Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Linalool on the Activity of Glyoxalase-I and Diverse Glycation Products in Rats with Type 2 Diabetes

Sina Mahdavifard[1],
Manochehr Nakhjavani[2]

[1] Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[2] Professor, Department of Endocrinology and Metabolism, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received March 9, 2020 Accepted May 13, 2020)

Abstract

Background and purpose: Hyperglycemia contributes to type 2 diabetes and diabetes vascular complications by reduction of the activity of glyoxalase-I (GLO-I) and elevation of glycation, oxidative stress, and inflammatory markers. Linalool is reported to have beneficial effects on glucose metabolism in animal models of diabetes, so, this study aimed at investigating the effect of linalool on the activity of GLO-1 and inflammatory markers in rats with type 2 diabetes.

Materials and methods: In this experimental study, type 2 diabetes was induced by nicotinamide and streptozotocin (210 + 55 mg/kg). The animals were divided into a control group and diabetic groups treated by linalool and those that received no treatment (n=10 per group). Linalool 25 mg/kg was administered by gavage daily for two months. Fasting blood sugar, insulin resistance index, lipid profile, the activity of GLO-I, markers of glycation (glycated albumin, methylglyoxal, and advanced glycation end products), oxidative stress (advanced oxidation end products and malondialdehyde), inflammation (interleukine-1β) as well as serum creatinine and 24-h urinary protein excretion (renal dysfunction markers) were measured in all groups.

Results: Linalool had reductive effects on serum fasting glucose, insulin resistance, dyslipidaemia, glycation oxidative stress, inflammatory markers, and renal dysfunction indices. GLO-I activity was found to be significantly higher in animals treated with linalool compared to the un-treated experimental group ($P < 0.001$).

Conclusion: Linalool could reduce the risk of developing diabetes vascular complications owing to raising the GLO-I activity and improving the antioxidant, anti-glycation, and anti-inflammatory properties and has beneficial effects on glucose and lipid metabolism.

Keywords: linalool, diabetes mellitus type 2, antioxidants

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (186): 24-33 (Persian).

*** Corresponding Author: Sina Mahdavifard -** Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran (E-mail: zfotoukian@gmail.com)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 186 تیر سال 1399 (33-24)

اثر لینالول بر فعالیت آنزیم گلی‌اوکسیلاز -1 و شاخص‌های مختلف گلیکه در موش‌های دیابتی نوع دو

سینا مهدوی فرد[1]

منوچهر نخجوانی[2]

چکیده

سابقه و هدف: افزایش قندخون با کاهش فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 و افزایش شاخص‌های گلیکه، استرس اکسیداتیو و التهابی در بروز دیابت نوع دو و اختلالات عروقی دیابتی نقش دارد. با توجه به اثر مفید لینالول بر متابولیسم گلوکز در مدل‌های حیوانی دیابت، هدف از این مطالعه بررسی اثر لینالول بر فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 و شاخص‌های مختلف گلیکه، استرس اکسیداتیو و التهابی در موش‌های دیابتی نوع دو است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، دیابت نوع دو در موش‌ها به وسیله ترکیب نیکوتینامید و استرپتوزوسین (210 و 55 mg/kg) القا شد. گروه‌های تحت مطالعه (10 موش در هر گروه) شامل گروه‌های کنترل، دیابتی بدون تیمار و دیابتی تحت تیمار لینالول بودند. گروه دیابتی تحت تیمار، روزانه به مدت دوماه از طریق گاواژ به میزان25 mg/kg لینالول دریافت کردند. قندخون ناشتا، شاخص مقاومت انسولین، پروفایل لیپیدی، فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 و شاخص های گلیکه (آلبومین گلیکه، متیل‌گلی‌اوکسال و ترکیبات نهایی گلیکه پیشرفته)، استرس اکسیداتیو (محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین‌ها، مالون‌دی‌آلدئید و LDL اکسیده) و التهابی (اینترلوکین - 1β) و همچنین شاخص‌های اختلال عملکردی کلیوی (کراتینین سرم و دفع پروتئین ادرار24 ساعته) اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: تیمار بر میزان قند ناشتای سرم، مقاومت انسولین، اختلالات لیپیدی، شاخص‌های گلیکه، استرس اکسیداتیو و التهابی و همچنین شاخص‌های اختلال عملکرد کلیوی موش‌های دیابتی اثر کاهنده و بر فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 اثر افزاینده داشت (P<0/001).

استنتاج: لینالول با افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی، ضد گلیکه و ضد التهابی و همچنین بهبود متابولیسم گلوکز و لیپید، توان کاهش خطر بروز اختلالات عروقی دیابت را دارد.

واژه های کلیدی: لینالول، دیابت ملیتوس نوع دو، آنتی‌اکسیدانت‌ها

مقدمه

دیابت نوع دو یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان است و بزودی به یکی از بزگ‌ترین چالش‌های بهداشتی و اقتصادی تبدیل می‌شود. این بیماری به‌علت اختلال در ترشح و یا عملکرد انسولین ایجاد می‌شود. استرس اکسیداتیو، محصولات گلیکه و التهاب در بروز اختلال عملکردی سلول‌های بتا-پانکراس، ایجاد مقاومت به انسولین و اختلالات عروقی دیابت نوع دو نقش دارند(1،2).

مولف مسئول: سینا مهدوی فرد - اردبیل: انتهای خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، گروه بیوشیمی بالینی E-mail: fard635@gmail.com

1. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

2. استاد، گروه غدد درون ریز و متابولیسم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت : 1398/12/19 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/12/25 تاریخ تصویب : 1399/2/24

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

علاوه بر این ترکیبات ابتدایی، میانی و نهایی گلیکه باعث تشدید استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شوند(3). ایجاد محصولات گلیکه در پی افزایش قند خون و ترکیبات دی‌کربونیل مانند متیل‌گلی‌اوکسال در افراد دیابتی به میزان چندین برابر افراد سالم افزایش می‌یابد. سیستم گلی‌اوکسیلاز شامل آنزیم‌های گلی‌اوکسیلاز-1 و گلی‌اوکسیلاز-2 با تجزیه ترکیبات دی‌کربونیل مهم‌ترین اثر را در کاهش تولید محصولات نهایی گلیکه پیشرفته (AGEs) دارد. گلی‌اوکسیلاز-1 مرحله محدود کننده خنثی‌سازی ترکیبات دی‌کربونیل را کاتالیز می‌نماید(4).

اخیراً استفاده از ترکیباتی که بر فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 اثر افزاینده و یا بر تشکیل محصولات مختلف گلیکه اثر کاهنده داشته باشند به عنوان یک هدف درمانی جهت پیشگیری یا کاهش خطر بروز اختلالات دیابتی مورد توجه قرار گرفته‌اند. از طرفی با توجه به استفاده از مواد طبیعی به علت عدم سمیت و سازگاری زیستی و همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانتی لینالول(5)، در این مطالعه استفاده از لینالول مورد توجه قرار گرفته است. لینالول یک منوترپن بوده و فراوان ترین بخش اسانس گیاهان دارویی مانند اسطوخودوس است. اثر لینالول بر قندخون(6)، التهاب و اختلالات کلیوی(7) در موش‌های دیابتی نوع یک مطالعه شده است. اخیراً اثر آنتی‌اکسیدانتی لینالول با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در موش‌های مدل کلسیفه‌شدن عروقی مشاهده گردید(5). تاکنون اثر لینالول بر فعالیت آنزیم گلی‌اوکسیلاز-1 و میزان محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیکه در بیماران دیابتی نوع دو و یا مدل‌های حیوانی دیابت گزارش نشده است. بنابراین، هدف ما از این مطالعه بررسی اثر لینالول بر فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و شاخص‌های مختلف گلیکه، استرس اکسیداتیو و التهابی در موش‌های دیابتی نوع دو است.

مواد و روش ها

اسپرتوزوتوسین، نیکوتینامید، لینالول، گلوکز، فسفات منو هیدروژن دی پتاسیم و فسفات دی هیدروژن پتاسیم از شرکت سیگما خریداری شد.

طراحی مطالعه

موش‌های صحرایی نر (8 هفته) از نژاد ویستار آلبینو با وزن 15±170 گرم از انستیتو پاستور ایران، کرج، خریداری شد. موش‌ها تحت شرایط کنترل شده در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اردبیل نگهداری شدند. القا دیابت نوع دو، بعد از دو هفته سازگاری با شرایط، با تزریق نیکوتینامید و استرپتوزوتوسین (در بافر سیترات با pH برابر 4/5) به ترتیب به میزان 210 و 55 میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن، انجام شد. سه روز پس از القای دیابت، میزان قندخون موش‌ها اندازه‌گیری گردید و مواردی که قند بالای 200 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند، به عنوان مدل دیابتی پذیرفته شدند و برای تایید القای دیابت نوع دو، شاخص مقاومت انسولین تعیین شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه 10 تایی به ترتیب ذیل تقسیم شدند. گروه کنترل، دیابتی و گروه دیابتی دریافت کننده لینالول (دیابتی+ لینالول). گروه دیابتی تحت تیمار با لینالول به مدت دو ماه روزانه 25 میلی‌گرم لینالول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در نیم میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید 0/01 درصد از طریق گاواژ قرار گرفتند. گروه کنترل و دیابتی بدون تیمار تنها نیم میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید 0/01 درصد در مدت مطالعه دریافت کردند. انتخاب دوز تیمار براساس اثر آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی لینالول در این دوز است(9،8). پروتکل تجربی توسط کمیته اخلاقی حیوانی مطابق با دستورالعمل برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی آماده شده توسط دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تصویب و اجرا گردید (کد اخلاق: IR.ARUMS.REC.1397.176).

جمع‌آوری نمونه ادرار 24 ساعته، خون و بافت

نمونه ادرار 24 ساعته سه روز پیش از پایان مطالعه با قرار دادن موش‌ها در قفس متابولیک جمع‌آوری شد.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

نمونه خون از قلب موش‌ها پس از 16 ساعت ناشتایی در پی بیهوشی با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین (90 و 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) جمع‌آوری و در لوله‌های دارای ضد انعقاد EDTA و بدون ضد انعقاد ریخته شد.

سنجش قند، پروفایل لیپیدی و شاخص‌های عملکرد کلیه

به روش آنزیمی با کیت‌های شرکت پارس آزمون مقادیر قند خون ناشتا، تری گلیسرید، کلسترول و HDL، LDL و کراتینین سنجش شد. شاخص آتروژنی از طریق تقسیم میزان LDL بر HDL محاسبه گردید. انسولین سرم با کیت الیزا (Mercodia, Uppsala, Sweden) اندازه‌گیری شد و شاخص مقاومت انسولین، HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) محاسبه شد(3). میزان دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته با روش کدورت سنجی اندازه‌گیری شد(10). جهت سنجش مقدار دفع پروتئین در ادرار 24 ساعته، به 1 میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرو استیک 3 درصد، 0/1 میلی‌لیتر نمونه افزوده و پس از 5 دقیقه جذب آن در طول موج 420 برابر محلول شاهد خوانده شد.

سنجش محصولات ابتدای، میانی و نهایی گلیکه

غلظت آلبومین گلیکه براساس احیا ماده نیتروبلوتترازولیوم و خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج 540 نانومتر تعیین گردید(11). برای سنجش آلبومین گلیکه، 50 میکرولیتر آلبومین استخراج شده از سرم و 100 میکرولیتر ایدواستامید 5 میلی‌مولار در یک لوله آزمایش ریخته شد و بمدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، 1 میلی‌لیتر معرف نیتروبلوتترازولیوم 500 میکرومولار به لوله حاوی نمونه افزوده شد و دوباره انکوبه گردید و پس از 30 دقیقه، جذب نمونه در برابر محلول شاهد (معرف) در طول موج 540 نانومتر خوانده شد و براساس منحنی استاندارد غلظت آلبومین گلیکه در نمونه تعیین گردید. محصولات میانی گلیکه مانند متیل‌گلی‌اوکسال با روش HPLC فاز معکوس و قرائت جذب در در طول موج 360 نانومتر اندازه‌گیری شد(12). جهت سنجش متیل‌گلی‌اوکسال، میزان مشتقات دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین متیل‌گلی‌اوکسال با استفاده از ستون C18 و فاز متحرک بافر فسفات/ استونیتریل/2- متیل پروپانول در طول موج 360 نانومتر تعیین گردید. مقدار AGEs براساس جذب فلورومتری در طول موج تابشی 440 نانومتر و طول موج تحریکی 370 نانومتر سنجیده شد(13). جهت سنجش AGEs، ابتدا نمونه به نسبت 1 به 50 با بافر فسفات 100 میلی‌مولار با pH برابر 7/4 رقیق گردید و سپس جذب فلورسنت آن بوسیله دستگاه فلورومتر اندازه‌گیری شد. چگونگی سنجش محصولات گلیکه در مطالعات قبلی ما بیان شده است(15،14).

سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو و التهابی

سنجش محصولات پیشرفته پروتئین اکسیده یا AOPP براساس روش اسپکتروفتومتری در طول موج 340 نانومتر انجام شد(16). برای سنجش AOPP، نمونه سرم به نسبت 1 به 5 با بافر سیترات 200 میلی‌مولار رقیق گردید، سپس به آن یدور پتاسیم 1/6 مولار و اسید استیک گلاسیال بترتیب به میزان 10 و 20 میکرولیتر اضافه شد، سپس جذب نمونه در طول‌موج 340 نانومتر قرائت گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از تیوباربیتوریک اسید و خواندن جذب در طول موج 532 نانومتر اندازه‌گیری شد. LDL اکسیده براساس جذب فلورسنت در طول موج تابشی و طول موج تحریکی به ترتیب 430 و 360 محصولات فلورسنت حاصل از اکسیداسیون آپو B-100 سنجیده شد(17). جهت سنجش LDL اکسیده، ابتدا LDL از سرم استخراج و سپس در بافر فسفات 100 میلی‌مولار با pH برابر 7/4 حل شد و جذب فلورسنت آن اندازه‌گیری گردید. چگونگی سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در مقالات قبلی ما بیان شده است(15،14). فاکتور التهابی اینترلوکین 1β

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

(IL-1β) با کیت الیزا (Immunotech, France) اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم گلی‌اوکسیلاز-1

فعالیت آنزیم گلی‌اوکسیلاز- 1 در همولیزیت گلبول‌های قرمز براساس تشکیل لاکتوئیل گلوتاتیون و خواندن میزان جذب در طول موج 240 نانومتر اندازه‌گیری شد(18). به 1 میلی‌لیترمعرف واکنش (بافرفسفات 100 میلی‌مولار با pH برابر7/2 ، گلوتانیون 1/7 میلی‌مولار، سولفات منیزیم 16 میلی‌مولار و متیل گلی‌اوکسال 3/5 میلی‌مولار) 20 میکرولیتر همولیزیت اضافه شد و جذب آن پس از دو دقیقه در طول موج 240 نانومترخوانده شد. نحوه سنجش آنزیم‌های گلی‌اوکسیلاز در مطالعه قبلی ما بیان شده است(15).

اثر لینالول بر تشکیل محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیکه در شرایط in vitro

آلبومین از سرم با استفاده از تری‌کلرو استیک اسید و اتانول استخراج گردید(14،15). 5 میلی‌لیتر بافر فسفات 100 میلی‌مولار با pH برابر 7/4 حاوی آلبومین (10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و سدیم آزاید (0/1 میلی‌مول بر لیتر) در سه لوله آزمایش ریخته شد. لوله اول: آلبومین، لوله دوم: آلبومین +گلوکز (50 میلی‌مولار)، لوله سوم: آلبومین + گلوکز + لینالول (25 میلی‌گرم بر لیتر). لوله‌ها بمدت سه ماه در دمای 37 درجه نگهداری شد و بترتیب پس از سه هفته و سه ماه، نمونه جهت سنجش آلبومین گلیکه و متیل گلی‌اوکسال و در پایان جهت سنجش AGEs برداشته شد وبراساس روش‌های سنجش محصولات گلیکه درقسمت مطالعه *in vivo* میزان آن‌ها اندازه‌گیری گردید.

تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean± SD) ارائه شد. از نرم‌افزار SPSS16 و آزمون تحلیل واریانس چندگانه یا چند متغیری (MANOVA-Tukey) که یک روش یک طرفه درون گروهی برای مقایسه چند متغیر است و از همبستگی چندگانه و ضریب همبستگی به ترتیب برای تعیین قدرت پیش‌بینی مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نفروپاتی دیابتی و التهاب براساس فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و جهت تعیین ضریب همبستگی بین فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 با مقایر شاخص مقاومت انسولین، LDL اکسیده، شاخص آتروژنی، دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته و اینترلوکین-1β استفاده گردید. P<0/05 برای تمام سنجش‌ها معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر لینالول بر مقادیر قندخون ناشتا، انسولین، شاخص مقاومت انسولین (HOMA)، پروفایل لیپیدی شامل تری‌گلیسرید، کلسترول تام، HDL، LDL و شاخص آتروژنی و همچنین شاخص‌های اختلال عملکردی کلیوی شامل کراتینین سرم و دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته در گروه‌های کنترل و دیابتی در جدول شماره 1 مشخص است. القای دیابت نوع دو منجر به افزایش همه متغیرها و کاهش میزان انسولین و HDL در موش‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل شد ولی لینالول این تغییرات را جبران کرد (P<0/001).

جدول شماره 1: اثر لینالول بر میزان قندخون ناشتا، انسولین، شاخص مقاومت انسولین، پروفایل لیپیدی و شاخص‌های اختلال عملکردی کلیوی در گروه‌های کنترل و دیابتی

پارامتر	گروه			سطح معنی‌داری
	کنترل	دیابتی	دیابتی +لینالول	
گلوکز ناشتا (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	86/35 ± 6/28	284/07 ± 16/12*#	148/63 ± 10/76*.#	0/001
انسولین (میکرو واحد بر میلی‌لیتر)	18/51 ± 1/25	8/23 ± 0/43*#	12/81 ± 0/76*.#	0/001
شاخص مقاومت انسولین	3/94 ± 0/31	5/77 ± 0/61*#	4/70 ± 0/61*.#	0/001
تری‌گلیسرید (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	83/05 ± 4/37	232/40 ± 14/12*#	122/40 ± 6/63*.#	0/001
کلسترول تام (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	88/19 ± 5/73	172/65 ± 9/91*#	105/01 ± 8/45*.#	0/001
HDL (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	54/07 ± 4/67	23/76 ± 2/27*#	42/57 ± 2/27*.#	0/001
LDL (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	17/51 ± 1/09	102/41 ± 7/42*#	37/96 ± 3/82*.#	0/001
شاخص آتروژنی	0/32 ± 0/03	4/31 ± 0/42*#	0/89 ± 0/07*.#	0/001
کراتینین (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	0/67 ± 0/06	1/33 ± 0/12*#	0/81 ± 0/12*.#	0/001
دفع ادراری پروتئین (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	14/66 ± 1/60	319/37 ± 18/70*#	174/17 ± 9/38*.#	0/001

*: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (P< 0/001)

#: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی (P< 0/001)

روش آماری MANOVA و آزمون Tukey (تعداد در هر گروه 10سر موش صحرایی)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

مقایسه غلظت محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیکه (به ترتیب آلبومین گلیکه، متیل گلی‌اوکسال و AGEs) و شاخص‌های استرس اکسیداتیو (محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین‌ها، مالون‌دی‌آلدئید و LDL اکسیده) و همچنین فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 در گروه‌های کنترل و دیابتی بدون تیمار و تحت تیمار با لینالول در جدول شماره 2 نشان داده شده است. لینالول بر مقادیر شاخص‌های مختلف گلیکه و استرس اکسیدایتو اثر کاهنده و همچنین بر فعالیت آنزیم گلی‌اوکسیلاز -1 نسبت به گروه دیابتی بدون تیمار اثر افزاینده داشت (P<0/001).

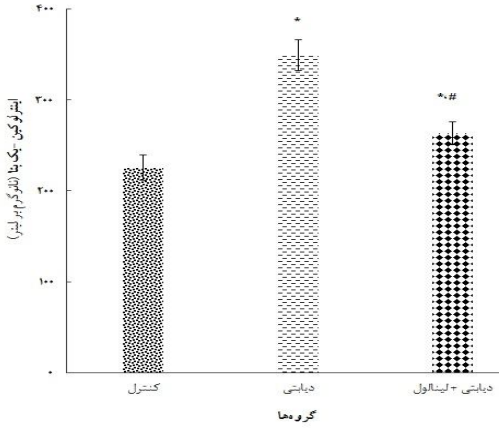
جدول شماره 2: مقایسه غلظت شاخص های گلیکه، استرس اکسیداتیو و التهابی وهمچنین فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 در گروه‌های کنترل و دیابتی

پارامتر	گروه			سطح معنی‌داری
	کنترل	دیابتی	دیابتی + لینالول	
آلبومین گلیکه (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	86/35 ± 6/28	284/07 ± 16/12*	148/63 ± 10/76*#	0/001
متیل گلی‌اوکسال (میکرومول بر لیتر)	13/17 ± 0/51	50/62 ± 0/61*	26/32 ± ۰/۳۲	0/001
محصولات نهایی گلیکه پیشرفته (واحد قراردادی)	79/05 ± 3/87	250/40 ± 15/12*	173/63 ± 9/12*	0/001
پروتئینهای اکسیده (میکرومول بر لیتر)	26/95 ± 2/79	73/41 ± 5/91*	42/66 ± 4/01*	0/001
مالون‌دی آلدئید (میکرومول بر لیتر)	13/19 ± 5/73	117/65 ± 7/62*	51/74 ± 4/91*	0/001
LDL اکسیده (واحد قراردادی)	215/43 ± 13/05	527/21 ± 34/72*	309/64 ± 18/19*	0/001
گلی‌اوکسیلاز -1 (واحد بر لیتر)	41/32 ± 3/52	18/57 ± 2/67*	30/43 ± 2/87*	0/001

*: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (P<0/001)
#: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی (P<0/001)
روش آماری MANOVA و آزمون Tukey (تعداد در هر گروه 10 سر موش صحرایی)

مقایسه میزان IL-β1 در گروه های کنترل، دیابتی بدون تیمار و تحت تیمار با لینالول در نمودار شماره 1 نشان داده شده است. میزان اینترلوکین- یک بتا در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت ولی تیمار بر میزان این شاخص اثر کاهنده داشت (P<0/001).

میزان ضریب همبستگی بین فعالیت گلی‌اوکیسلاز- و مقادیر شاخص مقاومت انسولین، LDL اکسیده، شاخص آتروژنی، دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته و اینترلوکین - 1β در جدول شماره 3 آورده شده است. بین فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 و سایر پارمترها ضریب همبستگی منفی بالایی در این مطالعه مشاهده شد که نشانگر رابطه معکوس بین فعالیت گلی‌اوکسیلاز و مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نفروپاتی و التهاب است (P<0/005). میزان ضریب همبستگی بین فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 و سایر پارامترها برابر 0/892 است که نشان دهنده توان پیش‌بینی فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 در مورد بروز مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نفروپاتی دیابتی و التهاب است (P<0/005).



نمودار شماره 1: غلظت سرمی اینترلوکین -یک بتا در گروه‌های کنترل و دیابتی بدون تیمار و تحت تیمار با لینالول
*: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (P< 0/001)
#: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی (P< 0/001)
روش آماری MANOVA و آزمون Tukey (تعداد در هر گروه 10 سر موش صحرایی)

جدول شماره 3: میزان ضریب همبستگی بین فعالیت گلی‌اوکسیلاز -1 و شاخص مقاومت انسولین، LDL اکسیده، شاخص آتروژنی و اینترلوکین - β1

پارامتر	میزان ضریب همبستگی (r)	سطح معنی‌داری
شاخص مقاومت انسولین	-0/797	0/005
LDL اکسیده	-0/905	0/005
شاخص آتروژنی	-0/845	0/005
دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته	-0/784	0/005
اینترلوکین -1β	-0/875	0/005

اثر لینالول بر تشکیل محصولات ابتدایی (آلبومین گلیکه)، میانی (متیل گلی‌اوکسال) و نهایی گلیکه (محصولات نهایی گلیکه پیشرفته) آلبومین موش صحرایی در شرایط in vitro

اثر تیمار بر تشکیل محصولات مختلف گلیکه از آلبومین سرم موشی در شرایط *in vitro* در جدول شماره 4

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

نمایان است. میزان آلبومین گلیکه، متیل‌گلی‌اوکسال و AGEs در شرایط بدون تیمار و در حضور گلوکز افزایش بارزی داشت در صورتی که میزان تشکیل این محصولات در حضور لینالول نسبت به عدم حضور کاهش یافت.

جدول شماره 4: اثر لینالول بر تشکیل محصولات ابتدایی (آلبومین گلیکه)، میانی (متیل‌گلی‌اوکسال) و نهایی گلیکه (AGEs) محصولات نهایی گلیکه پیشرفته) آلبومین موش صحرایی در شرایط *in vitro*

لوله آزمایش	پارامتر		
	آلبومین گلیکه (میکرومول بر لیتر)	متیل گلی‌اوکسال (میکرومول بر لیتر)	محصولات نهایی گلیکه پیشرفته (واحد قراردادی)
آلبومین	133/35 ± 2/08	3/41 ± 0/12	47/39 ± 1/06
آلبومین + گلوکز	1106/82 ± 6/31	12/07 ± 0/34	503/01 ± 5/07
آلبومین + گلوکز لینالول	359/21 ± 3/07	7/63 ± 0/22	389/62 ± 3/72

بحث

در این مطالعه اثر لینالول برمحصولات مختلف گلیکه، استرس اکسیداتیو، التهاب و فعالیت سیستم گلی‌اوکسیلاز در موش‌های دیابتی نوع دو بررسی شد. لینالول با افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و کاهش شاخص‌های گلیکه، استرس اکسیداتیو و التهابی و همچنین بهبود متابولیسم گلوکز و لیپید خطر بروز و گسترش اختلالات عروقی دیابت را کاهش داد. افزایش قند خون، مقاومت انسولین، شاخص‌های گلیکه، استرس اکسیدایتو و التهابی و کاهش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و همچنین افزایش شاخص آتروژنی، منجر به آتروسکلروز و نفروپاتی دیابتی می‌گردد(3،1). میزان گلوکز سرم و شاخص مقاومت انسولین در موش‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش بارزی داشت (جدول شماره 1). لینالول با کاهش گلوکز و شاخص مقاومت انسولین بهمراه افزایش انسولین در گروه دیابتی نسبت به گروه دیابتی بدون تیمار اثرات مفید خود را بر متابولیسم گلوکز و عمکرد انسولین نشان داد($P<0/001$). محصولات مختلف گلیکه، استرس اکسیداتیو و سایتوکاین‌های التهابی در اختلال عملکردی سلول‌های بتا پانکراس و ایجاد مقاومت انسولین نقش دارند. افزایش اینترلوکین-1β منجر به آپاپتوز سلول‌های بتا-پانکراس و اختلال در ترشح انسولین می‌گردد(19). این سایتوکین همچنین با تشدید استرس اکسیداتیو بیان ژن سوبسترای رسپتور انسولین -1 (IRS-1) و انتقال ناقل گلوکز نوع چهار (GLUT-4) را به غشا پلاسمایی می‌کاهد و منجر به اختلال در انتقال گلوکز و لیپوژنز می‌گردد(20). میزان IL-1β0 (تصویر شماره 1) در گروه‌های دیابتی دریافت کننده لینالول نسبت به گروه مشابه بدون تیمار پایین‌تر بود ($P<0/001$).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کنترل قند خون تنها توان پیشگیری از بروز اختلالات عروقی کوچک را دارد(22،21). تشکیل و تجمع AGEs در بیماران دیابتی حتی با کنترل قند خون افزایش می‌یابد و از طرفی AGEs برای مدت‌های طولانی در بافت‌های بیماران دیابتی می‌ماند و منجر به اختلال در ترشح انسولین، مقاومت انسولین و بروز اختلالات دیابتی می‌گردد(23). تیمار بر میزان آلبومین گلیکه، متیل‌گلی‌اوکسال و AGEs در موش‌های دیابتی اثر کاهنده داشت (جدول شماره 2). مشابه این نتایج در شرایط *in vitro* (جدول شماره 4) در مطالعه ما یافت شد که تاییدکننده اثر ضدگلیکه لینالول بر تشکیل محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیکه می‌باشد. با توجه به اثر افزاینده تولید رادیکال‌های آزاد به وسیله محصولات مختلف گلیکه و IL-1β، مقادیر شاخص‌های استرس اکسیدایتو شامل محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین‌ها و مالون‌دی‌آلدئید در گروه دیابتی بیش‌تر از گروه کنترل بود. از طرفی تیمار در پی کاهش شاخص های گلیکه و التهابی میزان شاخص‌های استرس اکسیداتیو را نیز در گروه‌های دیابتی کاهش داد. با توجه به این‌که سلول‌های بتا-پانکراس در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر هستند و تیمار با کاهش استرس اکسیداتیو بر این سلول‌ها اثر محافظتی نشان داد، احتمالاً این تیمار با کاهش منابع تولیدکننده رادیکال‌های آزاد و افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پرکسیداز اثر آنتی‌اکسیدانتی خود را ایفا می‌نماید(24).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

تاکنون اثر لینالول بر گلوکز خون، انسولین و شاخص مقاومت انسولین در موش‌های دیابتی نوع دو گزارش نشده است و تنها اثرکاهنده آن بر گلوکز بواسطه افزایش ترشح انسولین در موش‌های دیابتی نوع یک و اثر مهاری آن بر گلیکه شدن آلبومین در شرایط *in vitro* گزارش شده است(6). در این مطالعه برای نخستین بار اثر افزاینده لینالول بر فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و اثر کاهنده آن بر تشکیل محصولات مختلف گلیکه درموش‌های دیابتی نوع دو و شرایط *in vitro* بیان شد. به نظر می‌رسد، لینالول با کاستن محصولات گلیکه، استرس اکسیدایتو و روندهای التهابی بهمراه افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 منجر به کاهش قندخون و مقاومت انسولین می‌شود.

کاهش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 (مهم‌ترین عامل در افزایش AGEs) و افزایش IL-1β مهمترین عوامل در بروز آتروسکلروز و نفروپاتی دیابتی هستند و افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و کاهش IL-1β به عنوان اهداف درمانی اختلالات دیابتی اخیراً مورد توجه قرار گرفته است(25-27). لینالول با افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و کاهش IL-1β، بهبود متابولیسم گلوکز و لیپید (جدول شماره 1) و کاهش شاخص‌های گلیکه و استرس اکسیداتیو (جدول شماره 2) اثر مفید خود را در کاهش خطر بروز اختلالات عروقی نشان داد. میزان شاخص آتروژنی و LDL اکسیده (جدول شماره 2) در پی القای دیابت نوع دو در موش‌ها افزایش یافت ولی تیمار با کاهش آن‌ها اثر پیشگیرنده خود را برابر آتروسکلروز نشان داد. شاخص‌های اختلال عملکردی کلیوی شامل کراتینین سرم و دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته در گروه دیابتی تحت تیمار با لینالول کم‌تر از گروه دیابتی بدون تیمار بود که بیانگر اثر حفاظتی آن برابر نفروپاتی دیابتی است ($P<0/001$). افزایش فاکتور تغییردهنده رشد- بتا یک (TGF-β1) در پی افزایش شاخص‌های گلیکه، استرس اکسیداتیو و التهابی مهم‌ترین عامل در بروز نفروپاتی دیابتی است(1،28) و لینالول با کاهش شاخص‌های ذکر شده توان کاهش خطر بروز نفروپاتی دیابتی را دارد. اثر کاهنده لینالول بر کلسترول و تری‌گلیسرید و کاهش اختلال عملکرد کلیوی در موش‌های دیابتی نوع یک(29،30) و اثر ضد التهابی آن در موش‌های در معرض اندوتوکسین(31) قبلاً گزارش شده است.

در این مطالعه بین فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 و مقادیر شاخص مقاومت انسولین، LDL اکسیده، شاخص آتروژنی، دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته و اینترلوکین-1β ضریب همبستگی منفی و همچنین ضریب همبستگی چندگانه بالایی مشاهده گردید (جدول شماره 3)، که بیانگر توان پیشگیری از مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نفروپاتی دیابتی و التهاب با افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 در بیماران دیابتی است و با فعالیت این آنزیم با بروز مقاومت انسولین، اختلالات عروقی دیابت و التهاب رابطه معکوس دارد ($P<0/005$).

لینالول با افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1، داشتن ویژگی‌های ضد گلیکه، آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی همچنین اثر مفید بر متابولیسم قند و لیپید به نظر می‌رسد توان کاهش خطر بروز اختلالات عروقی دیابت را داشته باشد. افزایش فعالیت گلی‌اوکسیلاز-1 منجر به کاهش مقاومت انسولین، التهاب و خطر بروز آتروسکلروز و نفروپاتی دیابتی می‌گردد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پرشکی اردبیل جهت همکاری در اجرای این مطالعه سپاسگزاریم.

References

1. Mahdavifard S, Nakhjavani M. Effect of Cysteine on Transforming Growth Factor β1 as the Main Cause of Renal Disorder in a Rat Model of Diabetic Nephropathy. J Mazandaran Univ Med Sci. 2019; 29(180):95-101.
2. Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, Medic S,

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

Sabale M, Rowles J ,et al. Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity between insulin resistance, obesity, and Alzheimer's disease. Mediators Inflamm 2015; 2015: 105828.

3. Mahdavifard S, Nakhjavani M. Effect of Glutamine on Oxidative Stress, Inflammatory, and Glycation Markers, and the Activity of Glyoxalase System in Diabetic Rats with Atherosclerosis. J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28(170): 33-42.
4. Nigro C, Leone A, Raciti GA, Longo M, Mirra P, Formisano P, et al. Methylglyoxal-Glyoxalase 1 Balance: The Root of Vascular Damage. Int J Mol Sci. 2017;18(1):188-202.
5. Mahdavifard S, Nakhjavani M. Effect of Cysteine on Transforming Growth Factor β1 as the Main Cause of Renal Disorder in a Rat Model of Diabetic Nephropathy. J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(180): 95-101.
6. Deepa B, Venkatraman Anuradha C. Linalool a plant detived monoterpene alochol, rescues kidney from diabetes-induced nephropathic changes via glucose reduction. Diabetol Croat 2011; 40(4): 121-137.
7. Deepa B, Venkatraman Anuradha C. Effects of linalool on inflammation ,matrix accumulation and podocyte loss in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Toxicol Mech Methods 2013; 23(4): 223-234.
8. Deepa B1 VAC. Effects of linalool on inflammation, matrix accumulation and podocyte loss in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Toxicol Mech Methods 2013; 23(4):223-234.
9. Ravizza R GM, Molteni R, Monti E. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. Oncol Rep 2008; 20: 625-630.
10. Shahangian S, Brown P, Ash K. Turbidimetric measurement of total urinary proteins: a revised method. Am J Clin Pathol 1984; 81(5): 651-654.
11. Xu YJ, Wu XQ, Liu W, Lin XH, Chen JW, He R. A convenient assay of glycoserum by nitroblue tetrazolium with iodoacetamide. Clin Chim Acta 2002; 325(1-2): 127-131.
12. Deng Y, Yu PH. Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications. J Chromatogr Sci 1999; 37(9): 317-322
13. Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. Physiol Res 2002; 51(6): 597-604.
14. Mahdavifard S, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Taghikhani M. The synergistic effect of antiglycating agents (MB-92) on inhibition of protein glycation, misfolding and diabetic complications in diabetic-atherosclerotic rat. Eur J Med Chem 2016; 121: 892-902.
15. Mahdavifard S, Bathaie S, Nakhjavani M, Heidarzadeh H. L-cysteine is a potent inhibitor of protein glycation on both albumin and LDL, and prevents the diabetic complications in diabetic–atherosclerotic rat. Food Res Int 2014; 62: 909-916.
16. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med 1992; 13(4): 341-390.
17. Sharma K. Effect of radiation on glyoxalase I and glyoxalase II activities in spleen and liver of mice. Int J Radiat Biol 1993; 63(2): 233-238.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:33 +0430 on Sunday July 5th 2020

18. Patel R, Dwivedi M, Mansuri MS, Ansarullah, Laddha NC, Thakker A, et al. Association of Neuropeptide-Y (NPY) and Interleukin-1beta (IL1B), Genotype-Phenotype Correlation and Plasma Lipids with Type-II Diabetes. PLoS One 2016; 11(10): 164437.
19. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through downregulation of insulin receptor substrate-1 expression. Endocrinology 2007; 148(1): 241-251.
20. Casanova F AD, Adams F, Gooding KM, Looker HC, Aizawa K, et al. The impact of cardiovascular co-morbidities and duration of diabetes on the association between microvascular function and glycaemic control. Cardiovasc Diabetol 2017; 16: 114.
21. Holman RR PS, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. . N Engl J Med 2008; 359(15): 577-589.
22. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. Biomolecules 2015; 5(1): 194-222.
23. Kaur T, Kaul S, Bhardwaj A. Efficacy of linalool to ameliorate uremia induced vascular calcification in wistar rats. Phytomedicine 2018; 51: 191-195.
24. Peiró C, Lorenzo Ó, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF. IL-1β Inhibition in Cardiovascular Complications Associated to Diabetes Mellitus. Front Pharmacol 2017; 8: 363
25. Buraczynska M KK, Wacinski P, Zaluska W. Interleukin-1β Gene (IL1B) Polymorphism and Risk of Developing Diabetic Nephropathy. Immunol Invest 2019; 48(6): 1-8.
26. Rabbani N TP. Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. Antioxid Redox Signal 2019; 30(3): 354-374.
27. Gomes KB RK, Fernandes AP. The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Nephropathy. In J of Med Gen 2014: 180270
28. Deepa B, Anuradha CV. Linalool, a plant derived monoterpene alcohol, rescues kidney from diabetes-induced nephropathic changes via blood glucose reduction. Diabetol Croat 2011; 40(4): 121-137.
29. Deepa B, Venkatraman Anuradha C. Effects of linalool on inflammation, matrix accumulation and podocyte loss in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Toxicol Mech Methods 2013; 23(4): 223-234.
30. Lee S C, Wang S Y, Li C C, Liu C T. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde and linalool f. J Food Drug Anal rom the leaf essential oil of Cinnamomum osmophloeum Kanehira in endotoxin-induced mice 2018; 26(1): 211-220.