تأثیر عصاره ساقه گیلاس وحشی بر واکنش گلیکه شدن آلبومین

محدثه عبدلی[1]*؛ امیرقریب[2]؛ زهره فائزی زاده[2]

چکیده

زمینه: گلیکه شدن غیرآنزیمی پروتئین‌ها عمده‌ترین عامل بروز عوارض دیابت شیرین می‌باشد. مهار روند گلیکه شدن می‌تواند باعث کاهش عوارض دیابت گردد. در طب سنتی ایران جوشانده ساقه گیلاس وحشی به‌عنوان یک عامل کاهنده قند خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات مهاری عصاره اتانولی، آبی و جوشانده ساقه گیلاس وحشی بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین بود.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا عصاره اتانولی، آبی و جوشانده ساقه گیلاس وحشی تهیه گردید. سپس از عصاره‌های مذکور غلظت‌های مختلف تهیه شد و به محلول آلبومین و گلوکز اضافه گردید. سرانجام درصد گلیکه شدن آلبومین در گروه‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها نسبت به گروه شاهد که هیچ غلظتی از عصاره‌های تهیه شده را دریافت نکرده بود، به کمک روش اسیدتیو باربیتوریک مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: در مقایسه با گروه شاهد، جوشانده ساقه گیلاس وحشی در غلظت‌های 20، 10 و 2 میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌ترتیب مقدار آلبومین گلیکه شده را به مقدار 1/55±85/10، 1/75±72/35 و 1/22±51/25 درصد کاهش داد (P<0/001). علاوه بر این در غلظت 20 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، اثر مهاری جوشانده ساقه گیلاس وحشی بر گلیکه شدن آلبومین نسبت به عصاره تهیه شده با آب مقطر سرد (P=0/021) و اتانول (P=0/009) بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: عصاره ساقه گیلاس وحشی به ویژه به شکل جوشانده می‌تواند میزان گلیکه شدن آلبومین را به‌مقدار قابل‌توجهی کاهش دهد و بنابراین می‌تواند جهت کاهش عوارض دیابت شیرین مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: گیلاس وحشی، آلبومین، گلیکه شدن، برون تن

«دریافت: 1393/3/17 پذیرش: 1393/7/8»

1. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان

2. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد

* **عهده‌دار مکاتبات:** بروجرد، خیابان مدرس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، گروه زیست شناسی، کد پستی775-14515، تلفن: 066-42500201، 09183884937 Email:mohadeseabdoli@yahoo.com

مقدمه

گیلاس وحشی یک گونه از خانواده گل سرخ (Rosaceae) محسوب شده و به‌طور طبیعی در نقاط مختلف قاره اروپا، آفریقا و آسیا، در کشورهایی نظیر ترکیه، انگلستان، مراکش، قزاقستان و ایران یافت می‌شود (1 و 2). بخش‌های مختلف این گیاه حاوی مواد آنتی‌اکسیدان، از جمله ترکیبات فنلی، آلکالوئیدی و فلاونوئیدی است و می‌تواند خطر بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو از جمله سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی را کاهش دهد (3 و 4). همچنین ترکیبات موجود سبب کاهش چربی پلاسما می‌شود (5 و 6). در طب سنتی ایران جوشانده ساقه این گیاه برای کاهش فشارخون، اِدِم و دفع سنگ کلیه استفاده می‌گردد (7). مشخص شده که عصاره ساقه گیلاس وحشی ادرارآور است. این اثر را مربوط به محتویات فلاونوئیدی و پتاسیم موجود در آن می‌دانند (8 و 9). همچنین این عصاره می‌تواند سبب کاهش التهابات گردد و بر روی سیستم قلبی- عروقی و نیز عضلات صاف اثر محافظتی

دارد (10 و 11).

دیابت شیرین یک بیماری اندوکرینی شایع است که در اثر عدم کنترل می‌تواند صدمات جدی را به نواحی مختلف بدن از جمله کلیه‌ها، سیستم قلبی- عروقی، عصبی و بینایی وارد نماید (12). شواهد در مورد آزمایش‌های برون‌تن و درون‌تن نشان می‌دهد که در دیابت شیرین افزایش قندخون عامل اصلی بروز این گونه عوارض مهلک است (13). به‌نظر می‌رسد که در این ارتباط، گلیکه شدن غیرآنزیمی پروتئین‌ها نقش مهمی را در پیشرفت این عوارض ایفا نماید (14). به‌طور طبیعی به‌دلیل افزایش طولانی‌مدت گلوکز خون، مقدار درصد پروتئین‌های گلیکه‌شده به‌صورت مداوم افزایش می‌یابد که خود می‌تواند سبب تغییرات ساختمانی و عملکردی در پروتئین‌های مذکور گردد (15). جلوگیری از واکنش گلیکه شدن پروتئین‌ها می‌تواند به‌عنوان عاملی مؤثر در کاهش عوارض بیماری دیابت شیرین محسوب گردد (13). به‌همین دلیل در علم پزشکی استفاده از مهارکننده جهت جلوگیری از گلیکه شدن پروتئینها بسیار مورد توجه بوده و از دیر باز تاکنون از این‌گونه ترکیبات به‌عنوان عوامل درمانی و کنترلی در بیماران مبتلا به دیابت شیرین استفاده می‌شود (16). امروزه شناسایی ترکیباتی که می‌توانند سبب مهار گلیکه شدن پروتئینها گردند، مورد توجه و علاقه بسیاری از محققان در سرتاسر دنیا است (17). با توجه به این‌که تاکنون اثر عصاره ساقه گیلاس وحشی در جلوگیری از گلیکه شدن آلبومین مورد بررسی قرار نگرفته است در این تحقیق به بررسی اثر عصاره اتانولی، آبی و نیز جوشانده ساقه گیلاس وحشی در مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

مواد: چوب گیلاس وحشی از مناطق اطراف خرم‌آباد جمع‌آوری گردید و کلیه محلول‌های مورد استفاده از مواد شیمیایی خریداری شده از دو شرکت مرک و سیگما تهیه شد.

روش آزمایش: در این مطالعه تجربی، آزمایش‌های انجام‌گرفته مطابق با روش‌های استفاده شده در مطالعات قبلی انجام شد (17 و 18) و شامل موارد ذیل بود:

الف- واکنش گلیکه شدن آلبومین: به یک میلی‌لیتر محلول 5 درصد آلبومین یک میلی‌لیتر محلول 3 گرم درصد میلی‌لیتر گلوکز اضافه گردید. جهت جلوگیری از هرگونه آلودگی، به این محلول یک میلی‌لیتر محلول جنتامایسین با غلظت 50 میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر اضافه شد. سپس محلول مذکور برای 72 ساعت در بن‌ماری (شرکت پایا پژوهش، ایران) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از گذشت این زمان محلول مذکور با استفاده از کیسه دیالیز در مقابل 20 میلی‌لیتر بافر فسفات (0/01 مولار و pH معادل 7/4) دیالیز شد. لازم به ذکر است که کیسه دیالیز مذکور قبل از استفاده با محلول اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA)، 10 میلی‌مولار فعال شده بود.

ب- اندازه‌گیری میزان گلیکه شدن آلبومین: این عمل با استفاده از تست تیوباربیتوریک اسید (TBA) انجام شد (15). بدین‌منظور به محلول به‌دست‌آمده از قسمت فوق یک میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک 20 درصد افزوده شد. سپس محلول حاصل سانتریفوژ (شرکت اپندورف، آلمان) گردید و محلول رویی آن دور ریخته شد. در ادامه به رسوب به‌دست‌آمده 0/5 میلی‌لیتر بافر فسفات (0/01 مولار و pH معادل 7/4) و 0/5 میلی‌لیتر اسیداگزالیک 0/3 نرمال افزوده و به‌مدت یک ساعت در بن‌ماری 100 درجه قرار داده شد. سپس به هر لوله 0/5 میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک 40 درصد اضافه گردید و بعد از آن عمل سانتریفوژ انجام شد. سپس محلول رویی با پی‌پت پاستور جدا و به یک میلی‌لیتر از آن 0/5 میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک 0/05 مولار اضافه گردید. سپس نیم‌ساعت در دمای 40 درجه قرار داده شد و در نهایت جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی- ماوراء بنفش (شرکت شیمیدزو، ژاپن) در طول موج 443 نانومتر قرائت شد.

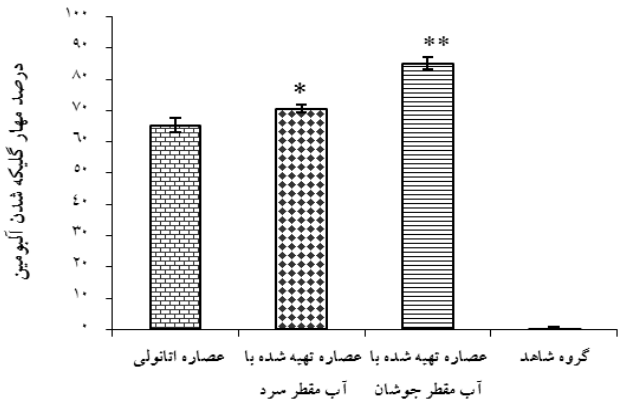
ج- تهیه عصاره و جوشانده ساقه گیلاس وحشی: عصاره اتانولی و آبی ساقه گیلاس وحشی با قرار دادن 100 گرم از ساقه گیلاس در 600 میلی‌لیتراز هر یک از حلال‌های مذکور تهیه شد. محلول جوشانده نیز از قرار دادن 100 گرم از ساقه گیلاس در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر جوشان و رسیدن حجم نهایی آن به 600 میلی لیتر تهیه شد. سپس محلول‌های مذکور با استفاده از کاغذ صافی یکنواخت گردیدند. در مرحله بعد به کمک پیکنومتر غلظت عصاره‌های استخراج‌شده اندازه‌گیری شد و سپس از آن‌ها به‌کمک رقیق‌سازی با آب مقطر دیونیزه غلظت‌های 20، 10 و 2 میلی‌گرم در دسی‌لیتر تهیه شد.

د- بررسی تأثیر عصاره‌های اتانولی و آبی و نیز جوشانده ساقه گیلاس وحشی بر واکنش گلیکه شدن آلبومین: جهت انجام این عمل، به محلولی که حاوی 1 میلی لیتر محلول آلبومین 5 درصد و 1 میلی‌لیتر گلوکز 3 گرم درصد بود 1 میلی‌لیتر از هر عصاره با غلظت‌های مختلف (20، 10 و 2 میلی‌گرم در دسی‌لیتر) اضافه شد و به مدت 72 ساعت در حرارت آزمایشگاه انکوبه گردید. برای تعیین میزان اثر هریک از غلظت‌های مختلف، تست TBA مطابق روش "ب" انجام گرفت و جهت اطمینان از به‌دست آوردن نتایج قابل قبول هر آزمایش 3 بار تکرار شد. در مورد گروه شاهد نیز به محلول حاوی 1 میلی‌لیتر آلبومین 5 درصد و 1 میلی‌لیتر گلوکز 3 گرم درصد، به جای افزودن 1 میلی‌لیتر از عصاره‌های مذکور مقدار 1 میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و همانند گروه‌های تیمار شده مورد آزمایش قرار گرفت.

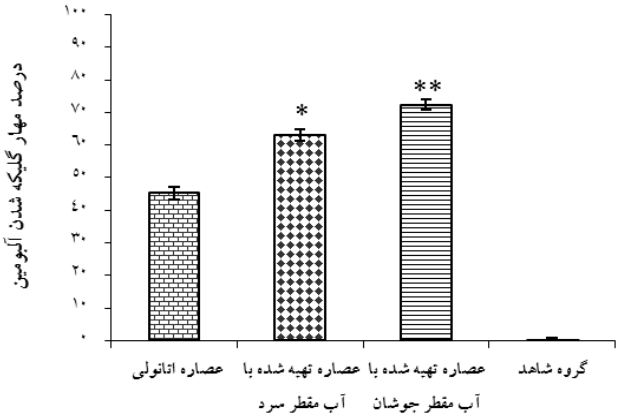
هـ- تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت مقایسه میزان گلیکه شدن آلبومین در بین گروه‌های مورد مطالعه تست آنالیز واریانس (ANOVA) مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

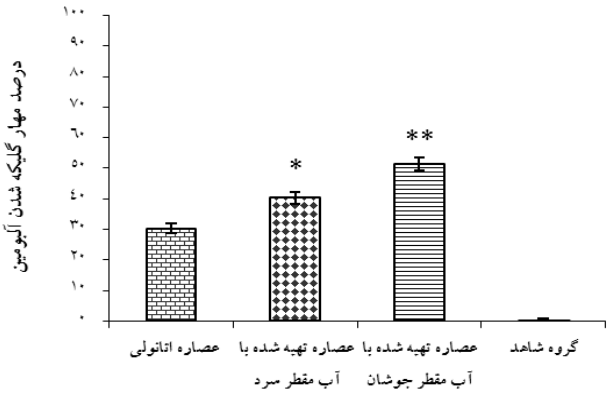
در این تحقیق در مقایسه با گروه شاهد اثر سه غلظت 20، 10 و 2 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر عصاره اتانولی، آبی و نیز جوشانده ساقه گیلاس وحشی بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین بررسی گردید. همچنِن اثر هر سه نوع عصاره بر مهار گلیکه شدن آلبومین مورد مقایسه قرار گرفت. در مقایسه با گروه شاهد محلول جوشانده در غلظت 20 میلی‌گرم در دسی‌لیتر دارای بیشترین اثر مهاری (85/10±1/55%) و عصاره اتانولی با همین غلظت دارای کم‌ترین اثر مهارکنندگی (65/20±1/50%) بر روی واکنش گلیکه شدن آلبومین می‌باشد (نمودار 1). در تمام غلظت‌های مورد مطالعه، میزان درصد مهار گلیکه شدن آلبومین توسط جوشانده ساقه گیلاس



نمودار 1- مقایسه اثر عصاره اتانولی و آبی و نیز جوشانده ساقه گیلاس وحشی در غلظت 20 میلی‌گرم در دسی‌لیتر بر مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین. [*اختلاف معنادار بین گروه تیمارشده با عصاره تهیه شده با آب مقطر سرد و عصاره اتانولی (P=0/035) ، **اختلاف معنادار بین گروه تیمار شده با عصاره تهیه‌شده با آب مقطر جوشان و عصاره اتانولی (P=0/009)].



نمودار2- مقایسه اثر عصاره اتانولی و تهیه‌شده با آب مقطر سرد و جوشان چوب گیلاس وحشی در غلظت **10** میلی‌گرم در دسی‌لیتر بر مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین. [*اختلاف معنادار بین گروه تیمارشده با عصاره تهیه‌شده با آب مقطر سرد و عصاره اتانولی (P=**0/017**) ، **اختلاف معنادار بین گروه تیمار شده با عصاره تهیه‌شده با آب مقطر جوشان و عصاره اتانولی (P=**0/001**)].



نمودار 3- مقایسه اثر عصاره اتانولی و تهیه شده با آب مقطر سرد و جوشان چوب گیلاس وحشی در غلظت **2** میلی‌گرم در دسی لیتر بر مهار واکنش گلیکه شدن آلبومین. [*اختلاف معنادار بین گروه تیمار شده با عصاره تهیه‌شده با آب مقطر سرد و عصاره اتانولی (P=**0/025**)، **اختلاف معنادار بین گروه تیمار شده با عصاره تهیه‌شده با آب مقطر جوشان و عصاره اتانولی (P=**0/008**)].

وحشی نسبت به دو نوع عصاره دیگر کاملاً معنادار بوده و نیز اثر ضد گلیکاسیونی عصاره آبی نسبت به عصاره اتانولی معنادار می‌باشد (نمودار **2** و **3**).

بحث

در بیماری دیابت شیرین به‌دلیل افزایش میزان قند خون، پروتئین‌های بدن به‌صورت غیرآنزیمی با اتصال به گلوکز به حالت گلیکه درآمده و با گذشت زمان موجب تظاهرات دیررس این بیماری می‌شوند (**16**). در این نوع واکنش اتصال گروه آلدئیدی قند به عوامل آمین آزاد موجود در ساختار پروتئین صورت می‌گیرد (**17**). عوامل مختلفی مانند از جمله می‌توان به غلظت قند و پروتئین و نیز عوامل محیطی مؤثر روی میزان گلیکه شدن پروتئینها مؤثرند (**18**). تاکنون مطالعه‌های مختلفی در ارتباط با عوامل مؤثر بر روی گلیکه شدن پروتئین‌های سرم خون انجام شده است. در مطالعه‌ای که روی زردچوبه، هل و زنجبیل انجام شد، ثابت گردید که عصاره این گیاهان باعث کاهش درصد گلیکه شدن آلبومین در آزمایشگاه می‌شود (**19**). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که برخی از روغن‌های فرار گیاهی نظیر

پولگون، تیمول، ژرانیول و لیمونن سبب کاهش گلیکه شدن آلبومین در شرایط آزمایشگاهی می‌شود و در این میان تیمول با غلظت 0/5 گرم بر لیتر دارای بیشترین اثر مهاری در این زمینه است (20). در مطالعه‌ای دیگر کاهش اتصال غیرآنزیمی گلوکز به آلبومین در حضور دارچین، سماق و فلفل گزارش شده است (21).

در پژوهشی دیگر توسط عسگری و همکاران اثر فلاونوئیدهای مختلف نظیر روتین، کامفرول، کوئرستین و مورین بر گلیکه شدن آلبومین، هموگلوبین و انسولین در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است (22). همچنین نادری و همکارانش نشان دادند که زردچوبه سبب کاهش اتصال غیرآنزیمی گلوکز به آلبومین می‌گردد درحالی‌که در مورد زعفران چنین اثری وجود ندارد (23). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره ساقه گیلاس وحشی می‌تواند موجب مهار یا کاهش گلیکه شدن آلبومین گردد. شاید دلیل این امر ناشی از رقابت ترکیبات مؤثر موجود در آن برای واکنش با آلبومین باشد که در مورد سایر ترکیبات گیاهی نیز مشاهده گردیده است (19 و 20). تاکنون تحقیقات مختلفی بر روی خواص ساقه گیلاس وحشی انجام شده است. نتایج این تحقیقات نشان داده که عصاره ساقه این گیاه باعث کم شدن عوارض مختلف بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود (10). Bursal و همکارانش نشان دادند که عصاره‌های آبی و اتانولی استخراج‌شده از ساقه گیلاس وحشی دارای ترکیبات ضد رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدانی است (24).

نتیجه‌گیری

عصاره‌های تهیه‌شده از آلبومین توسط عصاره ساقه گیلاس وحشی به‌ویژه به شکل جوشانده، می‌تواند در از بین بردن عوارض دیابت نقش مؤثری را ایفا نمایند. با توجه به مثبت بودن نتایج آزمایش پیشنهاد می‌گردد که تأثیر این عصاره‌ها در مهار گلیکه شدن پروتئین‌ها به‌صورت درون‌تن (in vivo) نیز انجام گیرد تا در صورت امکان بتوان عصاره ساقه گیلاس وحشی را به‌عنوان محلول جلوگیری‌کننده از عوارض دیابت شیرین معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی بوده که با حمایت مالی باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم می‌آورند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Ferretti G, Bacchetti T, Belleggia A, Neri D. Cherry antioxidants: from farm to table. Molecules. 2010;15(10):6993-7005.
2. McCune LM, Kubota C, Stendell-Hollis NR, Thomson CA. Cherries and health: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2011;51(1):1-12.
3. Serra AT, Duarte RO, Bronze MR, Duarte CMM. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. Food Chem. 2011;125:318-25.
4. Ballistreri G, Continella A, Gentile A, Amenta M, Fabroni S, Rapisarda P. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars grown in Italy. Food Chem. 2013;140(4):630-8.
5. Prior RL, Gu L, Wu X, Jacob RA, Sotoudeh G, Kader AA, Cook RA. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. J Am Coll Nutr. 2007;26(2):170-81.
6. Jacob RA, Spinozzi GM, Simon VA, Kelley DS, Prior RL, Hess-Pierce B, Kader AA. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. J Nutr. 2003;133(6):1826-9.
7. Hooman N, Mojab F, Nickavar B, Pouryousefi-Kermani P. Diuretic effect of powdered Cerasus avium (cherry) tails on healthy volunteers. Pak J Pharm Sci. 2009;22(4):381-3.

8. Amin GR. [Popular traditional medicinal plants of Iran (Persian)]. Tehran: Research Deputy of Tehran University of Medical Sciences. 2005;152-3.
9. Blazsó G, Gábor M. Anti-inflammatory effects of cherry (Prunus avium L.) stalk extract. Pharmazie. 1994;49(7):540-1.
10. Hetényi E, Vályi-Nagy T. Pharmacology of cherry (Prunus avium) stalk extract. II. Cardiovascular effects. Acta Physiol Acad Sci Hung. 1969;35(2):189-97.
11. Hetényi E, Vályi-Nagy T. Pharmacology of cherry (Prunus avium) stalk extract. I. Effect on smooth muscle. Acta Physiol Acad Sci Hung. 1969;35(2):183-8.
12. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. Korean J Physiol Pharmacol. 2014;18(1):1-14.
13. Povichit N, Phrutivorapongkul A, Suttajit M, Chaiyasut CC, Leelapornpisid P. Phenolic content and in vitro inhibitory effects on oxidation and protein glycation of some Thai medicinal plants. Pak J Pharm Sci. 2010;23(4):403-8.
14. Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. Biochim Biophys Acta. 2013;1830(12):5509-14.
15. Grzebyk E, Piwowar A. Glycoxidative modification of albumin in medical research. Pol Merkur Lekarski. 2013;34(202):239-42.
16. Xu W, Chen L, Shao R. Influence of glycation of plasma proteins in diabetes on the binding interaction with polyphenols. Curr Drug Metab. 2014;15(1):116-9.
17. Gharib A, Faezizadeh Z, Godarzee M. Treatment of diabetes in the mouse model by delphinidin and cyanidin hydrochloride in free and liposomal forms. Planta Med. 2013;79(17):1599-604.
18. Sheikh N, Safari MR, Mani Kashani Kh, Araghchian M, Zeraati F. Study on the effect of garlic on the in vitro albumin glycation reaction. Acta Medica Iranica. 2004;42(1):16-18.
19. Sheykh N, Safari M, Mani Kashani Kh, Araghchian M, Zeraati F, Malakouti SM. [The effect of turmeric, cardamom and ginger on in vitro albumin glycation (Persian)]. Sci J Hamadan Med Sci Health. 2004;10(4):47-50.
20. Safari M, Sheykh N, Mani Kashani Kh. Effect of some essential oils on albumin glycation in vitro. J Med Plants. 2002;1(3):79-83.
21. Sheykh N, Safari M, Araghchian M, Zeraati F. The effect of somac, cinnamonun and black pepper on albumin glycation in vitro. J Med Plants. 2003;2(7):13-8.
22. Asgary S, Naderi Gh, Gharipoor M. [The effect of some flavonoids on in vitro non-enzymatic glycosylation of proteins (Persian)]. J Kermanshah Univ Med Sci. 2004;8(1):1-9.
23. Naderi Gh, Asgary S, Taher M, Sabet B, Nikkhoo N. Antioxidant effect of turmeric and saffron on the oxidation of hepatocytes, LDL and non-enzymatic glycation of hemoglobin. J Med Plants. 2005;16(4):29-35.
24. Bursal E, Köksal E, Gülçin I, Bilsel G; Gören AC. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (Cerasus avium L.) determined by LC–MS/MS. Food Res Int. 2013;51(1):66-74.