تأثیر ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) بر فعالیت و ساختار آلفاگلوکوزیداز

سما علیجانی[۱]، آزاده حکمت*[۲] و سارا خاوری نژاد[۳]

چکیده

"آلفاگلوکزیداز" از گروه آنزیم‌های هیدرولازی است که انتهای غیراحیایی کربوهیدرات‌ها را به آلفاگلوکز، هیدرولیز می‌کند. مهار این آنزیم، موجب مهار جذب گلوکز می‌گردد. ترکیباتی که آنزیم آلفاگلوکزیداز را مهار می‌کنند، به منظور درمان دیابت نوع دو به کار می‌روند. "خارخسک" (*Tribulus terrestris*) گیاهی دارویی است که در سراسر جهان رویش دارد. ساپونین‌های این گیاه، ترکیب مؤثر اصلی آن و مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه می‌باشند. این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک را بر فعالیت و ساختار آلفاکلوگوزیداز توسط طیف‌سنجی الایزاریدر، UV-Visible و دورنگ نمایی دورانی (CD) مورد بررسی قرار می‌دهد. نتایج طیف‌سنجی الایزاریدر نشان می‌دهد ساپونین به صورت ضد رقابتی، موجب مهار فعالیت آنزیم آلفاگلوکزیداز می‌گردد. مقدار نصف غلظت مهاری (IC_{50}) برای ساپونین ۳۸ میکرومولار محاسبه شد. جذب نور مرئی فرابنفش آلفاگلوکزیداز با افزودن غلظت‌های ساپونین افزایش یافت. مقایسه طیف CD آنزیم آلفاگلوکزیداز و کمپلکس ساپونین ـ آنزیم نشان می‌دهد محتوای ساختار آلفا هلیکس، کاهش و محتوای ساختارهای صفحات بتا و رندوم کویل، افزایش یافت. در مجموع، نتایج نشان می‌دهد ساپونین استخراج شده از گیاه خارخسک در آلفاگلوکوزیداز تغییرات ساختاری ایجاد می‌کند و فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد. به صورت خلاصه، ساپونین‌های استخراج شده از گیاه خارخاسک می‌تواند برای طراحی داروی درمان دیابت نوع دوم گزینه‌ای مناسب باشد.

واژگان کلیدی: آلفاگلوکوزیداز، ساپونین، گیاه خارخاسک، مهارکننده، طیف‌سنجی.

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. * گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. *نویسنده مسئول: hekmat@ut.ac.ir

۳. گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

مقدمه

امروزه "دیابت ملیتوس"، شایع‌ترین اختلال متابولیکی مزمن و اهمیت آن بیش‌تر به دلیل شیوع، سیر طولانی بیماری و عوارض آن است. این بیماری به علت نقص اکتسابی یا مادرزادی در ترشح انسولین، یا عملکرد آن، یا کاهش پاسخ دهی اندام‌ها نسبت به انسولین ترشح شده ایجاد می‌شود (۱). چنین نقصی باعث افزایش سطح گلوکز خون می‌شود که این وضعیت می‌تواند بسیاری از سیستم‌های بدن، مانند عروق خونی و اعصاب راتخریب کند. امروزه داروهای گیاهی به واسطهٔ غیر تهاجمی بودن و عوارض جانبی اندک در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند.

"خارخاسک" (*Tribulus terrestris*) گیاه دارویی از خانواده *Zygophyllaceae* است. تمام قسمت‌های گیاه مذکور، برای مصارف دارویی قابل استفاده می‌باشد. از گیاه کامل و میوه آن برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود (۲). این گیاه، اصولا بیابان‌زی و کویری است؛ اما به صورت علف هرز در بیش تر مناطق رشد می‌کند. خارخاسک گیاهی علفی، یک‌ساله روی زمین خوابیده یا نیمه ایستاده، دارای شاخ و برگ افشان و بومی مناطق خشک و شنی می‌باشد (۳, ۴). رنگ میوه‌های آن سبز مایل به زرد، بدون بو و با طعمی مشخص است. میوه‌های این گیاه در اواخر تابستان و اوایل پاییز جمع‌آوری می‌شوند. مواد مؤثر این گیاه، آلکالوئید، پلی فنول، ساپونین، استروئید، گلیکوزید و همچنین ترکیبات خاص استروئیدی است (۳). گیاه پنج نوع ماده گلیکوزیدی نیز دارد که همه آن‌ها دارای گلوکز است و علاوه بر گلوکز، قندهای آرابینوز را شامل می‌شود. گیاه خارخاسک دارای فواید مختلفی است، از جمله خاصیت ضدمیکروبی، ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی و هچنین در درمان بیمارهای قلبی-عروقی، دیابت، تومورها، دردهای مفصلی و بیمارهای تنفسی کاربرد دارد. عصاره خارخاسک، توانایی بدن را برای ایجاد توده ماهیچه‌ای و قدرت بدنی افزایش می‌دهد (۴). مطالعات اخیرنشان داده که عصاره این گیاه خاصیت مهار آپاپتوز و گشادکردن رگ‌ها را نیز دارا می‌باشد و همچنین باعث محافظت اپی‌تلیال سلول‌های کلیوی در مقابل آسیب‌های مصرف اگزالات و اتیلن گلیکول می‌شود (۴). گیاه خارخاسک به عنوان یک گیاه غنی از ساپونین شناخته شده است (۵).

تری ترپن‌ها و استروئیدها که از پیش ماده‌های حاوی ۳۰ کربن ایجاد شده‌اند، می‌توانند به عنوان ترکیبات آزاد تشکیل شوند؛ اما بیش‌تر به صورت ساپونین‌ها ایجاد می‌گردند و معمولاً یک یا چند مولکول قند نیز به آن‌ها متصل است. ساختار شیمیایی ساپونین‌ها، شامل یک هسته هیدروفوبیک (ساپوژنین) است که توسط یک زنجیره قندی هیدروفیل متصل به آگلیکون تریترپنی یا استروئیدی، احاطه شده است (۶). بسته به نوع ژنین، ساپوژنین‌ها را می‌توان به سه دسته گلیکوزیدهای تری ترپنوئیدی، گلیکوزیدهای استروئیدی و گلیکوزیدهای آلکالوئیدی ـ

استروئیدی تقسیم‌بندی کرد (۷). از ویژگی‌های فارماکولوژیک ساپونین‌ها می‌توان به فعالیت ضد تب، اثر خواب‌آوری، اثر انقباضی بر روی رحم، درمان علائم یائسگی، نظیر برافروختگی، بی‌خوابی و افسردگی، خاصیت شیرین کنندگی، اثر پایین آورندگی چربی خون و اثر ضد التهابی اشاره کرد (۸).

گلوکوزیدازها شامل آنزیم‌هایی‌اند که الیگوساکاریدها و دی ساکاریدها را هیدرولیز می‌کنند. گلوکوزیدازها معمولا براساس منوساکاریدها نام‌گذاری می‌شوند (۹). آلفاگلوکوزیداز (α-D-Glucoside glucohydrolase, AGL) موجب جذب گلوکز از روده می‌شود. نام دیگر این آنزیم مالتاز است. داروهای مهارکننده این آنزیم، می‌توانند قند خون را کاهش دهند و از جذب گلوکز، جلوگیری کنند. آلفاگلوکوزیدازها بر اساس شناخت سوبسترای ویژه، به ۳ رده طبقه‌بندی می‌شوند. در رده اول سوبسترا هتروژنوس می‌باشد؛ مانند آریل گلوکوزید و ساکارز. همچنین با وجود سوبستراهای پلیمری مانند نشاسته فعالیتی ندارند. رده دوم با وجود مالتوز بسیار فعال است و با وجود آریل گلوکوزید فعالیت اندکی دارد. رده سوم شبیه رده دوم فعالیت می‌کنند؛ اما الیگو، دی‌ساکاریدها و نشاسته را با سرعت‌های متفاوت هیدرولیز می‌کنند (۹). آلفاگلوکوزیدازها براساس شباهت توالی اسیدهای آمینه، خود به دو خانواده گلوکوزهیدرولاز (GH) ۱۳ و۳۱ طبقه‌بندی می‌گردند. خانواده GH ۱۳، دارای سه دمین A، B و C می‌باشند و آلفاآمیلاز، آلفاگلوکوزیداز، سیکلودکسترین گلوکانوترانسفراز، پولولاناز، ایزومالتاز، ایزوآمیلاز، آنزیم‌های شاخه‌شکن و نئوپولولاناز را شامل می‌شوند. شباهت اسیدهای آمینه در این اعضا کم است؛ اما همه آن‌ها دارای چهار بخش محافظت شده می‌باشند و سه رزیدو اسیدی کاتالتیکی در این بخش‌های محافظت شده گزارش شده است (۱۰).

مهار فعالیت آلفاگلوکوزیداز، یکی از روش‌های پیشگیری افزایش گلوکز خون در بیماران دیابتی است. بازدارنده‌های آلفاگلوکوزیداز، گروهی ازداروهای ضد دیابت خوراکی هستند که در درمان دیابت نوع ۲ به کار می‌روند و تأثیرشان جلوگیری از هضم کربوهیدرات‌ها همچون نشاسته و قند است. قندها برای جذب‌شان از دیواره روده، نیازمند تبدیل به اشکال ساده (تک‌قندی) هستند. بازدارنده‌های آلفاگلوکوزیداز با جلوگیری از این عمل، موجب کاهش قند خون می‌شوند (۱۱). امروزه یافتن مهارکننده‌های جدید از عصاره‌های گیاهی، به منظور مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز هدف بسیاری از تحقیقات است. لذا با توجه به آثار مفید عصاره گیاه خارخاسک، در این مطالعه به بررسی تأثیر عصاره ساپونینی استخراج شده از این گیاه بر فعالیت آلفاگلوکوزیداز پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

"آلفاگلوکوزیداز" (α -Glucosidase) (استخراج شده از گونه ساکارومایسس سرویزیه؛ (*Saccharomyces cerevisiae*) Type لیوفیلیزه، کم‌تر از ۱۰ یونیت بر میلی‌گرم، ۰/۰۲ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر آبی، دانسیته

۰/۹۹۷ گرم بر میلی‌لیتر) و p-nitrophenyl α-D-glucoside (PNPG) از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) و سدیم کربنات، اسید کلریدریک، دی‌پتاسیم فسفات (K_2HPO_4) و مونوپتاسیم فسفات (KH_2PO_4) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. تمام آزمایش‌ها در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۶/۸ ؛ آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

نمونه گیاهی

نمونه گیاه خارخسک (*Tribulus terrestris*) در مردادماه سال ۱۳۹۵ توسط برومند و حکمت از حوالی استان قزوین جمع آوری و به منظور شناسایی دقیق به پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تحویل داده شد. تشخیص و شناسایی تا سطح گونه و ایجاد نمونه هرباریومی با کد هرباریومی MPH ۴۵۳۹ توسط دکتر قربانی صورت گرفت. بعد از تأیید نمونه گیاهی، مقدار ۱ کیلوگرم نمونه گیاه به دور از نور آفتاب و در سایه، در دمای اتاق خشک گردید. نمونه‌ها بعد از خشک شدن با آسیاب خرد و برای عصاره‌گیری آماده شدند.

عصاره‌گیری ساپونین

ابتدا ۱۰۰ گرم پودر گیاهی توسط ترازو وزن و در کاغذ صافی قرار داده شد و سپس داخل دستگاه سوکسله با ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول به مدت ۸ ساعت نهاده شد. عصاره به دست آمده دارای مقداری متانول بود که برای جدا کردن متانول آن، از دستگاه روتاری استفاده شد. عصاره خشک حاصل در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و بعد از آن‌که کاملاً به صورت محلول درآمد، محلول را در قیف دکانتور ریخته و سپس به آن، ۵۰ میلی‌لیتر بوتانل نرمال به منظور ورود ساپونین به این فاز اضافه شد. بعد از هم زدن نمونه و گذشت زمان معین، دو لایه تشکیل و فاز آلی و آبی جدا شدند. لایه بالایی (فاز آلی) دارای بوتانل نرمال بود و با استفاده از دستگاه روتاری Tech Lab مدل Ev 311 (ساخت آمریکا)، بوتانل آن را خارج کرده و فاز آلی به صورت رسوب به دست آمد. سپس به منظور رسوب ساپونین، قطره قطره دی اتیل اتر به نمونه اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ شد و رسوب قهوه‌ای رنگی به دست آمد که شامل ساپونین تام گیاه بود. برای اطمینان از وجود ساپونین‌ها، مقداری از رسوب در آب گرم حل و به مدت چند ثانیه تکان داده شد. بر روی مخلوط به ارتفاع چند سانتی‌متر کف دائم تشکیل شد که این، نشان‌دهنده وجود ساپونین است.

کروماتوگرافی مایع تحت خلأ (VLC)

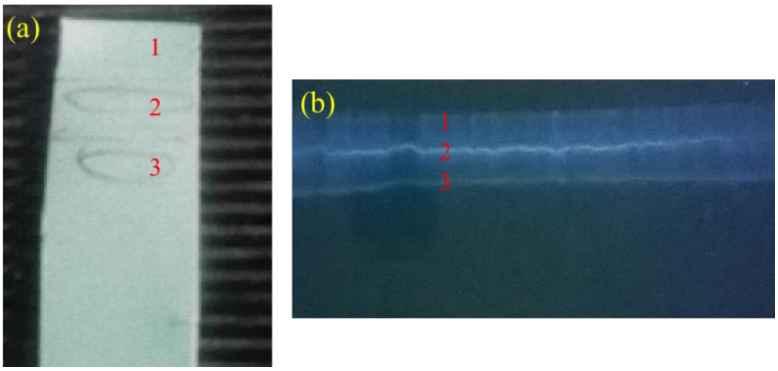
ساپونین تام استخراج شده برای جداسازی فرکشن‌های آن، طبق مراحل زیر با استفاده از کروماتوگرافی جدا شد. برای آماده کردن کروماتوگرافی مایع تحت خلأ (VLC)، قیف مخصوص کروماتوگرافی به پمپ خلأ وصل و ستون

به کمک مکش پمپ تا چند سانتی‌متر مانده به انتهای ستون، با سیلیکا ژل دارای مش بالای ۴۰۰ فشرده شد. سطح سیلیکاژل نباید دارای ترک باشد. به همین منظور بعد از پر کردن ستون، با یک حلال بی‌اثر، مانند هگزان شست‌وشو شد. ابتدا ستون کروماتوگرافی با حلال کلروفرم خالص مورد شویش قرار گرفت و سپس از سیستم حلالی کلروفرم-متانول (۱۰-۹۰)، (۲۰-۸۰)، (۳۰-۷۰) و (۵۰-۵۰) برای شویش ستون استفاده شد. بعد از گذشت زمان و در پایان کروماتوگرافی، ۴ محلول به شماره ۱ تا ۴ به دست آمدند که در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفتند.

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

"کروماتوگرافی لایه نازک" برای هر ۴ محلول حاصل از کروماتوگرافی VLC به طریق زیر انجام شد:

ابتدا کاغذ TLC که شامل یک صفحه آلومینیومی ۲۰ cm × ۲۰ cm پوشیده از یک لایه سیلیکاژل به عنوان فاز ثابت می‌باشد؛ با اندازه مناسب انتخاب شد و سپس برای برداشتن نمونه، به طور جداگانه از هر کدام از ۴ محلول به دست آمده از مرحله قبل، از لوله‌های کاپیلاری (که با حرارت نازک و کشیده شده بود) استفاده شد تا کم‌ترین میزان از نمونه به صفحات TLC منتقل شود. سپس هر کدام، جداگانه درون تانک کروماتوگرافی با فاز متحرک مخلوط کلروفرم ـ متانول با نسبت‌های (۱۰۰-۰)، (۹۰-۱۰)، (۸۰-۲۰)، (۷۰-۳۰) و (۵۰-۵۰)، به ترتیب به عنوان فاز متحرک که جهت اشباع شدن ریخته شده بود؛ قرار داده شد. از بین مخلوط‌های مختلف کلروفرم ـ متانول فقط مخلوط کلروفرم ـ متانول (۷۰-۳۰) توانست حداقل سه فرکشن ساپونین مجزا ایجاد کند (شکل ۱). این سه فرکشن توسط دستگاه UV-CABINET تشخیص داده شد. برای اطمینان وجود سه ساپونین، کروماتوگرافی دوبعدی بر روی کاغذ TLC نیز انجام شد. با توجه به این که ضریب خاموشی ساپونین $\varepsilon = ۱۶۵۴۲/۵\ nM^{-1}\ cm^{-1}$ در طول موج ۳۳۰ نانومتر رابطه بیر ـ لامبرت غلظت ساپونین برابر با ۰/۰۱۵ nM به دست آمد.



شکل ۱. تصویر TLC گرفته شده با لامپ UV ۳ ساپونین استخراج شده از گیاه خارخسک در طول موج (a) ۲۵۴ نانومتر و (b) ۳۶۶ نانومتر

سنجش فعالیت آنزیم

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، از روش استانداردی که کمپانی سیگما با استفاده از مراجع مختلف و بهینه‌سازی شرایط، پیشنهاد کرده است، استفاده شد (۱۲). مخلوط واکنش، حاوی ۰/۲ میکرولیتر آلفا گلوکوزیداز، ۱۳۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار، ۱۰ میکرومولار سوبسترا و ساپونین در غلظت‌های مختلف ۴۵، ۱۰۵، ۱۳۵ و ۱۸۵ میکرومولار بود. این مخلوط در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی تهیه و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از خارج کردن پلیت از انکوباتور، واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌مولار PNPG آغاز شد. مخلوط واکنش مجدداً در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. در نهایت با اضافه کردن ۸۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۰/۲ مولار، واکنش متوقف شد. جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر، توسط دستگاه الیزاریدر ELX ۸۰۸ BioTek (ساخت آمریکا) ثبت شد. پس از اتمام سنجش، جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظرش کسر و سپس با تفریق جذب چاهک کنترل از چاهک نمونه، جذب نهایی محاسبه شد. سپس نمودار جذب نهایی چاهک‌ها علیه زمان رسم شده و شیب نمودار محاسبه و از مخلوط واکنش بدون عصاره گیاهی، به عنوان کنترل و مخلوط واکنش بدون آلفا گلوکوزیداز به عنوان شاهد استفاده شد (این آزمایش برای هر یک از غلظت‌ها سه مرتبه تکرار شد).

واکنش‌هایی که در درون محلول اندازه گیری فعالیت آنزیم انجام می‌پذیرد، به صورت زیر است:

P-Nitrophenyl-α-glucopyranoside(PNPG)→p-Nitrophenol(PNP)+Glucose

برای محاسبه فعالیت از رابطه ۱ استفاده شد:

$$\text{Enzyme Activity} = \frac{\frac{dA}{dt}}{\varepsilon L} \qquad (۱)$$

در این زمینه $\frac{dA}{dt}$ سرعت تغییر جذب نوری ایجاد شده است که به وسیله الایزاریدر در حالت کینتیکی، قابل اندازه‌گیری است. l، طول مسیر نور و برابر ۱ سانتیمتر و ε، ضریب خاموشی است که براساس گزارش موجود مراجع، برابر $M^{-1}cm^{-1}$ ۱۱۲۰۰ می‌باشد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بوده و هر واحد فعالیت آنزیمی، با تعداد میکرومول‌های محصول ایجاد شده در دقیقه (µmol/min) برابر تعریف می‌شود.

مطالعات طیف‌سنجی مرئی ـ فرابنفش

با استفاده از طیف‌سنجی مرئی ـ فرابنفش Cary spectrophotometer, 100 Conc (ساخت انگلیس)، در ابتدا طیف جذبی آنزیم (در غلظت ۴/۸ µM) در محدوده طول موج ۲۰۰-۶۰۰ نانومتر اسکن و سپس ساپونین (با

غلظت‌های ۴۵، ۱۰۵، ۱۳۵ و ۱۸۵ میکرومولار) به آنزیم افزوده و میزان تغییرات ساختار سوم آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (تمامی آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار شد).

مطالعات طیف‌سنجی دوررنگ نمای حلقوی (CD)

طیف‌های CD ، با استفاده از طیف‌سنج دورنگ‌نمایی دورانی Aviv، Model 215 (ساخت آمریکا) ثبت شد. ابتدا طیف CD نمونه آنزیم (در غلظت ۴/۸ µM) مورد بررسی قرار گرفت و سپس طیف‌های CD پس از افزودن ساپونین (با غلظت‌های ۴۵، ۱۰۵، ۱۳۵ و ۱۸۵ میکرومولار) در محدوده طول موج ۱۹۰ تا ۳۲۰ نانومتر با استفاده از کووت کوارتز، طول مسیر ۰/۱ سانتی‌متر، رزولوشن ۰/۲ نانومتر و سرعت اسکن ۲۰ نانومتر در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت شد (تمامی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد). به منظور آنالیز داده‌ها از نرم افزار CDNN استفاده شد.

نتایج

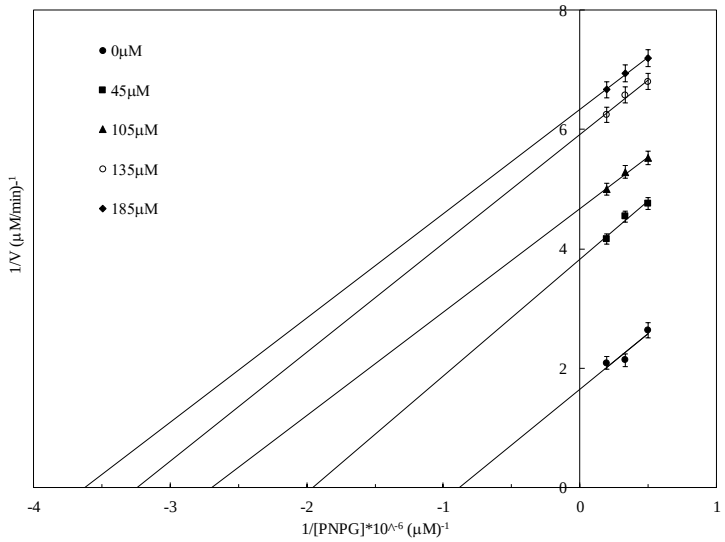
بررسی مهار آلفاگلوکوزیداز

چهار غلظت متفاوت از ساپونین انتخاب و فعالیت آنزیم در تمام این غلظت‌ها بررسی گردید. به منظور تعیین دقیق پارامترهای سنتیک آلفاگلوکوزیداز معادله جفت معکوس لاینویور-برگ (رابطه ۲) استفاده شد.

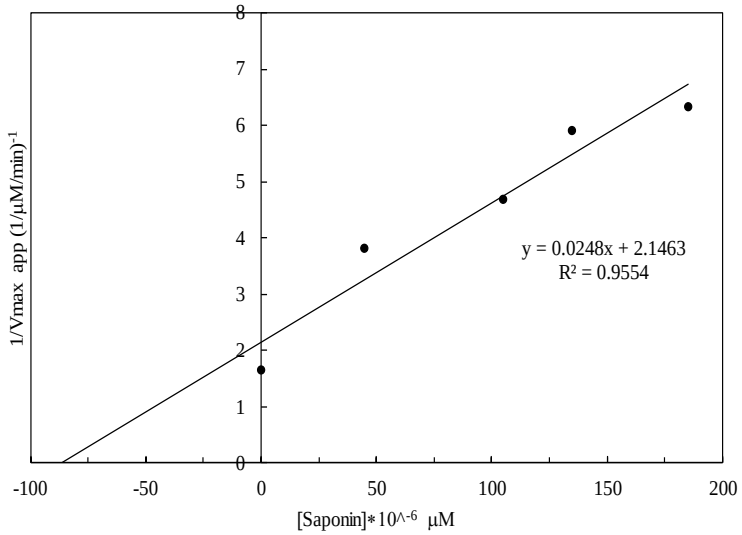
$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (۲)$$

شکل ۲ نشان دهنده منحنی جفت معکوس لاینویوربرک آلفاگلوکوزیداز، در نبود و وجود ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک است. با توجه به نتایج، مهار ساپونین از نوع ضد رقابتی است؛ زیرا در غلظت افزایش یابنده از مهارکننده، شیب نمودارها ثابت ماند؛ عرض از مبدا افزایش یافت؛ طول از مبدا منفی‌تر شد و همه نمودارها با هم موازی شدند (۱۳). به عبارت دیگر، مقدار V_{max} و K_m با افزایش غلظت مهارکننده کاهش یافت (جدول ۱).

در مرحله بعد، به منظور یافتن ثابت‌های مهار (K_i)، منحنی ثانویه معکوس رسم گردید (شکل ۳). مقدار K_i به دست آمد که در جدول ۱ بیان شده است.



شکل ۲. منحنی جفت معکوس لاینویور- برگ آلفاگلوکوزیداز با وجود و حضور ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک



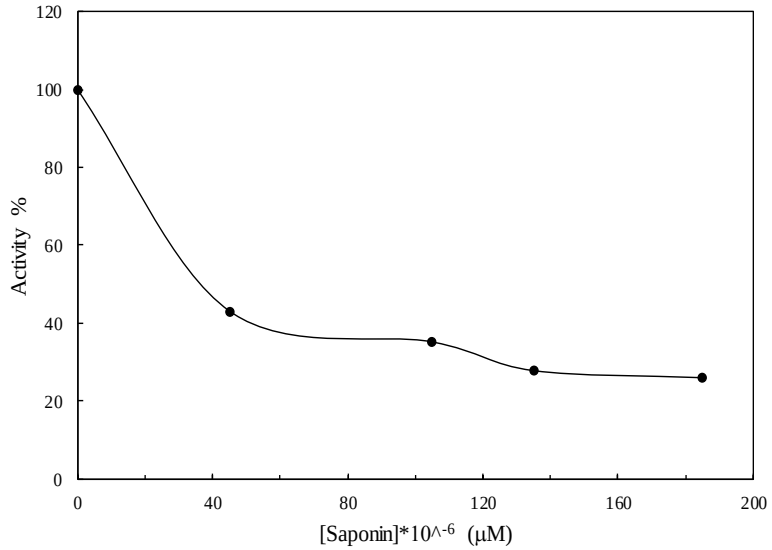
شکل ۳. منحنی ثانویه معکوس برگرفته از شکل ۲

بررسی درصد مهار آلفاگلوکوزیداز با وجود ساپونین

به منظور محاسبه درصد مهارکنندگی و درصد فعالیت آنزیم از روابط ۳ و ۴ استفاده گردید.

(۴) درصد مهارکنندگی= (سرعت در حضور مهارکننده—سرعت در غیاب مهارکننده)/ سرعت در غیاب مهارکننده

(۵) سپس با رسم نمودار غلظت‌های مختلف مهارکننده و محاسبه درصد فعالیت، میزان نصف غلظت مهاری (IC_{50}) مهارکننده به دست آمد (شکل ۴ و جدول ۱):



شکل ۴. اثر غلظت‌های مختلف ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک بر آلفاگلوکوزیداز

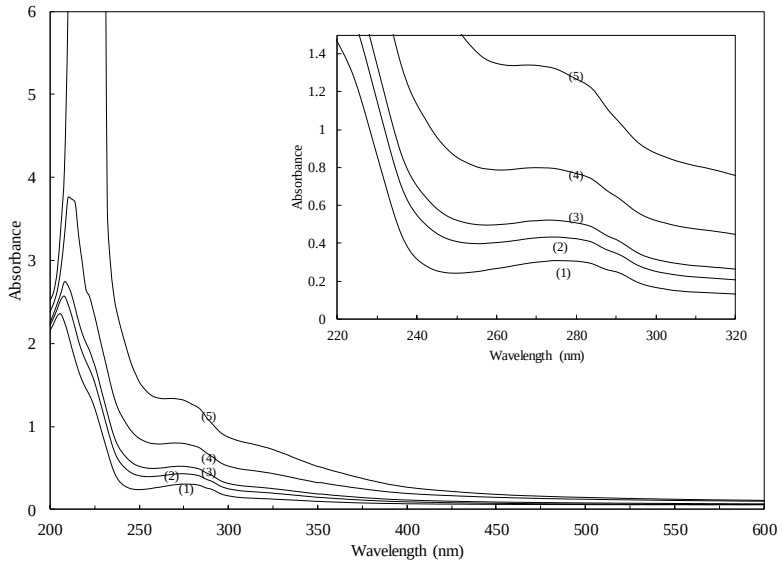
جدول ۱. مقایسه ثابت‌های سنتیکی آلفاگلوکوزیداز با وجود ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک

	نوع مهار	IC_{50} (μM)	K_i (mM)	V_{max} ($\mu M.min^{-1}$)	K_m (μM)
آنزیم در نبود مهارکننده				۰/۶۱	۱/۱۳
آنزیم با وجود ساپونین	ضد رقابتی	۳۸	۰/۰۸۶	۰/۱۶	۰/۲۷ (در غلظت ۱۸۵ میکرومولار)

بررسی طیف جذبی مرئی- فرابنفش

همان گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، آلفاگلوکوزیداز، دارای ماکزیمم جذب در طول موج حدود ۲۸۰ نانومتر و ۲۰۶ نانومتر است. جذب فرابنفش در طول موج ۲۰۶ نانومتر مربوط به پیوندهای پپتیدی پروتئین و جذب فرابنفش درطول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به انتقال π به π^* در حلقه اسیدهای آمینه آروماتیک می‌باشد. با افزودن مقدارهای مختلف ساپونین به آلفاگلوکوزیداز، جذب پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر افزایش می‌یابد که این، حاکی از تغییرات در ساختار پروتئین به ویژه محیط اطراف (Microenviroment) پروتئین، مخصوصاً در نزدیک اسیدهای آمینه آروماتیک می‌باشد (۱۴) که نشان می‌دهد ساپونین در این انتقالات تغییر ایجاد کرده است.

شکل ۵ نشان می‌دهد که کمپلکس ایجاد شده نیز در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارای جذب می‌باشد. قابل ذکر است از آن جا که ساپونین به هر دو کووت شاهد و نمونه افزوده شد، تغییرات ایجاد شده در جذب آنزیم در ناحیه ۲۸۰ نانومتر صرفاً به ایجاد کمپلکس میان ساپونین و آلفاگلوکوزیداز مربوط می‌باشد.

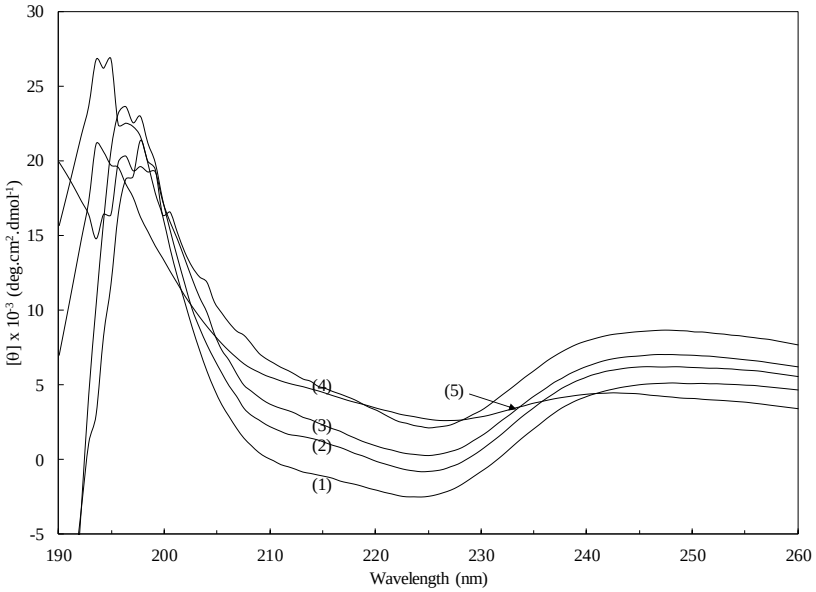


شکل ۵. طیف جذبی UV-Visible آلفاگلوکوزیداز با غلظت‌های مختلف ساپونین استخراج شده از گیاه خارخسک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت آنزیم ٤/٨ μM (۱) و غلظت‌های ساپونین از ۴۵، ۱۰۵، ۱۳۵ و ۱۸۵ میکرومولار (۲-۵). شکل ضمیمه: تغییرات طیف جذبی UV-Visible آنزیم آلفاگلوکوزیداز در محدوده ۲۲۰ تا ۳۲۰ نانومتر.

بررسی طیف دورنگ نمایی حلقوی (CD)

اسپکتروسکوپی CD، نوعی تکنیک کمی است که از آن برای مطالعه ساختار پروتئین‌ها در محلول‌های آبی استفاده می‌شود و به طور گسترده برای تعیین ساختار دوم ماکرومولکول‌ها کاربرد دارد. در این پژوهش، از طیف far-UV CD، برای ارزیابی تغییرات ساختاری آنزیم آلفاگلوکوزیداز القا شده توسط ساپونین استخراج شده از گیاه خارخسک استفاده شد. همان گونه که مشاهده می‌شود، آنزیم آلفاگلوکوزیداز ۲ قله منفی در طول موج‌های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر دارد که مشخص کننده ساختار آلفا هلیکس در آنزیم می‌باشد. طیف CD آنزیم و کمپلکس آنزیم-ساپونین در شکل ۶ نشان داده شده و نتایج آنالیز محتوای ساختار دوم در جدول ۲ فهرست شده است. جدول ۲ نشان می‌دهد که آلفاگلوکوزیداز به صورت طبیعی دارای ۴۵/۶۴% آلفا هلیکس، ۲۱/۰۲% صفحات بتا و ۳۳/۳۳% رندوم کویل در ساختار دوم خود می‌باشد. با اضافه کردن غلظت‌های افزایشی ساپونین، شدت قله‌ها در هر دو طول موج تغییر یافتند و در قله‌ها هیچ جابه جایی مشخصی مشاهده نشد. با افزایش غلظت ساپونین، محتوای آلفا هلیکس آنزیم کاهش چشمگیر یافته، در بالاترین غلظت به ۳/۱۰% می‌رسد و با افزایش غلظت

ساپونین، محتوای رندوم کویل‌ها و صفحات بتا افزایش می‌یابد. نتایج آنالیز کاهش ساختار آلفا هلیکس و افـزایش در ساختار صفحات بتا و رندوم کویل در حضور ساپونین، گویای اینترکشن بین ساپونین و آنزیم می‌باشد. بنابراین، اتصال ساپونین با آلفاگلوکوزیداز سبب تغییرات ساختاری در آنزیم و از دسـت دادن پایـداری آلفـا هلـیکس شـده است. به عبارتی دیگر، ساختار آنزیم، با وجود ساپونین به طور ویـژه تغییـر کـرده اسـت. ایـن نتیجـه بـا تغییـرات ساختاری به دست آمده از طیف UV-Vis منطبق می‌باشد.



شـکل ۶. طیـف CD آلبـومین در نبـود و وجـود نسـبت‌های مـولی مختلـف سـاپونین اسـتخراج شـده از گیـاه خارخسـک. آلفاگلوکوزیداز (۱)، نسبت مولی ساپونین به آنزیم ۴۵، ۱۰۵، ۱۳۵ و ۱۸۵ میکرومولار (۵) نانومولار دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

جدول ۲. محتوای ساختار دوم آنزیم آلفاگلوکوزیداز با وجود و عدم سـاپونین‌های اسـتخراج شـده از گیـاه خارخسـک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

درصد پیچه‌های نامنظم	درصد صفحات بتا	درصد مارپیچ آلفا	مول آنزیم/مول ساپونین (میکرومولار)
۲۲/۳۳	۲۱/۰۲	۵۵/۶۴	۰
۴۶/۷۲	۳۳/۳۱	۱۹/۹۶	۴۵
۴۴/۳۵	۵۲/۱۲	۳/۶۰	۱۰۵
۴۶/۱۰	۵۰/۶۸	۳/۲۳	۱۳۵
۴۴/۹۱	۵۲/۰۳	۳/۱۰	۱۸۰

بحث

با توجه به آمار بالای دیابت در جهان، بررسی روش‌های درمانی این بیماری به یکی از بحث برانگیزترین موضوعات عصر حاضر مبدل شده است. همچنین با توجه به عوارض سوء داروهای مصرفی توسط بیماران، محققان به دنبال استفاده از منابع طبیعی، مانند عصاره و اسانس گیاهان به منظور درمان هستند. یکی از راه‌های اصلی کنترل قند خون پس از صرف غذا در بیماران دیابتی، استفاده از مهارکننده‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز است (۱۵). آلفاآمیلاز در روده، سبب تحریک کربوهیدارت موجود در رژیم غذایی و تبدیل آن به پلی ساکارید و دی ساکارید می‌شود. در ادامه، پلی ساکارید و دی ساکاریدها توسط آلفاگلوکوزیداز به مونوساکاریدها تجزیه می‌شوند. داروهای گوناگونی برای درمان دیابت نوع ۲درنظرگرفته شده که هرکدام به نوبه خود دارای عوارض متعددی است؛ ولی استفاده از عصاره‌های سودمند گیاهی تأثیرگذار می‌تواند به درمان این بیماری کمک شایانی کند (۹, ۱۰). لذا در این مطالعه تأثیر ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک بر فعالیت و ساختار آلفاگلوکوزیداز پرداخته شد.

بر اثر افزودن غلظت‌های مختلف ساپونین به آنزیم، فعالیت آنزیم توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد و کاهش فعالیت مشاهده گردید که این کاهش فعالیت آنزیم با وجود ساپونین، حاکی از آن است که ساپونین موجب مهار آنزیم گردیده است. وجود عصاره گیاهی باعث می‌شود مقدار کم‌تری سوبسترا تجزیه و در نتیجه ماده رنگی کم‌تری تولید شود، که این، به کاهش جذب نوری منجر می‌شود. نمودار مهار توسط ماده مؤثر رسم و طبق شکل ۲ مشخص شد که مهار از نوع ضدرقابتی می‌باشد (۱۳). مهارکننده ضد رقابتی، تنها می‌تواند کمپلکس آنزیم ـ سوبسترا را بشناسد و نمی‌تواند با آنزیم به تنهایی اندرکنش دهد. جایگاه اتصال مهارکننده در این نوع مهار، با مکان اتصال سوبسترا (جایگاه فعال) متفاوت است. به عبارتی، این نوع مهارکننده کنفورماسیون تغییر یافته کمپلکس آنزیم ـ سوبسترا را می‌شناسد. در این نوع مهار، در هر غلظت از مهارکننده، غلظت زیاد سوبسترا نمی‌تواند مانع تشکیل کمپلکس شود، بلکه برعکس، آن را تقویت می‌کند. پس با وجود این نوع مهارکننده، V_{max} و ثابت میکائیلس ظاهری آنزیم کاهش می‌یابد. بیش‌ترین مهار آنزیم با وجود ساپونین با غلظت ۱۸۰۰ میکرومولار مشاهده شد. معمولاً در مطالعات، به ذکر IC_{50} بسنده می‌شود و این، در حالی است که K_i به منظور بررسی سنتیک مهار، مؤثرتر می‌باشد. لذا در این مطالعه، هر دو پارامتر از طریق رسم نمودار جفت معکوس لاینویور–برگ محاسبه گردید. مقدار IC_{50} و K_i به ترتیب ۳۸ میکرومولار و ۰/۰۸۶ میلی‌مولار به دست آمد. پیش از این نیز اثر مهاری قابل توجه ساپونین‌های گونه‌های گیاهی دیگر بر روی فعالیت آلفاگلوکوزیداز نشان داده شده است (۱۶, ۱۷).

همان گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، جذب آلفاگلوکوزیداز در طول موج ۲۸۰ نانومتر، با افزودن

غلظت‌های افزایشی ساپونین استخراج شده ازگیاه خارخاسک افزایش یافته و رفتار هایپرکرومیک نشان می‌دهد. این نتیجه حاکی از آن است که باقی مانده‌های اسیدآمینه‌های آروماتیک آنزیم در محیط آب‌گریزتر قرار گرفته‌اند (۱۸). به معنای دیگر، در اسکلت (Back bone)، آنزیم تغییراتی روی داده است. همچنین این نتیجه، تشکیل کمپلکس بین ساپونین و آنزیم را تأیید می‌کند (۱۸). افزایش جذب در ناحیه پیوند پپتیدی نیز مشاهده می‌گردد که تأییدی دیگر بر تغییرات ساختاری آنزیم می‌باشد.

طیف far-UV CD آنزیم ۲ قله منفی در طول موج‌های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر را که مشخصه ساختار آلفا هلیکس پروتئین است؛ نشان داد. کاهش درصد آلفا هلیکس ساختار آنزیم با وجود ساپونین، نشان می‌دهد ساپونین، با باقی مانده اسیدآمینه‌های زنجیره اصلی پلی پپتید آنزیم، پیوند برقرار می‌کند و در نتیجه شبکه پیوند هیدروژنی را تغییر داده و باعث کاهش ساختار آلفا هلیکس شده است (۱۹). این نتایج با تغییرات ساختاری به دست آمده از طیف‌های مرئی ـ فرابنفش موافق می‌باشد. مطالعه بررسی اثر عصاره ریشه گیاه *Acacia nilotica* بر فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز نیز نشان می‌دهد که این ترکیب با تغییر ساختار دوم آنزیم و کاهش محتوای آلفا هلیکس و افزایش محتوای صفحات بتا موجب مهار آنزیم می‌گردد (۲۰). بنابراین، با وجود ساپونین، ساختار دوم و سوم آلفاگلوکوزیداز تغییر می‌یابد.

میزان جذب ساپونین توسط رژیم غذایی در انسان بسیار متغیر است و تابع عوامل مختلفی است همچون میزان ساپونین مصرف شده در هر وعده غذایی، برهمکنش آن با صفرا، روش‌های تهیه غذا و سیستم متابولیک هر فرد (۲۱). ارکان همکارانش نیز در مطالعه‌ای نقش مهاری ساپونین استخراج شده ازگیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) را بر فعالیت آلفاگلوکوزیداز بررسی کردند و نتایج مطالعات آن‌ها نیز نقش مهاری ساپونین را تأیید کرد. آن ها همچنین عنوان کردند که این ترکیب به همراه رژیم غذایی کم کالری نقش بسیار مهمی (علاوه بر درمان دیابت) در تنظیم وزن بدن دارد (۲۱). زانگ و همکاران نیز تأثیر مهاری ساپونین استخراج شده از گیاه خارخاسک را بر فعالیت آلفاگلوکوزیداز خارج شده از روده کوچک rat در شرایط *in vitro* بررسی کردند و نشان دادند میزان گلوکز خون rat، با وجود ساپونین کاهش می‌یابد (۲۲). قابل ذکر است در این مطالعه، سه ساپونین از ساپونین تام گیاه خارخاسک جدا و تنها تأثیر این سه ساپونین بر فعالیت آلفاگلوکوزیداز بررسی شد. این، در حالی است که در مطالعه ارکان و زانگ تأثیر ساپونین تام استخراج شده بر فعالیت آلفاگلوکوزیداز بررسی گردید. همچنین ارکان و زانگ به مکانیزم تأثیر ساپونین بر فعالیت آنزیم نپرداختند؛ حال آن که در این مطالعه به صورت جامعی به تغییرات ساختاری ایجاد شده توسط سه ساپونین گیاه خارخاسک بر آلفاگلوکوزیداز پرداخته شد.

نتیجه‌گیری

هدف اصلی این تحقیق، پی بردن به تأثیر ساپونین استخراج شده از گیاه "خارخاسک" (*Tribulus terrestris*) بر فعالیت و ساختار آلفاگلوکوزیداز است. ساپونین گیاه خارخاسک، به عنوان یک عصاره گیاهی به منظور مهار آلفاگلوکوزیداز بررسی گردید. بر اساس نتایج این تحقیق، از ساپونین گیاه خارخاسک به عنوان عصاره‌ای که دارای اثر مهار آنزیم است، می‌توان برای کنترل قند خون از طریق مهارآنزیم توسط ساپونین بهره برد. با توجه به نتایج تغییر در فعالیت آنزیم، به نظر می‌رسد ساپونین با تغییر ساختار آنزیم، موجب تغییر فعالیت آنزیم گردیده، فعالیت آن را کاهش داده است.

منابع

1. Yadolahi F, Tajbakhsh E, Momtaz H. Identification of causative agents of urinary tract infection and antimicrobial susceptibility in diabetic patients in Kermanshah. *App biol*, 2017; 7: 1-13.

2. Mohammed MS, Alajmi MF, Alam P, Khalid HS, Mahmoud AM, Ahmed WJ. Chromatographic finger print analysis of anti–inflammatory active extract fractions of aerial parts of Tribulus terrestris by HPTLC technique. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2014;4(3): 203-8.

3. Samy MN, Bishr MM, Ahmed AA, Kamel MS. A Review of non-Steroidal Phytoconstituents of *Tribulus Terrestris*. *Int J Pharmacogn*, 2016;3: 212-6.

4. Rajabi N, Karimi Jashni H. Evaluation of effect of tribulus terrestris extract on sex hormones in male rats after treatment with cyclophosphamide. *J Jahrom Univ Med Sci*, 2014;12(2):1-8.

5. Song YH, Kim DW, Curtis-Long MJ, Yuk HJ, Wang Y, Zhuang N, et al. Papain-like protease (PLpro) inhibitory effects of cinnamic amides from Tribulus terrestris fruits. *Biol. Pharm. Bull*, 2014;37(6): 1021-8.

6. Beveridge TH, Li TS, Drover JC. Phytosterol content in American ginseng seed oil. *J Agric Food Chem*, 2002;50(4): 744-50.

7. Koczurkiewicz P, Czyż J, Podolak I, Wójcik K, Galanty A, Janeczko Z, et al. Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells-mini-review of in vitro studies. *Acta Biochim Pol*, 2015;62(3): 383-93.

8. Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2007;47(3): 231-58.

9. Dušan V, Nenad M, Dejan B, Filip B, Segal AM, Dejan Š, et al. The specificity of α-glucosidase from Saccharomyces cerevisiae differs depending on the type of reaction: hydrolysis versus transglucosylation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014;98(14): 6317-28.

10. Yamamoto K, Nakayama A, Yamamoto Y, Tabata S. Val216 decides the

substrate specificity of α-glucosidase in Saccharomyces cerevisiae. *Eur J Biochem*, 2004;271(16): 3414-20.

11.Ernawati T. In silico evaluation of molecular interactions between known α-glucosidase inhibitors and homologous α-glucosidase enzymes from Saccharomyces cerevisiae, Rattus norvegicus, and GANC-human. TJPS, 2018; 42(1): 4-20.

12. Ashiq U, Jamal RA, Saleem M, Mahroof-Tahir M. Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd (II)-hydrazide complexes. *Arab J Chem*, 2017;10(4): 488-99.

13. Chen X, He X, Zhang B, Sun L, Liang Z, Huang Q. Wheat gluten protein inhibits α-amylase activity more strongly than a soy protein isolate based on kinetic analysis. *Int J Biol Macromol*, 2019;129: 433-41.

14. Roy D, Kumar V, James J, Shihabudeen MS, Kulshrestha S, Goel V, et al. Evidence that chemical chaperone 4-phenylbutyric acid binds to human serum albumin at fatty acid binding sites. *PLoS One*, 2015;10(7): e0133012.

15. Pirian K, Piri K. Evaluation of antioxidant and a-amylase inhibitory activity of two species Sargassum angostifolium and Palisada perforata. Iranian Journal of Cellular and Molecular Researches 2018: 31: 256-67.

16. Luo J-G, Ma L, Kong L-Y. New triterpenoid saponins with strong α-glucosidase inhibitory activity from the roots of Gypsophila oldhamiana. *Bioorg Med Chem*, 2008;16(6): 2912-20.

17. Sadegh-Nejadi S, Aberomand M, Ghaffari MA, Mohammadzadeh G, Siahpoosh A, Reza A. Inhibitory Effect of Ziziphus Jujuba and Heracleum Persicum on the Activity of Partial Purified Rat Intestinal Alpha-Glucosidase Enzyme. *J Mazandaran Univ Med Sci*, 2016;25(134): 135-46.

18. Hekmat A, Hajebrahimi Z, Motamedzade A. Structural Changes of Human Serum Albumin (HSA) in Simulated Microgravity. *Protein Peptide Lett*, 2017;24(11): 1030-9.

19. Cheng X-X, Lui Y, Zhou B, Xiao X-H, Liu Y. Probing the binding sites and the effect of berbamine on the structure of bovine serum albumin. *Spectrochim*

Acta A, 2009;72(5): 922-8.

20. Jaiswal N, Srivastava S, Bhatia V, Mishra A, Sonkar A, Narender T, et al. Inhibition of Alpha-Glucosidase by Acacia niloticaPrevents Hyperglycemia along with Improvement of Diabetic Complications via Aldose Reductase Inhibition. *J Diabetes Metab*, S. 2012;6: 1-7.

21. Ercan P, El SN. Inhibitory effects of chickpea and Tribulus terrestris on lipase, α-amylase and α-glucosidase. *Food Chem*, 2016;205: 163-9.

22. Zhang S, Qu W, Zhong S. Inhibitory effects of saponins from *Tribulus terrestris* on alpha-glucosidase in small intestines of rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2006;31: 910-13.

The effects of Saponin derived from *Tribulus terrestris* on the activity and structure of α-Glucosidase

Sama Alijani[1], Azadeh Hekmat[1*] and Sara Khavarynejad[2]

[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2] Department of Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran

* Corresponding author: hekmat@ut.ac.ir

Abstract

α-Glucosidase is a kind of hydrolase enzyme that catalyzes the hydrolysis of non-reducing terminal carbohydrates into α-glucose. Inhibition of this enzyme prevent the glucose absorption. Compounds that can inhibit α-glucosidase are widely used for the treatment of type 2 diabetes. *Tribulus terrestris* is a medicinal plant which is distributed around the world. Saponins in this plant are responsible for its biological activities. In the research, the α-glucosidase inhibitory activity of saponins extracted from *Tribulus terrestris* has been studied by ELISA reader, UV-Visible, and circular dichroism (CD) spectroscopies. The results of ELISA reader displayed that Saponins have functioned as uncompetitive inhibitory effects on α-glucosidase. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value were 38 µM for saponin. The absorption of α-glucosidase increased with the addition of saponin concentrations. Comparison of the α-glucosidase and α-glucosidase-saponin complex displayed that the content of the α-helix structure decreased and the content of the β-sheets and random coils structure increased. Collectively, the results showed that saponins extracted from *Tribulus terrestris* can disrupt the α-glucosidase enzyme structure and inhibit the enzyme activity. Altogether, the saponins extracted from *Tribulus terrestris* can be a good candidate for Type II diabetes treatment.

Keywords: α-glucosidase, Saponin, *Tribulus terrestris*, Inhibitor, Spectroscopy