اثر آنتی‌اکسیدانی زردچوبه و زعفران بر اکسیداسیون دیوارهٔ سلول‌های کبدی، LDL و قندی شدن غیرآنزیمی هموگلوبین

غلامعلی نادری[۱]*، صدیقه عسگری[۲]، مسیح‌الله طاهر[۳]، بابک ثابت[٤]، نادیا نیکخو[٥]

۱- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
۳- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی
٤- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
٥- دانشجوی فوق‌لیسانس، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
*آدرس مکاتبه: اصفهان، میدان جمهوری اسلامی، خیابان خرم، مرکز درمانی تحقیقاتی صدیقه طاهره(س)، صندوق‌پستی: ۱۱٤۸ - ۸۱٤٦٥، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، تلفن: ۳۳۵۹۶۹۶، ۳۳۵۹۷۹۷ (۰۳۱۱)، نمابر: ۳۳۷۳٤۳۵ (۰۳۱۱)
پست الکترونیک: crc@mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۲/۹/۱۱ **تاریخ تصویب:** ۸٤/٥/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: رادیکال‌های‌آزاد به خصوص گونه‌های اکسیژن فعال با ایجاد خسارت به بیومولکول‌هایی همچون DNA، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و یا لیپیدهای غشایی می‌توانند اختلالاتی را ایجاد کنند. پراکسیداسیون لیپیدها در ذره LDL و دیواره سلول‌های کبدی در تشکیل آترواسکلروز و بیماری کبدی و همچنین قندی شدن غیر آنزیمی پروتئین‌ها در کمپلکس شدن دیابت نقش دارند. عدم تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی و اکسیدانی می‌تواند باعث بروز اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در طولانی‌مدت گردد. در این مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانی بعضی از چاشنی‌های معروف از جمله زردچوبه و زعفران بر اختلالات ذکر شده بررسی گردید.

روش بررسی: ابتدا چاشنی گیاهان مورد بررسی تهیه و پس از شناسایی هرباریومی عصاره‌گیری شد. هپاتوسیت‌های موش تهیه گردید. آنگاه در مجاورت t- بوتیل هیدروپرکساید ۱/۵ میلی‌مولار قرار گرفت و میزان مالون دی‌آلدیید محصول پراکسیداسیون لیپید در حضور و غیاب عصارهٔ گیاهی و میزان آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) آزاد شده نیز ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اندازه‌گیری گردید. تغییرات گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و اکسیداسیون LDL نیز در حضور و غیاب عصاره‌ها بررسی گشت و میزان درصد مهار اکسیداسیون نسبت به کنترل محاسبه گردید.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که زردچوبه در غلظت ۱۰μg/ml میزان مالون دی‌آلدیید را ۲۸/۸ درصد، تولید AST را به میزان ۲۵/۵۳ درصد و در غلظت ۱ μg/ml میزان قندی شدن هموگلوبین را ۲۵/۸۵ درصد مهار می‌کند. اثر زردچوبه بر مهار اکسیداسیون LDL در غلظت ۱ μg/ml بسیار چشمگیر بود. زعفران نسبت به زردچوبه اثرات مهاری محسوسی در هر سه سیستم مورد آزمایش از خود نشان نداد.

بحث: این مطالعه نشان داد که زردچوبه در غلظت‌های به کار برده شده در هر سه سیستم اکسیداتیو اثرات مهاری آشکاری دارد و در مقایسه با زعفران آثار ضداکسیداسیون LDL و ضدگلیکوزیلاسیون هموگلوبین و حفاظت‌کننده از سلول‌های کبدی را دارا می‌باشد و می‌توان به عنوان آنتی‌اکسیدان و مکمل غذایی جهت بیماران دیابتیک، کبدی و افراد مستعد به آترواسکلروز مورد استفاده قرار گیرد.

گل‌واژگان: آنتی‌اکسیدان‌ها، زردچوبه، زعفران، LDL، سلول کبدی، هموگلوبین

مقدمه

رادیکال‌های آزاد واکنش‌گرهایی فوق‌العاده قوی هستند که تمایل زیادی برای گرفتن الکترون و جفت کردن الکترون‌های خود دارند. لذا باعث می‌شوند تا دیگر مولکول‌ها آسیب ببینند و یا عملکرد خود را از دست بدهند. خسارت‌های ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو به DNA، پروتئین و سایر مولکول‌ها می‌تواند باعث پیشرفت و تشدید بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، پیری، کاتاراکت، خونریزی کبدی و ایدز گردد [۱،۲،۳]. همچنین رادیکال‌های آزاد در مکانیسم عمل برخی از آنزیم‌های هم‌دار سیتوکروم شرکت می‌کنند [۲]. رادیکال‌های آزاد می‌توانند از منابع اندوژن و اگزوژن بر اثر استرس‌های اکسیداتیو تولید شوند [٤،٥]. از جمله حساس‌ترین هدف‌های پراکسیدانت‌ها می‌توان از اسیدهای چرب موجود در غشاهای بیولوژیک نام برد. اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع[1] منجر به کاهش سیالیت غشا و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شود که در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها دخالت دارد. در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها، اسیدهای چرب غیراشباع تغییر فرم می‌دهد و در نتیجه سیالیت و پتانسیل غشای لیپیدی کاهش می‌یابد که منجر به تغییر نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌شود. از سوی دیگر پراکسیداسیون لیپیدها بر آنزیم‌های غشایی تاثیر می‌گذارد، در روند انتقال یون‌ها و نیز رهاسازی مواد داخل سلولی تغییراتی ایجاد می‌شود. همچنین متابولیت‌های سیتوتوکسیک حاصل از پراکسیدهای لیپیدی ایجاد می‌شود که در اکسیداسیون پروتئین‌های موجود در LDL اهمیت به سزایی دارد [٤،٦،٧]. این روند در پاتوژنز آترواسکلروز نیز اهمیت ویژه‌ای دارد. با توجه به عوارض سوء رادیکال‌های آزاد، حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ضروری به نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها قادر هستند در مقادیر کم، غشاهای سلولی و ترکیبات مختلف موجود زنده را در مقابل اکسیدان‌ها حفظ کنند [۸]. تثبیت دوباره تعادل بین مواد پراکسیداسیون و آنتی‌اکسیدان به سلول اجازه می‌دهد تا عمل فیزیولوژیک نرمال خود را مجدداً به دست آورد [۹]. آنتی‌اکسیدان‌ها نقش ویژه‌ای در پیشگیری و درمان بیماری‌ها ایفا می‌کنند [۹،۱۰،۱۱،۱۲]. تحقیقات اخیر نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات خالص جدا شده از سیر، پیاز، فلفل و زردچوبه را به اثبات رسانیده‌اند و نیز تحقیقات انجام شده تأثیرات مهاری پراکسیداسیون لیپیدها را توسط میخک و زنجبیل نشان داده‌اند [۱۳]. انیسون نیروی دفاعی بدن را در مقابل عفونت‌ها زیاد می‌کند و خواص ضدویروس و محرک دارچین به اثبات رسیده است [١٤]. با توجه به اینکه گزارشی راجع به تاثیرات آنتی‌اکسیدانی زردچوبه و زعفران بر سه سیستم اکسیداتیو: اکسیداسیون دیواره سلول‌های کبدی، اکسیداسیون LDL و قندی شدن غیر آنزیمی هموگلوبین موجود نیست، تحقق حاضر طراحی گشت تا در صورت مشاهده تاثیرات مطلوب، از این گیاهان بتوان جهت جلوگیری از عوارض دیابت و آترواسکلروز و بیماران کبدی بهره جست.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است. زردچوبه و زعفران تهیه و پس از شناسایی یک تا دو گرم از چاشنی ساییده شده را به درون یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و ۳۰ سی‌سی الکل ۷۰ درجه به عنوان حلال به آن اضافه گردید. پس از تکان دادن به مدت ۷۲ ساعت در یخچال نگهداری شد محتویات ارلن صاف شده و بر روی شیشهٔ ساعت خشک گردید. سپس وزن آن اندازه‌گیری و در حلال دی متیل سولفون اکسید حل شده و با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار غلظت‌های مختلف آن تهیه و مورد استفاده قرار گرفت [۱۵]. پس از بیهوش کردن موش صحرایی با کلروفرم، ابتدا حفره شکمی باز و رگ‌های خونی کبد مسدود شد. سپس با محلول هانکس بدون کلسیم که به عنوان محلول پرفیوژن استفاده گردید، کبد را بدون خون نموده و به وسیله بافر تریس شستشو داده شد سپس با دستگاه هموژنایزر هموژن گردید و هموژن حاصل پس از صاف شدن به صورت محلول یک دست به دست آمد [١٦]. سوسپانسیون سلولی حاصل را صاف نموده، هپاتوسیت‌های جدا شده مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید و آنگاه با تریپان بلو رنگ‌آمیزی و درصد سلول‌های زنده اندازه‌گیری شد. برای نگهداری این

[1] Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA)

سلول‌ها، بایستی روی یخ قرار داده شوند [۱۷]. مقدار مشخصی از سلول‌های کبدی (10^6cell/ml) انتخاب و در مجاورت t- بوتیل هیدروپروکساید(tBH) mM ۱/۵ قرار گرفت و میزان مالون‌دی‌آلدیید (MDA) تولید شده در غیاب و حضور عصاره به عنوان یک مارکر پراکسیداسیونی لیپیدی در طول موج ۵۳۵nm اندازه‌گیری شد [۱۸]. سپس همان مقدار از سلول‌های کبدی انتخاب گردید و در مجاورت (tBH) mM ۱/۵ قرار گرفت و میزان آنزیم AST آزاد شده به عنوان یک مارکر آسیب غشای سلولی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی در غیاب و حضور عصاره با استفاده از کیت شرکت من اندازه‌گیری گردید. میزان مهار گلیکوزیلاسیون هموگلوبین به صورت *in vitro* در حضور و عدم حضور عصاره گیاهی با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر shimadzu در طول موج nm ٤٣٤ تعیین گشت [۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳،۲٤،۲۵]. LDL از خون داوطلبان مرد نرمال با استفاده از دستگاه اولتراسانتریفوژ جدا و آنگاه در بافر فسفات سالین (pH=۷/٤، ۰/۱M) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد دیالیز گردید [۲۷]. پس از دیالیز مقدار پروتئین LDL با روش لوری تعیین مقدار شد [۲۰]. آنگاه در حضور سولفات مس (۱/٦٦μM) اکسید گردید. غلظت‌های ۰/۰۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ μg/ml از عصاره انتخاب و میزان تغییر اکسیداسیون LDL در حضور و فقدان عصاره درnm ۲۳٤ بررسی گردید [۲٦،۲۷]. هر آزمایش سه بار تکرار و میانگین مقادیر گزارش گردیده است.

نتایج

در آزمایشی که جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره تام زردچوبه و زعفران بر هپاتوسیت‌های کبدی انجام گرفت نشان داده شد که عصاره زردچوبه در غلظت‌های ۰/۵، ۲/۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱/٤، ۱۱/۸۸ و ۲۸/۸۰ درصد تولید MDA را مهار می‌کند (جدول شماره ۱). در آزمایشی که به منظور مهار پراکسیداسیون دیواره سلولی با استفاده از اندازه‌گیری ترشح آنزیمی AST انجام گرفت (جدول شماره ۲) نشان داده شد که عصاره تام زردچوبه در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۲۵/۵۳ درصد مانع از ترشح AST می‌شود. زعفران در غلظت‌های ذکر شده آثار محسوس مهاری بر روی تولید MDA و AST نداشت و نتایج نیز گزارش داده نشد.

در آزمایشی که جهت بررسی اثرات ضد گلیکوزیلاسیون هموگلوبین انجام گرفت نشان داده شد که زردچوبه در غلظت ۱ μg/ml به میزان ۲۵/۸۵ و زعفران ٦/۷۷ درصد مانع از گلیکوزیلاسیون هموگلوبین می‌شود. در آزمایشی که جهت بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی زردچوبه بر اکسیداسیون LDL انجام گرفت نشان داده شد که زردچوبه در غلظت ۱ μg/ml توانست زمان lage phase را از ٤۰ دقیقه در نمونه کنترل به ۱۲۰ دقیقه در نمونه تست افزایش دهد (نمودار شماره ۱). زعفران در این غلظت آثار مطلوبی بر اکسیداسیون LDL نشان نداد (نمودار شماره ۲).

جدول شماره ۱ - مقایسه میزان MDA تولید شده در طی پراکسیداسیون لیپیدی در سیستم دیوارهٔ سلول‌های کبد در غلظت‌های مختلف عصارهٔ تام زردچوبه

گیاه	غلظت نهایی عصاره (μg/ml)	Cont MDA (nM/L) (Mean ±SD)	Test MDA (nM/L) (Mean ±SD)	درصد کاهش اکسیداسیون
زردچوبه	۰	٤۲۵ ± ۸۰	۱٦۱۹ ± ٤	–
	۱۰	۱۵۷۳ ± ۱۳۲	۱۱۲۰ ± ۸۲	۲۸/۸۰*
	۲/۵	۱۵۱٤ ± ۲۱	۱۳۳٤ ± ۸۷	۱۱/۸۸*
	۰/۵	۱۳۹۹ ± ۱٤۱	۱۳۷۹ ± ٦۷	۱/٤۰
زعفران	۰	۳۷۵ ± ۲۵	۱٦۰۰ ± ۳۷	–
	۱۰	۱۵۷۳ ± ۱۱۷	۱۵٦۰ ± ۸۲	۰/۸۳
	۲/۵	۱۵٦۸ ± ۷۰	۱۵۵۷ ± ۷۸	۰/۷۱
	۰/۵	۱۵۷۵ ± ۸۵	۱۵٦۵ ± ٤۵	۰/٦۳

مقدار 10^6 هپاتوسیت در هر میلی‌لیتر انتخاب و با غلظت‌های مختلف عصاره تام زردچوبه در شرایط آزمایشگاه با (۱/۵ mM) tBH مخلوط شد. سپس میزان MDA تولید شده در طول موج nm ۵۳۵ اندازه‌گیری گردید. هر عدد میانگین سه بار آزمایش است. *= (p< ۰/۰۵۱)

جدول شماره ۲ – مقایسه میزان AST آزاد شده طی پراکسیداسیون لیپیدی در دیواره سلول‌های کبدی در غلظت‌های مختلف عصاره تام زردچوبه

گیاه	غلظت نهایی عصاره (µg/ml)	Control (U/L) (Mean ±SD)	Test (U/L) (Mean ±SD)	درصد کاهش اکسیداسیون
زردچوبه	۰	۱۰۵ ± ۳	۱۲۱±۱	–
	۱۰	۱٤۰ ± ۲	۱۰٤ ±٤	۲۵/۵۳*
	۲/۵	۱۰٦ ± ۳	۸۹ ± ۳	۱٦/۰۱*
	۰/۵	۱٤۳ ± ۲	۱٤۱ ± ۳	۱/٦۰
زعفران	۰	۷٦ ± ۲	۱۰۰ ± ۳	–
	۱۰	۹۲ ± ۱	۹۰ ± ٦	۳/۱۰
	۲/۵	۱۰۰ ± ۳	۹۸ ± ۲	۲/۳۰
	۰/۵	۹۹ ± ۳	۹۷ ± ۱	۱/۲۰

مقدار $۱۰^{٦}$ هپاتوسیت در هر میلی‌لیتر انتخاب و با غلظت‌های مختلف عصاره زردچوبه در شرایط آزمایشگاه با tBH (۱/۵ mM) مخلوط شد. سپس طبق روش میزان فعالیت آنزیم آزاد شده در طول موج ۳٤۰nm اندازه‌گیری گردید. هرعدد میانگین سه بار آزمایش است. (p< ۰/۰۵) = *

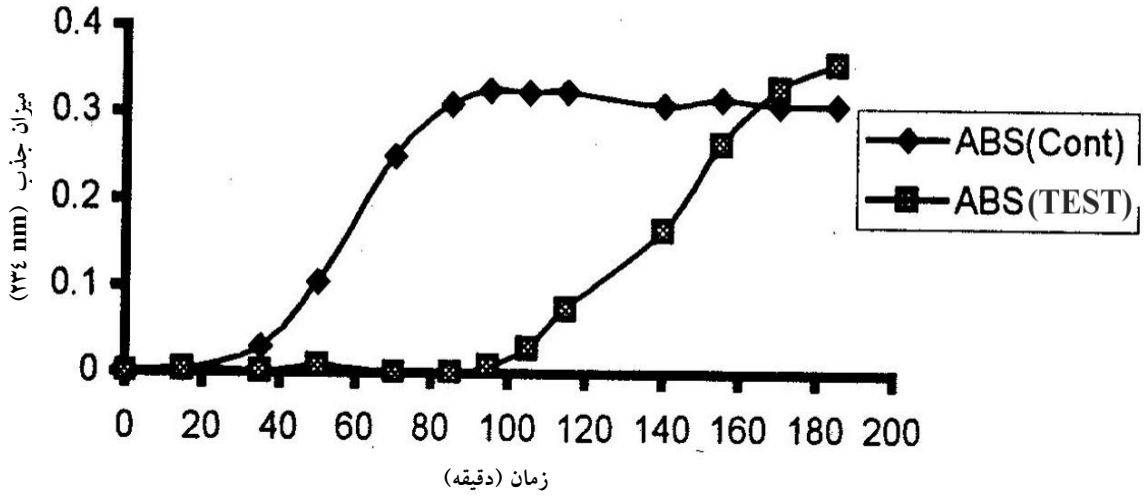
جدول شماره ۳ – مقایسه میزان گلیکوزیلاسیون هموگلوبین در مجاورت غلظت‌های عصارهٔ تام زردچوبه و زعفران

گیاه	غلظت نهایی عصاره (µg/ml)	میزان جذب نوری (Mean± SD)	درصد مهار گلکوزیلاسیون
زردچوبه	۰	۰/۲۹٤±۰/۰۱٤۹	-
	۱	۰/۲۱۸±۰/۰۱۳۰	۲۵/۸۵*
	۰/۵	۰/۲٤٤ ±۰/۰۲۳۸	۱۷/۰۰*
	۰/۲۵	۰/۲٦٤ ± ۰/۰۰۵۱	۱۰/۲۰*
زعفـران	۰	۰/۲۳٦±۰/۰۳٦۰	-
	۱	۰/۲۲۰ ± ۰/۰۱۲۰	٦/۷۷
	۰/۵	۰/۲۳۵ ±۰/۰۲۲۰	۰/٤۲
	۰/۲۵	۰/۲٦۰ ±۰/۰۱۵۹	–۱۰/۱٦

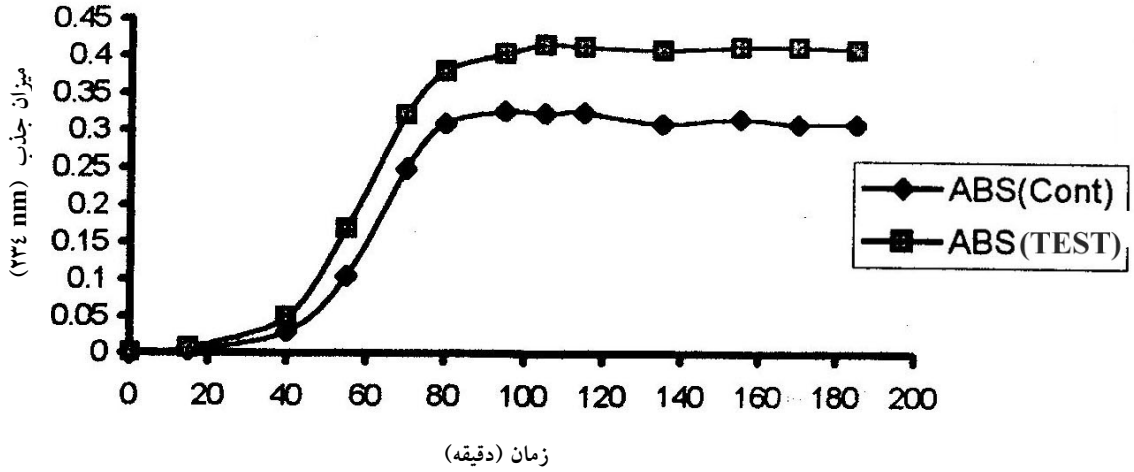
غلظت ثابتی از هموگلوبین (۵گرم درصد) و گلوکز طبق روش‌ها انتخاب گردید و با غلظت‌های مختلف عصارهٔ زردچوبه و زعفران در شرایط آزمایشگاه انکوبه شد. سپس میزان جذب نوری در طول موج ٤٤۳nm اندازه‌گیری و درصد مهار گلیکوزیلاسیون محاسبه گردید. هر عدد میانگین سه بار آزمایش است. (p< ۰/۰۵) = *

بحث

بررسی نتایج زردچوبه بر سیستم اکسیداسیون هپاتوسیت و قندی شدن غیرآنزیمی هموگلوبین و اکسیداسیون LDL نشان داد که زردچوبه از خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی برخوردار است و در هر سه سیستم اثر زردچوبه وابسته به دوز است. اثرات آنتی‌اکسیدانی زردچوبه را می‌توان به curcumin موجود در آن نسبت داد. مطالعات زیادی اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیب را ثابت کرده‌اند. در یک بررسی اثر مهارکننده curcumin بر پراکسیداسیون لیپیدی را به طور وابسته به دوز ثابت کرده است [۲۹]. محقق دیگری نشان می‌دهد که ترکیبات curcuminoid حاصل از زردچوبه قادر هستند از سلول‌های اپیدرم پوست تحت استرس رادیکال‌های اکسیژن محافظت کنند [۳۰]. در مطالعه دیگری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در کبد موش‌هایی که زردچوبه در رژیم



نمودار شماره ۱- اثر عصاره زردچوبه در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اکسیداسیون LDL. غلظت ثابتی از LDL انتخاب و با غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تام زردچوبه در شرایط آزمایشگاه در مجاورت CuSO4 (با غلظت ۱/٦٦ میکرومولار) قرار گرفت. سپس میزان جذب دی‌ان کنژوگه تشکیل شده در طول موج ۲۳٤ نانومتر نمونه‌های تست ■ و کنترل ♦ در زمان تعیین شده اندازه‌گیری شد.



نمودار شماره ۲- اثر عصاره زعفران در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اکسیداسیون LDL. غلظت ثابتی از LDL انتخاب و با غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تام زعفران در شرایط آزمایشگاه در مجاورت CuSO4 (با غلظت ۱/٦٦ میکرومولار) قرار گرفت. سپس میزان جذب دی‌ان کنژوگه تشکیل شده در طول موج ۲۳٤ نانومتر نمونه‌های تست ■ و کنترل ♦ در زمان تعیین شده اندازه‌گیری شد.

غذایی آنها به کار رفته نسبت به گروه کنترل بالاتر بوده و این دلالت بر اثر مهارکننده زردچوبه بر پراکسیداسیون لیپیدها از طریق افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد [۳۱].

بررسی دیگری نیز حاکی از اثر زردچوبه در کاهش قابلیت پراکسیداسیون لیپیدی در میکروزوم کبد و میتوکندری در خرگوش‌های مبتلا به آترواسکلروز می‌باشد [۳۲]. در یک مطالعه اثر سه نوع (۱۱۱و ۱۱ و۱) curcumin از زردچوبه بر مهار تولید پراکسید بررسی شده و ثابت شد که نوع ۱۱۱ که فعال‌ترین کورکومینویید زردچوبه است بالاترین اثر مهاری را دارد [۳۲]. تحقیقات نشان داده‌اند که آپولیپوپروتئین B ذره LDL در مراحل اولیه آترواسکلروز یک القا کننده مهم تکثیر ماکروفاژ می‌باشد و در تحقیق دیگری نشان داده شده است که تجویز خوراکی روزانه عصاره زردچوبه به طور معنی‌داری میزان LDL و ApoB را کاهش و HDL و ApoA را در افراد سالم افزایش می‌دهد [۳٤]. در سیستم قندی شدن غیرآنزیمی هموگلوبین زعفران بیشتر اثر پراکسیدانی در غلظت‌های پایین نشان می‌دهد و در غلظت بالا اثر آنتی‌اکسیدانی آن چشمگیر نیست. در سیستم اکسیداسیون LDL نیز اثر پراکسیدانی مشاهده می‌شود و در مطالعات انجام شده بر زعفران از crocin یک کاروتنویید محلول در آب در غلظت بالا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان یاد شده است [۳۵]. لذا عدم پاسخ به سیستم‌های مورد آزمایش ما شاید به علت انتخاب دوزهای پایین زعفران باشد. مطالعات پیشرفته فارماکولوژیک ثابت می‌کنند که عصاره زعفران دارای اثرات ضدسرطانی در *in vitro* می‌باشد شاید به خاطر اثرات پراکسیدانی آن می‌باشد. لذا مطالعات انجام شده و همین‌طور مطالعه‌ای که ما انجام دادیم همه دلیل بر وجود مواد آنتی‌اکسیدان در عصاره زردچوبه می‌باشد و می‌توان نتیجه گرفت که به احتمال زیاد می‌توان از زردچوبه به عنوان آنتی‌اکسیدان مکمل جهت بیماری‌هایی از جمله دیابت و بیماری کبدی و آترواسکلروز به عنوان پیشگیری کننده و یا درمان استفاده نمود.

منابع

1. Laster P, Midori H and Toshikazu Y. Antioxidant food supplements in human health. Sandiego. Academic Press. 1999, pp. 371-2.

2. Cross A R and Jones OTG. Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Bioch. Imica. et Biophysica Acta*. 1991; 1057: 281-298.

3. Leuke DS and Rankin SM. The oxidative modification. *Biochem. J*. 1990; 270: 471-748.

4. Cross C. Oxygen radical and human disease. *Ann. Int. Med*. 1987; 107: 526-545.

5. Delattre J and Bonne Font-Rousselot D. Oxidative stress, free radicals and aging. *Biotech. Lab. International*. 1998; 21-23.

6. Halliwell B and Gutterridge JMC. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease. *An Overview Methods Enzymol*. 1990; 186: 1-85.

7. Miki M. Free radical chain oxidation of rat red blood cell by molecular oxygen and its inhibition by a- Tochopherol. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 258: 373-380.

8. Rice Evans CA and Eurdon RM. Free radical damage and its control. Amsterdam. Elsevier. 1994; 113: 46-49.

9. Leung FY. Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. *J. Nutr. Eiochem*. 1998; 9: 304-307.

10. Urtis CA and Ash wood ER. Fandamentals of clinical chemistry. 4th ed. London: WB Saunsers Company. 1996, pp: 299-301, 341.

11. Peng J, Jones GL and Watson K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidants supplements. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 1598 - 1606.

12. Chan AC, Chow CK and Chiu D. Intraction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc. Soc. Exp. Bioi. Med*. 1999; 222: 274-282.

13. Pulla Reddy ACH and Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of

lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol. Cell Biochem*. 1992; 111: 117-124.

14. Chevallier A. The encyclopedia of medical plants. Dorling Kindersley Limited. 1997, pp: 80, 91, 95, 182, 246.

۱۵. صمصام شریعت هـادی. عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثر گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی آنها. انتشارات مانی. ۱۳۷۱، صفحات ۳-۱۲.

16. Buege JA and Aust SD. Microsomal lipid peroxidation *Methods enzymol*. 1978; 52: 302-310.

17. Cook IA and Mitchell IB. Viability measurements in mamalian cell systems. *Anal. Biochem*. 1989; 179: 1-7.

18. Kostner K. Is oxidative stress causally linked to unstable angina pectoris? A study in 100 C.A.D patients and matched control. *Cardiovasc. Res*. 1997; 36: 330-6.

19. Vankampen EJ and Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Acta Clin. Chem*. 1985; 8: 1414.

20. Markwell MAK, Haas SM and Tolbert NE. Protein determination in membrane and lipoprotein is stable by pro-oxidant copper. *FEBS Lett*. 1994, pp. 194 - 343.

21. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, Rafiei M and Arefian A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharm. Acta Helv*. 1999; 73: 223-226.

22. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N and Vakili R. The inhibitory effects of pure flavonoids on *in vitro* protein glycosylation. *Herbal Pharmacotherapy*. 2002; 2: 47-57.

23. Fairbanks VF and Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company 1994, pp: 2020-30.

24. Van Kampen E and Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Adv. Clin. Chem*. 1965; 8: 141-187.

25. Fluchiger R and Winter Halter KH. Biochemical and clinical aspects of hemoglobin l aspects of hemoglobin abnormalities. New York: Academic Press, 1978, p: 208.

26. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landon C and Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*. 1992; 339: 1183-1184.

27. Steven P and Gieseg H. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Lett*. 1994; 343: 188-194.

28. Tringali C. Bioactive compounds from natural sources. Taylor & Francis 2001, P: 365.

29. Pulla Reddy ACH and Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol. Cell Biochem*. 1992; 111: 117 - 124.

30. Bonte F. Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. *Planta Med*. 1997; 63(3): 265-6.

31. Reddy AC and Lokesh BR. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced peroxidation in the rat liver. *Food Chem. Toxicol*. 1994; 32: 279-83.

32. Quiles JL, Aguilera C and Mesa MD. An ethanolic-aqueous extract of *Curcuma longa* decreases the susceptibility of liver microsomes and mitochondria to lipid peroxidation in atherosclerotic rabbits. *Biofactors*. 1998; 8: 51-57.

33. Ruby AJ, Kuttan G and Babu KD. Anti-Tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett*. 1995; 94: 79-83.

34. Remirez-Bosca A and Carrion MA. An hydroalcholic extract of *Curcuma longa* lowers the apo B/ apo A ratio. Implications for atherogenesis prevention. *Mech. Ageing Dev*. 2000; 119: 41-47.

35. Pham TQ and Cormier F. Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleid acid and crocin with oxygen. *J. Agric. Food Chem*. 2000; 48: 1455-1461.