The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.4, Sering.74, Winter 2023, p. 150-162

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره۴، پیاپی ۷۴، زمستان ۱۴۰۱، ص ۱۶۲-۱۵۰
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir

10.22051/JAB.2021.34309.1398

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی عصاره‌های هیدروالکلی و متانولی گیاه تشنه‌داری: مهار دناتوراسیون پروتئین آلبومین و تثبیت غشای گلبول‌های قرمز

سارا هادی پور ثابت[۱]، سیف اله بهرامی‌کیا[۲*]. زهرا بقایی‌فر[۳*]

چکیده

مقدمه: *التهاب حاد و مزمن از رایج‌ترین علل هیپوآلبومینمی هستند که این کمبود از افزایش مصرف آن توسط سلولها، کاهش سنتز آن و ورود آن به درون فضای خارج ناشی می شود استفاده از ترکیبات گیاهی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با کاهش اکسیداتیو استرس به عنوان یک استراتژی مهم برای کاهش بیماری‌های التهابی مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدالتهابی عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی این گیاه بر مهار دناتوراسیون آلبومین و همچنین مهار همولیز گلبول قرمز است.*

روش ها: *در این مطالعه‌ی تجربی، ابتدا عصاره های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری تهیه گردید و میزان فنول و فلاونوئید تام به روش اسپکتروفتومتری محاسبه و در نهایت فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گیاه در غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) بررسی شد. در تست ضدالتهابی مهار دناتوراسیون پروتئین، به آلبومین ۱٪ سرم گاوی، غلظت‌های مختلف عصاره اضافه و بعد از حرارت، درصد مهار برای دناتوراسیون آلبومین محاسبه شد. در تست تثبیت غشای گلبول‌قرمز به RBC لخته نشده، غلظت‌های مختلف عصاره اضافه و پس از حرارت درصد مهار همولیز محاسبه گردید. نتایج به صورت Mean±SD در نرم افزار اکسل بیان گردیدند.*

نتایج و بحث: *نتایج این مطالعه نشان داد میزان فنول و فلاونوئید در هر عصاره متفاوت و مقدار آن در عصاره‌ی متانولی گیاه تشنه‌داری بیشتر بود، هر دو عصاره‌ی هیدروالکلی و متانولی در یک رفتار وابسته به دوز دناتوراسیون آلبومین را مهار کردند. مقدار IC_{50} عصاره‌ی متانولی تشنه‌داری در تست DPPH برابر با ۳۱۲/۴، در تست ضدالتهابی مهار دناتوراسیون پروتئین، ۳۹۳/۲ و در تست ضدالتهابی تثبیت غشای گلبول‌قرمز برابر با ۵۰۲/۵۲ می‌باشد که از IC_{50} عصاره‌ی هیدروالکلی تشنه‌داری در تست‌های فوق کمتر است و همچنین بین اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و دوز عصاره ارتباط مستقیم وجود دارد.*

---

۱ . فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، لرستان ایمیل *نویسنده مسئول: Bahramikia.s@lu.ac.ir
۳. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
*نویسنده مسئول: Z_baghaeifar@pnu.ac.ir

از نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که نوع حلال استفاده شده برای استخراج عصاره فاکتور مهمی در اثرات‌آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی گیاه محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلبومین، آنتی اکسیدان ها، ضد التهابی ، عصاره تشنه داری، گلبول قرمز

مقدمه

التهاب، روند پاسخ به آسیب بافت است که به علل مختلف از جمله اثر باکتری‌ها، ضربه، مواد شیمیایی، گرما و... به‌وجود می‌آید که به صورت تغییرات ثانویه بسیار شدیدی در بافت‌ها برای التیام بافت بروز می یابد (Biarnes & Bonica, 1995). التهاب به طور کلی به دو دسته‌ی اصلی تقسیم می‌شود: الف- حاد که کوتاه مدت می‌باشد و از چند دقیقه تا چند روز طول می‌کشد و با خروج مایع و پروتئین‌های پلاسمایی و تجمع لوکوسیتی عمدتا شامل نوتروفیل‌ها مشخص می‌شود. ب- التهاب مزمن که دارای دوره‌ی طولانی مدت یعنی از چند روز تا چند سال و با ورود لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها و با تزاید عروقی همراه با آن و تشکیل فیبروز مشخص می‌گردد. اما این اشکال اصلی التهاب ممکن است با هم همپوشانی داشته باشند (Sun et al., 2005; Cotran *et al.*, 1994).

التهاب حاد و مزمن از رایج‌ترین علل هیپوآلبومینمی می‌باشد که این کمبود از افزایش مصرف آن توسط سلولها، کاهش سنتز آن و ورود آن به درون فضای خارج ناشی می‌شود. آلبومین یک پروتئین محلول در آب است و نقش‌های فیزیولوژیکی زیادی در بدن ایفا می‌کند که می‌توان به حفظ فشار آنکوتیک پلاسما در سیستم عروقی، حفظ حالت مایع پلاسما و جریان یافتن آن در بدن با حفظ آب در سیستم جریان خون و..... اشاره نمود(Sun et al., 2005). عوامل بسیاری نشان‌دهنده التهاب در بدن می‌باشد. از جمله‌ی این عوامل وجود سلول‌های التهابی مانند نوتروفیل‌ها، لنفوسیت ها، پلاسموسیت ها، ائوزینوفیل ها، بازوفیل ها و ماست‌سل ها، ماکروفاژها و گلبول های قرمز هستند. به‌دلیل التهاب، دیواره‌ی عروقی بسیار نفوذپذیر می‌شود و گلبول‌های قرمز از آن عبور می‌کند و در محل التهاب تراگذری (دیاپدز) رخ می‌دهد(Biarnes & Bonica, 1995). همچنین، استرس اکسیداتیو، به عنوان عدم تعادل بین تولید سلولی گونه‌های اکسیژن فعال و مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، اثرات بیماری‌زایی مختلفی را در شروع فرایندهای پاتولوژیک مختلف هم چون التهاب دارد. رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر این فرآیند در بدن، سبب بوجودآمدن مشکلاتی از جمله اکسیداسیون لیپید های غشای سلولی می‌شوند که این امر منجر به ناپایداری و متلاشی شدن غشای سلول می‌شود و یا اینکه ترکیبات سلولی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و از همه مهمتر DNA مورد حمله واقع می‌گردد و مسبب بیماری می‌شوند(Eskandari et al., 2022; Mathew & Abraham, 2006). گیاهان یکی از با ارزش‌ترین منابع طبیعی دارویی هستند که امروزه توجه بسیاری از کشورهای جهان را به خود معطوف کرده است و اقدامات بسیاری برای استفاده از گیاهان و فرآورده‌های آن‌ها در درمان بیماری‌ها از جمله بیماری‌های التهابی و کاهش عوارض دارویی صورت گرفته است. گیاهان به اشکال متفاوت از جمله به صورت خام، عصاره، جوشانده و غیره مورد استفاده قرار می گیرند. عصاره های بسیاری از گیاهان نیز به طور مستقیم و خام برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند. از خواص با ارزش منابع گیاهی، استفاده از آن‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Azizi Moradi and Bahramikia, 2020). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده اند که متابولیت های ثانویه استخراج شده از قسمت‌های مختلف گیاه مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست گیاهان دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند (Shukla *et al.*, 2009; Amraee et al., 2020). گیاه تشنه‌داری

از خانواده گل میمونیان(اسکروفولاریاسه) که اغلب علفی است می‌تواند تحت تاثیر شرایط واقع شود و زندگی چند ساله را انتخاب نماید. این گیاه نیز می‌تواند دارای اعضای چوبی باشد که به ندرت به صورت درخت دیده می‌شود. این گیاه خودرو است و در تمام کره زمین مخصوصا معتدل و سرد دیده می‌شود. جنس اسکروفولاریا در ایران ۴۲ گونه‌ی علفی و نیز تعداد بیشتری از نوع چند ساله و بوته‌ای دارد، نام محلی آن تشنه‌داری است و در نواحی ایلام و خوزستان دیده می‌شود. گیاهان این خانواده دارای ظاهر متفاوتی هستند از جمله دارای برگ‌های متناوب یا متقابل، گل‌هایی با رنگ‌های متفاوت، وضع منفرد یا مجتمع، آرایش گل به صورت خوشه، سنبله و گرزن هستند. این گیاهان دارای ترکیبات مفیدی مانند گلوکوزیدها هستند که به عنوان داروی گیاهی استفاده می‌شوند(Cotran *et al.*, 1994). ریشه‌ی آن‌ها دارای ترکیبات رنگی نفنوکینونی با نام آلکانین و شیکونین می‌باشد که فرم هیدروکسی نفتوکینونی آن دارای اثرات بارز آنتی‌اکسیدانی است(Yamasaki *et al.*, 1993). به‌صورت تجربی و سنتی حالت‌های مختلف آن، ازجمله جوشانده خوراکی، بخور و ضماد برای درمان بیماری‌های مختلفی از قبیل التهاب چشم و گوش، سوختگی‌ها، زخم عفونی، اپیزیاتومی، درد، سرماخوردگی، هموروئید، کورک و دیگر موارد استفاده می‌شود که اجزای اصلی آن فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی و فنیل پروپونوئیدها هستند(Shohani, 2001).

هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری است تا بتوان راهکارمناسبی را در استفاده از این گیاه در درمان بیماری‌های التهابی مختلف مانند روماتیسم، لوپوس، شوگرن، سرطان و بیماری های سیستم ایمنی پیشنهاد داد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه تشنه داری

گیاه تشنه داری از کوه‌های شهرستان ایلام جمع آوری و توسط دکتر خدایاری(دانشگاه لرستان، ایران) شناسایی و با کد Lu125 در هرباریوم دانشگاه لرستان ثبت شد. گیاه با آب مقطر شسته و تحت شرایط آزمایشگاهی دور از نور و رطوبت خشک و به‌وسیله آسیاب پودر و در ظروف دربسته‌ای نگهداری شد.

عصاره‌گیری

مقدار ۲۵ گرم نمونه‌ی پودر شده در ۱۴۰ میلی‌لیتر حلال متانول (عصاره‌ی متانولی) و ۱۴۰میلی‌لیتر حلال آب و اتانول به نسبت ۱:۱ اضافه شد و بعد از ۷۲ ساعت نگهداری آن در شرایط آزمایشگاهی، محلول مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه ورتکس گردید. بعد از فیلتر کردن به‌وسیله کاغذ صافی (واتمن ۴۰)، برای تبخیر شدن حلال از دستگاه روتاری استفاده شد. درجه روتاری برای عصاره متانولی روی دمای ۶۵ درجه و برای عصاره هیدروالکلی روی درجه ۷۸ تنظیم شد و هنگامی که به اندازه ۱۰ میلی‌لیتر از محلول باقی ماند از دستگاه روتاری خارج و روی شیشه ساعت اتوکلاو شده ریخته و سپس در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه قرار داده شد تا خشک شود.

سنجش محتوای کلی ترکیبات فنولی

میزان محتوای کلی ترکیبات فنولی در عصاره گیاه تشنه‌داری براساس واکنش‌گر Folin Ciocalteus Reagan (FCR) تخمین زده شد. در این روش ۰٫۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ی مورد آزمایش با ۲٫۵ میلی لیتر محلول رقیق شده FCR به نسبت ۱به۱۰یا به عبارت دیگر ۱ میلی‌لیتر از معرف به ۹ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷٫۵ درصد کربنات سدیم (۷٫۵ گرم کربنات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به مخلوط اضافه شد. جذب نمونه بعد از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه، در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. از ترکیب فنولی گالیک‌اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید. بعد از خواندن جذب، نمودار استاندارد رسم و معادله خط به دست آمد و بر اساس آن میزان فنول عصاره‌ها اندازه‌گیری شد(Slinkard & Singleton, 1977)

سنجش ترکیبات فلاونوئیدی تام

در این روش از واکنش‌گر کلریدآلومینیوم ($AlCl_3$) برای سنجش فلاونوئیدها استفاده شد. به همین منظور به ۰٫۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ی مورد آزمایش به ترتیب ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۰٫۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۵ درصد نیتریت‌سدیم ($NaNo_2$) اضافه شد. بعداز گذشت ۶ دقیقه، ۰٫۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد $AlCl_3$ به نمونه اضافه گردید. رنگ محلول با اضافه شدن آلومینیوم کلرید به سمت طیف زرد رنگ تغییر کرد و بعد از ۶ دقیقه انکوباسیون، ۲ میلی‌لیتر از سود ۴ درصد به مخلوط اضافه و رنگ قرمز مایل به صورتی مشاهده شد. در آخر با آب مقطر حجم نمونه‌ها به ۵ میلی‌لیتر رسید. جذب نمونه‌ها بعد از گذشت ۱۵ دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. از ترکیب فلاونوئیدی کاتچین (Catechin) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد(Zhishen *et al*, 1999). نمودار استاندارد بر پایه جذب غلظت‌های محلول کاتچین رسم و براساس معادله خط به دست آمده میزان فلاونوئید تام عصاره‌ها اندازه گیری و محاسبه شد.

سنجش میزان جمع‌آوری رادیکال‌های DPPH

در این روش از ماده دی فنیل پیکریل هیدرازیل(DPPH)، به عنوان یک منبع تولید رادیکال های آزاد پایدار استفاده می‌شود. قدرت آنتی اکسیدانی با تغییر رنگ محلول DPPH از بنفش به سمت زرد رنگ شدن مشخص می‌شود. تغییر رنگ بیشتر نشان‌دهنده‌ی قدرت آنتی‌اکسیدان قوی‌تری است. در این روش، ۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف نمونه مورد آزمایش به ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH به عنوان منبع رادیکال‌های آزاد اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه و جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. تغییر رنگ همراه با کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر رابطه مستقیمی با میزان قدرت پروتون‌دهندگی آنتی‌اکسیدان‌ها دارد(Chow *et al*, 1999). کنترل مثبت در این تست اسید اسکوربیک می باشد. مقدار ۱ میلی گرم از آن را در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل و غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از آن تهیه شد.

در نهایت با استفاده از رابطه زیر میزان به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH تعیین گردید.

$$I\% = [(A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank}] \, 100$$

Ablank= جذب نوری کنترل Asample= جذب نوری عصاره I%= درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH

برای بیان قدرت آنتی‌اکسیدانی به دست آمده طبق این روش، می‌توان از شاخص IC_{50} استفاده کرد که بیانگر غلظت مورد نیاز از آنتی‌اکسیدان‌ها برای کاهش۵۰ درصدی غلظت رادیکال‌های DPPH اولیه می‌باشد. باید توجه داشت که شاخص IC_{50} نسبت معکوسی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها دارد.

سنجش اثر ضدالتهابی با تست مهار دناتوراسیون پروتئین

کمبود پروتئین آلبومین که فراوان‌ترین پرونئین موجود در پلاسمای خون است می‌تواند سبب بروز مشکلات از جمله التهاب شود. یکی از مهم‌ترین عملکردهای زیستی آلبومین، توانایی پیوند با ترکیبات زیست فعال طبیعی و سنتزی است، لذا آلبومین به عنوان حامل، برای پیوند با موادی مانند ترکیبات گیاهی با ویژگی‌های درمانی و دارویی گزینه مناسبی به نظر می رسد. از طرفی دیگر، آلبومین نقش اساسی را در تنظیم فشار اسمزی بازی می‌کند یعنی با حفظ فشار انکوتیک سبب گردش مایعات و جلوگیری از تجمع بیش از حد مایعات در بدن می شود(Lin *et al*, 2009). از طرفی، آلبومین سرم گاوی، در دسترس و فراوان‌ترین آلبومین می‌باشد(Elzoghby *et al*, 2012). حرارت سبب دناتوره شدن پروتئین آلبومین می‌شود و در نتیجه سطح آن کاهش می‌یابد.

در این روش ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره گیاه به ۵۰۰ میکرو لیتر از آلبومین ۱٪ سرم گاوی اضافه گردید. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد و پس از سرد شدن محلول، جذب آن در دمای اتاق در طول موج ۶۶۰ خوانده شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد و درصد مهار برای دناتوره شدن پروتئین از معادله زیر محاسبه شد. اسید سالیسیلیک استیل به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

در نهایت از فرمول زیر استفاده شد.

$$\% \text{ inhibition: } 100-((A_1 - A_2)/A_0)\ 100$$

A_1= جذب نمونه A_2 = جذب کنترل محصول A_0= جذب کنترل مثبت

سنجش اثر ضد التهابی با تست پایداری غشا

گلبول قرمز اصلی‌ترین قسمت خون است که در بیماری‌های التهابی مقدار آن کاهش می‌یابد. در این روش مهار همولیز شدن گلبول قرمز توسط عصاره‌ها سنجیده شده است.

تهیه‌ی سوسپانسیون گلبول قرمز(RBC): ابتدا ۰,۵ گرم EDTA در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به ازای ۲ میلی لیتر از خون انسان (دانشجویان دانشگاه لرستان) ۵۰ میکرولیتر از آن را استفاده شد تا از لخته شدن خون جلوگیری شود. سپس خون لخته نشده انسان، در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول به‌دست‌آمده سه بار با سرم فیزیولوژیک برای خارج کردن لایه‌ی بافی کوت شسته شد. لایه RBC با استفاده از محلول بافر فسفات به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد.

همولیز ناشی از گرما: ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به ۱۰۰ میکرولیتر از RBC ۱۰درصد اضافه شد. محلول حاصل در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و سپس در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد.

مایع رویی آن جمع آوری و جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. اسید سالیسیلیک استیل به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. درصد تثبیت از محاسبه زیر به دست آمد:

$$\% \text{ Inhibition: } 100-((A_1 - A_2)/A_0)\ 100$$

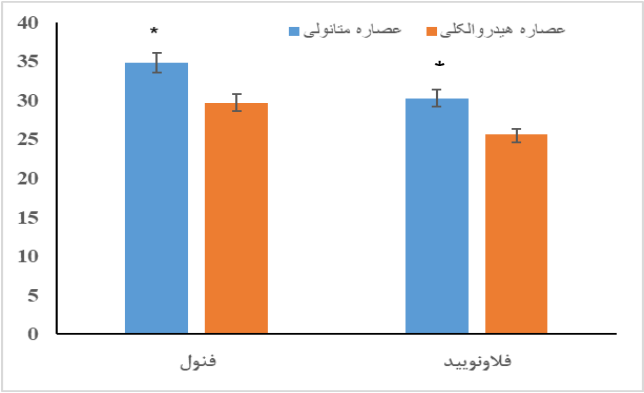
A_1= جذب نمونه A_2= جذب کنترل محصول A_0= جذب کنترل مثبت

آنالیز های آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از آزمونt تست انجام شدند. تمامی داده ها به صورت میانگین±SD بیان شدند. داده ها زمانی معنی دار بودند که $P < 0.05$ به دست آمد.

نتایج و بحث

در سال‌های اخیر، گرایش جهانی به گیاهان دارویی رونق یافته است و کشورها در تلاش هستند که از داروهای باارزش گیاهی در موارد بسیاری استفاده کنند. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، در سال ۱۹۸۶، چهارده کشور و در سال ۲۰۰۷ تعداد ۱۱۰ کشور از ۱۹۳ کشور عضو این سازمان برنامه‌هایی را برای رونق مصرف داروهای سنتی تدوین و اجرا کرده‌اند.

امروزه می‌توان از گیاهان به عنوان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند فلاونوییدها، آلفا و بتا کاروتن، آسکوربات و..... استفاده نمود(Shahidi, 2000; Yamasaki & Grace, 1994). با توجه به ارتباط مستقیم بین استرس اکسیداتیو و پاتولوژی فرایندهای التهابی، استفاده از این ترکیبات در درمان بیماری‌های التهابی از جمله سرطان، آب مروارید، بیماری‌های عصبی، بیماری‌های قلبی و... به عنوان یک راهبرد درمانی مهم محسوب می شود. التهاب، واکنش بدن در مقابل یک عامل عفونی است که در طول آن حوادث مختلفی رخ می دهد. استفاده از گیاهان در درمان بیماری ها و بررسی فواید دارویی گیاهان به قرن ها پیش بر می‌گردد. در حدود ۲۵ درصد از داروها منشأ گیاهی دارند(Huang et al, 2009). در این بازه محققان مطالعات بسیاری در مورد انواع گیاهان با اثر ضدالتهابی انجام دادند(Homayoni, 2015). از جمله‌ی این گیاهان می‌توان به بابونه، اسطوخودوس، نعنا (Biarnes & Bonica, 1995) که دارای خواص ضد التهابی می‌باشند اشاره نمود. وجود ترکیبات فلاونوئیدی در این نوع گیاهان به عنوان ترکیبات ضد التهاب و ضد درد شناخته شده است. این ترکیبات با مهار تولید سیتوکین های التهابی و مهار آنزیم سیکلواکسیژناز در مسیر سنتز پروستاگلاندین‌ها و متعاقب آن افزایش تولید آراشیدونات سبب مهار التهاب می‌شوند(Toker *et al.*, 2004; Rotelli *et al.*, 2003). فلاونوییدها با مهار تجمع گیرنده ها و آبشار سیگنالی، التهاب مزمن و حاد را کم می کنند(Kumazawa *et al.*, 2006). در این مطالعه خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی گیاه *Scrophularia striata* مورد بررسی واقع شده است. ابتدا میزان فنول تام و فلاونوئید تام در عصاره‌های گیاه تشنه‌داری اندازه گیری شد. میزان فنول تام و فلاونویید موجود در هر عصاره متفاوت و در عصاره متانولی بیشتر از عصاره هیدروالکلی بود. (شکل ۱).

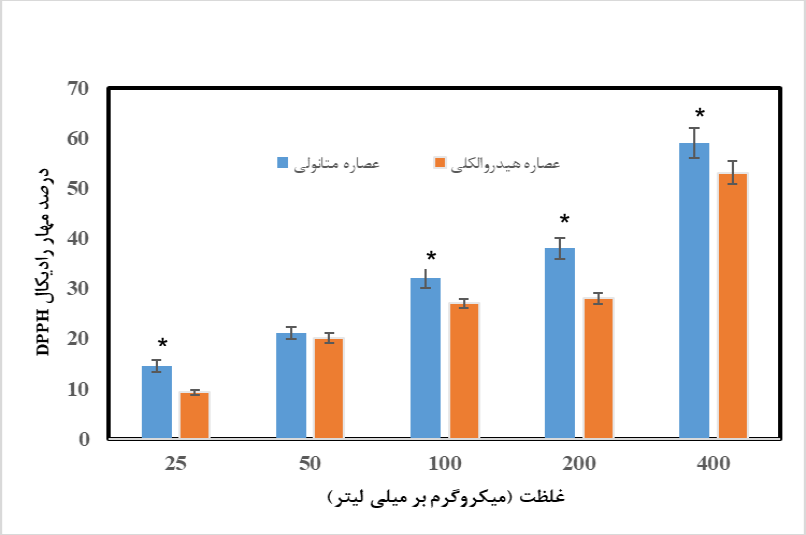


شکل ۱- میزان فنول و فلاونوئید تام موجود در عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری

*** نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD و $p<0.05$ می‌باشد**

Figure 1. Total phenols and flavonoids contents in methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata*

سپس، اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری به روش DPPH بررسی شد. نتایج به دست آمده در شکل ۲ و جدول ۱ نمایش داده شده است. در این آزمون Vit C به عنوان کنترل مثبت می‌باشد. نتایج نشان داد که در حضور عصاره های متانولی و هیدروالکلی تشنه داری در غلظت های مختلف جذب رادیکال آزاد DPPH کاهش پیدا کرد که این موید مهار رادیکال های آزاد توسط عصاره ها به صورت وابسته به دوز است. درصد مهار رادیکال آزاد، در عصاره متانولی تشنه‌داری از عصاره‌ی هیدروالکلی بیشتر می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی و فلاونوییدی موجود در گیاهان نقش اساسی را در مهار تولید رادیکال های آزاد و فعالیت آنتی اکسیدانی بازی می‌کنند (Shahidi, 2000; Azizi Moradi and Bahramikia, 2020). با توجه به حضور این ترکیبات در گیاه همانطور که در بالا توضیح داده شد احتمالا این ترکیبات باعث مهار رادیکال های آزاد در مطالعه حاضر هستند.



شکل ۲- مهار رادیکال های DPPH در غلظت‌های مختلف از عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی تشنه‌داری

*** نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD و $p<0.05$ می‌باشد**

Figure 2. Inhibition of DPPH radicals at different concentrations of methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata*

*

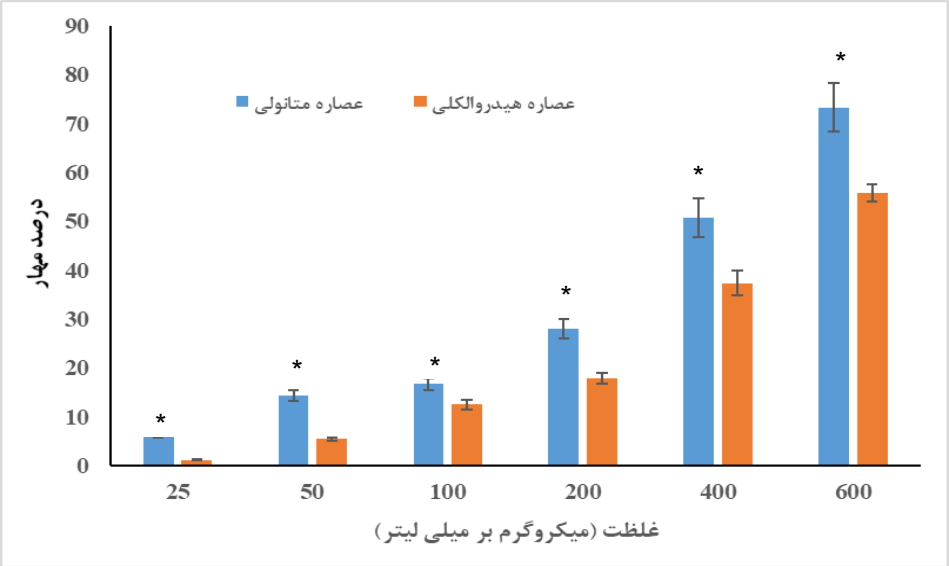
همچنین میزان IC_{50} عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی برای مهار رادیکال های آزاد DPPH به ترتیب ۳۱۲,۴ و ۳۶۸ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با ویتامین C (۶۹,۴) به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- میزان IC_{50} عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری در تست DPPH

Table 1. IC_{50} of methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata* in DPPH test

نمونه	IC_{50} (میکرو گرم بر میلی لیتر)
عصاره متانولی	۳۱۲/۴
عصاره هیدروالکلی	۳۶۸/۵
ویتامین ث	۶۹/۴

بعد از تایید اثرات آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه تشنه داری، اثرات ضد التهابی آنها مورد بررسی قرار گرفت. اثر ضدالتهابی عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری به روش تست مهار دناتوراسیون آلبومین بررسی شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است هر دو عصاره هیدروالکلی و متانولی در یک رفتار وابسته به دوز دناتوراسیون آلبومین را مهار کردند. میزانIC_{50} برای عصاره متانولی در مقایسه با عصاره هیدروالکلی کمتر بود (جدول ۲).



شکل ۳- مهار دناتوراسیون آلبومین در غلظت‌های مختلف از عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه داری

*** نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD و $p<0.05$ می‌باشد**

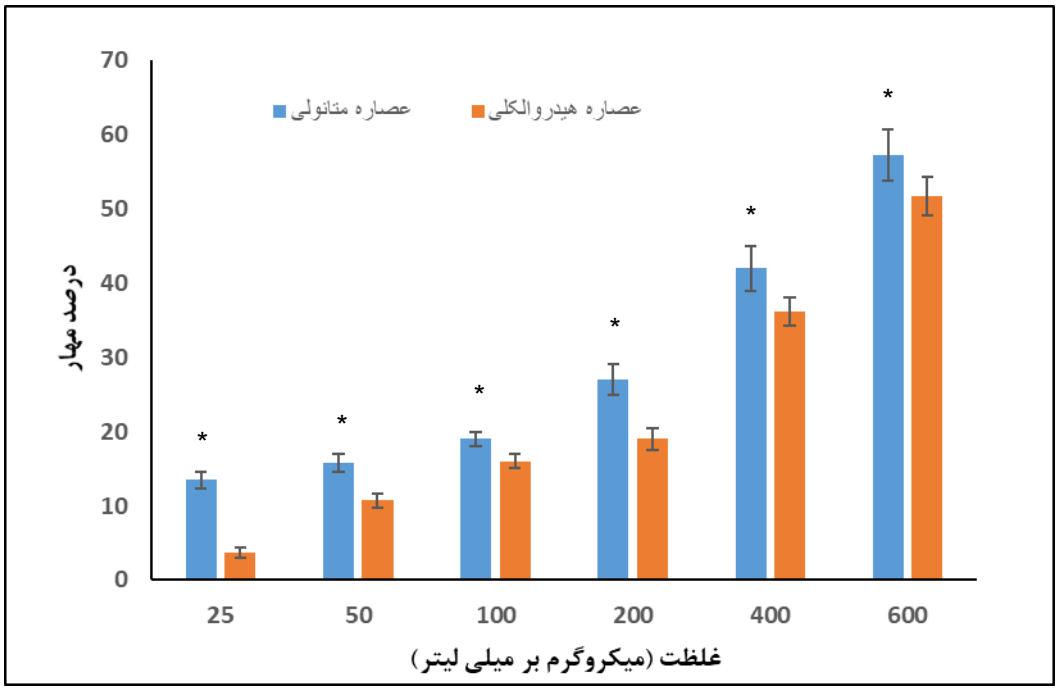
Figure 3. Inhibition of albumin denaturation in different concentrations of methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata*

جدول۲- میزان IC_{50} عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه داری در تست مهار دناتوراسیون پروتئین آلبومین

Table 2: IC_{50} level of methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata* in albumin protein denaturation inhibition test

نمونه	میکرو گرم بر میلی لیتر)
عصاره متانولی	۳۹۳/۲
عصاره هیدروالکلی	۵۳۷/۳۹

در آخر، اثر ضدالتهابی عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه داری به روش تست پایداری غشا بررسی شد. همانطور که در شکل ۴ آورده شده است هر دو عصاره‌ی هیدروالکلی و متانولی در یک رفتار وابسته به دوز مانع از همولیز گلبول‌های قرمز شدند.



شکل ۴-مهار همولیز غشای گلبول قرمز در غلظت‌های مختلف از عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه داری

*** نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± SD و $p<0.05$ می‌باشد**

Figure 4. Inhibition of erythrocyte membrane hemolysis at different concentrations of methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata*

میزان IC_{50} هریک از عصاره های گیاه در تست مهار همولیز گلبول قرمز در جدول ۳ آورده شده است. این میزان در نمونه های گلبول قرمز انکوبه شده با عصاره‌ی متانولی در مقایسه با عصاره‌ی هیدروالکلی کمتر بوده است. مطالعات مختلف نشان داده اند که یکی از عوامل اصلی در ناپایداری غشای گلبول های قرمز، اکسیدشدن گروههای تیول موجود در پروتئین های غشا می‌باشد. ازطرفی تحقیقات مختلف به‌وسیله محققین نشان داده‌اند که ترکیبات فلاونوییدی موجود در گیاهان مثل امفرول، روتین

و مورین باعث حفاظت‌گروه‌های SH غشا از اکسیدشدن و متعاقب آن جلوگیری از همولیز گلبول‌های قرمز می شوند (Asgari et al., 2005). با توجه به این نتایج، می توان اثرات پایدارکنندگی غشای گلبول‌های قرمز در این مطالعه را به حضور قابل توجهی از ترکیبات فنول و فلاونویید در گیاه مرتبط دانست.

جدول ۳- میزان IC_{50} عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی گیاه تشنه داری در تست مهار همولیز گلبول قرمز

Table 3: IC50 of methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata* in erythrocyte hemolysis inhibition test

نمونه	IC_{50} (میکرو گرم بر میلی لیتر)
عصاره متانولی	۵۰۲/۵۲
عصاره هیدروالکلی	۵۷۸/۰۰

مطالعات مختلف هم‌چنین نشان داده‌اند که ترکیبات گلیکوزید فنیل پروپانوییدی استخراج‌شده از گونه‌ی اسکروفولاریا اسکرودوینا خاصیت ضدالتهابی دارند (Díaz *et al*, 2004). با توجه به خاصیت ضدالتهابی ترکیبات فنول و فلاونویید و فنیل پروپانوئیدها در گیاهان این خانواده و حضور این ترکیبات در این گیاه، یکی از مکانیسم های احتمالی اثرات ضدالتهابی گیاه تشنه داری می‌تواند به دلیل وجود این ترکیبات در گیاه باشد(Azadmehr *et al*, 2013). در مطالعه‌ی ما، میزان ترکیبات فنول و فلاونویید قابل توجه بود. طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه مقدار فنول و فلاونویید در عصاره‌های متانولی بیشتر است و نیز درصد مهار رادیکال آزاد، در عصاره‌ی متانولی *Scrophularia striata* از بقیه عصاره‌ها بیشتر می‌باشد. بین اثر ضدالتهابی عصاره‌ی گیاه *Scrophularia striata* و دوزهای متفاوت ارتباط مستقیم وجود دارد به گونه ای که مهار التهاب و تثبیت غشا گلبولهای قرمز وابسته به دوز می‌باشد. نتایج مطالعه ما با مطالعات Diaz و همکارانش همخوانی داشت (Díaz *et al*, 2004).

نتیجه گیری

مطالعات مختلف نشان داده اند که جوشانده خوراکی، بخور و ضماد گیاه تشنه داری به صورت تجربی و سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی از قبیل التهاب چشم و گوش، سوختگی‌ها، زخم عفونی، اپیزیاتومی، درد، سرماخوردگی، هموروئید، کورک و دیگر موارد استفاده می‌شود که در درمان بیماری‌های التهابی کاربرد دارد (Shohani, 2003). با توجه به اثبات نقش ترکیبات آنتی اکسیدانی مثل فنول ها و فلاونوییدها در گیاهان دارویی مختلف در بروز اثرات ضدالتهابی و حضور مقادیر قابل توجهی از این ترکیبات در گیاه مطالعه ما و همچنین اثبات وجود ترکیبات رنگی نفنوکینونی با نام های آلکانین و شیکونین (فرم هیدروکسی نفتوکینونی آن دارای اثرات بارز آنتی‌اکسیدانی است) در ریشه‌ی گیاه (Yamasaki *et al*, 1993)، می توان اثرات ضدالتهابی گیاه را به حضور این ترکیبات در گیاه ربط داد. برای اثبات این موضوع باید درمطالعات آینده، با خالص سازی این ترکیبات اثرات ضدالتهابی آنها را مورد بررسی قرار داد. از طرفی مطالعه ما نشان داد که نوع عصاره نیز فاکتور مهمی در سنجش التهابی محسوب می‌شود زیرا در این مطالعه عصاره متانولی اثر ضد التهابی بیشتری از خود نشان داده است و علت آن نوع حلال مورد استفاده‌ی آن است. با توجه به اینکه بیماری‌های التهابی انواع مختلف دارد و عوامل مختلفی نیز در بروز این نوع بیماری‌ها دخیل هستند. از طرفی با توجه به پتانسیل بالای گیاه *Scrophularia striata* در درمان بیماریهای مختلف و هم چنین اثرات ضدالتهابی و

آنتی‌اکسیدانی آن در مطالعه حاضر می‌توان مطالعات گسترده‌ای را در رابطه با درمان با استفاده از این گیاه در بیماری‌های‌التهابی مختلف مانند روماتیسم، لوپوس، شوگرن، سرطان، بیماری های سیستم ایمنی، و .....انجام داد.

سپاسگزاری

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

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

منابع

Amraee. S.;Bahramikia. S.;Mohammadi. A. (2020). Effective fraction of Teucrium polium suppressed polyol pathway through inhibiting the aldose reductase enzyme: strategy to reduce retinopathy. Journal of Medicinal Plants 19(73): 82-90.

Asgari. P.;Naderi, G., and Asgari, N. (2005). Protective effects of flavonoids against globular hemolysis induced by free radicals. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research 21 (4): 505-515.

Azizi Moradi. F.;Bahramikia. S. (2020). Effect of hydroalcoholic Extract of Acanthus (Gundelia tournefortii L) on the Glycation of Bovine Serum Albumin (BSA) in Diabetic Models. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 33(2): 240-251.

Azadmehr. A.;Hajiaghaee R.;Zohal. M. A.; and Maliji. G. (2013). Protective effects of Scrophularia striata in Ovalbumin-induced mice asthma model. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 21(1): 56.

Biarnes. J.; and Bonica, L. (1995). Subnetwork 15. The European dimension and training of trainers.

Cotran. R. S.;Kumar. V.; and Robbins. S. L. (1994). Robbins pathologic basis of disease. 5th Edition. Philadelphia, 1994

Dı́az. A. M.;Abad. M. A. J.;Fernández. L.;Silván. A. M.;De Santos. J.; and Bermejo. P. (2004). Phenylpropanoid glycosides from Scrophularia scorodonia: in vitro anti-inflammatory activity. Life sciences 74(20): 2515-2526.

Elzoghby. A. O.;Samy. W. M.; and Elgindy. N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. Journal of controlled release 157(2): 168-182.

Eskandari. N.;Bahramikia. S.;Mohammadi. A. N.;Taati. M.;Safari Jafarabad. S. (2022). Geraniol ameliorated serum lipid profile and improved antioxidant defense system in pancreas, liver and heart tissues of alloxan-induced diabetic rats. Biologia **77:** 241–248.

Homayoni Tabrizi. M.;Asoodeh. A.;Shabestarian. H. (2015). Isolation and identi? cation of a new antioxidant peptide from casein camel milk using pepsin and pancreatin. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 22(1): 45-56.

Huang. Z. R.;Lin. Y. K.; and Fang. J. Y. (2009). Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. Molecules 14(1): 540-554.

Kumazawa. Y.;Kawaguchi. K. and Takimoto. H. (2006). Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory responses caused by tumor necrosis factor α. Current pharmaceutical design 12(32): 4271-4279.

Lin. H.;Lan. J.;Guan. M.;Sheng. F.; and Zhang H. (2009). Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 73(5): 936-941.

Mathew. S.; and Abraham. T. E. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. Food and Chemical Toxicology 44(2): 198-206.

Rotelli. A. E.;Guardia. T.;Juárez. A. O.;De la Rocha. N. E.; and Pelzer. L. E. (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. Pharmacological research 48(6): 601-606.

Shohani. F. (2003). People Journalism of Ivan. Ilam Cultural Heritageorg 56-57.

Shukla. S.;Mehta. A.;Bajpai. V. K.; and Shukla. S. (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. Food and Chemical Toxicology 47(9): 2338-2343.

Slinkard. K.; and Singleton. V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture 28(1): 49-55.

Sun. C.;Yang. J.; Wu. X.;Huang. X.;Wang. F.; and Liu. S. (2005). Unfolding and refolding of bovine serum albumin induced by cetylpyridinium bromide. Biophysical journal 88(5): 3518-3524.

Toker. G.;Küpeli. E.;Memisoğlu. M.; and Yesilada. E. (2004). Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of Tilia argentea (silver linden). Journal of Ethnopharmacology 95(2-3): 393-397.

Yamasaki. H.; and Grace. S. C. (1998). EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H_2O_2-peroxidase system. FEBS letters 422(3): 377-380.

Yamasaki. K.;Otake. T.;Mori. H.;Morimoto. M.;Ueba. N.;Kurokawa. Y.; and Yuge. T. (1993). Screening test of crude drug extract on anti-HIV activity. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 113(11): 818-824.

Zhishen. J.;Mengcheng. T.; and Jianming. W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry 64(4): 555-559..

Evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory capacity of hydroalcoholic and methanolic extracts of *Scrophularia striata*: Inhibition of albumin protein denaturation and stabilization of erythrocyte membrane

S. Hadi Pour Sabet[1], S. Bahramiikia[*2], Z. Baghaifar[*2]

Received:2022.2.22
Accepted: 2022.6.25

Abstract

Introduction: Acute and chronic inflammation are the most common causes of hypoalbuminemia. This deficiency is because of increased consumption of cells, decreased synthesis and entering into space. The use of herbal compounds with antioxidant properties can be used as an important strategy to reduce inflammatory diseases by reducing oxidative stress. The aim of this study was to investigate the antioxidant and anti-inflammatory capacity of methanolic and hydroalcoholic extracts of *Scrophularia striata* plant on the inhibiting of albumin denaturation as well as inhibiting of the erythrocyte hemolysis.

Methods: In this study, methanol and hydroalcoholic extract of *Scrophularia striata* were prepared and total phenol and flavonoids were calculated spectrophotometrically. The antioxidant activities of the plant extracts at different concentrations (25, 50, 100, 200, 400, 600 µg/ml) were investigated by the DPPH method. In protein denaturation inhibition, 1% bovine serum albumin was added to different concentrations of the extract and after heating, the percentage of inhibiting of albumin denaturation was calculated. In the RBC membrane immobilization assay, to non-clot RBC, different concentrations of the extract were added and after heating, the percentage of hemolysis inhibition was calculated. The results were expressed as Mean ± SD in Excel software.

Results and discussion: The results showed that the amounts of phenol and flavonoid in each extract were different and the highest amounts was in the methanolic extract of *Scrophularia striata*. The IC_{50} of methanolic extract of *Scrophularia striata* in the DPPH test equals 312.4 µg/ml, anti-inflammatory protein denaturation inhibition test, 393.2 µg/ml, and anti-inflammatory erythrocyte membrane immobilization test 502.52 µg/ml, which are lower than the IC_{50} of hydroalcoholic extract. In addition, there is a direct relationship between antioxidant and anti-inflammatory activities and extract doses. According to the results of this study, the type of solvent used for extraction has an important role in the antioxidant and anti-inflammatory effects of the plant.

Keywords: Albumin, Anti-inflammatory, Antioxidants, RBC, Scrophularia striata extract.

---

1 MSc Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

1 Associated Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Lorestan

(*Corresponding Author Email: Bahramikia.s@lu.ac.ir)

1. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

(*Corresponding Author : Z_baghaeifar@pnu.ac.ir)