

اثرات دارچین، سماق و فلفل بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین در in vitro

نسرین شیخ^{۱*}، محمدرضا صفری^۲، ملیحه عراقچیان^۳، فاطمه زراعتی^۴

۱- استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

۳- داروساز، عضو هیأت علمی گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

۴- استادیار گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

تلفن: ۸- ۸۲۷۶۲۹۶ (۰۸۱۱) نمابر: ۸۲۷۶۲۹۹ (۰۸۱۱)

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 می‌نماید. مهم‌ترین و شاخص‌ترین علامت کلینیکی آن افزایش قند خون می‌باشد که منجر به گلیکه شدن پروتئین‌های مختلف بدن می‌گردد که این امر باعث تغییر ماهیت، ساختمان و عملکرد بیوشیمیایی آنها می‌شود. یکی از راه‌های احتمالی درمان دیابت ملیتوس، کاهش یا مهار این واکنش است. به نظر می‌رسد که استفاده از افزودنی‌های غذایی در این راه مفید و موثر باشد. هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر برخی از افزودنی‌های غذایی مثل دارچین، سماق و فلفل بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین در *in vitro* می‌باشد.

بدین منظور در حضور غلظت‌های مختلف هریک از این افزودنی‌ها، واکنش گلیکه شدن آلبومین در *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، ۲/۰ و ۱/۰ گرم بر دسی‌لیتر دارای اثر مهار بر واکنش گلیکه شدن آلبومین می‌باشند و در این میان، سماق در غلظت ۱g/dl دارای بیشترین مهار بود (۸۰ درصد). ترتیب اثرات افزودنی‌های فوق، به صورت زیر است:

دارچین > فلفل > سماق

نتایج این تحقیق نشان داد که افزودنی‌های غذایی مورد مطالعه باعث کاهش واکنش گلیکاسیون آلبومین گردیدند.

کلواژگان: افزودنی‌های غذایی، دیابت ملیتوس، گلیکاسیون آلبومین



مقدمه

دیابت ملیتوس یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در جوامع بشری است که مقابله با عوارض ناشی از آن، هزینه هنگفتی را به سیستم درمانی تحمیل می‌نماید. مهم‌ترین و شاخص‌ترین علامت کلینیکی آن افزایش قندخون می‌باشد که منجر به گلیکته شدن پروتئین‌های مختلف بدن می‌گردد [۱]. در نتیجه واکنش گلیکته شدن پروتئین‌ها، ماهیت و ساختمان فضایی آنها تغییر می‌یابد و فعالیت بیوشیمیایی آنها دچار تغییرات گوناگونی می‌شود [۲]. همین امر باعث بروز بیماری‌های مختلفی نظیر آترواسکلروز، رتینوپاتی، نفروپاتی، کاتاراکت و... می‌گردد [۳]. در بسیاری از بافت‌های بدن همچون بافت عضلانی، برای استفاده از گلوکز نیاز به انسولین می‌باشد و در دیابت ملیتوس به دلیل کاهش انسولین و یا کاهش حساسیت بافت‌ها به انسولین، جذب گلوکز توسط این بافت‌ها کاهش و غلظت گلوکز خون افزایش می‌یابد و در نتیجه زمینه برای انجام واکنش گلیکته شدن آلبومین افزایش پیدا می‌کند [۴]. واکنش گلیکته شدن آلبومین در حقیقت اتصال گروه آلدیدی قند با عوامل آمین آزاد موجود در ساختمان پروتئینی آلبومین است که به صورت آهسته انجام می‌گیرد. برای تشخیص آلبومین گلیکته شده، راه‌های مختلفی وجود دارد که یکی از مرسوم‌ترین آنها، روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) است. این معرف با محصولات حاصل از واکنش گلیکته شدن آلبومین ترکیب می‌شود و تولید ماده‌ای با حداکثر جذب در طول موج ۴۴۳ نانومتر می‌کند [۵]. میزان گلیکته شدن آلبومین به عوامل مختلفی از جمله غلظت گلوکز، زمان انکوباسیون پروتئین با گلوکز و... بستگی دارد. با توجه به اینکه افزایش قندخون منجر به واکنش گلیکته شدن پروتئین‌ها می‌شود و این امر سبب تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها می‌گردد لزوم مهار واکنش گلیکته شدن پروتئین‌ها، به شدت احساس

می‌شود. سالها است که توجه محققین بر روی یافتن ترکیباتی که مانع از گلیکته شدن پروتئین‌ها گردند بدون اینکه اثرات جانبی نگران‌کننده‌ای داشته باشند معطوف گردیده و به همین منظور، امروزه توجه خاصی به افزودنی‌های غذایی مختلف شده است. این ترکیبات از این جهت جالب هستند که دارای منشای گیاهی بوده و کاربرد وسیعی در رژیم‌های غذایی گوناگون دارند. در این تحقیق، اثرات سه افزودنی غذایی به نام‌های: سماق (*Rhus coriaria* L.)، دارچین (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) و فلفل سیاه (*Peper nigrum* L.) بر روی واکنش گلیکته شدن آلبومین در *in vitro* مورد بررسی قرار گرفته است.

در ذیل مروری کوتاه بر گیاهان مورد استفاده در این پژوهش خواهیم داشت:

۱- سماق: گیاهی است که گل‌های آن به صورت خوشه مجتمع بوده که تبدیل به میوه‌های کروی کوچک و قرمز رنگ می‌گردد. از نظر ترکیبات شیمیایی سماق دارای تانن، دکستروز و میریستین می‌باشد. خواص درمانی آن شامل اثرات قابض، ضدالتهاب و بندآورنده خون است. همچنین به علت وجود تانن، در درمان مسمومیت با سموم آکالوئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۶].

۲- دارچین: گیاهی است معطر و مطبوع که از نظر ترکیبات شیمیایی دارای روغن‌های فرار، سینامون آلدید، ترپن‌ها، سینامیل الکل، لیمونن، فلاندرن و سافرول می‌باشد. این گیاه از نظر درمانی دارای اثرات آنتی اسپاسمودیک، ضدنفخ، ضداسهال، آنتی‌باکتریال، خنک‌کننده و ضدانگل است. همچنین برای درمان بی‌اشتهایی، کولیک روده، اسهال اطفال، سرماخوردگی، آنفلوانزا و به خصوص برای کولیک همراه با نفخ و اختلالات گوارشی همراه با تهوع مفید است [۸،۷].

۳- فلفل سیاه: فلفل سیاه گیاهی است که گل‌های آن به صورت مجتمع و به شکل شاتون است که پس از

مدتی تبدیل به میوه‌های کوچک و کروی و به تعداد زیاد می‌گردند. از نظر ترکیبات شیمیایی فلفل دارای اسانس‌های با بوی مطبوع مانند فلاندرن و کادینن است همچنین ترکیبات آکالوئیدی مثل پیپرین و پیرولیدین در آن وجود دارد. این گیاه دارای اثرات تحریک‌کننده و عطسه‌آور است به‌طوری‌که مصرف مقادیر کم آن محرک دستگاه گوارش و مخاطها است ولی به نظر می‌رسد که مصارف درمانی چشمگیری نداشته باشد [۶،۸،۹].

روش‌ها

الف - مواد مورد استفاده

پودر خشک ۳ افزودنی غذایی (شامل سماق، دارچین و فلفل) از شرکت گلپر سینا خیز تهیه گردید و همچنین کلیه مواد شیمیایی از شرکت‌های مرک (آلمان) و سیگما (امریکا) خریداری شد.

ب - روش آزمایش

۱- انجام واکنش گلیکه شدن آلبومین: به یک میلی‌لیتر محلول ۵ گرم درصد آلبومین مقدار یک میلی‌لیتر محلول ۳۰۰ mg/۱۰۰ ml گلوکز اضافه شد و جهت جلوگیری از هر نوع آلودگی محیط، جنتامایسین با غلظت ۲۰ mg/۱۰۰ ml 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 شد (قبلاً کیسه دیالیز در محلول EDTA ۱۰ μmol آماده گردید) [۱۰].

۲- اندازه‌گیری میزان گلیکه شدن آلبومین: جهت اثبات واکنش گلیکه شدن آلبومین از تست TBA استفاده شد بدین ترتیب که به مخلوط فوق یک میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد (TCA) افزوده و سپس به مدت ده دقیقه با سرعت

۳۰۰۰ rpm سانتیفریوژ نموده، محلول رویی دور ریخته شد. این عمل دو بار انجام گرفت. در ادامه به رسوب فوق یک میلی‌لیتر بافر فسفات با مشخصات فوق و نیم میلی‌لیتر اسید اگزالیک ۰/۳ نرمال افزوده و به مدت یک ساعت در بن‌ماری در حال جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن در حرارت آزمایشگاه، به هر لوله نیم میلی‌لیتر TCA با غلظت ۴۰ درصد اضافه نموده و بعد از سانتیفریوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm، مایع رویی را جدا نموده و به یک میلی‌لیتر از مایع جدا شده نیم میلی‌لیتر محلول TBA ۰/۰۵ مولار اضافه گردید و نیم ساعت در حرارت ۴۰ درجه در بن‌ماری قرار گرفت. در پایان جذب نمونه در طول موج ۴۴۳ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۱].

۳- تهیه محلول استوک از هریک از افزودنی‌های غذایی: مقدار ۱ گرم از هریک از افزودنی‌های مورد مصرف را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل نموده و به مدت یک ساعت بر روی شیکر به‌خوبی مخلوط کرده و در نهایت برای به‌دست آوردن محلول یکنواخت از کاغذ صافی عبور داده شد.

۴- بررسی تاثیر هر یک از افزودنی‌های غذایی بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین: از محلول استوک هر یک از افزودنی‌های غذایی، سه رقت شامل ۱، ۰/۲ و ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر تهیه گردید و مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف هر یک از ترکیبات شامل یک میلی‌لیتر محلول آلبومین ۵ درصد و یک میلی‌لیتر گلوکز ۳۰۰ mg/۱۰۰ ml (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 افزودنی‌ها، تست TBA مطابق روش ۲ انجام گرفت. کلیه مراحل آزمایش و هریک از غلظت‌های افزودنی‌ها به‌صورت سه تایی انجام گرفت و جهت به‌دست آوردن نتایج قابل قبول، آزمایش‌ها تکرار شد.

ج- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل بر اساس تست ANOVA دو طرفه محاسبه گردید.

نتایج

در این تحقیق، اثرات غلظت‌های افزودنی‌های سماق، دارچین و فلفل بر روی واکنش گلیک‌شدن آلبومین مورد بررسی قرار گرفته است. تمام ترکیبات در چهار غلظت (۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۱ گرم در صد میلی‌لیتر) مورد استفاده قرار گرفتند و برای تعیین میزان گلیک‌شدن آلبومین از تست TBA استفاده گردید. آزمون ANOVA دو طرفه نشان داد که اختلاف در میزان مهار واکنش گلیک‌شدن آلبومین در افزودنی‌های مختلف به‌عنوان تابعی از غلظت افزودنی‌ها تغییر می‌کند.

تأثیر متقابل افزودنی‌های غذایی و غلظت آنها در مهار واکنش گلیک‌شدن آلبومین: نتایج حاصل از اثرات این ترکیبات در جدول شماره ۱ آمده است. مطابق این جدول، افزودنی سماق در غلظت ۱ gr/dl دارای بیشترین مهار (۸۰/۸ درصد) بود. همچنین فلفل

در غلظت ۱ gr/dl به میزان قابل توجهی (۷۹/۹ درصد) باعث مهار واکنش گلیک‌شدن آلبومین گردید. ترتیب اثرات افزودنی‌های غذایی موردنظر بر روی واکنش گلیک‌شدن آلبومین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ و ۱ گرم درصد میلی‌لیتر به صورتهای زیر آمده است:

در غلظت ۰/۱ gr/dl : فلفل > دارچین > سماق
در غلظت ۰/۲ gr/dl : دارچین > فلفل > سماق
در غلظت ۱ gr/dl : دارچین > فلفل > سماق

بحث

در بیماری دیابت، با افزایش قندخون، پروتئین‌های بدن به طریقه غیرآنزیماتیک با اتصال به گلوکز به شکل گلیک‌درآمده و با گذشت زمان، موجب بروز تظاهرات دیررس دیابتی می‌گردند. یکی از مهم‌ترین راه‌های پیشگیری از دیابت، کاهش یا مهار گلیکاسیون پروتئین‌ها است که در این تحقیق، اثرات غلظت‌های مختلف سه افزودنی غذایی به‌نامهای سماق، دارچین و فلفل بر روی واکنش گلیک‌شدن آلبومین به‌صورت in vitro مورد مطالعه قرار گرفت. هر سه افزودنی فوق کم و بیش مورد مصرف

جدول شماره ۱- مقایسه اثر سماق، دارچین و فلفل در میزان مهار واکنش گلیک‌شدن آلبومین بر مسب غلظت‌های مختلف

انواع افزودنی‌ها	درصد میزان مهار واکنش گلیک‌شدن در غلظت ۱ gr/dl (Mean±SD)	درصد میزان مهار واکنش گلیک‌شدن در غلظت ۰/۲ gr/dl (Mean±SD)	درصد میزان مهار واکنش گلیک‌شدن در غلظت ۰/۱ gr/dl (Mean±SD)	P. value
سماق	۸۰/۸۲ ± ۲/۰۵	۷۱/۹۳ ± ۱/۲۶	۶۴/۴۴ ± ۲/۳۳	$F_{(2,9)}=53/58$ $P=0/000$ (S)**
دارچین	۷۸/۰۱ ± ۲/۴۶	۶۹/۷۰ ± ۲/۴۸	۵۷/۷۷ ± ۶/۸۴	$F_{(2,9)}=15/75$ $P=0/004$ (S)**
فلفل	۷۹/۸۸ ± ۸/۴۳	۷۰/۲۹ ± ۲/۹۴	۵۳/۰۹ ± ۱/۸۰	$F_{(2,9)}=19/97$ $P=0/001$ (S)

در مطالعات صورت گرفته در سال‌های ۲۰۰۰ و ۲۰۰۱ مشخص گردید که سماق و دارچین همانند انسولین باعث کاهش قندخون شده و در نتیجه بر روی روند گلیک‌شدن پروتئین‌های پلاسمایی نظیر آلبومین تاثیرگذار است [۱۲، ۱۳]. در سایر مطالعات، خواص گوناگونی نظیر ضد دیابتی، کاهش بیماری‌های قلبی عروقی، ضد سرطانی برای این افزودنی‌ها گزارش گردیده است [۷، ۸]. اما در هیچ‌یک از آنها اشاره‌ای به چگونگی عمل و نحوه مکانیسم‌شان نشده است. این پروژه اولین گام عملی در پی دستیافتن به مکانیسم احتمالی این افزودنی‌ها در کاهش روند بیماری دیابت است. لذا پیشنهاد می‌گردد با توجه به نتایج این تحقیق که اثرات مهاري افزودنی‌های غذایی را بر روی گلیک‌شدن آلبومین نشان می‌دهد انجام پژوهش‌های دیگر به صورت *in vivo* و کلینیکی ضروری است تا مناسب‌ترین دوز مصرفی هر یک از این افزودنی‌ها به دست آید.

اکثریت خانواده‌ها هستند و با توجه به کاربرد وسیع آنها، مطالعه تاثیرات کلینیکی‌شان در بهبود و درمان بیماری‌ها مفید می‌باشد [۶].

غلظت‌های مورد استفاده از این افزودنی‌ها در این پژوهش در حدودی انتخاب گردید که مورد مصرف در رژیم‌های غذایی باشد. از آنجایی که، برخی از افزودنی‌های غذایی دارای اثرات کاهش‌دهندگی دیابت می‌باشند اما هنوز به طور دقیق، مکانیسم اثرات آنها مشخص نیست، با این فرض، در این مطالعه، تاثیرات احتمالی آنها بر روی روند گلیک‌شدن آلبومین مورد سنجش قرار گرفت.

با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل در قسمت نتایج، مشخص گردید که هر سه افزودنی مورد استفاده دارای اثر مهاري بر واکنش گلیک‌شدن آلبومین در *in vitro* بودند. مناسب‌ترین غلظت آنها، ۱g/dl بود که سه افزودنی سماق، فلفل و دارچین به ترتیب به میزان ۸/۸۰، ۸/۷۹ و ۷۸ درصد باعث مهار گلیک‌شدن آلبومین گردیدند.

منابع

1. Thrope SR, Baynes JW. Role of the maillard reaction in diabetes mellitus and disease of aging. *Drug* 1996; 9: 69-76
2. Hunt JV, Skamarauskas JT, Mitchinson MJ. Protein glycation and fluorescent material in human atheroma. *Atherosclerosis* 1994; 111: 225-31.
3. Day IF, Ingerbretsen CG, Ingerbretsen WR Jr, Baynes JW, Thorpe SR. 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 antioxdation & protein modification: the potential role of antioxdation in diabetes. *Biochem. J.* 1987; 454: 243-50.
5. Dolhofer R, Wieland OH. Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus. *Diabetes* 1980; 294: 17-22.
6. امین غلامرضا. گیاهان دارویی سنتی ایران. تهران، موسسه پژوهش‌های گیاهان دارویی ایران. ۱۳۷۰: صفحات ۳۱، ۳۲، ۴۸، ۷۳، ۱۱۸، ۱۲۱، ۱۹۵، ۱۹۶، ۲۰۰، ۲۰۷، ۲۲۱، ۲۲۲.
7. Ebadi M. *Pharmacd dynamic basis of herbal medicine*. Boca Raton: CRP. 2002 pp: 14, 36, 135-45, 289-90.
8. Merrily A, Kuhn RN, David-Winston AHG. *Herbal Therapy & Supplements*. Philadelphia: Lippincott, 2000 pp: 148-52, 255-9, 330-3.



۹. صمصام شریعت هادی، معطر فریبرز. فارماگوگنوزی. اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۶۱ صفحات: ۵-۲۳۴، ۱۹-۲۱۸، ۱۴-۲۱۳، ۹-۱۸۸ و ۶۸-۷۰.

10. Dolhfer R, Wiland OH. Improvement of the thiobarbituric assay for serum glycosylation determination. *Clin. Chem. Acta.* 1981; 112: 197-204.

11. Work TS, Work E. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. North : Holland publishing company , 1969 pp: 423-8.

12. Turmeric/Healthy ME, available at : <http://www.ahealthyme.com> . first published, May 12, 2000.

13. Turmeric/Healthy ME, available at : <http://www.maly\sumac> 1.htm, second published, July 29, 2001.

