مهارِ آلفاگلوکوزیداز توسط عصاره‌ی هگزانی اندام‌های هوایی گیاهان خاکشیر (*Descurainia sophia* L.schuar) و شاه تره (*Fumaria vaillantii* Loisel)

مرتضی صادقی و محمد علی زارعی*

ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

بیماری دیابت تأثیر عمده‌ای بر سلامت انسانها دارد. یکی از راه‌های مفید برای جلوگیری از افزایش قند خون، کاهش جذب روده‌ای گلوکز از طریق مهار آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کربوهیدرات‌ها مانند آلفاگلوکوزیداز است. هدف از این تحقیق یافتن مهار کننده قوی با منشاء گیاهی برای آنزیم آلفاگلوکوزیداز بود. عصاره هگزانی اندام‌های هوایی (گل، برگ، ساقه) در دو گیاه خاکشیر و شاه‌تره در هفت غلظت مختلف، از نظر فعالیت مهاری آن‌ها بر آنزیم آلفاگلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم به روش میکروپلیت اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۵ نانومتر بررسی شد. هم‌چنین ترکیبات موجود در عصاره هگزانی گل خاکشیر و برگ شاه‌تره که بیش‌ترین اثر مهاری را روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشتند، توسط دستگاه GC/MS شناسایی شدند. از میان اندام‌های هوایی دو گیاه، عصاره هگزانی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای اندام گل خاکشیر و ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای اندام برگ شاه‌تره، فعالیت مهارکنندگی قابل توجهی بر آنزیم آلفاگلوکوزیداز نشان دادند. میزان IC_{50} این عصاره‌ها به ترتیب برابر ۸۸/۰ و ۰۴/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. الگوی مهار برای عصاره گل خاکشیر مهار مختلط (رقابتی-غیررقابتی) و برای عصاره برگ گیاه شاه‌تره از نوع مهار نارقابتی بود. آنالیز GC/MS نشان داد که این عصاره‌ها حاوی ترکیبات فنیل‌پروپانوئید و فنل هستند که می‌توانند مسئول بخشی از اثر مهاری آنها بر روی فعالیت آلفاگلوکوزیداز باشد. عصاره هگزانی این دو اندام، دارای ظرفیت مهارکنندگی موثری هستند و جداسازی عوامل این ظرفیت، با هدف دسترسی به مهارکننده‌های دارای کاربرد دارویی، می‌تواند موضوع مناسبی برای پژوهش های آینده باشد.

واژه های کلیدی: آلفاگلوکوزیداز، خاکشیر، شاه تره ، عصاره‌ی هگزانی، مهار آنزیمی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۷۱۰۶۳۲ ، پست الکترونیکی: mazarei@uok.ac.ir

مقدمه

اختلال در بخش درون‌ریز پانکراس باعث ایجاد بیماری دیابت ملیتوس می‌شود. دیابت ملیتوس شایع‌ترین اختلال مختلط متابولیکی در جهان است که با افزایش در سطح گلوکز خون تشخیص داده می‌شود. شیوع جهانی دیابت در میان بزرگسالان (۲۰ تا ۷۹ سال) در سال ۲۰۱۰، ۲۸۵ میلیون نفر بوده است و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۳۰ به ۴۳۹ میلیون نفر برسد (۴). اگر میزان گلوکز خون پس از صرف غذا به طور مزمن ادامه داشته باشد باعث ایجاد هیپرگلیسمی مزمن می‌شود که می‌تواند منجر به گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌های متعددی در بدن شود (۲۶) و این قنددار شدن پروتئین‌ها منجر به تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته که یکی از عوامل عمده عوارض دیابت است، می‌شود. سطح بالای گلوکز می‌تواند پروتئین‌های ساختاری و عملکردی زیادی را قنددار نموده و باعث از دست دادن عملکرد این پروتئین‌ها شود (۲۲). هم زمان با پیشرفت بیماری دیابت، خطر ایجاد عوارض دیگر مانند رتینوپاتی ، نفروپاتی ، نوروپاتی و آترواسکلروزیس نیز افزایش می‌یابد و به این ترتیب،

بیماری می‌تواند به ارگان‌های خاصی از جمله شبکیه، گلومرول کلیوی و سیستم محیطی عصبی آسیب برساند (۷). تنظیم مسیرهای متعددی (مانند مسیر پلی‌اُل، هگزوز آمین و متیل گلی‌اکسال) در هیپرگلیسمی مزمن بهم می‌خورد و در صورت ادامه داشتن قنددار شدن، مسیرهای ذکر شده می‌توانند آسیب‌های جدی وارد نمایند. تنظیم بالای این مسیرها در دیابت ثابت شده است و راه‌حل‌های زیادی باید صورت بگیرد تا این مسیرها تنظیم شود (۱۵). بنابراین، شناسایی راه‌هایی برای درمان دیابت ملیتوس همراه با تلاش‌هایی جهت پیشگیری از پیشرفت آن، راه توقف این بیماری خواهد بود. سرکوب کننده‌های اشتها، مهارکننده‌های هضم پلی‌ساکاریدها، محرک‌های ترشح انسولین و انسولین‌های القا شده مصرف گلوکز را تحریک می‌کنند و از طریق مهار کردن گلوکونئوژنز و گلیکوژنولیز باعث به تعادل رسیدن سطح گلوکز خون می‌شوند (۲۰). کنترل سطح گلوکز خون پس از صرف غذا می‌تواند یک عامل مهم برای درمان دیابت باشد. یکی از روش‌های کاهش هایپرگلیسمی پس از غذا تأخیر در جذب مونوساکاریدها از طریق مهار آنزیم‌های هیدرولیزکننده کربوهیدرات‌ها مانند آلفاگلوکوزیداز می‌باشد (۱۷). بنابراین، امروزه استفاده از مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز نقش به سزایی در درمان دیابت دارند. این مهارکننده‌ها باعث تأخیر عمل آنزیم آلفاگلوکوزیداز برای شکستن کربوهیدرات‌های پیچیده به قندهای ساده می‌شوند و به این ترتیب ورود گلوکز به خون را کاهش می‌دهند (۴). علاوه بر انسولین استفاده از عوامل خوراکی هیپوگلیسمی مثل سولفونیل‌اوره‌آز، بی‌گوانیدها، تیازولیدین‌دیونزها، مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز و تقلیدکننده‌های ترشح داخلی (پپتید شبه گلوکاگون-۱، پلی‌پپتید مهارکننده گاستریک و مهارکننده‌های دی‌پپتیدیل پپتیداز ۴) کمک زیادی به کنترل دیابت می‌کنند (۲۲). هر چند که مهارکننده‌هایی مثل آکاربوز ، ووگلیبوز ، نوجیرومایسین و ۱-دئوکسی‌نوجیرومایسین به عنوان عوامل خوراکی در بیماری دیابت استفاده می‌شوند (۳) اما با توجه به اینکه استفاده مداوم از این مهارکننده‌ها باعث اثرات جانبی زیادی مثل اسهال ، دردهای شکمی ، نفخ شکم و سمیت کبدی می‌شوند بنابراین، لازم است مهارکننده‌های جدید با عوارض جانبی کمتر گسترش یابد (۲۹). شواهد علمی اخیر نشان می‌دهد که عوارض ناشی از دیابت می‌تواند با رژیم غذایی مناسب، ورزش کردن و روش‌های دارویی جدید درمان شود. علاوه بر این احتمال جلوگیری از شیوع دیابت با به کار بردن افزودنی‌های غذایی و یا گیاهان دارویی یکی از موضوعات پژوهشی جالب می‌باشد (۱۹). فلور گیاهی استان کردستان حاوی گونه‌های گیاهی می‌باشد که در طب سنتی برای درمان بعضی از بیماری‌ها استفاده می‌شود. در نتیجه یک مطالعه غربالگری با هدف شناسایی اثر مهارکنندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز در میان عصاره هگزانی ۶۰ گونه گیاهی بومی استان کردستان، که توسط یکی از نویسندگان این مقاله انجام گرفته بود، ۷ گیاه با فعالیت مهارکنندگی بالا معرفی شدند که دو گیاه خاکشیر (D. sophia) و شاه‌تره (F. vaillantii) از آن جمله‌اند (۳۰). از آنجا که در مطالعه فوق عصاره دو گیاه خاکشیر و شاه‌تره در میان هفت گیاه شناسایی شده دارای بالاترین اثر مهاری (به ترتیب با مهارکنندگی ۹۴ و ۸۳ درصد) بودند، مطالعه حاضر به صورت بخشی از برنامه تکمیلی مطالعه فوق با هدف تعیین موقعیت اندامی مهار کننده در دو گیاه مذکور و هم‌چنین تعیین نوع مهار آنزیم برای عصاره‌های دارای درصد مهار بالا، انجام گرفت.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و بیوشیمیایی: آنزیم آلفاگلوکوزیداز مخمری، سوبسترای پارانیترو فنیل آلفا دی گلوکو پیرانوزید (pNPG)، آکاربوز (مهارکننده استاندارد آنزیم آلفا گلوکوزیداز)، آلبومین سرم گاوی (BSA) از نمایندگی شرکت سیگما، حلال ان- هگزان، DMSO (دی متیل

سولفوکساید) و سایر مواد شیمیایی از نمایندگی‌های شرکت مرک خریداری شدند.

جمع‌آوری گیاهان و تهیه پودر: اندام‌های هوایی گیاهان خاکشیر (*Descurainia sophia*) و شاه‌تره (*Fumaria vaillantii*)، از مناطق مختلف استان کردستان جمع‌آوری شدند (جدول ۱). پس از شناسایی تاکسونومیک آن‌ها در هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی استان کردستان با نام لاتین Herbarium of Research Center of Agricultural and Natural Resources of Kurdistan in Sanandaj (HKS)، بلافاصله به آزمایشگاه گروه علوم زیستی دانشگاه کردستان منتقل شدند. اندام‌های مختلف (شامل گل، برگ و ساقه) به طور کامل جداسازی و در سایه و دمای محیط آزمایشگاه خشک شدند و قبل از تهیه‌ی پودر، نمونه‌ها از لحاظ نظافت و عدم آلودگی بررسی شدند سپس به وسیله قیچی باغبانی به قطعات کوچکی خرد شدند و بوسیله آسیاب به صورت پودر نرم درآورده شدند.پودرهای به دست آمده از اندام‌های هوایی گیاه تا زمان عصاره‌گیری، در ظروف درب‌دار پلاستیکی و در دمای اتاق نگه‌داری شدند.

جدول ۱- مشخصات هرباریومی و موقعیت جغرافیایی تهیه نمونه های گیاهی.

کد هرباریومی	نام علمی گیاه	تاریخ گردآوری	ارتفاع محل از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	موقعیت و محل گردآوری نمونه
HKS 5327	*Descurainia sophia*	۱۳۹۵/۲/۲۸	۱۴۵۰	۳۵/۲۰	۴۷/۰۰	استان کردستان: سنندج ، ایستگاه زاله
HKS 6996	*Fumaria vaillantii*	۱۳۹۵/۲/۱۸	۱۹۲۰	۳۶/۲۲	۴۷/۱۲	استان کردستان: جاده دیواندره به سقز، بین روستاهای کالاکان و کانی سفید

تهیه عصاره هگزانی از نمونه‌های گیاهی: به منظور تهیه‌ی عصاره هگزانی، ۴۰ گرم پودر تهیه شده از هر یک از اندام‌های هوایی گیاه به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال ان- هگزان خیسانده شد و با فواصل زمانی معینی هم‌زده می‌شدند. پس از طی زمان طی شده، نمونه‌ها توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد. مایع صاف شده توسط دستگاه روتاری اواپریتور (Heidolph، مدل HEI-036000130 و سرعت ۵۰ RPM) در دمای $^{\circ}$C ۶۵ تغلیظ شده و پس از تخلیه از مخزن دستگاه، جهت خشک شدن کامل، روی شیشه ساعت به قطر ۱۵ سانتی‌متر، پخش شده و در زیر هود شیمیایی و در دمای محیط قرار گرفت. عصاره‌های خشک شده از روی سطح شیشه ساعت جمع‌آوری و تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای $^{\circ}$C ۲۰- نگه‌داری شدند. جهت افزایش میزان حلالیت عصاره‌های هگزانی در بافرِ اصلی ، از دی‌متیل‌سولفوکساید استفاده شد. به این منظور یک و نیم گرم از عصاره گیاهی در ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفواکساید حل شد. از این محلول به عنوان محلول ذخیره در مراحل بعدی تجارب استفاده شد(۳۰).

سنجش فعالیت آنزیم: در این مطالعه جهت سنجش قدرت مهارکنندگی عصاره‌های اندام‌های هوایی گیاه بر روی فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز، از روش Pistia-Brueggeman با مختصری تغییرات استفاده شد (۲۳). سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۱۵۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان Tecan مدل Sunrise به ترتیب زیر انجام شد. ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶/۶، ۲۰ میکرولیتر از عصاره محلول در ان- هگزان و ۱۰ میکرولیتر آنزیم آلفاگلوکوزیداز ساکارومایسس سرویزیه (۱U/ml محلول در بافر فسفات) وارد چاهک شده، به منظور مخلوط شدن این اجزا با هم میکروپلیت در درون دستگاه به مدت ۳ ثانیه مرتعش شد. پس از ۵ دقیقه انکوبه کردن در دمای $^{\circ}$C ۳۷، برای شروع واکنش ۲۰ میکرولیتر سوبسترای پارانیتروفنیل آلفا گلوکوپیرانوزید به مخلوط

فوق اضافه شد. آنگاه پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ °C، جهت توقف واکنش، ۵۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۰/۱ مولار به آن اضافه شد. به منظور همزمانی شروع واکنش‌ها، از سمپلر ۱۲ کاناله برای اضافه کردن سوبسترا و سدیم کربنات ۰/۱ مولار استفاده شد. سپس میکروپلیت در داخل دستگاه میکروپلیت قرار گرفته و پس از ۳ ثانیه هم‌زدن، جذب آن به مدت ۳ دقیقه و هر یک دقیقه یکبار در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب میکروپلیت‌های خالی، در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شده و از جذب نهایی کم شد. سنجش عصاره‌های گیاهی در سه تکرار انجام شد. به دلیل امکان حضور برخی عوامل دیگر غیر از محصول واکنش، که دارای جذب در ۴۰۵ نانومتر بودند و یا هیدرولیز خودبه‌خودی سوبسترا، برای هر کدام از عصاره‌ها یک چاهک بلانک (حاوی تمام مواد به غیر از آنزیم) نیز تعریف شد. هم‌چنین برای تمام سنجش‌ها از کنترل مثبت (آکاربوز به جای عصاره) و منفی (بافر فسفات به جای عصاره) استفاده شد. یک واحد از فعالیت آنزیمی آلفاگلوکوزیداز به صورت مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که در دمای ۳۷ درجه سانتی¬گراد و در مدت زمان یک دقیقه موجب تولید یک میکرومول محصول پارانیتروفنول از سوبسترای پارانیتروفنیل آلفا گلوکوپیرانوزید گردید.

تحلیل داده‌ها: پس از پایان سنجش فعالیت آنزیم، جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظرش کسر شده و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از جذب چاهک تست، جذب نهایی محاسبه شد. سرعت واکنش براساس شیب نمودار جذب در برابر زمان محاسبه شد. با استفاده از فرمول مهار، درصد مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز به وسیله عصاره به دست آمد (معادله‌ی۱). درصد مهار برای سه تکرار هر عصاره محاسبه و انحراف استاندارد براساس میانگین به دست آمده محاسبه شد. تمام این مراحل با استفاده از نرم‌افزار سیگما پلات انجام شده است.

معادله (۱)

$$\%\text{مهار} = \frac{\text{شیب نمودار عصاره} - \text{شیب نمودار کنترل منفی}}{\text{شیب نمودار کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

تمام مراحل گفته شده برای ۷ غلظت مختلف ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره، و ۱۰ غلظت مختلف ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۷، ۰/۰۱۶، ۰/۰۳۱، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای آکاربوز انجام شده و میانگین درصد مهار به دست آمد. غلظت‌های فوق برای عصاره های گیاهی پس از یکسری تجربیات آزمون و خطا با هدف یافتن مناسب‌ترین محدوده اثر بدست آمدند، اما در مورد اکاربوز نظر به اطلاع از IC_{50} آن که ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است، غلظت‌های کاری بر مبنای آن انتخاب شدند . در رسم نمودارهای درصد مهار مبنای انتخاب غلظت چه برای عصاره و چه برای اکاربوز مهار صددرصدی بود، و در مواردی که به این سطح از مهار نمی‌رسیدند، غلظت اعمال‌کننده حداکثر مهار، ملاک بود. از طریق رسم نمودار درصد مهار بر علیه غلظت نهایی عصاره، IC_{50} که بیان کننده مقدار غلظتی از عصاره‌ها است که ۵۰ درصد مهار می‌دهد، تعیین شد.

فعالیت مهاری نسبی (RIA) نشان دهنده نسبت IC_{50} مهارکننده استاندارد (آکاربوز) به IC_{50} مهارکننده مورد نظر (عصاره‌ها) می‌باشد. از فعالیت مهاری نسبی می‌توان جهت مقایسه قدرت بازدارندگی مهارکننده‌های مختلف آنزیم مورد نظر استفاده نمود. جهت محاسبه RIA از معادله زیر استفاده شد (۸).

$$\text{RIA} = \frac{(\text{IC50 مهارکننده استاندارد})}{(\text{IC50 مهارکننده تست})}$$

آنالیز سنتیکی عصاره‌های دارای بیشترین درصد مهار: به منظور تعیین نوع مهار اعمال شده توسط عصاره‌های دارای بیشترین درصد مهار بر روی آنزیم، نمودار معکوس مضاعف لینویور- برک براساس واکنش آنزیمی در حضور

غلظت‌های مختلف مهارکننده و بدون حضور عصاره (کنترل) در شش غلظت مختلف سوبسترا، رسم شد. غلظت‌های تهیه شده سوبسترا براساس ضرایب تصحیح کننده رویکرد لینویور- برک انتخاب، و عملاً سوبسترا در شش غلظت۳/۱۱، ۲/۴۸، ۱/۸۷، ۱/۲۴، ۰/۶۲۲ و ۰/۳۱۱ میلی‌مولار تهیه گردید. بعد از تعیین مهار با استفاده از رویکرد لینویور- برک، جهت مقایسه از رویکردهای هانس- وولف و ادی- اسکاچارد (۲۵) نیز برای اندام‌هایی که بیش‌ترین درصد مهار را بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشتند، استفاده شد. برای رسم این نمودارها از یکی از غلظت‌های عصاره هگزانی اندام مربوطه استفاده شد. برای کنترل و هر یک از غلظت‌های مهارکننده V_{max} و K_m تعیین گردیدند.در نهایت مقدار ثابت مهارکنندگی Ki با استفاده از نمودارهای ثانویه در غلظت‌های مختلف مهارکننده برای هریک از مهارکننده‌ها تعیین گردید.

کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنج جرمی: با توجه به خاصیت مهارکنندگی عصاره هگزانی اندام‌های هوایی گیاهان، لازم بود مشخص شود که این خاصیت مهارکنندگی مربوط به کدام یک از اجزاء تشکیل‌دهنده عصاره است. لذا شناسایی ترکیبات نیز صورت گرفت. جهت شناسایی ترکیبات موجود در عصاره‌های مختلف گیاهان از دستگاه GC (مدل A-7890، شرکت Agilent) همراه با MS (مدل A-5973، شرکت Agilent) استفاده می‌شود. در این تکنیک پس از تزریق نمونه‌ها به دستگاه، با محاسبه و بررسی مؤلفه‌های مختلف طیف‌های جرمی ترکیبات موجود در عصاره‌ها و مقایسه تمامی این مؤلفه‌ها با مشخصات ترکیب‌های استاندارد، اقدام به شناسایی اجزای موجود در نمونه می‌گردد. عصاره‌هایی که دارای بیش‌ترین اثر مهاری بر آنزیم آلفاگلوکوزیداز بودند، جهت آنالیز GC/MS به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کردستان ارسال شدند.

جدول ۲- مشخصات دستگاه GC-MS و جزئیات روش‌کار مورد استفاده جهت آنالیز نمونه‌های عصاره اندام‌های گیاهان مورد تحقیق

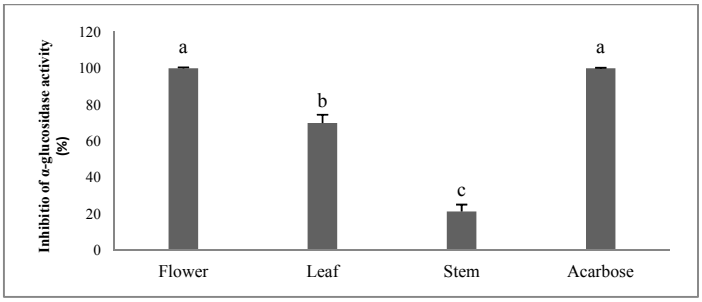
دستگاه GC	مدل A-7890، شرکت Agilent ، ساخت کشور آمریکا
نوع ستون	N-5
ابعاد ستون	طول ۳۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر
برنامه ریزی دمایی ستون	دمای اولیه ˚c ۴۵، گرادیان دمایی ċ/min ۲ ، دمای نهایی˚c۲۵۰
محل تزریق	Split/split less
گاز حامل	هلیوم
دستگاه Mass	مدل A-5973، شرکت Agilent ، ساخت کشور آمریکا
دمای محفظه یونش	۲۳۰˚C
تجزیه‌گر جرمی	Quadrupole
دمای تجزیه‌گر جرمی	۱۵۰˚C

نتایج

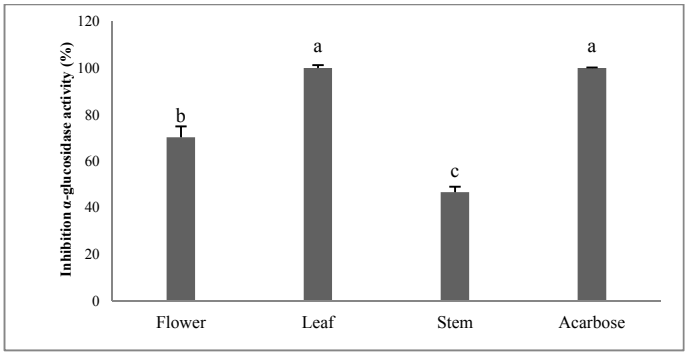
درصد مهار و IC_{50}: نتایج حاصل از مهارکنندگی عصاره هگزانی اندام‌های هوایی این گیاهان نشان داد که در گیاه خاکشیر بیش‌ترین درصد مهار (۱۰۰ درصد) مربوط به اندام گل (شکل ۱) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در گیاه شاه‌تره بیش‌ترین درصد مهار (۱۰۰ درصد) مربوط به اندام برگ (شکل ۲) در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر بود.

میزان IC_{50} هم‌چنین شاخص RIA برای عصاره هگزانی اندام‌های دارای بالاترین درصد مهار بر آنزیم آلفاگلوکوزیداز در جدول ۳ آورده شده است. مطابق آن میزان IC_{50} به دست آمده برای عصاره هگزانی اندام گل

گیاه خاکشیر و برگ در گیاه شاه‌تره نسبتاً پایین و لذا قابل توجه است.



شکل ۱- مقایسه حداکثر درصد مهار آلفاگلوکوزیداز توسط عصاره هگزانی اندام‌های هوایی گیاه خاکشیر با آکاربوز (غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گل، برگ و ساقه و غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آکاربوز). مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار بیان شده‌اند. در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حروف مشترک هستند براساس آزمون (حروف دانکن a، b و c) حداقل تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد اختلاف ندارند.



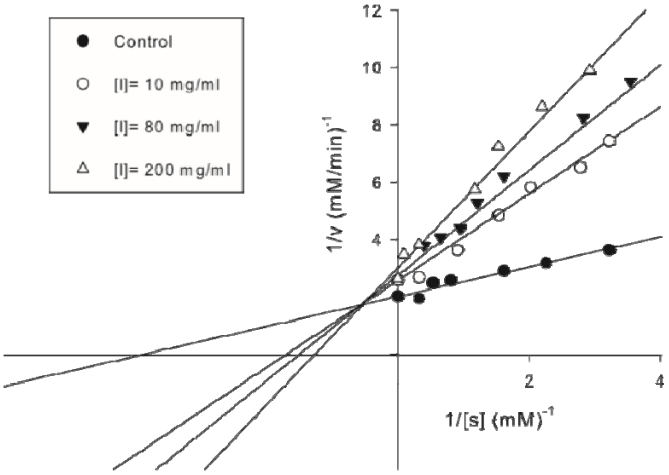
شکل ۲- مقایسه حداکثر درصد مهار آلفاگلوکوزیداز توسط عصاره هگزانی اندام‌های هوایی گیاه شاه‌تره با آکاربوز (غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گل، برگ و ساقه و غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آکاربوز). مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار بیان شده‌اند. در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حروف مشترک هستند براساس آزمون (حروف دانکن a، b و c) حداقل تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد اختلاف ندارند.

جدول ۳- میزان IC_{50} عصاره هگزانی اندام‌های هوایی دو گیاه در مقایسه با نمونه استاندارد آکاربوز(IC_{50} = ۰/۰۸ mg/ml) و مقادیر فعالیت مهار نسبی RIA برای عصاره هگزانی اندام‌های دارای بالاترین درصد مهار آلفاگلوکوزیداز

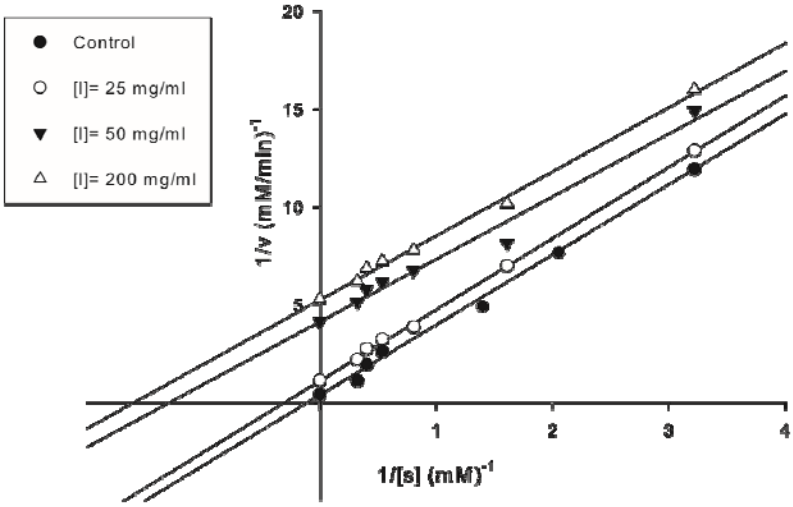
نام گیاه	نوع اندام	میزان IC_{50} (mg/ml)	RIA
خاکشیر	گل	۰/۸۸	۰/۰۰۱
	برگ	۳/۱۶	۰/۰۰۰۳
	ساقه	۲۱/۱۸	–
شاه‌تره	گل	۵/۰۴	۰/۰۰۰۲
	برگ	۱/۰۴	۰/۰۰۰۹
	ساقه	۳۱/۱۶	–

نتایج بررسی سینتیکی واکنش آنزیم آلفاگلوکوزیداز در حضور عصاره گیاهان با رویکرد لینویور- برک: نتایج مطالعه سینتیکی دو عصاره هگزانی اندام‌های دارای درصد مهار بالای گیاهان فوق نشان داد که عصاره اندام گل در

خاکشیر مطابق الگوی مهار مختلط(رقابتی- غیررقابتی) (شکل ۳) و اندام برگ در شاه‌تره مطابق الگوی مهار نارقابتی(شکل۴) رفتار می‌کنند. جهت مقایسه، آکاربوز که در غلظت ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد، با الگوی مهار رقابتی باعث مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز شد.



شکل ۳- تغییرات V_o^{-1} در مقابل $[S_o]^{-1}$ (شکل معکوس مضاعف) جهت تعیین نوع مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز توسط سه غلظت (۱۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره هگزانی اندام گل گیاه خاکشیر، الگوی مهار مختلط (مرکب) می‌باشد.



شکل ۴- تغییرات V_o^{-1} در مقابل $[S_o]^{-1}$ (شکل معکوس مضاعف) جهت تعیین نوع مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز توسط سه غلظت (۲۵، ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره هگزانی اندام برگ گیاه شاه‌تره، الگوی مهار نارقابتی می‌باشد.

مقادیر پارامترهای سینتیکی: مقادیر پارامترهای سینتیکی محاسبه شده مربوط به مهار، توسط عصاره‌ی گل برای خاکشیر در جدول ۴ و عصاره برگ برای شاه‌تره در جدول ۵ آمده است. مقادیر K_m، K_m^{app}، V_{max}، V_{max}^{app}، و K_i از طریق رسم شکل $1/V_o$ بر علیه $1/[S_o]$ و به دست آوردن معادله‌ی خط، محاسبه شد. برای تعیین مقدار Ki از طریق رسم شیب نمودار اولیه در مقابل غلظت مهار کننده $[I_o]$ برای گل خاکشیر (شکل ۵) و برگ شاه‌تره (شکل ۶) انجام شد.

نتایج بررسی سینتیکی واکنش آنزیم آلفاگلوکوزیداز با رویکردهای "هانس- وولف" و "ادی- اسکاچارد": بعد از تعیین نمودن مهار با استفاده ازرویکرد لینویور-

برک، جهت مقایسه بیش‌تر رویکردهای هانس- وولف و ادی- اسکاچارد نیز برای داده‌های عصاره‌های گل خاکشیر و برگ شاه‌تره که بیش‌ترین درصد مهار را بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشتند، رسم گردید. نتایج مطالعه سینتیکی عصاره هگزانی گل خاکشیر با استفاده از رویکرد هانس- وولف، مهار مرکب (شکل ۷) و برای اندام برگ شاه‌تره مهار نارقابتی (شکل ۸) را از خود نشان می‌دهد که با نتایج نمودارهای معکوس مضاعف قبلی مطابقت دارد. هم‌چنین نتایج با استفاده از نمودار ادی- اسکاچارد و نیز محل تقاطع در نمودارها برای گل خاکشیر مهار مرکب (شکل ۹) و برای برگ شاه‌تره مهار نارقابتی (شکل ۱۰) را نشان می‌دهد.

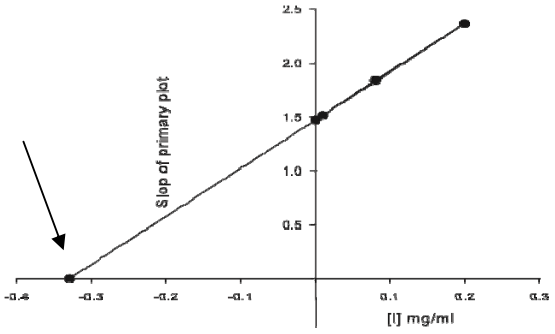
نتایج آنالیز GC/MS عصاره هگزانی گل خاکشیر و برگ شاه‌تره: جداول ۶ و ۷، به ترتیب ترکیبات موجود در عصاره اندام گل خاکشیر و برگ شاه‌تره با ساختار دوبعدی آن‌ها را نشان می‌دهند که بعضی از این ترکیبات در عصاره‌های هگزانی دو گیاه از Pub Chem به دست آمدند و بعضی از این ساختارهای شمیایی در Pub Chem ثبت نشده‌اند و شناسایی ساختار و ویژگی‌های آن‌ها به پژوهش‌های بیش‌تری نیاز دارد. در میان پیک‌های مربوط به گل خاکشیر ۱۰ پیک و برای برگ شاه‌تره ۸ پیک قابل توجه بودند که اقدام به شناسایی ترکیبات آن‌ها شد. نتایج حاصل از تعیین ترکیبات موجود در عصاره هگزانی گل خاکشیر و برگ شاه‌تره حاکی از آن است که این عصاره‌ها حاوی فنیل‌پروپانوئیدها (ائوژینول و ایزوائوژینول)، ترکیبات حاوی فلاونوئید (ایزوکانین) و ترکیبات گروه متوکسی و فنل (فنل ۲- متوکسی- ۵- (۱- پروپنیل)، فنل- ۲- متوکسی- ۳- (۲- پروپنیل) و ترکیبات حاوی برم (۵- برومو آدامانتان- ۲- وان) می‌باشند.

جدول ۴- مقادیر پارامترهای سینتیکی محاسبه شده برای عصاره هگزانی اندام گل در خاکشیر (مهار مرکب).

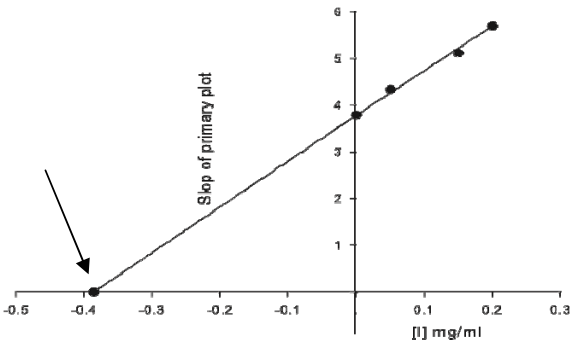
غلظت(mg/ml)	K_m (mM)	K_m^{app}(mM)	V_{max} (mM/min)	V_{max}^{app} (mM/min)	Ki (mg/ml)
۱۰	۰/۲۶	۰/۵۹	۰/۵	۰/۳۹	۰/۳۲۹
۸۰		۰/۶۷		۰/۳۶	
۲۰۰		۰/۸۳		۰/۳۵	

جدول ۵- مقادیر پارامترهای سینتیکی برای عصاره هگزانی اندام برگ در شاه‌تره (مهار نارقابتی).

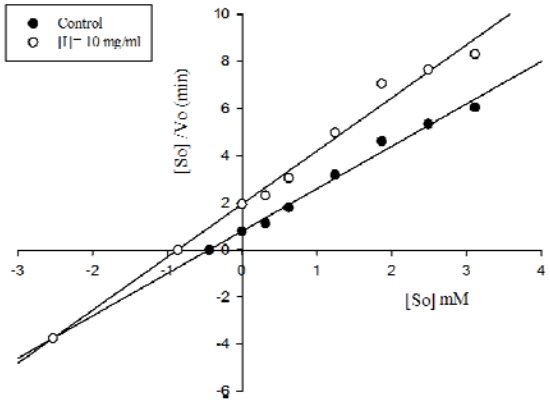
غلظت(mg/ml)	K_m (mM)	K_m^{app}(mM)	V_{max} (mM/min)	V_{max}^{app} (mM/min)	Ki (mg/ml)
۲۵	۰/۲۶	۰/۲۱	۰/۵	۰/۰۹	۰/۳۸۵
۵۰		۰/۱۳		۰/۰۶	
۲۰۰		۰/۰۸		۰/۰۱	



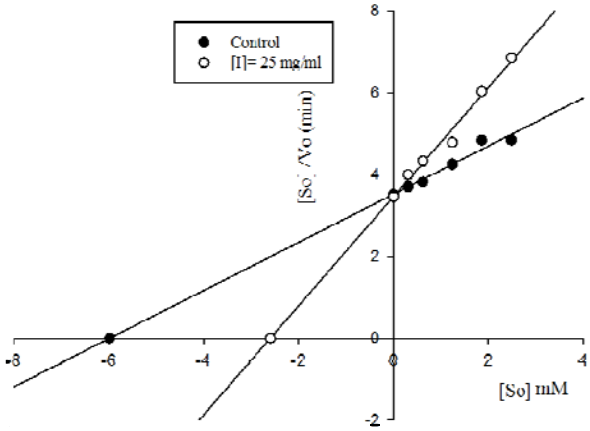
شکل ۵- شکل ثانویه تغییرات شیب نمودار اولیه در مقابل غلظت‌های مختلف مهارکننده جهت تعیین ثابت مهارکنندگی عصاره هگزانی گل گیاه خاکشیر. (مقدار K_i- با فلش نشان داده شده است)



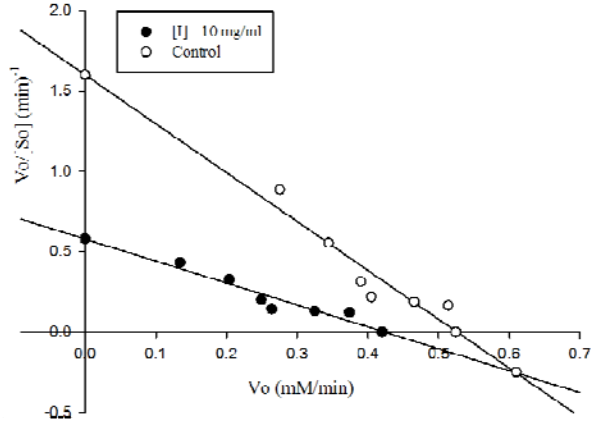
شکل ۶- شکل ثانویه تغییرات شیب شکل اولیه در مقابل غلظت‌های مختلف مهارکننده جهت تعیین ثابت مهارکنندگی عصاره هگزانی برگ شاه‌تره. (مقدار K_i– با فلش نشان داده شده است)



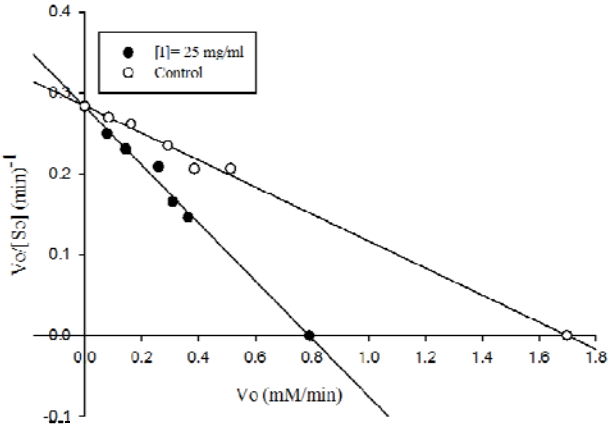
شکل ۷- تغییرات $[S_o]/V_o$ در مقابل $[S_o]$ جهت تعیین نوع مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز با استفاده از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هگزانی گل خاکشیر که مهار مرکب را نشان می‌دهد.



شکل ۸- تغییرات $[S_o]/V_o$ در مقابل $[S_o]$ جهت تعیین نوع مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز با استفاده از غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هگزانی برگ شاه‌تره که مهار نارقابتی را نشان می‌دهد.



شکل ۹- تغییرات $V_o/[S_o]$ در مقابل V_o جهت تعیین نوع مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز با استفاده از شکل ادی-اسکاچارد و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گل خاکشیر که مهار مرکب را نشان می‌دهد.

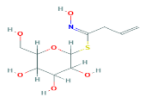
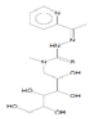
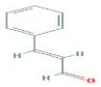
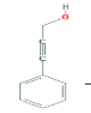
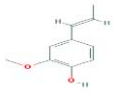
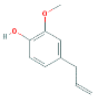
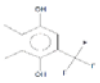
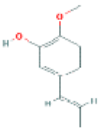
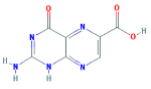


شکل ۱۰- تغییرات $V_o/[S_o]$ در مقابل V_o جهت تعیین نوع مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز با استفاده از شکل ادی-اسکاچارد و در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای برگ شاه‌تره که مهار نارقابتی را نشان می‌دهد.

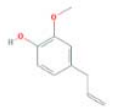
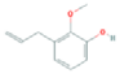
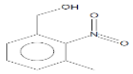
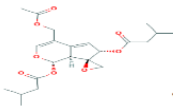
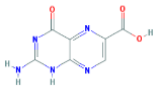
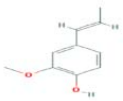
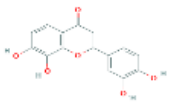
بحث و نتیجه‌گیری

بیماری دیابت یک اختلال متابولیکی مختلط است که با کمبود ترشح انسولین و یا کاهش حسگری نسبت به انسولین تشخیص داده می‌شود. تأخیر درترشح انسولین پس از صرف غذا منجر به افزایش یک موج شدید در سطح گلوکز خون می‌شود که به قله هایپرگلیسمی معروف است (۴). در صورتی که هایپرگلیسمی پس از صرف غذا به صورت مزمن ادامه یابد منجر به عوارض قلبی- عروقی در بیماران دیابتی می‌شود (۷). با تجزیه شدن غذا به خصوص غذاهای حاوی کربوهیدرات بالا، این کربوهیدرات‌ها توسط آنزیم‌های مختلف به گلوکز تبدیل می‌شوند از جمله‌ی این آنزیم‌ها، آلفاگلوکوزیداز روده‌ای واقع در اپی‌تلیوم روده کوچک می‌باشد. این آنزیم در مرحله آخر هیدرولیز کربوهیدرات‌ها، پیوند گلیکوزیدی در الیگوساکاریدها را تجزیه می‌کند و موجب تولید مونوساکاریدهای قابل جذب می‌شود (۱۲).

جدول ۶- مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره هگزانی گل خاکشیر توسط دستگاه GC/MS.

ردیف	RT (min)	نام ترکیب	Pub Chem CID	ساختار دوبعدی
۱	۷/۱۶	Desulphosinigrin	۹۶۰۱۷۱۶	
۲	۷/۸۸	1-Methylamino-1-deoxy-d-glucitol-N-thiocarboxylic acid 2-[1-[2-pyridyl]ethylidene]hydrazide	-----	
۳	۸	5-Bromoadamantan-2-one	۵۹۰۹۰۵	
۴	۸/۲	Cinnamylaldehyde	۶۳۷۵۱۱	
۵	۸/۵	3-Phenyl-2-propyn-1-ol	۱۲۳۱۱۵	
۶	۸/۹	Isoeugenol	۸۵۳۴۳۳	
۷	۹/۱۱	Eugenol	۳۳۱۴	
۸	۹/۴۶	Phen-1,4-diol, 2,3-dimethyl-5-trifluoromethyl	-----	
۹	۹/۶۹	Phenol, 2-methoxy-5-(1-propenyl)	۱۷۸۱۹۴۷	
۱۰	۱۰/۵	Pterin-6-carboxylic acid	۷۰۳۶۱	

جدول ۷- مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره هگزانی برگ شاه‌تره توسط دستگاه GC/MS.

ردیف	RT (min)	نام ترکیب	Pub Chem CID	ساختار دوبعدی
۱	۸/۲	Eugenol	۳۳۱۴	
۲	۸/۹	Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)	۵۹۶۳۷۳	
۳	۸/۲۷	Cinnamylaldehyde	۶۳۷۵۱۱	
۴	۸/۵۱	3-Methyl-2-nitrobenzyl alcohol	-----	
۵	۸/۸۹	Valtrate	۴۴۲۴۳۶	
۶	۸/۹۶	Pterin-6-carboxylic acid	۷۰۳۶۱	
۷	۹/۶۹	Isoeugenol	۸۵۳۴۳۳	
۸	۱۰/۵	Isookanin	۱۲۳۰۹۹۰۴	

مهارکننده‌ها با الیگوساکاریدها رقابت، و از تجزیه آن‌ها به مونوساکاریدها جلوگیری می‌کنند. بنابراین، باعث کاهش فرآیند هضم و نهایتاً کاهش سطح گلوکز خون می‌شوند. آکاربوز، ووگلیبوز و میگلیتول مهارکننده‌های تجاری آلفاگلوکوزیداز می‌باشند و به عنوان خط اول درمان برای کاهش هایپرگلیسمی پس از صرف غذا در نظر گرفته می‌شوند. این داروها همراه با داروهای خوراکی مانند مت‌فورمین و سولفانیل‌اوره قند خون را کنترل می‌کنند و باعث کاهش سطح هموگلوبین گلیکوزیله شده (HbA1c) می‌شوند. وجود، مهارکننده‌های فوق دارای اثرات جانبی معدی- روده‌ای مانند اسهال و نفخ شکم است و این عوارض باعث می‌شوند که جهتِ مطالعات، بیش‌تر به سمت منابع طبیعی و گیاهان دارویی سوق پیدا کند و جست‌وجوی مهارکننده‌های جدید به ویژه از منابع طبیعی که دارای عوارض جانبی کم‌تری باشند، ضروری به نظر می‌رسد (۴).

گیاه خاکشیر (*D.sophia*) از خانواده براسیکاسه و از گیاهان یکساله می‌باشد. در طب سنتی از خاکشیر به عنوان ضدتب، باز کننده اشتها، ضدکرم و در درمان بیماری‌های مربوط به گلو استفاده می‌شد (۲۸). گونه خاکشیر بومی مناطق شمال آفریقا و جنوب اروپا می‌باشد و در ایران نیز در نواحی غرب (تبریز و سنندج) و شمال (آمل) یافت می‌شود (۱۸). نجاتی و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که عصاره‌ی هیدروالکلی دانه‌ی خاکشیر بر میزان غلظت سرمی تستوسترون در بافت بیضه تأثیر می‌گذارد. مطالعات دیگر نشان داد که در خاکشیر ترکیبات گلیکوزید سولفوره و ترکیبات فنولی وجود دارند (۲۱). گیاه شاه‌تره (*F.vaillantii*) عضوی از خانواده فوماریاسه و از انواع گیاهان یکساله می‌باشد و میوه‌ی این گیاه کروی تا بیضوی شکل می‌باشد (۱۶). هم‌چنین مطالعات داروشناسی نشان داده است که این گیاه دارای فعالیت‌های ضدتب (۱۰)، ضد اسهال (۹) و حفاظت کبدی (۲۴) می‌باشد در ضمن اثر هیپوگلیسمی با این گیاه نشان داده شده است (۲). آنکیتا و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت مهاری عصاره الکلی ۱۵ گیاه را بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز آزمایش کردند که در بین این گیاهان، ریزوم گیاه *Picrohiza kurroa* و ریشه گیاه *Rubia cordifolica* دارای بیش‌ترین تأثیر مهاری بر روی آنزیم بودند (۴). کیم و همکاران (۲۰۰۸) تحقیقی بر روی جداسازی دو ترکیب ۲و۴ دی‌بروموفنل و ۲و۴و۶ تری‌بروموفنل از جلبک‌های *Grateloupia elliptica* و *Polyopes lancifolia* انجام دادند و بررسی نتایج نشان داد که این دو ترکیب اثر مهاری بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشتند (۱۱). بریندیس و همکاران (۲۰۱۴) با نشان دادن مهار آلفاگلوکوزیداز توسط عصاره آبی *Coriandrum sativum* و هم‌چنین جدا کردن ترکیبات فعال در این گیاه، اثبات کردند که این گیاه موجب کاهش هایپرگلیسمی در محیط In vitro می‌شود (۶).

براساس نتایج حاصل از این پژوهش بیش‌ترین میزان مهارکنندگی گیاه خاکشیر مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هگزانی گل (۱۰۰ درصد) و بیش‌ترین میزان فعالیت مهاری گیاه شاه‌تره مربوط به غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هگزانی برگ (۱۰۰ درصد) بود. مطابق نتایج به دست آمده می‌توان گفت که از میان اندام‌های هوایی گیاه خاکشیر و شاه‌تره، گل خاکشیر و برگ شاه‌تره دارای اثر مهاری بیش‌تری می‌باشند و جهت پژوهش‌های بعدی می‌توان بر روی این اندام‌ها تمرکز کرد. براساس مطالعات مربوط به محاسبه IC_{50} برای اندام‌های هوایی گیاهان مورد نظر، اندام گل گیاه خاکشیر دارای مقدار IC_{50} برابر با ۰/۸۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و اندام برگ شاه‌تره دارای IC_{50} برابر با ۱/۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین شاخص فعالیت مهاری نسبی (RIA)، برای عصاره‌ی گل خاکشیر برابر با ۰/۰۰۱ و برای عصاره‌ی برگ شاه‌تره برابر با ۰/۰۰۰۹ بود. این شاخص از مقایسه توان مهاری عصاره‌ها با مهارکننده خالص استاندارد این آنزیم به دست می‌آیند و جهت مقایسه توان مهارکنندگی عصاره‌های مختلف مورد استفاده می‌باشد. از میان اندام‌های هوایی بیشترین مقدار RIA مربوط به گل خاکشیر و برگ شاه‌تره بود، (هر چه میزان شاخص RIA بیش‌تر باشد، نشان‌دهنده فعالیت مهاری بیشتری بر روی آنزیم می‌باشد). با توجه به IC_{50} کمتر و RIA بیشتر برای این دو اندام از گیاهان مورد بررسی، می‌توان این گونه برداشت نمود که ممکن است یک نوع مهارکننده قوی در عصاره این اندام‌ها وجود داشته باشد و بنابراین می‌توان مطالعات بعدی را با در نظر داشتن این موضوع، با هدف یافتن ترکیباتی با فعالیت مهارکنندگی آلفاگلوکوزیداز، بیشتر بر روی این اندام‌ها از دو گیاه متمرکز نمود. روند تغییرات مقدار IC_{50} در اندام‌های مورد مطالعه این دو گیاه به صورت: گل شاه‌تره > برگ خاکشیر > برگ شاه‌تره > گل خاکشیر و روند تغییرات شاخص RIA نیز در اندام‌های مورد مطالعه این دو گیاه به صورت: گل خاکشیر > برگ شاه‌تره > برگ خاکشیر > گل شاه‌تره می‌باشد. لذا هر دو شاخص حکایت

از توان بالای مهاری عصاره گل خاکشیر و برگ شاه‌تره دارد.

مطابق نتایج حاصل از بررسی‌های سینتیک مهار آنزیمی، با استفاده از سه رویکرد لینویور- برک، هانس- وولف و ادی- اسکاچارد، عصاره هگزانی اندام گل گیاه خاکشیر الگوی مهار مختلط (رقابتی- غیررقابتی) و عصاره برگ شاه‌تره الگوی مهار نارقابتی را از خود نشان دادند. با توجه به نوع الگوی مهار (مرکب) در گل خاکشیر انتظار می‌رود که مهارکننده موجود در عصاره با تمایل متفاوت به آنزیم (E) و مجموعه آنزیم- سوبسترا (ES) متصل شود. اما در مورد برگ شاه‌تره به دلیل وجود مهار نارقابتی می‌توان این گونه برداشت نمود که مهارکننده موجود در عصاره فقط به مجموعه¬ی آنزیم- سوبسترا وصل می‌شود و مهارکننده وقتی عمل می‌کند که مجموعه آنزیم و سوبسترا (ES) شکل گرفته باشد.

به منظور شناخت بیشتر از کم و کیف ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های هگزانی اندام‌های هوایی دارای فعالیت آنتی‌گلوکوزیدازی با استفاده از دستگاه GC/MS ترکیبات موجود در عصاره‌های هگزانی دارای بیشترین درصد مهار آلفاگلوکوزیدازی مشخص شد. این عصاره‌ها شامل گل خاکشیر و برگ شاه‌تره بود. براساس مطالعات قبلی مشخص شده است که ترکیباتی مانند فنیل‌پروپانوئیدها و مشتقات آن‌ها (۲۷)، بروموفنل‌ها (مونوبروماید فنل، دی‌بروماید فنل و ...) (۱۴)، مشتقات شالکن سولفانامید (۵)، فلاونوئیدها (ژرادون، لوتئولین) و ترکیبات فنلی (۱) اثرات مهارکنندگی قابل توجهی بر آنزیم آلفاگلوکوزیداز دارند. با توجه به مهارکننده‌های استاندارد آنزیم آلفاگلوکوزیداز (آکاربوز، ووگلیبوز و ...) می‌توان نتیجه گرفت که در این مهارکننده¬ها گروه NH وجود دارد و در عصاره هگزانی نیز ترکیباتی مانند ۱- متیل آمینو- ۱- دئوکسی- دی- گلوسیتول و پترین- ۶- کربوکسیلیک اسید حاوی گروه NH می‌باشند و احتمالاً از طریق خاصیت احیاکنندگی می‌توانند باعث مهار آنزیم شوند. از طرفی مهارکننده‌های طبیعی آنزیم آلفاگلوکوزیداز مانند کوتالانول و سالاسینول که از گیاه S.reticulata به دست آمده‌اند، دارای گوگرد می‌باشند و در عصاره‌های هگزانی نیز ترکیبی مانند دسولفوسینگرن (Desulphosinigrin) حاوی گوگرد است. با توجه به ترکیبات موجود در عصاره هگزانی دو اندام و هم‌چنین مشخص شدن نوع مهار در دو اندام، انتظار می‌رود که این ترکیبات موجب مهار مختلط (رقابتی- غیر رقابتی) و نارقابتی به ترتیب در گل خاکشیر و برگ شاه‌تره شوند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره هگزانی اندام‌های گل گیاه خاکشیر و برگ گیاه شاه‌تره به صورت قابل توجهی دارای اثر مهاری بر فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز می‌باشند و همچنین با توجه به نتایج مطالعات سینتیک مهار آنزیمی می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً این عصاره‌ها دارای ترکیباتی با عملکرد هر یک از مهارکننده‌های آنزیم آلفاگلوکوزیداز می‌باشند و بنابراین شاید بتوان در مطالعات بعدی از این عصاره‌ها با هدف شناسایی منابع بالقوه تهیه داروهای جدید و دارای عوارض پایین، در جلوگیری از پیشرفت بیماری دیابت و درمان این بیماری استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی همکاران و مسئولین دانشکده علوم دانشگاه کردستان به جهت فراهم نمودن شرایط و امکانات انجام این پژوهش و همچنین از جناب آقای مهندس حسین معروفی که در تمام مراحل گردآوری شناسایی و آماده سازی نمونه های گیاهی ما را یاری نمودند، ابراز می‌نمایند.

منابع

1- Ahmed D, Kumar V, Sharma M, Verma A. 2014. Target guided isolation, in-vitro antidiabetic, antioxidant activity and molecular docking studies of some flavonoids from Albizzia Lebbeck Benth. bark. BMC complementary and alternative medicine 14(1):155.

2- Akhtar M, Khan Q, Khaliq T. 1984. Effects of Euphorbia prostrata and Fumaria parviflora in normoglycaemic and alloxan-treated hyperglycaemic rabbits. Planta medica 50(02):138-142.

3- Asano N. 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. Glycobiology 13(10):93R-104R.

4- Bachhawat J, Shihabudeen M, Thirumurugan K. 2011. Screening of fifteen Indian Ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. Int J Pharm Pharm Sci 3:267-274.

5- Bharatham K, Bharatham N, Park KH, Lee KW. 2008. Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of α-glucosidase inhibitors. Journal of Molecular Graphics and Modelling 26(8):1202-1212.

6- Brindis F, González-Andrade M, González-Trujano M, Estrada-Soto S, Villalobos-Molina R. 2014. Postprandial glycaemia and inhibition of α-glucosidase activity by aqueous extract from Coriandrum sativum. Natural product research 28(22):2021-2025.

7- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414(6865):813-820.

8- Chang T-S. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. International journal of molecular sciences 10(6):2440-2475.

9- Gilani AH, Bashir S, Janbaz KH, Khan A. 2005. Pharmacological basis for the use of Fumaria indica in constipation and diarrhea. Journal of Ethnopharmacology 96(3):585-589.

10- Khattak SG, Gilani SN, Ikram M. 1985. Antipyretic studies on some indigenous Pakistani medicinal plants. Journal of ethnopharmacology 14(1):45-51.

11- Kim K, Nam K, Kurihara H, Kim S. 2008. Potent α-glucosidase inhibitors purified from the red alga Grateloupia elliptica. Phytochemistry 69(16):2820-2825.

12- Kim Y-M, Wang M-H, Rhee H-I. 2004. A novel α-glucosidase inhibitor from pine bark. Carbohydrate research 339(3):715-717.

13- Kwon Yi, Apostolidis E, Shetty K. 2008. Inhibitory potential of wine and tea against α-Amylase and α-Glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. Journal of Food Biochemistry 32(1):15-31.

14- Liu M, Zhang W, Wei J, Lin X. 2011. Synthesis and α-glucosidase inhibitory mechanisms of bis (2, 3-dibromo-4, 5-dihydroxybenzyl) ether, a potential marine bromophenol α-glucosidase inhibitor. Marine drugs 9(9):1554-1565.

15- Luo X, Wu J, Jing S, Yan L-J. 2016. Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. Aging and disease 7(1):90.

16- Mandal U, Nandi D, Chatterjee K, Biswas A, Ghosh D. 2010. Remedial effect of aqueous extract of whole plant of Fumaria vaillantii Loisel and ripe fruit of Benincasa hispida Thunb in ranitidine induced-hypochlorhydric male rat. International Journal of Applied Research in Natural Products 3(1):37-47.

17- Misbah H, Aziz AA, Aminudin N. 2013. Antidiabetic and antioxidant properties of Ficus deltoidea fruit extracts and fractions. BMC complementary and alternative medicine 13(1):118.

18- Mohammadini N, Rezaei MA, Loripoor M, Vazirinejad R. 2008. Assessment of the effect of Sisymbrium consumption on spontaneous labor in nulipars. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 10(2):0-0.

19- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. 2003. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. Jama 289(1):76-79.

20- Nathan DM. 2005. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. N Engl J Med 353:2643-2653.

21- Nejati V, Khaneshi F. 2014. The Effect of Hydroalcoholic Extract of Descurainia sophia Seed on the changes of Testis Tissue, Sperm Parameters, and Testosterone Level in Rats with Streptozotocin-induced Diabetes. Qom University of Medical Sciences Journal 8(5).

22- Nyenwe EA, Jerkins TW, Umpierrez GE, Kitabchi AE. 2011. Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. Metabolism 60(1):1-23.

23- Pistia-Brueggeman G, Hollingsworth RI. 2003. The use of the o-nitrophenyl group as a protecting/activating group for 2-acetamido-2-deoxyglucose. Carbohydrate research 338(5):455-458.

24- Rao KS, Mishra S. 1997. Hepatoprotective activity of the whole plants of Fumaria indica. Indian journal of pharmaceutical sciences 59(4):165.

25- Segel IH. 1976. Biochemical Calculations: How to Solve Mathematical Problems in General Biochemisrems in General Biochemistry: John Wiley and Sons.

26- Shim Y-J, Doo H-K, Ahn S-Y, Kim Y-S, Seong J-K, Park I-S, Min B-H. 2003. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of Rhus chinensis on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. Journal of ethnopharmacology 85(2):283-287.

27- Singh P, Jayaramaiah RH, Agawane SB, Vannuruswamy G, Korwar AM, Anand A, Dhaygude VS, Shaikh ML, Joshi RS, Boppana R. 2016. Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights. Scientific reports 6.

28- Vural C. A new combination in Descurainia (Brassicaceae) from Turkey; 2009. BioOne. p 65-66.

29- Yoshikawa M, Murakami T, Yashiro K, Matsuda H. 1998. Kotalanol, a potent α-glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic Ayurvedic medicine Salacia reticulata. Chemical & pharmaceutical bulletin 46(8):1339-1340.

30- Zarei MA, Poursharifi M. 2015. Searching for Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity in Hexane Extracts by some Plants from Kurdistan Province. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 3(3):291-296.

α-glucosidase inhibition by hexane extract from aerial parts of *Descurainia sophia* L.schuar and *Fumaria vaillantii* Loisel

Sadeghi M. and Zarei M.A.

Dept. of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran.

Abstract

Diabetes is a progressive metabolic disorder that affects many people in the world. One way to prevent any after meal upsurge in blood glucose levels is to inhibit intestinal carbohydrate hydrolyzing enzymes such as α-glucosidase. The purpose of this study was to investigate the inhibitory effect of hexane extract obtained from separated aerial parts of *Descurainia sophia* L.schuar and *Fumaria vaillantii* Loisel on α-glucosidase activity. After preparation of hexane extracts from aerial parts of the plants, their effect on α-glucosidase activity was investigated in seven different concentrations. Enzyme activity was assayed in triplicate using p-NPG as substrate. The amount of produced p-NP was determined at 405 nm wavelength. Acarbose was used as the positive control. Among the aerial parts of two plants, *Descurainia sophia's* flower hexane extract at 200 mg/ml concentration, and *Fumaria vaillantii*'s leaf hexane extract at 300 mg/ml concentration, significantly inhibited activity of the enzyme. IC_{50} values of the above mentioned extracts were 0.88 and 1.04 mg/ml respectively. The type of inhibition for the *Descurainia Sophia* flower was mixed inhibition (Competitive-noncompetitive) and for the *Fumaria vaillantii* leaf was uncompetitive inhibition. The results of GC-MS analysis of active extracts, revealed the presence of phenylpropanoid and phenol, which could be responsible for the observed inhibitory effects on the α-glucosidase activity. Hexane extracts from *Descurainia sophia*'s flower and *Fumaria vaillantii*'s leaf have an effective α-glucosidase inhibitory capacity for future research, with the goal of achieving pharmacologically categorized inhibitors.

Key words: α-glucosidase, *Descurainia sophia*, *Fumaria vaillantii*, Hexane extract