Archive of SID

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

محمدرضا صفری[1*]، نسرین شیخ[2]، خسرو مانی کاشانی[3]

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 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 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 گلیکه شدن آلبومین در in vitro می‌باشد. بدین منظور در حضور غلظت‌های مختلف هریک از این ترکیبات، واکنش گلیکه شدن آلبومین به صورت in vitro انجام شد و با روش تیوباربیتوریک اسید مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج حاصل نشان داد که ترکیبات مورد مطالعه در غلظت‌های سه گانه g/dl ۱، g/dl ۰/۲ و g/dl ۰/۱ دارای اثر مهاری بر واکنش گلیکه شدن آلبومین می‌باشند و در این میان، تیمول در غلظت g/dl ۱ 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 شاخص ترین علامت کلینیکی آن افزایش قند خون می‌باشد که منجر به گلیکه شدن پروتئین‌های مختلف بدن می‌گردد [۱]. در نتیجه واکنش گلیکه 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 گلیکه شدن آلبومین زیاد می‌شود [٤]. واکنش گلیکه شدن آلبومین در حقیقت اتصال گروه آلدییدی قند با عوامل آمین آزاد موجود در ساختمان پروتئینی آلبومین است که به صورت آهسته انجام می‌گیرد. برای تشخیص آلبومین گلیکه شده، راه‌های مختلفی وجود دارد که یکی از مرسوم ترین آنها، روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) است. این معرف با محصولات حاصل از واکنش گلیکه شدن آلبومین ترکیب می‌شود و تولید ماده‌ای با حداکثر جذب در طول موج ٤٤٣ نانومتر می‌کند [٥]. میزان گلیکه 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 گلیکه شدن پروتئین‌ها می‌شود و این امر سبب تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها می‌گردد لزوم مهار واکنش گلیکه شدن پروتئین‌ها، به شدت احساس می‌شود. سالها است که توجه محققین بر روی یافتن ترکیباتی که مانع از گلیکه 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 ٥ ترکیب موجود در اسانس‌ها به نام‌های: پولگون (Pulegone)، تیمول (Thymol)، ژرانیول (Geraniol)، لیمونن (Limonene) و لینالول (Linalool) بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین به روش in vitro مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

الف ـ مواد مورد استفاده

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

ب ـ روش آزمایش

۱- انجام واکنش گلیکه شدن آلبومین

به یک میلی‌لیتر محلول ٥ گرم درصد آلبومین مقدار یک میلی‌لیتر محلول۳۰۰۰mg/۱۰۰ml گلوکز اضافه شد و جهت جلوگیری از هر نوع آلودگی محیط، جنتامایسین با غلظت ۲۰mg/۱۰۰ml در بافر فسفات (۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤) اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اطاق جهت انجام انکوباسیون به طور ثابت قرار گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون در بافر فسفات دیالیز گردید (قبلاً کیسه دیالیز در محلول EDTA µmol ۱۰ آماده شده بود).

www.SID.ir

Archive of SID

۲- اندازه گیری 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 ۳۰۰۰rpm 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 درحرارت آزمایشگاه، به هر لوله نیم میلی‌لیتر TCA با غلظت ٤٠ درصد اضافه نموده و بعد از سانتریفوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰rpm، 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 ٤٠ درجه در بن ماری قرار گرفت. در پایان جذب نمونه در طول موج ٤٤٣ نانومتر اندازه‌گیری شد .

۳- تهیه محلول استوک از هریک از ترکیبات

مقدار ۰/۱ گرم از هریک ازترکیبات مورد مصرف را در ۱۰ml 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 گلیکه شدن آلبومین

از محلول استوک هر یک از ترکیبات فرار، سه رقت شامل۱ 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 ٥ درصد و یک میلی‌لیتر گلوکز ۳۰۰۰ g/۱۰۰ 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، 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 ـ 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 گلیکه 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 گلیکه شدن آلبومین از تست TBA استفاده گردید. آزمون ANOVA دو طرفه نشان داد که اختلاف در میزان مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین در ترکیبات مختلف به عنوان تابعی از غلظت آنها تغییر می‌کند.

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

نتایج حاصل از اثرات ترکیبات فوق در جدول شماره ۱ آمده است. مطابق این جدول، تیمول در غلظت gr/dl ۱ دارای بیشترین مهار (۹٤ درصد) بود. همچنین لیمونن در غلظت ۰/۲gr/dl به میزان قابل توجهی (۹۰ درصد) باعث مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین گردید. ترتیب اثرات ترکیبات مورد نظر بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ و ۱ گرم درصد میلی‌لیتر به صورت‌های زیر آمده است.

در غلظت ۰/۱gr/dl:

www.SID.ir

Archive of SID

تیمول < ژرانیول< لینالول< پولگون< لیمونن

در غلظت ۰/۲ gr/dl:

تیمول < پولگون< ژرانیول< لینالول<لیمونن

در غلظت ۱ gr/dl:

لینالول< لیمونن< پولگون< ژرانیول< تیمول

مقایسه دو به دوی ترکیبات مورد مطالعه در غلظت‌های فوق نشان داد که در غلظت ۰/۱ gr/dl تأثیر لینالول بر میزان مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین متفاوت از ژرانیول نمی‌باشد (P>۰/۰۵).

در غلظت ۰/۲gr/dl تأثیر لینالول بر میزان مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین متفاوت از لیمونن نمی‌باشد (P>۰/۰۵).

همچنین تأثیر پولگون بر میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن آلبومین متفاوت از ژرانیول و تیمول نمی‌باشد (P>۰/۰۵).

همچنین تأثیر پولگون بر میزان مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین متفاوت از ژرانیول و لیمونن نمی‌باشد.

از طرف دیگر تأثیر ژرانیول بر میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن 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 گلیکه شدن آلبومین بر حسب غلظت برابر است با :

۰/۲ gr/dl > ۱ gr/dl > ۰/۱ gr/dl

و مقایسات دوبه دو نشان داد که لینالول در کلیه غلظت‌های مورد مطالعه اثر مهاری بر واکنش گلیکه شدن آلبومین در in vitro داشته است (P<۰/۰۵).

در مورد پولگون عبارتست از:

۱ gr/dl > ۰/۲ gr/dl > ۰/۱ gr/dl

و مقایسات دوبه دو نشان داد که منحصراً اثر پولگون ۱ gr/dl بر میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن آلبومین متفاوت از پولگون ۰/۱ gr/dl می‌باشد و در سایرین تفاوت دیده نشد و از نظر آماری معنی‌دار نبود.

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

انواع ترکیبات	میزان مهار واکنش گلیکه شدن در غلظت ۱ gr/dl Mean±SD	میزان مهار واکنش گلیکه شدن در غلظت ۰/۲ gr/dl Mean±SD	میزان مهار واکنش گلیکه شدن در غلظت ۰/۱ gr/dl Mean±SD	P. value
لینالول	۷۶/۰۲۳±۶/۶۳	۸۵/۷۳۰±۰/۵۳	۶۲/۴۵۱±۳/۹۸	$F_{(۲,۲۹)}$ =۲۱/۲۹۸ P= ۰/۰۰۰
پولگون	۸۰/۰۰۰± ۷/۵۹	۷۳/۴۵۰±۰/۸۱	۷۰/۱۷۰±۵/۹۵	$F_{(۲,۲۹)}$ =۳/۳۴۳ P= ۰/۰۴۹
ژرانیول	۸۷/۰۱۷±۱/۹۵	۷۶/۸۴۰±۲/۳۰	۶۱/۰۵۲±۴/۳۹	$F_{(۲,۲۹)}$ =۲۶۰/۶۷۴ P= ۰/۰۰۰
لیمونن	۷۶/۰۲۳±۱/۹۳	۹۰/۱۷۰±۲/۴۵	۷۹/۵۳۰±۲/۹۴	$F_{(۲,۲۹)}$ =۸/۴۶۴ P= ۰/۰۰۱
تیمول	۹۴/۰۳۵±۲/۵۳	۶۸/۵۳۰±۷/۵۷	۲۳/۶۲۰±۵/۶۸	$F_{(۲,۲۹)}$ =۱۹۸/۰۳ P= ۰/۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

P.value	$F_{(۲۹،٤)}$=۹/٤۸۸ P=۰/۰۰۰	$F_{(۲۹،٤)}$=۱۲/۲۷٦ P=۰/۰۰۰	$F_{(۲۹،٤)}$=٦۹/۰۱۸ P=۰/۰۰۰

در مورد ژرانیول به صورت زیر است :

۱ gr/dl > ۰/۲ gr/dl > ۰/۱ gr/dl

و مقایسات دوبه دو نشان داد که در هر سه زوج غلظت ژرانیول تفاوت مشاهده شده بر روی مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

در مورد لیمونن عبارتست از :

۰/۲ gr/dl > ۰/۱ gr/dl > ۱ gr/dl

مقایسات دوبه دو نشان داد که میزان مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین در لیمونن ۱gr/dl متفاوت از لیمونن ۰/۱ gr/dl نمی‌باشد. ولی در سایر مقایسات دوبه دو تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار است.

در مورد تیمول به صورت زیر است :

۱ gr/dl > ۰/۲ gr/dl > ۰/۱ gr/dl

و مقایسه‌های دوبه دو نشان داد که تفاوت مشاهده شده بر روی مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین، در همه زوج غلظت‌های مورد مقایسه، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بحث

این مطالعه نشان داد برخی از ترکیبات تشکیل دهنده روغن‌های فرار بر واکنش گلیکاسیون آلبومین موثرند. روغن‌های فرار ترکیبات لیپوفنیلیک گیاهی هستند که شامل گروه‌های مختلفی می‌باشند. بسیاری از آنها دارای ساختمان فنلی هستند که توانایی واکنش مستقیم با برخی از پروتئین‌ها را دارند [٦].

در مطالعات گوناگونی که صورت گرفته فعالیت‌های مختلفی به آنها نسبت داده شده است از جمله آنتی‌اکسیدانی در برابر انواع واکنش‌های اکسیداسیون بیومولکول‌ها مثل لیپیدها، پروتئین‌ها و . . . [۷]، جمع کنندگی رادیکال‌های آزاد [۸]، مهارکنندگی واکنش تجمع پلاکت‌ها و تأثیر بر روی واکنش انتقال خون [۹] و کمک به تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها [۹]. اما گزارش‌های کمی در مورد تأثیرات آنها بر روی واکنش‌های گلیکاسیون پروتئین‌های 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 پروتئین‌ها گردیدند [۱۰].

خلاف این امر نتایج حاصل از پژوهش‌های Delevs و همکارانش بود که نشان داد که روغن‌های فرار باعث کاهش گلیکاسیون پروتئین‌هایی نظیر هاپتوگلوبین گردید [۱۱].

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که از بین ترکیبات مورد مطالعه یعنی تیمول، ژرانیول، لینالول، لیمونن و پولگون، تیمول در غلظت ۱ g/dl دارای بیشترین اثر مهاری بر روی گلیکاسیون آلبومین بود که این با نتایج پژوهش‌های Gigli و همکارانش کاملاً مطابقت داشت [۱۲].

علت بالا بودن قدرت مهارکنندگی 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

www.SID.ir

Archive of SID

اتصال گلوکز به آن می‌شود و در نتیجه گلیکاسیون آلبومین به طور چشمگیری کاهش می‌یابد.

نتایج حاصل از این تحقیق، بیانگر این است که برخی فرآورده‌های گیاهی مثل روغن‌های فرار، می‌توانند با مهار یا کاهش گلیکاسیون پروتئین‌ها مثل آلبومین، احتمالاً مانع از عوارض ناشی از دیابت ملیتوس گردند. پیشنهاد می‌شود که این آزمایش‌ها به صورت in vivo نیز انجام گیرد تا مناسب‌ترین غلظت روغن‌های فرار که توانایی مهار یا کاهش واکنش عوارض ناشی از دیابت ملیتوس را داشته باشند مشخص گردد.

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 ascid and diabetes mellitus in subcellular biochemistry . 1995: Vl 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 antioxidantive activity of natural poly-phenolic using a model chain reaction oxidation. *Zdrawookhr Ka*$_2$ 1995; 2: 40-3.

۷. صفری محمدرضا. مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های فرار، فلاونوییدها و ویتامین C بر روی تمایل LDL طبیعی و اکسیده به رسپتور مربوطه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان . ۱۳۷۹: ۹۰-۹۹.

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. Ethnopharmocol.* 1994; 43: 217-21.

10. Delers F, Strecker G, Engler R. Glycosylation of chiken 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.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir