

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

Sina Mahdavi¹,
Manochehr Nakhjavani²

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-1 β) 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 Mahdavi¹ - Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
(E-mail: zfotoukian@gmail.com)

اثر لینالول بر فعالیت آنزیم گلی اوکسیلاز-1¹ و شاخص های مختلف گلیکیم در موش های دیابتی نوع دو

سینا مهدوی فرد¹

منوچهر نخبجوانی²

چکیده

سابقه و هدف: افزایش قندخون با کاهش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و افزایش شاخص های گلیکیم، 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 مدل های حیوانی دیابت، هدف از این مطالعه بررسی اثر لینالول بر فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و شاخص های مختلف گلیکیم، استرس اکسیداتیو و التهابی در موش های دیابتی نوع دو است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، دیابت نوع دو در موش ها به وسیله ترکیب نیکوتینامید و استرپتوزوسین (210 mg/kg) القا شد. گروه های تحت مطالعه (10 موش در هر گروه) شامل گروه های کنترل، دیابتی بدون تیمار و دیابتی تحت تیمار لینالول بودند. گروه دیابتی تحت تیمار، روزانه به مدت دوماه از طریق گاواژ به میزان 25 mg/kg لینالول دریافت کردند. قندخون ناشتا، شاخص مقاومت انسولین، پروفایل لیپیدی، فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و شاخص های گلیکیم (آلبومین گلیکیم، متیل گلی اوکسال و ترکیبات نهایی گلیکیم پیشرفته)، استرس اکسیداتیو (محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین ها، مالون دی آلدئید و LDL اکسیده) و التهابی (اینتروکین - 1β) و همچنین شاخص های اختلال عملکردی کلیوی (کراتینین سرم و دفع پروتئین ادرار 24 ساعته) اندازه گیری شدند.

یافته ها: تیمار بر میزان قند ناشتای سرم، مقاومت انسولین، اختلالات لیپیدی، شاخص های گلیکیم، استرس اکسیداتیو و التهابی و همچنین شاخص های اختلال عملکرد کلیوی موش های دیابتی اثر کاهنده و بر فعالیت گلی اوکسیلاز-1 اثر افزایش دهنده داشت ($P < 0/001$).

استنتاج: لینالول با افزایش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و ویژگی های آنتی اکسیدانتی، ضد گلیکیم 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، آنتی اکسیدانت ها

مقدمه

دیابت نوع دو یکی از شایع ترین بیماری ها در سراسر جهان است و بزودی به یکی از بزرگ ترین چالش های بهداشتی و اقتصادی تبدیل می شود. این بیماری به علت اختلال در ترشح و یا عملکرد انسولین ایجاد می شود. مقاومت به انسولین و اختلالات عروقی دیابت نوع دو نقش دارند (1،2).

E-mail: fard635@gmail.com

مؤلف مسئول: سینا مهدوی فرد - اردبیل: انتهای خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، گروه یوشیمی بالینی

1. استادیار، گروه یوشیمی 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

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 170 ± 15 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 سترات با pH برابر 4/5) به ترتیب به میزان 210 و 55 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، انجام شد. سه روز پس از القای دیابت، میزان قندخون موش‌ها اندازه‌گیری گردید و مواردی که قند بالای 200 میلی گرم بر دسی لیتر 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 میلی گرم لینالول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در نیم میلی لیتر دی‌متیل سولفوکساید 0/01 درصد از طریق گاواژ قرار گرفتند. گروه کنترل و دیابتی بدون تیمار تنها نیم میلی لیتر دی‌متیل سولفوکساید 0/01 درصد در مدت مطالعه دریافت کردند. انتخاب دوز تیمار براساس اثر آنتی اکسیدانتی 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.

علاوه بر این ترکیبات ابتدایی، میانی و نهایی گلیک باعث تشدید استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شوند (3). ایجاد محصولات گلیک در پی افزایش قند خون و ترکیبات دی کربونیل مانند متیل گلی اوکسال در افراد دیابتی به میزان چندین برابر افراد سالم افزایش می‌یابد. سیستم گلی اوکسیلاز شامل آنزیم‌های گلی اوکسیلاز-1 و گلی اوکسیلاز-2 با تجزیه ترکیبات دی کربونیل مهم‌ترین اثر را در کاهش تولید محصولات نهایی گلیک پیشرفته (AGEs) دارد. گلی اوکسیلاز-1 مرحله محدود کننده خنثی سازی ترکیبات دی کربونیل را کاتالیز می‌نماید (4). اخیراً استفاده از ترکیباتی که بر فعالیت گلی اوکسیلاز-1 اثر افزایش دهنده و یا بر تشکیل محصولات مختلف گلیک 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 آنتی اکسیدانتی 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 آنتی اکسیدانتی لینالول با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی در موش‌های مدل کلسیفه شدن عروقی مشاهده گردید (5). تاکنون اثر لینالول بر فعالیت آنزیم گلی اوکسیلاز-1 و میزان محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیک در بیماران دیابتی نوع دو و یا مدل‌های حیوانی دیابت گزارش نشده است. بنابراین، هدف ما از این مطالعه بررسی اثر لینالول بر فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و شاخص‌های مختلف گلیک، استرس اکسیداتیو و التهابی در موش‌های دیابتی نوع دو است.

مواد و روش‌ها

اسپرئوزوتوسین، نیکوتینامید، لینالول، گلوکز،

نمونه خون از قلب موش‌ها پس از 16 ساعت ناشتایی در پی بیهوشی با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین (90 و 10 میلی گرم 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 تری کلرو 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 گلیکته

غلظت آلبومین گلیکته براساس احیا ماده نیتروبلو تترازولیوم و خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج 540 نانومتر تعیین گردید (11). برای سنجش آلبومین گلیکته، 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 نیتروبلو تترازولیوم 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 گلیکته در نمونه تعیین گردید. محصولات

میانی گلیکته مانند متیل‌گلی‌اوکسال با روش HPLC فاز معکوس و قرائت جذب در در طول موج 360 نانومتر اندازه‌گیری شد (12). جهت سنجش متیل‌گلی‌اوکسال، میزان مشتقات دی‌نیترو فیل هیدرازین 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 گلیکته در مطالعات قبلی ما بیان شده است (14، 15).

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 طول موج 340 نانومتر قرائت گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از تیوباریتوریک 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 (14، 15). فاکتور التهابی اینترلوکین 1β

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

فعالیت آنزیم گلی اوکسیلاز-1

فعالیت آنزیم گلی اوکسیلاز-1 در همولیزیت گلبول های قرمز براساس تشکیل لاکتونیل گلوکاتیون و خواندن میزان جذب در طول موج 240 نانومتر اندازه گیری شد (18). به 1 میلی لیتر معرف واکنش (بافر فسفات 100 میلی مولار با pH برابر 7/2، گلوکاتانیون 1/7 میلی مولار، سولفات منیزیم 16 میلی مولار و متیل گلی اوکسال 3/5 میلی مولار) 20 میکرولیتر همولیزیت اضافه شد و جذب آن پس از دو دقیقه در طول موج 240 نانومتر خوانده شد. نحوه سنجش آنزیم های گلی اوکسیلاز در مطالعه قبلی ما بیان شده است (15).

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

آلبومین از سرم با استفاده از تری کلرو استیک اسید و اتانول استخراج گردید (14، 15). 5 میلی لیتر بافر فسفات 100 میلی مولار با pH برابر 7/4 حاوی آلبومین (10 میلی گرم بر میلی لیتر) و سدیم آزاید (0/1 میلی مول بر لیتر) در سه لوله آزمایش ریخته شد. لوله اول: آلبومین، لوله دوم: آلبومین + گلوکز (50 میلی مولار)، لوله سوم: آلبومین + گلوکز + لینالول (25 میلی گرم بر لیتر). لوله ها بمدت سه ماه در دمای 37 درجه نگهداری شد و بترتیب پس از سه هفته و سه ماه، نمونه جهت سنجش آلبومین گلیک و متیل گلی اوکسال و در پایان جهت سنجش AGEs برداشته شد و براساس روش های سنجش محصولات گلیک در قسمت مطالعه *in vivo* میزان آن ها اندازه گیری گردید.

تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (mean $\pm$ SD) ارائه شد. از نرم افزار SPSS16 و آزمون تحلیل واریانس چند گانه یا چند متغیری (MANOVA-Tukey) که یک روش یک طرفه درون

گروهی برای مقایسه چند متغیر است و از همبستگی چند گانه و ضریب همبستگی به ترتیب برای تعیین قدرت پیش بینی مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نفروپاتی دیابتی و التهاب براساس فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و جهت تعیین ضریب همبستگی بین فعالیت گلی اوکسیلاز-1 با مقایر شاخص مقاومت انسولین، LDL اکسیده، شاخص آتروژنی، دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته و اینترلوکین- β 1 استفاده گردید. $P < 0/05$ برای تمام سنجش ها معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر لینالول بر مقادیر قندخون ناشتا، انسولین، شاخص مقاومت انسولین (HOMA)، پروفایل لیپیدی شامل تری گلیسرید، کلسترول تام، HDL، LDL و شاخص آتروژنی و همچنین شاخص های اختلال عملکردی کلیوی شامل کراتینین سرم و دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته در گروه های 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 موش های 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 شاخص های اختلال عملکردی کلیوی در گروه های کنترل و دیابتی

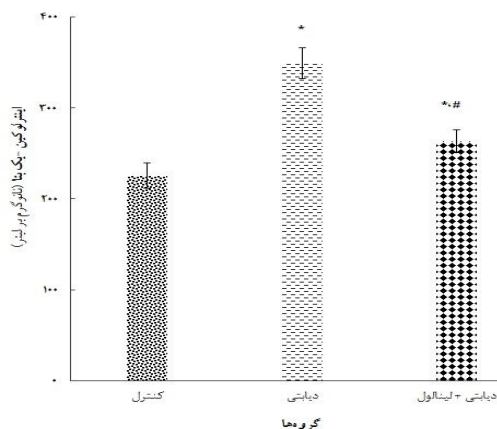
پارامتر	گروه			معنی داری
	کنترل	دیابتی	دیابتی + لینالول	
گلوکز ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	86/35 $\pm$ 6/28	284/07 $\pm$ 16/12*	148/63 $\pm$ 10/76*#	0/001
انسولین (میکرو واحد بر میلی لیتر)	18/51 $\pm$ 1/25	8/23 $\pm$ 0/43*	12/81 $\pm$ 0/76*#	0/001
شاخص مقاومت انسولین	3/94 $\pm$ 0/31	5/77 $\pm$ 0/61*	4/70 $\pm$ 0/61*#	0/001
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	83/05 $\pm$ 4/37	232/40 $\pm$ 14/12*	122/40 $\pm$ 6/63*#	0/001
کلسترول تام (میلی گرم بر دسی لیتر)	88/19 $\pm$ 5/73	172/65 $\pm$ 9/91*	105/01 $\pm$ 8/45*#	0/001
HDL (میلی گرم بر دسی لیتر)	54/07 $\pm$ 4/67	23/76 $\pm$ 2/27*	42/57 $\pm$ 2/27*#	0/001
LDL (میلی گرم بر دسی لیتر)	17/51 $\pm$ 1/09	102/41 $\pm$ 7/42*	37/96 $\pm$ 3/62*#	0/001
شاخص آتروژنی	0/32 $\pm$ 0/03	4/31 $\pm$ 0/42*	0/89 $\pm$ 0/07*#	0/001
کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر)	0/67 $\pm$ 0/06	1/33 $\pm$ 0/12*	0/81 $\pm$ 0/12*#	0/001
دفع ادراری پروتئین (میلی گرم بر دسی لیتر)	14/66 $\pm$ 1/60	319/37 $\pm$ 18/70*	174/17 $\pm$ 9/38*#	0/001

*: نمایانگر تفاوت معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/001$)

#: نمایانگر تفاوت معنی دار با گروه دیابتی ($P < 0/001$)

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

معکوس بین فعالیت گلی اوکسیلاز و مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نفروپاتی و التهاب است ($P < 0/005$). میزان ضریب همبستگی بین فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و سایر پارامترها برابر 0/892 است که نشان دهنده توان پیش‌بینی فعالیت گلی اوکسیلاز-1 در مورد بروز مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نفروپاتی دیابتی و التهاب است ($P < 0/005$).



نمودار شماره 1: غلظت سرمی اینترلوکین-1 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 گلی اوکسیلاز-1 و شاخص مقاومت انسولین، LDL اکسیده، شاخص آتروژنی و اینترلوکین-1β

پارامتر	میزان ضریب همبستگی (r)	سطح معنی‌داری
شاخص مقاومت انسولین	-0/797	0/005
LDL اکسیده	-0/805	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 گلیکته)، میانی (متیل‌گلی اوکسال) و نهایی گلیکته (محصولات نهایی گلیکته پیشرفته) آلبومین موش صحرایی در شرایط *in vitro* اثر تیمار بر تشکیل محصولات مختلف گلیکته از آلبومین سرم موشی در شرایط *in vitro* در جدول شماره 4

مقایسه غلظت محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیکته (به ترتیب آلبومین گلیکته، متیل‌گلی اوکسال و AGEs) و شاخص‌های استرس اکسیداتیو (محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین‌ها، مالون‌دی‌آلدئید و LDL اکسیده) و همچنین فعالیت گلی اوکسیلاز-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 گلیکته و استرس اکسیداتیو اثر کاهنده و همچنین بر فعالیت آنزیم گلی اوکسیلاز-1 نسبت به گروه دیابتی بدون تیمار اثر افزایش‌دهنده داشت ($P < 0/001$).

جدول شماره 2: مقایسه غلظت شاخص‌های گلیکته، استرس اکسیداتیو و التهابی و همچنین فعالیت گلی اوکسیلاز-1 در گروه‌های کنترل و دیابتی

پارامتر	کنترل	دیابتی	دیابتی + لینالول	سطح معنی‌داری
آلبومین گلیکته (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	86/35 ± 6/28	284/07 ± 16/12*	148/63 ± 10/76*#	0/001
متیل‌گلی اوکسال (میکرومول بر لیتر)	13/17 ± 0/51	50/62 ± 0/61*	26/32 ± 0/32	0/001
محصولات نهایی گلیکته پیشرفته (واحد)	79/05 ± 3/87	250/40 ± 15/12*	173/63 ± 9/12*	0/001
فرارادی				
پروتئین‌های اکسیده (میکرومول بر لیتر)	26/85 ± 2/79	73/41 ± 5/81*	42/66 ± 4/01*	0/001
مالون‌دی‌آلدئید (میکرومول بر لیتر)	13/19 ± 5/73	117/65 ± 7/62*	51/74 ± 4/91*	0/001
LDL اکسیده (واحد فرارادی)	215/43 ± 13/05	527/21 ± 34/72*	309/64 ± 18/19*	0/001
گلی اوکسیلاز-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-1β در گروه‌های کنترل، دیابتی بدون تیمار و تحت تیمار با لینالول در نمودار شماره 1 نشان داده شده است. میزان اینترلوکین-1 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 گلی اوکسیلاز-1 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 گلی اوکسیلاز-1 و سایر پارامترها ضریب همبستگی منفی بالایی در این مطالعه مشاهده شد که نشانگر رابطه

نمایان است. میزان آلبومین گلیک، متیل گلی اوکسال 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 گلیک)، میانی (متیل گلی اوکسال) و نهایی گلیک (AGEs) محصولات نهایی گلیک پیشرفته) آلبومین موش صحرایی در شرایط *in vitro*

پارامتر	آلبومین گلیک (میکرومول بر لیتر)	متیل گلی اوکسال (میکرومول بر لیتر)	محصولات نهایی گلیک 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 بر محصولات مختلف گلیک، استرس اکسیداتیو، التهاب و فعالیت سیستم گلی اوکسیلاز در موش های دیابتی نوع دو بررسی شد. لینالول با افزایش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و کاهش شاخص های گلیک، 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، شاخص های گلیک، استرس اکسیداتیو و التهابی و کاهش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و همچنین افزایش شاخص آتروژنی، منجر به آتروسکلروز و نفروپاتی دیابتی می گردد (31). میزان گلوکز سرم و شاخص مقاومت انسولین در موش های دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش بارزی داشت (جدول شماره 1). لینالول با کاهش گلوکز و شاخص مقاومت انسولین به همراه افزایش انسولین در گروه دیابتی نسبت به گروه دیابتی بدون تیمار اثرات مفید خود را بر متابولیسم گلوکز و عملکرد انسولین نشان داد (P<0/001). محصولات مختلف گلیک، استرس اکسیداتیو و سایتو کاین های التهابی در اختلال عملکردی سلول های بتا پانکراس و ایجاد مقاومت انسولین نقش دارند. افزایش اینترلوکین-1β منجر به آپاپتوز سلول های

بتا-پانکراس و اختلال در ترشح انسولین می گردد (19). این سایتو کین همچنین با تشدید استرس اکسیداتیو بیان ژن سوپسترای رسپتور انسولین-1 (IRS-1) و انتقال ناقل گلوکز نوع چهار (GLUT-4) را به غشا پلاسمایی می کاهد و منجر به اختلال در انتقال گلوکز و لیپوژن می گردد (20). میزان IL-1β (تصویر شماره 1) در گروه های دیابتی دریافت کننده لینالول نسبت به گروه مشابه بدون تیمار پایین تر بود (P<0/001).

شواهدی وجود دارد که نشان می دهد کنترل قند خون تنها توان پیشگیری از بروز اختلالات عروقی کوچک را دارد (21،22). تشکیل و تجمع AGEs در بیماران دیابتی حتی با کنترل قند خون افزایش می یابد و از طرفی AGEs برای مدت های طولانی در بافت های بیماران دیابتی می ماند و منجر به اختلال در ترشح انسولین، مقاومت انسولین و بروز اختلالات دیابتی می گردد (23). تیمار بر میزان آلبومین گلیک، متیل گلی اوکسال و AGEs در موش های دیابتی اثر کاهنده داشت (جدول شماره 2). مشابه این نتایج در شرایط *in vitro* (جدول شماره 4) در مطالعه ما یافت شد که تایید کننده اثر ضد گلیک لینالول بر تشکیل محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیک می باشد. با توجه به اثر افزایش تولید رادیکال های آزاد به وسیله محصولات مختلف گلیک و IL-1β، مقادیر شاخص های استرس اکسیداتیو شامل محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین ها و مالون دی آلدئید در گروه دیابتی بیش تر از گروه کنترل بود. از طرفی تیمار در پی کاهش شاخص های گلیک و التهابی میزان شاخص های استرس اکسیداتیو را نیز در گروه های دیابتی کاهش داد. با توجه به این که سلول های بتا-پانکراس در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر هستند و تیمار با کاهش استرس اکسیداتیو بر این سلول ها اثر محافظتی نشان داد، احتمالاً این تیمار با کاهش منابع تولید کننده رادیکال های آزاد و افزایش بیان ژن آنزیم های آنتی اکسیداتیو مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلو تاتیون پرکسیداز اثر آنتی اکسیداتی خود را ایفا می نماید (24).

یک (TGF- β 1) در پی افزایش شاخص‌های گلیک، استرس اکسیداتیو و التهابی مهم‌ترین عامل در بروز نروپاتی دیابتی است (28،1) و لینالول با کاهش شاخص‌های ذکر شده توان کاهش خطر بروز نروپاتی 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 گلی اوکسیلاز-1 و مقادیر شاخص مقاومت انسولین، LDL اکسیده، شاخص آتروژنی، دفع پروتئینی ادرار 24 ساعته و اینترلوکین-1 β ضریب همبستگی منفی و همچنین ضریب همبستگی چندگانه بالایی مشاهده گردید (جدول شماره 3)، که بیانگر توان پیشگیری از مقاومت انسولین، آتروسکلروز، نروپاتی دیابتی و التهاب با افزایش فعالیت گلی اوکسیلاز-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 گلی اوکسیلاز-1، داشتن ویژگی‌های ضد گلیک، آنتی‌اکسیداتی 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 گلی اوکسیلاز-1 منجر به کاهش مقاومت انسولین، التهاب و خطر بروز آتروسکلروز و نروپاتی دیابتی می‌گردد.

سپاسگزاری

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

تاکنون اثر لینالول بر گلوکز خون، انسولین و شاخص مقاومت انسولین در موش‌های دیابتی نوع دو گزارش شده است و تنها اثر کاهنده آن بر گلوکز بواسطه افزایش ترشح انسولین در موش‌های دیابتی نوع یک و اثر مهارتی آن بر گلیک شدن آلبومین در شرایط *in vitro* گزارش شده است (6). در این مطالعه برای نخستین بار اثر افزایش لینالول بر فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و اثر کاهنده آن بر تشکیل محصولات مختلف گلیک در موش‌های دیابتی نوع دو و شرایط *in vitro* بیان شد. به نظر می‌رسد، لینالول با کاستن محصولات گلیک، استرس اکسیداتیو و روندهای التهابی به همراه افزایش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 منجر به کاهش قند خون و مقاومت انسولین می‌شود.

کاهش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 (مهم‌ترین عامل در افزایش AGEs) و افزایش IL-1 β مهمترین عوامل در بروز آتروسکلروز و نروپاتی دیابتی هستند و افزایش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و کاهش IL-1 β به عنوان اهداف درمانی اختلالات دیابتی اخیراً مورد توجه قرار گرفته است (25-27). لینالول با افزایش فعالیت گلی اوکسیلاز-1 و کاهش IL-1 β ، بهبود متابولیسم گلوکز و لیپید (جدول شماره 1) و کاهش شاخص‌های گلیک 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 نروپاتی دیابتی است ($P<0/001$). افزایش فاکتور تغییردهنده رشد - بتا

References

1. Mahdavi S, Nakhjavani M. Effect of Cysteine on Transforming Growth Factor β 1 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,

- 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. Mahdavi 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. Mahdavi S, Nakhjavani M. Effect of Cysteine on Transforming Growth Factor β 1 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 derived monoterpene alcohol, 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 B, 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. Mahdavi 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. Mahdavi 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.

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-1 β Inhibition in Cardiovascular Complications Associated to Diabetes Mellitus. Front Pharmacol 2017; 8: 363
25. Buraczynska M KK, Wacinski P, Zaluska W. Interleukin-1 β 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.