

اثر زردچوبه، هل و زنجبیل بر روی واکنش گلیکة شدن آلبومین بصورت In vitro

دکتر نسرين شيخ*، محمدرضا صفری**، مهندس خسرو مانی کاشانی***، دکتر ملیحه عراقچیان****
دکتر فاطمه زراعتی****، دکتر سیدمنصور ملکوتی*****

چکیده:

دیابت ملیتوس یکی از شایعترین بیماریها در جوامع بشری است که مقابله با عوارض ناشی از آن هزینه هنگفتی را به سیستم درمانی تحمیل می نماید. مهمترین و شاخص ترین علامت کلینیکی آن افزایش قند خون می باشد که منجر به گلیکة شدن پروتئینهای مختلف بدن می گردد که این امر باعث تغییر ماهیت، ساختمان و عملکرد بیوشیمیایی آنها می شود. یکی از راههای احتمالی درمان دیابت ملیتوس، کاهش یا مهار این واکنش است. بنظر می رسد که استفاده از افزودنیهای غذایی مانند زردچوبه، هل و زنجبیل در این راه مفید و موثر باشد. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر ترکیبات فوق بر روی واکنش گلیکة شدن آلبومین بصورت in vitro می باشد. بدین منظور در حضور غلظتهای مختلف هریک از این ترکیبات، واکنش گلیکة شدن آلبومین بصورت in vitro انجام شد و با روش تیوباربیتوریک اسید مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که افزودنیهای مورد مطالعه در غلظتهای سه گانه ۱ g/dl، ۰/۲ g/dl و ۰/۱ g/dl دارای اثر مهاری بر واکنش گلیکة شدن آلبومین می باشند و در این میان، زنجبیل در غلظت ۱ g/dl دارای بیشترین مهار بود (۷۸ درصد). ترتیب اثرات ترکیبات فوق، بدین صورت است: زردچوبه > هل > زنجبیل. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیبات فوق باعث کاهش واکنش گلیکاسیون آلبومین می گردند.

کلید واژه ها: دیابت شیرین / زردچوبه / زنجبیل / گلیکاسیون آلبومین / هل

مقدمه:

می گردد(۱). در نتیجه واکنش گلیکة شدن پروتئینها، ماهیت و ساختمان فضایی آنها تغییر می یابد و فعالیت بیوشیمیایی آنها دچار تغییرات گوناگونی می شود(۲). همین امر باعث بروز بیماریهای مختلفی نظیر آترواسکلروز، رتینوپاتی، نفروپاتی، کاتاراکت و... می گردد(۳). در بسیاری از بافتهای بدن همچون بافت عضلانی، برای

دیابت ملیتوس یکی از شایعترین بیماریها در جوامع بشری است که مقابله با عوارض ناشی از آن، هزینه هنگفتی را به سیستم درمانی تحمیل می نماید. مهمترین و شاخص ترین علامت کلینیکی آن افزایش قند خون می باشد که منجر به گلیکة شدن پروتئینهای مختلف بدن

- * استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** عضو هیأت علمی گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** عضو هیأت علمی گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
***** استادیار گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
***** استادیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

کاربرد دارد همچنین دارای اثرات کاردیوتونیک ، اینوتروپیک ، کاهش فعالیت ترومبوکسان در پلاکتها و مهار کننده پروستاگلاندینها و لکوترین ها است و فعالیت ضدسرطانی ، ضد دردی و ضد میگرنی آن به اثبات رسیده است(۷). هل هم گیاهی است از تیره Zingiberaceae که همانند زنجبیل، برای معطر نمودن اغذیه کاربرد وسیعی دارد. اسانس های موجود در آن دارای اثرات آنتی اسپاسمودیک ، ضد نفخ و ضد ویروس است (۶) .

روش کار:

الف - مواد مورد استفاده: زردچوبه، زنجبیل و هل از شرکتهای گلپر سینا و سحرخیز تهیه گردید و کلیه مواد شیمیایی از شرکت مرک (آلمان) و شرکت سیگما (امریکا) خریداری شد.

ب - روش آزمایش:

۱- انجام واکنش گللیکه شدن آلبومین: به یک میلی لیتر محلول ۵ گرم درصد آلبومین مقدار یک میلی لیتر محلول ۳ گرم درصد گلوکز اضافه شد و جهت جلوگیری از هر نوع آلودگی محیط ، جنتامایسین با غلظت ۲۰mg/۱۰۰ml در بافر فسفات (۰/۱ مولار با pH=۷/۴) اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق جهت انجام انکوباسیون به طور ثابت قرار گرفت و پس از گذشت زمان انکوباسیون در بافر فسفات دیالیز گردید (قبلاً کيسه دیالیز در محلول EDTA ۱۰ μmol آماده گردید).

۲- اندازه گیری میزان گللیکه شدن آلبومین: جهت اثبات واکنش گللیکه شدن آلبومین از تست TBA استفاده شد بدین ترتیب که به مخلوط فوق یک میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ (TCA) افزوده ، سپس به مدت ده دقیقه با سرعت ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ نموده و در نهایت محلول رویی دور ریخته شد . این عمل دو بار انجام گرفت . در ادامه به رسوب فوق یک میلی لیتر بافر فسفات با مشخصات فوق و نیم میلی لیتر اسید اگزالیک ۰/۳ نرمال افزوده و به مدت یکساعت در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن در حرارت آزمایشگاه ، به هر لوله نیم میلی لیتر TCA با غلظت ۴۰٪ اضافه نموده و بعد از سانتریفوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰rpm ، مایع رویی را جدا نموده و به یک میلی لیتر از مایع جدا شده، نیم میلی لیتر محلول TBA ۰/۰۵ مولار اضافه گردید و نیم ساعت در

استفاده از گلوکز نیاز به انسولین می باشد و در دیابت ملیتوس بدلیل کاهش انسولین و یا کاهش حساسیت بافتها به انسولین، جذب گلوکز توسط این بافتها کاهش یافته و غلظت گلوکز خون افزایش می یابد و در نتیجه زمینه برای انجام واکنش گللیکه شدن آلبومین افزایش می یابد(۴). واکنش گللیکه شدن آلبومین در حقیقت اتصال گروه آلدئیدی قند با عوامل آمین آزاد موجود در ساختمان پروتئینی آلبومین است که بصورت آهسته انجام می گیرد. برای تشخیص آلبومین گللیکه شده، راههای مختلفی وجود دارد که یکی از مرسوم ترین آنها، روش تیوباربتوریک اسید (TBA) است. این معرف با محصولات حاصل از واکنش گللیکه شدن آلبومین ترکیب می شود و تولید ماده ای با حداکثر جذب در طول موج ۴۴۳ نانومتر می کند(۵). میزان گللیکه شدن آلبومین به عوامل مختلفی از جمله غلظت گلوکز ، زمان انکوباسیون پروتئین با گلوکز و . . . بستگی دارد. با توجه به اینکه افزایش قند خون منجر به واکنش گللیکه شدن پروتئینها می شود و این امر سبب تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئینها می گردد لزوم مهار واکنش گللیکه شدن پروتئینها ، به شدت احساس می شود. سالهاست که توجه محققین بر روی یافتن ترکیباتی که مانع از گللیکه شدن پروتئین ها گردند بدون اینکه اثرات جانبی نگران کننده ای داشته باشند معطوف گردیده است. به همین منظور ، امروزه توجه خاصی به افزودنیهای غذایی مختلف شده است. این ترکیبات از این جهت قابل توجه هستند که دارای منشاء گیاهی بوده و کاربرد وسیعی در رژیم های غذایی گوناگون دارند. در این مطالعه ، اثرات زردچوبه (Curcuma Longal)، زنجبیل (Zigiber Officinal Rose) ، و هل (Elettaria Cardamamum Maton) بر روی واکنش گللیکه شدن آلبومین بصورت in vitro مورد بررسی قرار گرفته است.

زردچوبه گیاهی است از خانواده Zingiberaceae که ریزوم آن به رنگ زرد و به عنوان رنگ دهنده و مطبوع کننده غذا مورد استفاده قرار می گیرد همچنین عصاره آن دارای اثرات آنتی اکسیدانی ، ضدقارچ ، ضد سرطان ، ضدالتهاب ، و ضد انگل است(۶). زنجبیل نیز گیاهی است از خانواده Zingiberaceae که بدلیل داشتن اسانسهای فرار برای معطر کردن مواد غذایی مختلف

جدول ۱: مقایسه اثرات زردچوبه، زنجبیل و هل در میزان مهار واکنش گلیکته شدن آلبومین بر حسب غلظت های مختلف

هل	زنجبیل	زردچوبه	انواع افزودنیها
۷۴/۸۵±۲/۳۳	۷۷/۵۴±۲/۵۳	۶۶/۵۵±۳/۴۰	درصد میزان مهار واکنش گلیکته شدن در غلظت ۱ gr/dl (Mean±SD)
۵۹/۵۳±۱/۶۵	۶۴/۲۱±۵/۷۴	۴۰/۲۳±۲/۲۸	درصد میزان مهار واکنش گلیکته شدن در غلظت ۰/۲ gr/dl (Mean±SD)
۶۵/۶۱±۰/۴۹	۴۹/۷۰±۴/۹۱	۶۴/۷۹±۲/۹۸	درصد میزان مهار واکنش گلیکته شدن در غلظت ۰/۱ gr/dl (Mean±SD)
$F_{(p,2)}=52/39$ $P=0/000$ (S)*	$F_{(p,2)}=27/44$ $P=0/001$ (S)*	$F_{(p,2)}=75/71$ $P=0/000$ (S)*	P. value

* تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات فوق بر اساس آزمون ANOVA دو طرفه انجام گرفته است.

(n=3)
SD= Standard Deviation

بحث:

در بیماری دیابت، با افزایش قند خون، پروتئینهای بدن به طریقه غیر آنزیماتیک با اتصال به گلوکز به شکل گلیکته درآمده و با گذشت زمان، موجب بروز تظاهرات دیررس دیابتی می گردند. یکی از مهمترین راههای پیشگیری از دیابت، کاهش یا مهار گلیکاسیون پروتئینهاست که در این مطالعه، اثرات غلظتهای مختلف زردچوبه، زنجبیل و هل بر روی واکنش گلیکته شدن آلبومین بصورت *in vitro* مورد مطالعه قرار گرفت. هر سه ترکیب فوق از تیره Zingiberaceae هستند که کم و بیش مورد مصرف اکثریت خانواده ها هستند و با توجه به کاربرد وسیع آنها، مطالعه تأثیرات کلینیکی آنها در بهبود و درمان بیماریها مفید می باشد (۷).

غلظتهای مورد استفاده از این ترکیبات در این پژوهش در حدودی انتخاب گردید که مورد مصرف در رژیم های غذایی باشد. از آنجائیکه، برخی از افزودنیهای غذایی دارای اثرات کاهش دهنده دیابت می باشند اما هنوز بطور دقیق، مکانیسم اثرات آنها مشخص نیست با این فرض، در این مطالعه، تأثیرات احتمالی آنها بر روی روند گلیکته شدن آلبومین مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به تجزیه و تحلیل داده های حاصل در

حرارت ۴۰ درجه در بین ماری قرار گرفت در پایان جذب نمونه در طول موج ۴۴۳ نانومتر اندازه گیری شد (۵).

۳- تهیه محلولهای استوک زنجبیل، زردچوبه و هل: مقدار ۰/۱ گرم از هر یک از ترکیبات مورد بررسی را در ۱۰ ml آب مقطر دو بار تقطیر حل نموده و به مدت یکساعت بر روی شیکر بخوبی مخلوط کرده و در نهایت برای بدست آوردن محلول یکنواخت از کاغذ صافی عبور داده شد.

۴- بررسی تأثیر زردچوبه، هل و زنجبیل بر روی واکنش گلیکته شدن آلبومین: از محلولهای استوک تهیه شده، سه رقت شامل ۱ gr/dl، ۰/۲ gr/dl و ۰/۱ gr/dl تهیه گردید و مقدار ۰/۱ میلی لیتر از غلظتهای مختلف هر یک از ترکیبات شامل یک میلی لیتر محلول آلبومین ۵ درصد و یک میلی لیتر گلوکز ۳ درصد (در محلول جنتامایسین و بافر فسفات) اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در حرارت آزمایشگاه انکوبه گردید. برای تعیین میزان اثر هر یک از غلظتهای مختلف، تست TBA مطابق روش ۲ انجام گرفت. کلیه مراحل آزمایش و هر یک از غلظتها، سه تایی انجام گرفت و جهت بدست آوردن نتایج قابل قبول، آزمایشها تکرار شد.

ج - تجزیه و تحلیل داده ها: تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل براساس تست ANOVA دو طرفه محاسبه گردید.

نتایج:

تأثیر متقابل غلظتهای مختلف نمونه ها در مهار واکنش گلیکته شدن آلبومین: نتایج حاصل از اثرات این ترکیبات در جدول ۱ آمده است. مطابق این جدول، زنجبیل در غلظت ۱ gr/dl دارای بیشترین مهار (۷۷/۵ درصد) بود. همچنین هل در غلظت ۱ gr/dl به میزان قابل توجهی (۷۴/۸ درصد) باعث مهار واکنش گلیکته شدن آلبومین گردید. ترتیب اثرات ترکیبات مورد نظر بر روی واکنش گلیکته شدن آلبومین در غلظتهای ۰/۱، ۰/۲ و ۱ گرم درصد میلی لیتر به صورتهای زیر آمده است:

در غلظت ۰/۱ gr/dl: زنجبیل > زردچوبه > هل
در غلظت ۰/۲ gr/dl: زردچوبه > هل > زنجبیل
در غلظت ۱ gr/dl: زردچوبه > هل > زنجبیل

همچنین نتایج نشان داد که اختلاف در میزان مهار واکنش گلیکته شدن آلبومین در نمونه های مختلف بصورت تابعی از غلظت آنها تغییر می کند.

- and disease of aging. Drug 1996; 9: 69-76.
2. Hunt JV , Skamaraukas JT , Mitchinson MJ. Protein glycation and fluorescent material in human atheroma. *Atherosclerosis* , 1994;111 : 225-31.
 3. Day IF, Ingerbretsen CG, Ingerbretsen WR. Non enzymatic glycosylation of serum proteins and hemoglobin response to change in blood glucose levels in diabetic rats. *Diabetes* 1980; 29: 524-27.
 4. Wolff-Simon P , Dean R. Glucose antioxidation & protein modification: the potential role of antioxidation in diabetes. *Biochem J* 1987; 454: 243-250.
 5. Dolhofer R, Wieland OH. Improvement of the thiobarbituric acid assay for serum glycosylation determination. *Clin Chem Acta* 1981 May ; 112(2): 197-204.
 6. William J , Kelly MS , Ambrose RN. *Nursing herbal medicine handbook*. Pennsylvania : Spring House, 2001, 101-102, 198-200, 210-212, 339-311, 435-436 484T-485T.
 ۷. امین غلامرضا . گیاهان دارویی سنتی ایران . تهران: موسسه پژوهش های گیاهان دارویی ایران. ۱۳۷۰: ۳۱،۳۲،۴۸،۷۳،۱۱۸،۱۲۱،۱۹۵،۱۹۶،۲۰۰،۲۰۷،۲۲۱،۲۲۲.
 8. Merrily A , Kuhn RN , David-Winston AHG. *Herbal therapy & supplements*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 2000: 148-152 , 255-259 , 330-333.
 9. Ebadi M. *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*. Boca Raton: CRP. 2002 :14,36, 135-145, 289-290.

قسمت نتایج ، مشخص گردید که هر سه ترکیب فوق ، دارای اثر مهارى بر واکنش گلیکته شدن آلبومین بصورت *in vitro* بودند. مناسب ترین غلظت آنها ، ۱ g/dl بود که زنجبیل ، هل و زردچوبه بترتیب به میزان ۷۸ ، ۷۵ و ۵۰ درصد باعث مهار گلیکته شدن آلبومین گردیدند. در مطالعات صورت گرفته در سالهای ۲۰۰۰ و ۲۰۰۲ مشخص گردید که زردچوبه همانند انسولین باعث کاهش قند خون شده و خواص گوناگونی نظیر کاهش بیماریهای قلبی عروقی ، ضد سرطانی نیز برای آن گزارش گردیده است (۸،۹). اما در هیچیک از آنها اشاره ای به چگونگی عمل و نحوه مکانیسم این ترکیبات نشده است. این پروژه اولین گام عملی در پی دست یافتن به مکانیسم احتمالی این ترکیبات در کاهش روند بیماری دیابت است . اما با توجه به این نکته که مصرف ترکیبات مورد آزمایش در این پژوهش در انسان از طریق غذا و در نتیجه ورود آنها به بدن از راه دستگاه گوارش صورت میگیرد ممکنست که برخی از نتایج آزمایشات *in vitro* با *in vivo* همخوانی نداشته باشد. علت این امر را می توان به تأثیرات آنزیمهای گوارشی مختلف در دستگاه گوارش بر روی مواد غذایی و این افزودنیها نسبت داد اما هنوز نتیجه قطعی و حتمی در این مورد بدست نیامده است و بنظر می رسد که لازمست این مطالعات بصورت *in vivo* نیز انجام پذیرد. لذا پیشنهاد می گردد با توجه به نتایج این تحقیق انجام پژوهشهای دیگر بصورت *in vivo* و کلینیکی صورت پذیرد تا مناسب ترین دوز مصرفی هر یک از این ترکیبات بدست آید.

منابع :

1. Thrope SR , Baynes JW. Role of the maillard reaction in diabetes mellitus