

## بررسی اثر روغن‌های فرار بر روی واکنش گلیکة شدن آلبومین به روش in vitro

محمدرضا صفری<sup>۱\*</sup>، نسرین شیخ<sup>۲</sup>، خسرو مانی کاشانی<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی همدان

۲- استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۳- عضو هیأت علمی گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

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

### 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 گلیکة 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 روغن‌های فرار در این راه مفید و موثر می‌باشد. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر برخی از ترکیبات تشکیل دهنده روغن‌های فرار نظیر پولگون، تیمول، ژرانیول، لینالول و لیمونن بر روی واکنش گلیکة شدن آلبومین در *in vitro* می‌باشد. بدین منظور در حضور غلظت‌های مختلف هریک از این ترکیبات، واکنش گلیکة شدن آلبومین به صورت *in vitro* انجام شد و با روش تیوباربتوریک اسید مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج حاصل نشان داد که ترکیبات مورد مطالعه در غلظت‌های سه گانه  $1 \text{ g/dl}$ ،  $0.2 \text{ g/dl}$  و  $0.1 \text{ g/dl}$  دارای اثر مهاری بر واکنش گلیکة شدن آلبومین می‌باشند و در این میان، تیمول در غلظت  $1 \text{ g/dl}$  دارای بیشترین مهار بود (۹۴ درصد). ترتیب اثرات ترکیبات فوق، به صورت زیر است:

لینالول > لیمونن > پولگون > ژرانیول > تیمول

نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات تشکیل دهنده روغن‌های فرار باعث کاهش واکنش گلیکاسیون آلبومین گردیدند.

گل واژگان: روغن‌های فرار، دیابت ملیتوس، گلیکاسیون آلبومین

## مقدمه

شدت احساس می‌شود. سالها است که توجه محققین بر روی یافتن ترکیباتی که مانع از گلکس شدن پروتئین‌ها گردند بدون این که اثرات جانبی نگران کننده‌ای داشته باشند معطوف گردیده است. به همین منظور، امروزه توجه خاصی به فرآورده‌های گیاهی مختلف از جمله روغن‌های فرار شده است. این ترکیبات از این جهت جالب هستند که دارای منشا گیاهی بوده و احتمال ایجاد اثرات جانبی و مسمومیت با آنها مخصوصاً در دوزهای کنترل شده، کم است. در این تحقیق، اثرات ۵ ترکیب موجود در اسانس‌ها به نام‌های: پولگون (Pulegone)، تیمول (Thymol)، ژرانیول (Geraniol)، لیمونن (Limonene) و لینالول (Linalool) بر روی واکنش گلکس شدن آلبومین به روش *in vitro* مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### الف - مواد مورد استفاده

۵ ترکیب (پولگون، تیمول، ژرانیول، لیمونن و لینالول) و همچنین کلیه مواد شیمیایی از شرکت مرک (آلمان) و سیگما (امریکا) خریداری شد.

### ب - روش آزمایش

#### ۱- انجام واکنش گلکس شدن آلبومین

به یک میلی‌لیتر محلول ۵ گرم درصد آلبومین مقدار یک میلی‌لیتر محلول ۳۰۰۰ mg/۱۰۰ ml گلوکز اضافه شد و جهت جلوگیری از هر نوع آلودگی محیط، جنتامایسین با غلظت ۲۰ mg/۱۰۰ ml در بافر فسفات (۰/۰۱ مولار با pH=۷/۴) اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق جهت انجام انکوباسیون به طور ثابت قرار گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون در بافر فسفات دیالیز گردید (قبلاً کیسه دیالیز در محلول EDTA ۱۰ μmol آماده شده بود).

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 شاخص ترین علامت کلینیکی آن افزایش قند خون می‌باشد که منجر به گلکس شدن پروتئین‌های مختلف بدن می‌گردد [۱]. در نتیجه واکنش گلکس 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 همچنین کاهش حساسیت بافت‌ها به انسولین، جذب گلوکز توسط این بافتها کاهش و غلظت گلوکز خون افزایش می‌یابد و در نتیجه زمینه برای انجام واکنش گلکس شدن آلبومین زیاد می‌شود [۴]. واکنش گلکس 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 گلکس شده، راه‌های مختلفی وجود دارد که یکی از مرسوم ترین آنها، روش تیوباربتوریک اسید (TBA) است. این معرف با محصولات حاصل از واکنش گلکس شدن آلبومین ترکیب می‌شود و تولید ماده‌ای با حداکثر جذب در طول موج ۴۴۳ نانومتر می‌کند [۵]. میزان گلکس 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 گلکس شدن پروتئین‌ها می‌شود و این امر سبب تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها می‌گردد لزوم مهار واکنش گلکس شدن پروتئین‌ها، به



تست TBA مطابق روش ۲ انجام گرفت. کلیه مراحل آزمایش و هر یک از غلظت‌های ترکیبات به صورت سه تایی انجام گرفت و جهت به دست 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 مختلف پولگون، تیمول، ژرانیول، لیمونن و لینالول بر روی واکنش گلکیک شدن 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 گلکیک شدن آلبومین از تست TBA استفاده گردید. آزمون ANOVA دو طرفه نشان داد که اختلاف در میزان مهار واکنش گلکیک شدن آلبومین در ترکیبات مختلف به عنوان تابعی از غلظت آنها تغییر می‌کند.

### تأثیر متقابل روغن‌های فرار و غلظت آنها در مهار واکنش گلکیک شدن آلبومین

نتایج حاصل از اثرات ترکیبات فوق در جدول شماره ۱ آمده است. مطابق این جدول، تیمول در غلظت ۱ gr/dl دارای بیشترین مهار (۹۴ درصد) بود. همچنین لیمونن در غلظت ۰/۲ gr/dl به میزان قابل توجهی (۹۰ درصد) باعث مهار واکنش گلکیک شدن آلبومین گردید. ترتیب اثرات ترکیبات مورد نظر بر روی واکنش گلکیک شدن آلبومین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ و ۱ گرم در صد میلی‌لیتر به صورت‌های زیر آمده است.

در غلظت ۰/۱ gr/dl:

۲- اندازه گیری میزان گلکیک شدن آلبومین جهت اثبات واکنش گلکیک 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 سانتریفوژ و 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 بن ماری 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 سانتریفوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm، مایع رویی را جدا و به یک میلی‌لیتر از مایع جدا شده نیم میلی‌لیتر محلول TBA ۰/۰۵ مولار اضافه گردید. آنگاه نیم ساعت در حرارت ۴۰ درجه در بن ماری قرار گرفت. در پایان جذب نمونه در طول موج ۴۴۳ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### ۳- تهیه محلول استوک از هریک از ترکیبات

مقدار ۰/۱ گرم از هریک از ترکیبات مورد مصرف را در ۱۰ ml آب مقطر دو بار تقطیر حل نموده و به مدت یک ساعت بر روی شیکر به خوبی مخلوط و در نهایت برای به دست آوردن محلول یکنواخت از کاغذ صافی عبور داده شد.

### ۴- بررسی تأثیر هر یک از ترکیبات بر روی واکنش گلکیک شدن آلبومین

از محلول استوک هر یک از ترکیبات فرار، سه رقت شامل ۱ gr/dl، ۰/۲ gr/dl و ۰/۱ gr/dl 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 ۱۰۰ g/۳۰۰۰ ml (در محلول جنتامایسین و بافر فسفات) اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در حرارت آزمایشگاه انکوبه گردید. برای تعیین میزان اثر هریک از غلظت‌های مختلف ترکیبات،



از طرف دیگر تأثیر ژرانیول بر میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین متفاوت از تیمول نمی‌باشد.

مقایسه تأثیر هر یک از مواد مورد مطالعه در سه غلظت به کار رفته نشان داد که برای لینالول، میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین بر حسب غلظت برابر است با :

$$0.2 \text{ gr/dl} > 1 \text{ gr/dl} > 0.1 \text{ gr/dl}$$

و مقایسات دوجه دو نشان داد که لینالول در کلیه غلظت‌های مورد مطالعه اثر مهاری بر واکنش گللیکه شدن آلبومین در *in vitro* داشته است ( $P < 0.05$ ).

در مورد پولگون عبارتست از:

$$1 \text{ gr/dl} > 0.2 \text{ gr/dl} > 0.1 \text{ gr/dl}$$

و مقایسات دوجه دو نشان داد که منحصراً اثر پولگون 1 gr/dl بر میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین متفاوت از پولگون 0.1 gr/dl می‌باشد و در سایرین تفاوت دیده نشد و از نظر آماری معنی‌دار نبود.

تیمول > ژرانیول > لینالول > پولگون > تیمون

در غلظت 0.2 gr/dl :

تیمول > پولگون > ژرانیول > لینالول > تیمون

در غلظت 1 gr/dl :

لینالول > تیمون > پولگون > ژرانیول > تیمول

مقایسه دو به دوی ترکیبات مورد مطالعه در غلظت‌های فوق نشان داد که در غلظت 0.1 gr/dl تأثیر لینالول بر میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین متفاوت از ژرانیول نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ).

در غلظت 0.2 gr/dl تأثیر لینالول بر میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین متفاوت از تیمون نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ).

همچنین تأثیر پولگون بر میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین متفاوت از ژرانیول و تیمول نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ).

همچنین تأثیر پولگون بر میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین متفاوت از ژرانیول و تیمون نمی‌باشد.

**جدول شماره ۱- مقایسه اثر ترکیبات تشکیل دهنده روغن‌های فرار در میزان مهار واکنش گللیکه شدن آلبومین بر حسب غلظت‌های مختلف**

P. value	میزان مهار واکنش گللیکه شدن			انواع ترکیبات
	میزان مهار واکنش گللیکه شدن در غلظت 0.1 gr/dl Mean±SD	میزان مهار واکنش گللیکه شدن در غلظت 0.2 gr/dl Mean±SD	میزان مهار واکنش گللیکه شدن در غلظت 1 gr/dl Mean±SD	
$F_{(2,29)} = 21/298$ $P = 0.000$	62/451±3/98	85/730±0/53	76/022±6/63	لینالول
$F_{(2,29)} = 3/343$ $P = 0.049$	70/170±5/95	73/450±0/81	80/000±7/59	پولگون
$F_{(2,29)} = 260/674$ $P = 0.000$	61/052±4/39	76/840±2/30	87/017±1/95	ژرانیول
$F_{(2,29)} = 8/464$ $P = 0.001$	79/530±2/94	90/170±2/45	76/023±1/93	تیمون
$F_{(2,29)} = 198/03$ $P = 0.000$	23/620±5/68	68/530±7/57	94/035±2/53	تیمول
	$F_{(29,4)} = 69/018$ $P = 0.000$	$F_{(29,4)} = 12/276$ $P = 0.000$	$F_{(29,4)} = 9/488$ $P = 0.000$	P. value

در مورد ژرانیول به صورت زیر است :

$$1 \text{ gr/dl} > 0.2 \text{ gr/dl} > 0.1 \text{ gr/dl}$$

و مقایسات دویه دو نشان داد که در هر سه زوج غلظت ژرانیول تفاوت مشاهده شده بر روی مهار واکنش گلیکته شدن آلبومین معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ).

در مورد لیمون عبارتست از :

$$1 \text{ gr/dl} > 0.1 \text{ gr/dl} > 0.2 \text{ gr/dl}$$

مقایسات دویه دو نشان داد که میزان مهار واکنش گلیکته شدن آلبومین در لیمون 1 gr/dl متفاوت از لیمون 0.1 gr/dl نمی باشد. ولی در سایر مقایسات دویه دو تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار است.

در مورد تیمول به صورت زیر است :

$$1 \text{ gr/dl} > 0.2 \text{ gr/dl} > 0.1 \text{ gr/dl}$$

و مقایسه های دویه دو نشان داد که تفاوت مشاهده شده بر روی مهار واکنش گلیکته شدن آلبومین، در همه زوج غلظت های مورد مقایسه، معنی دار است ( $P < 0.05$ ).

## بحث

این مطالعه نشان داد برخی از ترکیبات تشکیل دهنده روغن های فرار بر واکنش گلیکاسیون آلبومین موثرند. روغن های فرار ترکیبات لیپوفنیلیک گیاهی هستند که شامل گروه های مختلفی می باشند. بسیاری از آنها دارای ساختمان فنلی هستند که توانایی واکنش مستقیم با برخی از پروتئین ها را دارند [۶].

در مطالعات گوناگونی که صورت گرفته فعالیت های مختلفی به آنها نسبت داده شده است از جمله آنتی اکسیدانی در برابر انواع واکنش های اکسیداسیون بیومولکول ها مثل لیپیدها،

پروتئین ها و ... [۷]، جمع کنندگی رادیکال های آزاد [۸]، مهار کنندگی واکنش تجمع پلاکت ها و تأثیر بر روی واکنش انتقال خون [۹] و کمک به تنظیم متابولیسم کربوهیدرات ها [۹]. اما گزارش های کمی در مورد تأثیرات آنها بر روی واکنش های گلیکاسیون پروتئین های مختلف به دست آمده و نتایج متناقضی حاصل گردیده است. مثلاً مطالعه انجام شده توسط Al hader و همکارانش نشان داد که روغن فرار گیاه اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis*) باعث کاهش آزاد شدن انسولین و افزایش گلیکاسیون پروتئین ها گردیدند [۱۰].

خلاف این امر نتایج حاصل از پژوهش های Delevs و همکارانش بود که نشان داد که روغن های فرار باعث کاهش گلیکاسیون پروتئین های نظیر هاپتوگلوبین گردید [۱۱].

یافته های حاصل از این تحقیق نشان داد که از بین ترکیبات مورد مطالعه یعنی تیمول، ژرانیول، لینالول، لیمون و پولگون، تیمول در غلظت 1 g/dl دارای بیشترین اثر مهاری بر روی گلیکاسیون آلبومین بود که این با نتایج پژوهش های Gigli و همکارانش کاملاً مطابقت داشت [۱۲].

علت بالا بودن قدرت مهار کنندگی تیمول بر روی واکنش گلیکاسیون آلبومین، مربوط است به رقابتی که این روغن فرار با گلوکز برای واکنش با آلبومین دارد. در واقع تیمول به خوبی در واکنش با عوامل آمین پروتئین آلبومین شرکت کرده و مانع از اتصال گلوکز به آن می شود و در نتیجه گلیکاسیون آلبومین به طور چشمگیری کاهش می یابد.

نتایج حاصل از این تحقیق، بیانگر این است که برخی فرآورده های گیاهی مثل روغن های فرار، می توانند با مهار یا کاهش گلیکاسیون پروتئین ها مثل آلبومین، احتمالاً مانع از عوارض ناشی از



کاهش واکنش عوارض ناشی از دیابت ملیتوس را داشته باشند مشخص گردد.

دیابت ملیتوس گردند. پیشنهاد می‌شود که این آزمایش‌ها به صورت *in vivo* نیز انجام گیرد تا مناسبترین غلظت روغن‌های فرار که توانایی مهار یا

## منابع

1. Thrope SR and Baynes JW. Role of the millard reaction in diabetes mellitus and disease of aging. *Drug* 1996; 9: 69-76
2. Hunt JV. Ascorbic acid and diabetes mellitus in subcellular biochemistry . 1995: VI: 25: Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical cell biology (Harris RJ: ed) , Plenum press New York 369-379.
3. Day JF, Ingebretsen CG, Ingebretsen 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: 524-7.
4. Wolff Simon P and Dean Rogert . Glucose antioxidation & protein modification: the potential role of antioxidation in diabetes. *Biochem. J.* 1987; 454: 243-50.
5. Dolhofer R and Wieland OH. Increased glycosylation / of serum albumin in diabetes mellitus. *Diabetes* 1980; 294: 17-22.
6. Dacut K. Study of the antioxidative activity of natural poly-phenolic using a model chain reaction oxidation. *Zdrawookhr Ka<sub>2</sub>* 1995; 2: 40-3.
7. صفری محمدرضا. مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های فرار، فلاونوئیدها و ویتامین C بر روی تمایل LDL طبیعی و اکسیده به رسپتور مربوطه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان . ۱۳۷۹: ۹۹-۹۰.
7. Liu GT. The protective action seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Phramacol.* 1992; 43: 147-53.
8. Dajvydova OB, Turova EA , Golovach AV. The use of white and yellow turpentine baths with diabetic patients. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult* 1998; 3: 3-10
9. Al hader AA , Hasan ZA , Agqel MB. Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects on Rosmarinus Offecinalis. *J. Ethnopharmacol.* 1994; 43: 217-21.
10. Delers F, Strecker G, Engler R. Glycosylation of chicken haptoglobin : isolation and characterization of three molecular variants and study their distribution in hen plasma before and after turpen induced inflammation. *Biochem. Cell Biol.* 1988; 66: 208-17.
11. Gigli G, Altomonte F, Bocca B, et al. Evaluation of a new immunoturbidimetry techniqe for measuring microalbuminuria. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1991; 67: 273-8.