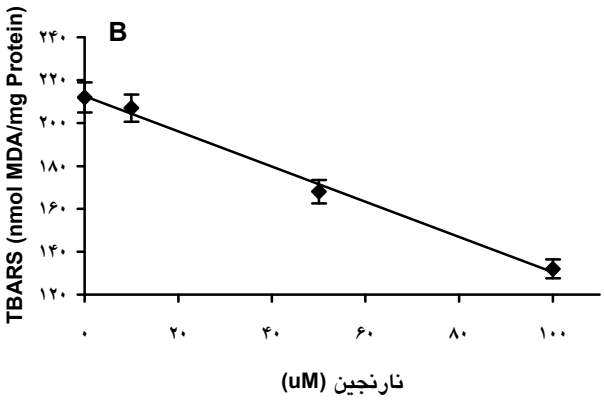
Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018



شکل ۱- حرکت الکتروفورزی محلول LDL (۲،۱) و پلاسما (۴،۳) روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.

LDL= لیپوپروتئین با دانسیته پائین، VLDL= لیپوپروتئین با دانسیته خیلی پائین، HDL= لیپوپروتئین 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 (○).

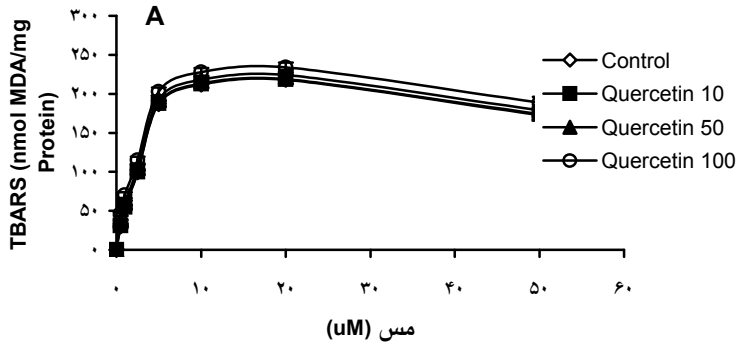
(B) اثر غلظت های مختلف نارنجین (۱۰۰-۰ µM) روی اکسیداسیون LDL (۵۰ µg protein/ml) توسط مس (۱۰ µM).

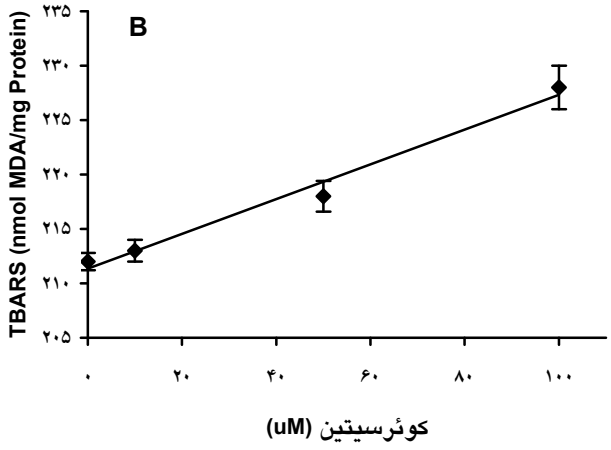
هر نقطه معرف سه بار اندازه گیری مستقل است که به صورت Mean± SD مشخص شده است.

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

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).

نتایج حاصل از ژل فیلتراسیون LDL (mg protein/ml ۱/۵) با مس ۵۰ 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



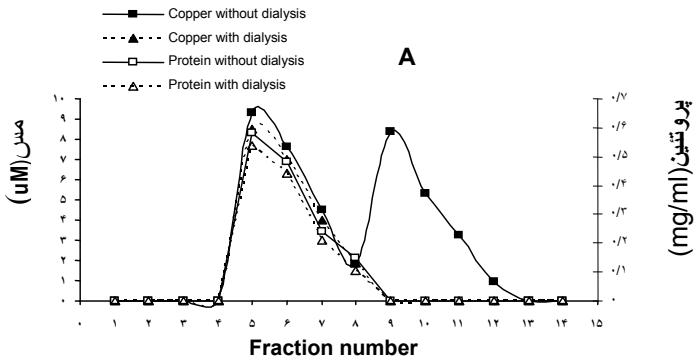


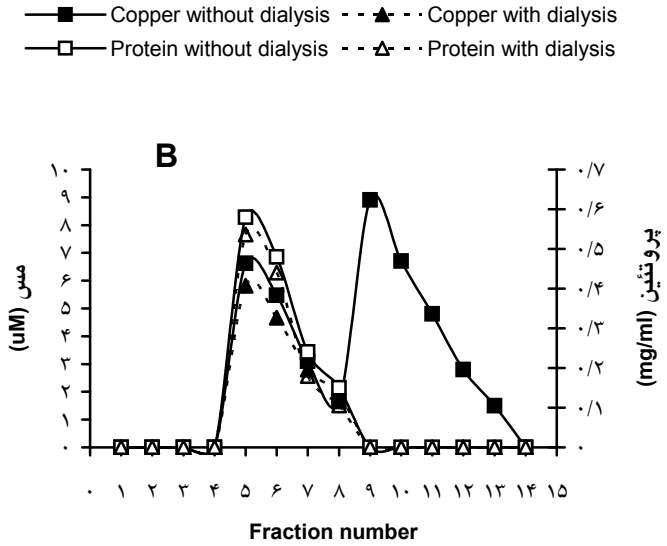
شکل ۳- (A) اثر غلظت های مختلف مس (۰-۵۰ μM) روی اکسیداسیون LDL (۵۰ μg protein/ml) در غیاب (◇) و حضور کوئرسیتین ۱۰ میکرومولار (■)، ۵۰ میکرومولار (▲) و ۱۰۰ میکرومولار (○).

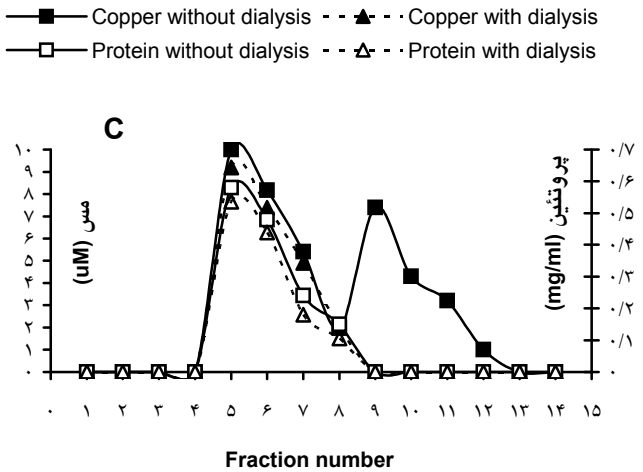
(B) اثر غلظت های مختلف کوئرسیتین (۰-۱۰۰ μM) روی اکسیداسیون LDL (۵۰ μg protein/ml) توسط مس (۱۰ μM).

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

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018







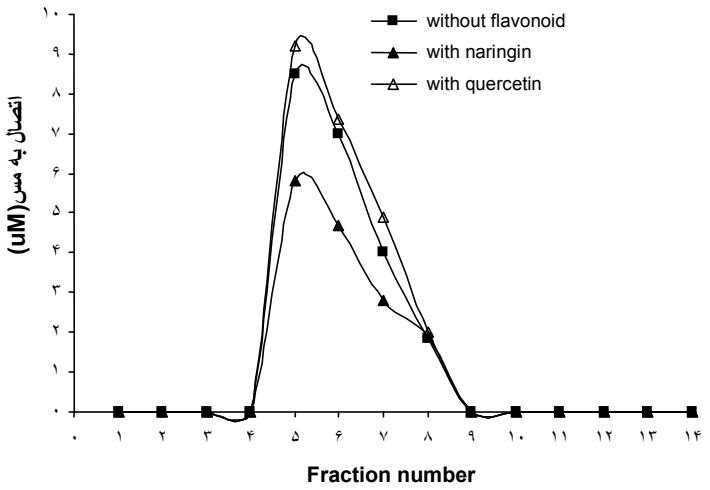
شکل ۴- ژل فیلتراسیون LDL اکسید شده با مس در غیاب (A) و حضور نارنجین (B) و کوئرسیتین (C).

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_{25} (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

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018



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

دیالیز شده و دیالیز نشده مشابه نیست که در این حالت برای نمونه های دیالیز نشده حضور مس علاوه بر نمونه محتوی پروتئین در نمونه هایی که پروتئین نیز وجود ندارد، مشاهده می گردد، در حالی که در نمونه های دیالیز شده مس فقط در محدوده فراکشن هایی دیده می شود که پروتئین حضور دارد (منحنی ۴A)، این نتایج مشخص می نماید 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 می شود (منحنی ۴B)، در حالی که حضور کوئرسیتین در محیط موجب کاهش مقدار مس آزاد و افزایش مقدار مس باند شده به LDL خواهد شد (منحنی ۴C). بدین طریق نتایج فوق نشان می دهند که نارنجین موجب کاهش اتصال یون های مس به LDL شده در حالی که کوئرسیتین این اتصال را افزایش می دهد (منحنی ۵).

بحث

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می دهد، اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها به‌ویژه LDL نقش مهمی را در فرایند ایجاد آتروز بازی می نماید [۱، ۲ و۲۱]. اکسیداسیون LDL شامل پراکسیداسیون اسیدهای چرب و تغییرات کووالان آپوپروتئین B است که نتیجه چنین تغییراتی افزایش برداشت LDL توسط ماکروفاژها و در نتیجه تشکیل سلول‌های کف آلود خواهد بود [۴، ۲۲]. 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 بیماری های قلبی- عروقی می شود [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 می دهد، چندان شناخته شده نمی باشد. گزارش‌های ارائه شده نشان می دهد 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 یون های فلزات واسطه همانند مس نیز احتمالاً برای این اکسیداسیون ضروری است [۲۶]. با توجه به مطالب فوق، در این مطالعه حساسیت اکسیداسیون LDL توسط یون های مس در غیاب و حضور دو فلاونوئید نارنجین و کوئرسیتین مورد بررسی قرار گرفت. انکوباسیون LDL جدا شده از پلاسما

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

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 این‌که با مهار تشکیل رادیکال‌های آزاد این فرایند را متوقف نمایند. نارنجین فلاونوئیدی است که به خاطر وجود گروه هیدروکسیل و کربونیل به ترتیب در کربن‌های شماره ۳ و ۴، حضور پیوند دوگانه بین کربن‌های 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 یون‌های 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 فلاونوییدها، طبق برخی گزارش‌های 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 ۱۰۰ng/ml در میلی لیتر دارای خاصیت آنتی اکسیدانی 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 واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد [۳۰].

$$2Cu^{+2} + \text{Flavonoid-OH} \longrightarrow 2Cu^{+2} + \text{Flavonoid=O} + H^{+}$$
$$Cu^{+} + O_2 \longrightarrow 2CuO_2^{+}$$
$$Cu^{+} + CuO_2^{+} + 2H^{+} \longrightarrow 2Cu^{+} + H_2O_2$$
$$\text{Target-}Cu^{+} + \text{complex} + H_2O_2 \longrightarrow \text{target-}Cu^{+2} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$
$$\text{Target-}Cu^{+2} + OH^{\cdot} \longrightarrow \text{damage target} + Cu^{+2}$$

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[1]، پروکسیل[2] و هیدروکسیل می شوند، بنابراین یون های کوپروس (Cu^{+1}) در مقایسه با یون های کوپریک (Cu^{+2}) تمایل بیشتری جهت این گونه واکنش ها دارند و به عبارت دیگر ترکیبی که موجب احیاء Cu^{+2} به 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 ۱۰۰ 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 یون‌های 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 یون‌های مس به LDL متصل شده اند. افزودن نارنجین به LDL قبل از انکوباسیون با یون‌های مس مشخص نمود که این فلاونوئید موجب افزایش مس آزاد در فاز آبی شده و تشکیل کمپلکس مس- LDL را در حدود ۳۲٪ کاهش می‌دهد. 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

1- Alkoxyl
2- Peroxyl

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

لیپوپروتئین را کاهش می‌دهد. 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 غلظت‌های 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 گزارش‌های قبلی 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 یون‌های مس و در نتیجه اکسیداسیون آن توسط ترکیباتی همانند فلاونوئیدها ممکن است راهبردی موثر جهت جلوگیری از پیشرفت بیماری های قلبی- عروقی باشد. مطالعه ما روی دو فلاونوئید نارنجین و کوئرسیتین نشان داد که در غلظت‌های 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.

مآخذ

1. 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.
2. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *Journal of Biological Chemistry* 1997*;* 272: 20963-20966.
3. 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.
4. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997*;* 95: 1062-1071.
5. Havala T, Pakenen P. Lipoprotein and atherosclerosis. *J of Clinic Basis and Cardiol* 2003*;* 3: 87-88.
6. 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.
7. 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.
8. Cook NC, Samman S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effect and dietary sources. *J of Nutr Biochem* 1996*;* 7: 66-76.
9. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J of Clinic Nutr* 2002*;* 76: 560-568.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 10:20 IRDT on Tuesday July 17th 2018

13. Catapano AL. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 1997*;* 48: 39-44.
14. Gieseg 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 Throm 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-Amsha 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 dite-tra-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.