Studying some of the biological effects of some commercially available dietary supplements containing grape seed extract in type2 diabetic patients

Dr. Zeinab Sarem*
Dr. Areej Bobo**
Dima Mayhoub***

(Received 9 / 5 / 2023. Accepted 28 / 6 / 2023)

□ ABSTRACT □

This study aims to determine the total content of phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of a preparation containing (500 mg) of *Vitis Vinifera* red grape seed extract (GSE) marketed by a local pharmaceutical company, in addition to evaluating the effect of its administration combined with metformin as an oral hypoglycemicdrug on serum levels of some biomarkers such as fasting blood glucose, C-reactive protein, Lipid profile in newly diagnosed patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). The 53 patients attending the endocrinology department at Tishreen University Hospital in Lattakia were divided into two groups, the participant group (n = 25) who were treated with metformin as a hypoglycemic in combination with a grape seed extract preparation (500 mg) once daily and the control group (n = 28) who were treated with metformin only. The total content of phenolic compounds of the studied product, measured using the Folin Ciocalto method and expressed as (gallic acid equivalents GAE), was (48.5 ± 2.07 mg GAE/500 mg GSE), while the antioxidant activity of the studied product measured by the Reducing Power method, expressed by the molar concentration of ferrous sulfate was (245.86 ± 12.02 µmol Fe^{+2}/500 mg GSE).

Taking a grape seed extract preparation once daily for 12 weeks resulted in a statistically significant decrease in mean levels of fasting blood glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol, and C-reactive protein (17.35%, 16.03%, 15.31%, 54.36% respectively). The mean value of triglyceride levels decreased, while and the mean value of high-density lipoprotein cholesterol HDL levels increased without statistical significance at the end of the study between and within two groups.

Key words: Diabetes Mellitus, Grape seed extract, Phenolic compounds, Antioxidants, Clinical trials.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

***Assistant Professor, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Syria.**
****Assistant Professor, Faculty of Medicine, Tishreen University, Syria.**
*****Postgraduate Student, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Syria.**

دراسة بعض التأثيرات الحيوية للمكملات الغذائية الحاوية على بذور العنب والمتوافرة تجارياً لدى مرضى السكري من النمط الثاني

د. زينب صارم*

د. أريج بوبو**

ديمه علي ميهوب***

(تاريخ الإيداع 9 / 5 / 2023. قبل للنشر في 28 / 6 / 2023)

□ ملخّص □

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد كل من المحتوى الكلي من المركبات الفينولية والفعالية المضادة للأكسدة مخبرياً لمستحضر حاو على (500 mg) من خلاصة مستخلص بذور العنب الأحمر *Vitis Vinifera* والمسوق من قبل إحدى الشركات الصيدلانية المحلية، إضافةً إلى تقييم تأثير مشاركة هذا المستحضر مع دواء الميتفورمين كخافض فموي لغلوكوز الدم على المستويات المصلية لبعض المشعرات الحيوية كمستويات الغلوكوز الصيامية، البروتين التفاعلي C، والصيغة اللبيدية لدى مرضى الداء السكري من النمط الثاني المشخّصين حديثاً. تم تقسيم المرضى المشاركين في الدراسة البالغ عددهم 53 مريضاً من المرضى المراجعين لقسم الغدد الصم في مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية إلى مجموعتين، مجموعة المشاركة (n=25) وتم وضعهم على الميتفورمين كخافض لغلوكوز الدم بالمشاركة مع مستحضر بذور العنب بجرعة (500 mg) لمرة واحدة يومياً ومجموعة الشاهد (n=28) الذين تم وضعهم على الميتفورمين فقط. بلغ المحتوى الكلي من المركبات الفينولية للمستحضر المدروس بطريقة الفولين سيوكالتو معبراً عنها بمكافئات حمض الغاليك (Gallic Acid Equivalents GAE) (48.5 ± 2.07 mg GAE/500 mg GSE)، بينما بلغت الفعالية المضادة للأكسدة للمستحضر المدروس المقاسة بطريقة القدرة الإرجاعية (Reducing Power) معبراً عنها بالتركيز المولي لكبريتات الحديدي (245.86 ± 12.02 µmol Fe^{+2}/500 mg GSE). أدى تناول مستحضر بذور العنب لمدة 12 أسبوع إلى انخفاض مهم إحصائياً في متوسط مستويات كل من غلوكوز الدم الصيامية، مستويات الكوليسترول الكلي، الكوليسترول منخفض الكثافة LDL ومستويات البروتين التفاعلي C بمعدل (17.35%، 16.03%، 15.31%، 54.36% على التوالي) لدى مجموعة المشاركة عند نهاية الدراسة. في حين انخفض متوسط مستويات الشحوم الثلاثية وارتفع متوسط مستويات الكوليسترول مرتفع الكثافة HDL دون دلالة إحصائية في نهاية الدراسة في مجموعة المشاركة وبين مجموعتي المشاركة ومجموعة الشاهد.

الكلمات المفتاحية: الداء السكري، مستخلص بذور العنب (Grape seed extract (GSE، المركبات الفينولية، مضادات الأكسدة، دراسات سريرية Clinical trials.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* **مدرس ، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية**

** **مدرس ، كلية الطب البشري، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية**

*** **طالبة دراسات عليا، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية**

مقدمة

يعد الداء السكري مشكلة صحية كبيرة وصلت إلى مستويات تنذر بالخطر منذ بداية القرن العشرين، حيث يعاني مايقارب نصف مليار شخص من مرض السكري في العالم. وفقاً لإحصائيات الإتحاد الدولي للداء السكري International Diabetes Federation (IDF) عام 2021 يقدر أن 537 مليون بالغ من سكان العالم مصاب بمرض السكري وقدر عدد الوفيات الناجمة عنه في عام 2021 بنحو 6.7 مليون شخص [1]. تمتلك منطقة الشرق الأوسط أعلى معدل انتشار للداء السكري والذي يُقارب 73 مليون بالغ في عام 2021. وفي سورية قدر الإتحاد الدولي للداء السكري، وجود مليون ونصف بالغ مصاب بالسكري في عام 2021 [1]. يعد النمط الثاني للسكري T2DM الأكثر شيوعاً (90–95 %)، وسببه كما هو معروف بالإضافة إلى العوامل الوراثية كالطفرات في مستقبلات الأنسولين، مقاومة الخلايا للأنسولين [2]. تنتج مقاومة الخلايا للأنسولين عن نمط الحياة السيء المعتمد على الإكثار من تناول الدهون المشبعة وقلة النشاط البدني، والتي تؤدي في النهاية إلى زيادة الجذور الحرة في الجسم التي تعطل شلال الأنسولين، فتوقف استخدام الغلوكوز من قبل الخلايا وترفع مستوياته في الدم. يؤدي استمرار ارتفاع غلوكوز الدم على المدى الطويل إلى مضاعفات عديدة كالاضطرابات القلبية، اعتلال الكلية، اعتلال الشبكية، تصلب الشرايين، القدم السكرية واعتلال الاعصاب، والتي تعتبر مسؤولة عن خطورة الداء السكري وزيادة معدل الوفيات به [3]، لذلك للوقاية من هذه المضاعفات يجب منع غلوكوز الدم من الارتفاع المستمر والحفاظ على مستوياته ضمن القيم الطبيعية من خلال العلاج الدوائي المترافق مع تغيير النظام الغذائي، ومحاولة تخفيض كمية الجذور الحرة في الجسم عن طريق زيادة فعالية الجسم المضادة للأكسدة مما يقلل من تثبيط شلال الأنسولين ويزيد من استخدام غلوكوز الدم. تنتج الفعالية المضادة للأكسدة في الجسم عن مضادات أكسدة داخلية توجد بشكل طبيعي في الجسم كأنزيمات /Catalase Superoxide Dismutase/ Glutathione Reductase/ Glutathione Peroxidase أو عن مضادات أكسدة خارجية يتم تناولها عن طريق الغذاء أو عن طريق المكملات الغذائية كالفيتامينات(فيتامين C/E) والمعادن (السيلينيوم) والمستخلصات النباتية الحاوية على الكارتينوئيدات والمركبات الفينولية [4] .

من بين المستخلصات النباتية التي شاع استخدامها في الآونة الأخيرة مستخلص بذور العنب، التي أثبتت الدراسات المخبرية *in vitro* أنه غني بالبروأنتوسيانيدات، وأن فعاليته المضادة للأكسدة أفضل من فعالية كل من فيتامين C/E [5]، وذلك كونه قادر على كنس الجذور الحرة وفوق الأكاسيد وتحسين مستويات مضادات الأكسدة الداخلية كالغلوتاتيون المرجع Glutathione (GSH) وأنزيم Superoxide Dismutase (SOD) [6]. في حين أثبتت الدراسات السريرية *in vivo* أنه قادر على خفض مقاومة الأنسولين من خلال عدة آليات، فهو قادر على رفع مستويات الأديبونكتين الذي يزيد من حساسية الخلايا للأنسولين [7]، تنشيط Insulin receptor substrate (IRS) بشكل مشابه لعمل الأنسولين [8] ، وتثبيط امتصاص الغلوكوز في الجهاز الهضمي وتجنب الارتفاع المفاجئ لغلوكوز الدم في حال تناول وجبة حاوية على الكربوهيدرات من خلال تثبيط أنزيمات ألفا–غليكوزيداز وألفا– أميلاز المعوية [9]، إضافة إلى تخفيض تشكل مركبات Advanced Glycation End Products (AGEs) التي تعتبر مسؤولة عن المضاعفات المتعلقة بمرض السكري [10]. وبما أن المعالجات الدوائية التقليدية المتوافرة حالياً ترتبط بالعديد من المشاكل كفقدان الفعالية مع مرور الوقت بسبب الفقدان التدريجي لوظائف خلايا β البنكرياسية [11]، وظهور العديد من الاضطرابات الاستقلابية المصاحبة كالسمنة ونوبات انخفاض غلوكوز الدم [12] ، برزت أهمية

مشاركة الأدوية الخافضة للغلوكوز الفموية مع المستخلصات النباتية بهدف الحصول على تأثير تآزري في خفض غلوكوز الدم وإبطاء تطور المضاعفات.

لذا كان الهدف من هذه البحث دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص بذور العنب المتوافر في السوق المحلية مخبرياً وتقييم فعاليته من الناحية السريرية لدى مرضى T2DM عند مشاركته مع أحد الأدوية الخافضة للغلوكوز الفموية (الميتفورمين) في منع تطور هذا المرض من خلال قياس تأثيره على بعض المشعرات الحيوية لدى هؤلاء المرضى في بداية الدراسة وعند نهايتها (بعد 12 أسبوع).

طرائق البحث ومواده

❖ المواد والأجهزة المستخدمة

استخدمت في البحث مجموعة من المواد والأجهزة المتوافرة في مخابركلية الصيدلة – جامعة تشرين ومخبر البحوث البحرية في كلية الهندسة الزراعية.

❖ المحاليل المستخدمة

- **المحاليل المستخدمة في تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية :**
- محلول عمل من كاشف Folin Denis
- محلول كربونات الصوديوم 2% (w/v)
- سلسلة حمض الغاليك العيارية

تم تحضير محاليل حمض الغاليك بالتراكيز (0.8-0.6-0.4-0.2-0.1 g/L) ابتداء من محلول أم بتركيز (5 g/L)، حيث تم إجراء اختبار Folin-Ciocalteu للمحاليل المحضرة وقياس الامتصاصية ثلاث مرات لكل محلول ثم حساب المتوسط الحسابي للامتصاصية لكل من المحاليل المدروسة ورسم المنحني العياري كما في الشكل (1).

- **المحاليل المستخدمة في تحديد الفعالية الكلية المضادة للأكسدة وفق طريقة القدرة الإرجاعية Reducing Power Assay :**
- محلول كاشف فري سيانيد البوتاسيوم 1% (w/v)
- محلول ثلاثي كلور حمض الخل (TCA) 10% (w/v)
- محلول كلور الحديد 0.1% (w/v)
- محلول الوقاء الفوسفاتي (pH=6.6, 0.2M)
- سلسلة كبريتات الحديدي العيارية

تم تحضير محاليل كبريتات الحديدي بتراكيز (1, 1.5, 2, 2.5 µmol/1 ml) ابتداءً من محلول أم بتركيز (10 µmol/1 ml) ، حيث تم إجراء اختبار القدرة الإرجاعية وقياس الامتصاصية ثلاث مرات ثم حساب المتوسط الحسابي لامتصاصية كل محلول من المحاليل المدروسة ورسم المنحني العياري كما في الشكل (2).

- **العتائد kits المستخدمة في البحث**

1- **عتيدة مقايسة الغلوكوز (شركة BioSystem®):** في المرحلة الأولى تتم أكسدة الغلوكوز إلى غلوكونات وينتج الماء الأوكسيجيني الذي يتفاعل في المرحلة الثانية مع الفينول و4-aminoantipyrin فينتج Quinoneimine بلون زهري حيث تتناسب شدة اللون مع تركيز الغلوكوز في العينة.

2- **عتيدة مقايسة الكوليسترول الكلي (شركة BioSystem®):** تتم المعايرة بالطريقة الإنزيمية اللونية اعتماداً على Cholesterol Oxidase/Peroxidase حيث يقوم إنزيم الكوليسترول إستراز بدايةً بفصل الحموض الدسمة عن إسترات الكوليسترول محولاً إياها إلى كوليسترول حر غير مؤستر. يتفاعل الكوليسترول الحر مع O_2 بوجود الكوليسترول أوكسيداز منتجاً ببروكسيد الهيدروجين H_2O_2 . يعد H_2O_2 ركازة للتفاعل الإنزيمي الذي يتوسطه إنزيم البيروكسيداز مما يشكل معقداً ملوناً يتم قياس شدة لونه باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer.

3- **عتيدة مقايسة الكوليسترول منخفض الكثافة LDL (شركة QUIMICA):** تتم المعايرة المباشرة ل LDL دون استخدام أي معالجات سابقة أو طرد مركزي من خلال خطوتين رئيسيتين، الخطوة الأولى يتم فيها استبعاد VLDL وHDL والدقائق الكيلوسية بواسطة تفاعلات أكسدة محددة باستخدام الكوليسترول أستراز والكوليسترول أوكسيداز وبواسطة تفاعلات انحلال باستخدام الكاتالاز لتشكيل Cholestenone و H_2O_2 . الخطوة الثانية يتم فيها قياس LDL-C المتبقي بواسطة مقياس الطيف الضوئي عند تشكل لون ناتج عن تشكل معقد Quinone Complex بوجود عوامل محددة فعالة سطحياً.

4- **عتيدة مقايسة الكوليسترول مرتفع الكثافة HDL (شركة QUIMICA):** تتم المعايرة المباشرة ل HDL-C دون استخدام أي معالجات سابقة أو طرد مركزي. تعتمد هذه الطريقة على المعايرة الأنزيمية اللونية وتحرير HDL-C عن طريق خاصية الانحلالية والذي يتفاعل بدوره مع مولد اللون Chromogen حيث يساهم كل من الكوليسترول أستراز و الكوليسترول أوكسيداز في إعطاء لون قابل للقياس عند 600 nm باستخدام مقياس الطيف الضوئي. ويتم استخدام البولميرات للحفاظ على استقرار البروتينات الشحمية VLDL وLDL والدقائق الكيلوسية من خلال خاصية الإمتزاز وبالتالي لا تتفاعل مع المركبات الأنزيمية.

5- **عتيدة مقايسة الشحوم الثلاثية TG (شركة BioSystem®):** تتم المعايرة بالطريقة الإنزيمية اللونية Glycerol Phosphate Oxidase/Peroxidase حيث يقوم إنزيم الليباز بفصل الحموض الدسمة عن الغليسرول الذي يخضع لسلسلة من التفاعلات الإنزيمية يتم فيها استخدام إنزيمات غليسرول كيناز و غليسرول فوسفات أوكسيداز منتجاً ببروكسيد الهيدروجين H_2O_2 . يعد H_2O_2 ركازة للتفاعل الإنزيمي الذي يتوسطه إنزيم البيروكسيداز مما يُشكل معقداً ملوناً Quinoneimine يتم قياس شدة لونه باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer.

6- **عتيدة مقايسة البروتين التفاعلي C (شركة BioSystem®):** يسبب البروتين التفاعلي C في البلازما تراصاً لجزيئات اللاتكس المغلفة بالأجسام المضادة له مسبباً تشكل عكارة. يتناسب هذا التراص مع تركيز CRP في العينة ويمكن قياسه بواسطة مقياس العكارة Turbidimetry .

❖ طريقة العمل المخبرية

1. جمع العينات

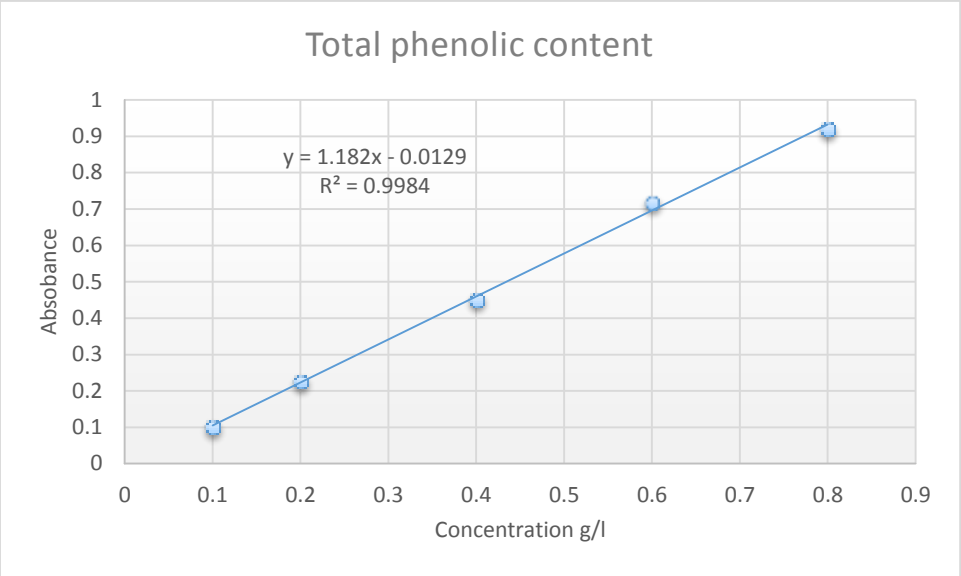
تم اختيار 3 عبوات مختلفة حاوية على خلاصة بذور العنب تابعة لإحدى الشركات الصيدلانية المحلية بشكل عشوائي، حيث تم تطبيق الاختبارات التي سيرد ذكرها لاحقاً على ثلاث كبسولات من كل عبوة، وحساب المتوسط الحسابي للمشعر المدروس في الكبسولة الواحدة من كل عبوة ثم للعبوات الثلاث.

2. تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية

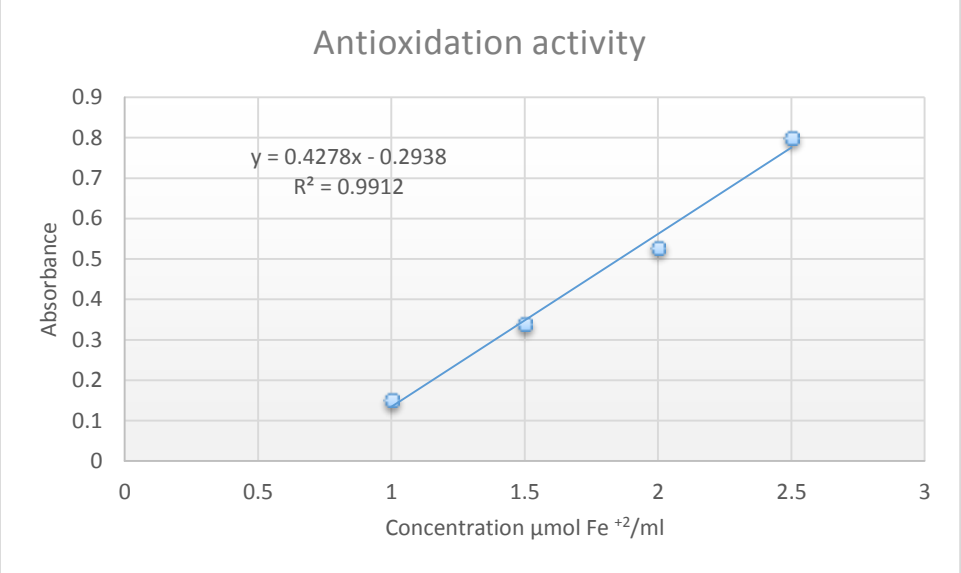
تم وزن كل كبسولة مدروسة، ثم تفريغها من محتوياتها في (200 ml) من الماء المقطر وحساب وزن محتواها من خلال الفرق بين الوزنتين، ثم تحريك العينة لمدة 15 دقيقة في حمام مائي للأمواج فوق الصوتية للاستخلاص ومن ثم ترشيحها. طبقت مراحل مقايسة المحتوى الكلي من المركبات الفينولية بطريقة Folin-Ciocalteu [13] من خلال مزج (0.1ml) من الرشاحة السابقة مع (2ml) من محلول كربونات الصوديوم 2% لمدة (5min)، ثم أُضيف (0.1ml) من كاشف Folin Denis الممدد بالماء المقطر بنسبة (1:1). تُرك المزيج الناتج بحرارة الغرفة مدة 30 دقيقة، ثم تمت قراءة الامتصاصية عند طول موجة 750nm. تم تحضير blank بتطبيق نفس الخطوات السابقة بعد استبدال (0.1ml) من مستخلص العينة ب (0.1ml) من الماء المقطر ليتم تصفير الجهاز باستخدامه. حُسبت كمية المركبات الفينولية الكلية بالرجوع إلى السلسلة العيارية لحمض الغاليك. تم حساب المتوسط الحسابي لكمية المركبات الفينولية المتواجدة في ثلاث كبسولات من كل عبوة من مستحضر بذور العنب المدروس، ثم للعبوات الثلاث معاً وعُبر عن النتائج بالمتوسط الحسابي لكمية المركبات الفينولية ± الإنحراف المعياري.

3. تحديد الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة القدرة الإرجاعية

تم وزن كل كبسولة مدروسة، ثم تفريغها من محتوياتها في (200 ml) من الماء المقطر وحساب وزن محتواها من خلال الفرق بين الوزنتين، تم تحريك العينة لمدة 15 دقيقة للاستخلاص ومن ثم ترشيحها. طبقت مراحل مقايسة القدرة الإرجاعية [14] من خلال مزج (0.5 ml) من الرشاحة السابقة مع (0.5 ml) من الوقاء الفوسفاتي و(0.5 ml) من كاشف فري سيانيد البوتاسيوم 1% في أنبوب اختبار وحضنه ضمن حمام مائي بدرجة حرارة (50°C) ولمدة (20 min)، ثم إضافة (0.5 ml) من محلول TCA 10% (w/v). بعد إضافة TCA 10%، تم أخذ (1 ml) من المزيج وأُضيف له (1 ml) من الماء المقطر و(0.2 ml) من محلول كلور الحديد 0.1%. لتُقرأ الامتصاصية عند طول موجة 700 nm . تم تحضير كل من ال blank ومحاليل السلسلة العيارية بتطبيق نفس الخطوات السابقة بعد استبدال (0.5 ml) من الرشاحة ب (0.5 ml) من الوقاء الفوسفاتي أو من محاليل السلسلة العيارية على الترتيب. ثم تم حساب الفعالية المضادة للأكسدة لمحتوى الكبسولة من خلاصة بذور العنب التجارية بعد تعويض الامتصاصية الناتجة في معادلة السلسة العيارية من كبريتات الحديدي والتي تتراوح تراكيزها بين (1–2.5 µmol/1 ml)، كُررت هذه التجربة على ثلاث كبسولات من كل عبوة من عبوات مستحضر بذور العنب المدروسة وحُسب المتوسط الحسابي للفعالية المضادة للأكسدة للكبسولة الواحدة في كل عبوة ثم للعبوات الثلاث وعُبر عن النتائج بالمتوسط الحسابي للفعالية المضادة للأكسدة ± الإنحراف المعياري.



الشكل (1) : السلسلة العيارية لحمض الغاليك المستخدمة في حساب المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في محاليل محتوى كبسولات مستحضر بذور العنب المدروسة



الشكل (2): السلسلة العيارية لكبريتات الحديدي المستخدمة في حساب الفعالية المضادة للأكسدة لمحاليل محتوى كبسولات مستحضر بذور العنب المدروسة ولمحاليل فيتامين C بطريقة القدرة الإرجاعية.

❖ طريقة العمل السريرية

▪ مجموعة المرضى

شملت الدراسة 53 مريضاً مصاباً بالداء السكري من النمط الثاني والمُشخَّص حديثاً من المرضى المراجعين لعيادة الغدد الصم في مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، تراوحت أعمارهم بين 36–70 عاماً وبلغت نسبة المرضى المشاركين من الذكور 35.8% ومن الإناث 64.2%. تم تشخيص الإصابة بالداء السكري من النمط الثاني لهؤلاء المرضى اعتماداً على المعايير المعتمدة للتشخيص منذ فترات زمنية تراوحت بين الأسبوع وحتى عام ونصف. شملت معايير الاستبعاد من الدراسة ما يلي: الحمل والإرضاع، الأمراض القلبية والكلوية، المرضى المعالجين بخافضات الغلوكوز الفموية الأخرى، المرضى المعالجين بالمتممات الغذائية الحاوية على مضادات الأكسدة الأخرى. تم تقسيمهم إلى مجموعتين: المجموعة الأولى (مجموعة الشاهد) تضمنت 28 مريضاً معالجاً بالميتفورمين كخافض فموي لغلوكوز الدم بجرعات مختلفة، بينما ضمت المجموعة الثانية (مجموعة المشاركة) 25 مريضاً معالجاً بالميتفورمين بجرعات مختلفة بالمشاركة مع مضاد الأكسدة التجاري الحاوي على 500 ملغ من خلاصة بذور العنب، وتمت متابعة المرضى في كلا المجموعتين لمدة 12 أسبوع، حيث استمرت الدراسة منذ شهر نيسان 2021 وحتى شهر آب 2022. تم تصميم استبيان خاص بكل مريض لتسجيل المعلومات الشخصية (العمر، الجنس، المهنة، الطول، الوزن، مشعر كتلة الجسم Body Mass Index (BMI)، التاريخ المرضي والدوائي، الأمراض الحالية والأدوية التي يتناولها المريض، ومدة الإصابة بالداء السكري). وتم الحصول على موافقة من قبل الأفراد المشمولين بالدراسة شفهياً وملء الاستبيان.

▪ الاعتيان

تم سحب 5 مل دم وريدي من كل مريض في بداية الدراسة وفي نهايتها (بعد 12 أسبوع) ضمن إجراءات العقامة المتبعة في بزل الدم صباحاً بعد صيام 8 ساعات على الأقل. وزعت الكمية في أنبوبين يحوي الأول مضاد الهيبارين لمعايرة (السكر الصيامي _ Lipid Profile – البروتين التفاعلي C)، أما الثاني فيحوي مضاد التخثر Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) من أجل إجراء تحليل تعداد دم وصيغة Complete Blood Count (CBC) . تم تثفيل عينات الدم وفصل البلاسما لإجراء المقايسات.

النتائج والمناقشة

▪ النتائج المخبرية

يبين الجدول التالي (1) المتوسط الحسابي لوزن محتوى الكبسولة في مستحضر بذور العنب المدروس والبالغ (504.1 ± 1.75 mg).

الجدول (1) المتوسط الحسابي لوزن محتوى الكبسولة في مستحضر بذور العنب المدروس

رقم العبوة	المتوسط الحسابي لوزن محتوى الكبسولة (mg) في العبوة الواحدة n = 3	المتوسط الحسابي لوزن محتوى الكبسولة (mg) في العبوات الثلاث Mean ± SD
1	505.9 ± 0.008	504.1 ± 1.75
2	502.4 ± 0.003	
3	504 ± 0.007	

جرى حساب المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في محاليل كبسولات مستحضر بذور العنب المدروسة استناداً إلى المعادلة الخطية للسلسلة العيارية لحمض الغاليك (y=1.182x -0.0129) وكانت قيمة معامل التحديد R^2 تساوي 0.9984 كما في الشكل (1). بلغ متوسط كمية الفينولات في الكبسولة الواحدة من المستحضر (2.07 ± 48.5 mgGAE/Cap GSE) كما يظهر الجدول (2)، تم تحديد هذا المحتوى الفينولي في الخلاصة المائية لمحتوى كبسولة بذور العنب، حيث يختلف محتوى المركبات الفينولية عموماً باختلاف المُحل المستخدم [15].

الجدول (2) متوسط المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في محتوى كبسولات مستحضر بذور العنب المدروس مقدراً ب (mgGAE/Cap)

رقم العبوة	المتوسط الحسابي لكمية المركبات الفينولية g GAE/l Mean ± SD n = 3	المتوسط الحسابي لكمية المركبات الفينولية mgGAE/200 ml = mgGAE/Cap Mean ± SD n = 3	متوسط كمية الفينولات mgGAE/Cap Mean ± SD
1	0.232 ± 0.01	46.53 ± 2.01	48.5 ± 2.07
2	0.241 ± 0.002	48.33 ± 0.57	
3	0.253 ± 0.002	50.66 ± 0.50	

بينما جرى حساب الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة القدرة الإرجاعية لمحاليل كبسولات مستحضر بذور العنب استناداً إلى المعادلة الخطية للسلسلة العيارية من كبريتات الحديدي (y=0.4278x – 0.2938) وكانت قيمة معامل التحديد R^2 تساوي 0.991 كما في الشكل(2). بلغ المتوسط الحسابي لتركيز شوارد الحديدي المتشكلة من استخدام كبسولة واحدة من مستحضر بذور العنب (245.86 ± 12.02 µmol Fe^{+2}/Cap) كما يظهر في الجدول (3). ونظراً لكون فيتامين C مضاد أكسدة معروف بفعاليته المضادة للأكسدة ويتم عادةً اعتباره كمضاد أكسدة مرجعي في العديد من الدراسات المخبرية، تم في هذا البحث قياس للفعالية المضادة للأكسدة بطريقة القدرة الإرجاعية لمستحضر فيتامين C المسّوق تجارياً بجرعة مماثلة (500 mg) بهدف مقارنتها مع الفعالية المضادة للأكسدة لمستحضر بذور العنب المدروس. عند قياس الفعالية المضادة للأكسدة ل 3 مضغوطات من مستحضر فيتامين C التجاري بلغ المتوسط الحسابي لتركيز شوارد الحديدي المتشكلة من استخدام مضغوطة واحدة (471.2 ± 5.63 µmol Fe^{+2}/500 mg V.C). على الرغم من وجود محتوى جيد من المركبات الفينولية في مستحضر بذور العنب التجاري المدروس والذي ترافق مع فعالية مضادة للأكسدة، إلا أنها وخلافاً لما ورد في بعض الدراسات المخبرية عن تفوق مستحضر بذور العنب في فعاليته المضادة للأكسدة على فيتامين C و E [16] [5] [17] ، كانت أقل من الفعالية المضادة للأكسدة لمستحضر فيتامين C التجاري بمقدار النصف تقريباً ، قد يُعزى ذلك إلى اختلاف الصنف النباتي المدروس، طريقة القياس المتبعة للفعالية المضادة للأكسدة أو المذيب المستخدم لاستخلاص البروأنتوسيانيدات[18] .

الجدول (3) : نتائج الفعالية المضادة للأكسدة لمحاليل كبسولات بذور العنب المدروسة بالاستناد إلى المعادلة الخطية للسلسلة العيارية لكبريتات الحديدي

رقم العبوة	المتوسط الحسابي لتركيز شوارد الحديدي المتشكلة µM Fe^{+2}/ml Mean ± SD n = 3	المتوسط الحسابي لتركيز شوارد الحديدي المتشكلة من استخدام كبسولة واحدة في العبوة الواحدة µM Fe^{+2}/200ml Mean ± SD n = 3	المتوسط الحسابي لتركيز شوارد الحديدي المتشكلة من استخدام كبسولة واحدة للعبوات الثلاث µM Fe^{+2}/Cap Mean ± SD

245.86 ± 12.02	**232.2 ± 5.54**	**1.161 ± 0.02**	**1**
	250.6 ± 19.11	**1.253 ± 0.09**	**2**
	254.8 ± 10.62	**1.274 ± 0.05**	**3**

- **النتائج السريرية**

تم التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج IBM SPSS statistics (version 22)، وتم استخدام الاختبارات الإحصائية التالية :

- اختبار Kolmogorov-Smirnov لمعرفة طبيعة توزع البيانات.
- اختبار Chi-Square or Fisher exact لدراسة العلاقة بين المتغيرات النوعية.
- اختبار Independent-Samples T-Test لدراسة العلاقة بين عينتين مستقلتين.
- تم التعبير عن النتائج كنسبة مئوية، وكمتوسط حسابي ± الانحراف المعياري
- اعتبرت النتائج هامة إحصائياً مع P-value <0.05

كان هناك تجانس في توزع مجتمع الدراسة بين كلا المجموعتين تبعاً لبيانات الأفراد فيما يخص الجنس، مشعر كتلة الجسم، جرعة الميتفورمين و مدة الإصابة بالداء السكري T2DM، وعلى العكس كان هناك فارق مهم إحصائياً في توزع العمر بين المجموعتين (P=0.002) الجدول (4).

الجدول(4) : خصائص المرضى المشاركين في بداية الدراسة في كل من مجموعة المشاركة والشاهد

	مجموعة الشاهد (ميتفورمين فقط)	مجموعة المشاركة (مستحضر بذور العنب + ميتفورمين)	P-value
الجنس (إناث/ذكور) n/n	11/17	8/17	**0.581**
العمر (سنة)	54.60 ± 7.32	48 ± 7.66	**0.002**
مدة الإصابة بالسكري من النمط الثاني (أشهر)	6.68 ± 4.08	8.14 ± 3.99	**0.194**
مشعر كتلة الجسم BMI (Kg/m^2)	BMI <25 (n=3) BMI =25-29.9 (n=20) BMI ≥30 (n=5)	BMI <25 (n=5) BMI =25-29.9 (n=13) BMI ≥30 (n=7)	**0.357**
جرعة الميتفورمين (mg)	500 (n=6) 850 (n=2) 1000 (n=5) 1700 (n=10) 2000 (n=5)	500 (n=8) 850 (n=5) 1000 (n=6) 1700 (n=4) 2000 (n=2)	**0.279**

أدى تناول مستحضر بذور العنب التجاري ذي الجرعة (500mg) لمرة واحدة يومياً لمدة 12 أسبوع إلى انخفاض مهم إحصائياً في متوسط مستويات غلوكوز الدم الصيامية FBC، الكوليسترول الكلي TC، كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL-c، البروتين التفاعلي C (CRP) (P=0.000، P=0.001، P=0.03، P=0.001 على التوالي) في نهاية الدراسة ضمن مجموعة المشاركة مقارنة بمتوسط مستويات هذه المشعرات عند بداية الدراسة. إضافةً إلى

انخفاضها بشكل مهم إحصائياً (P=0.001، P=0.000، P=0.016، P=0.001 على التوالي) في نهاية الدراسة عند مقارنتها بما أصبحت عليه في مجموعة الشاهد. في حين انخفض متوسط مستويات الشحوم الثلاثية TG وارتفع متوسط مستويات كوليسترول البروتين الدهني مرتفع الكثافة HDL-c عند نهاية الدراسة ضمن مجموعة المشاركة وبين المجموعتين لكن دون دلالة إحصائية كما يظهر في الجدول(5).

الجدول (5): متوسط مستويات المشعرات الحيوية المقاسة (mg/dl) لدى كل من مجموعة المصابين بالداء السكري المتناولين للميتفورمين والمتناولين للميتفورمين مع مكملات بذور العنب عند بدء الدراسة وبعد 12 أسبوعاً من تناول مكمل بذور العنب في مجموعة المشاركة. # : وجود اختلاف مهم إحصائياً p <0.05 ، ## : وجود اختلاف مهم إحصائياً P < 0.01، ### : P <0.001 عند نهاية مدة الدراسة ضمن مجموعة المشاركين المتناولين للميتفورمين مع مكملات بذور العنب مقارنة مع مستوياتها عند بدء الدراسة. *: وجود اختلاف مهم إحصائياً p <0.05 ، **: p < 0.01 ،*: p < 0.001 عند نهاية مدة الدراسة بين المجموعتين المدروستين. حذف القيم P ووضعها بحقل ضمن الجدول 5**

	مجموعة الشاهد (ميتفورمين فقط) N=28		مجموعة المشاركة (مستحضر بذور العنب + ميتفورمين) N=25	
	عند بدء الدراسة	بعد 12 أسبوع من بدء الدراسة	عند بدء الدراسة	بعد 12 أسبوع من بدء الدراسة
FBC (mg/dl)	116.21 ± 16.07	111.70 ± 9.80	120.36 ± 17.32	99.48 ± 13.62 ###**
TC (mg/dl)	179.27 ± 17.62	185.41 ± 17.70	191.62 ± 31.45	160.92 ± 25.95 ##***
TG (mg/dl)	136.50 ± 23.77	138 ± 26.29	148.38 ± 42.88	130.86 ± 44.59
LDL-c (mg/dl)	106.38 ± 15.66	111.50 ± 15.08	116.32 ± 31.45	98.52 ± 21.17#*
HDL-c (mg/dl)	45.57 ± 7.60	45.05 ± 6.50	45.90 ± 6.88	46.60 ± 6.58
CRP (mg/l)	3.75 ± 1.60	3.78 ± 1.42	5.39 ± 3.96	2.46 ± 1.25 ##**

على الرغم من أن العديد من الدراسات السابقة لم تُظهر تأثيراً ذا دلالة إحصائية لمستخلص بذور العنب على المشعرات الحيوية التي تم قياسها في دراستنا [6] [19] [20]، إلا أن نتائج هذا البحث اتفقت مع دراسات سريرية أخرى أُجريت في الجسم البشري وعلى حيوانات التجربة، خلصت إلى أن مستخلص بذور العنب قد يساهم في خفض مستويات كل من غلوكوز الدم، الكوليسترول الكلي، كوليسترول الLDL وCRP من خلال دوره في دعم النظام الدفاعي المضاد للأكسدة في الجسم الحي وإنقاص تشكل المركبات المؤكسدة (الناتجة عن تفاعل الجذور الحرة مع الجزيئات الحيوية كالبروتينات والدسم والكربوهيدرات والحموض النووية والتي تؤدي إلى إحداث آذيات قد تكون بعضها غير عكسية) وغيرها من الآليات التي تُخفض شدة الإجهاد التأكسدي الناتج عن الداء السكري لدى المرضى T2DM وبالتالي إبطاء تطور المرض ومضاعفاته [7] [9] [21] [22]. قد يعود هذا التناقض إلى اختلاف الجرعة المستخدمة من مكمل بذور العنب ومحتواه من المركبات الفينولية التي تختلف باختلاف مصدر العينة ودرجة النضج وتقنية الاستخلاص والتحضير [23]، وكذلك اختلاف مدة وتصميم الدراسة ومكان حدوثها، كما أن التنوع الكبير في المجموعات السكانية وتنوع خصائص المشاركين في هذه الدراسات الفيزيولوجية والاستقلابية قد يساهم في هذه التناقضات حيث أثبتت الدراسات السابقة أن الاختلاف في البكتيرية المعوية بين الأفراد يؤثر على التوافر الحيوي للمركبات الفينولية، مما يؤدي إلى تباين كبير في مستوياتها في المصل [24]، بالإضافة إلى اختلاف الأنظمة الغذائية المتبعة بين بلد وآخر،

فالتداخلات الغذائية بين البوليفينولات والمكونات الغذائية كالبروتينات والأحماض الدسمة والألياف الغذائية قد تؤثر على توافرها البيولوجي وبالتالي تأثيرها الحيوي في الجسم البشري [25].

وعلى الرغم من أن تأثير الميتفورمين على خفض غلوكوز الدم يتعلق بالعمر حيث تقل قدرته على زيادة حساسية الخلايا للأنسولين وفشل خلايا بيتا البنكرياسية كما في الدراسة التي قارنت مجموعتين عمريتين (25-44 سنة) (60-85 سنة) [26]، حيث وجد في دراستنا أن هناك فرق مهم إحصائياً بين متوسط عمر مجموعة المشاركة ومجموعة الشاهد (P=0.002) ولكن هذا الفرق لم يتجاوز 8 سنوات، لذلك قد لا يعود انخفاض غلوكوز الدم في مجموعة المشاركة مقارنة بمجموعة الشاهد إلى الفعالية الأكبر للميتفورمين في هذه المجموعة وإنما لمشاركته بمكمل بذور العنب.

بناءً على هذه النتائج يمكن اعتبار مستحضر بذور العنب مستحضراً ذا فعالية جيدة مضادة للأكسدة يساهم في خفض مستويات غلوكوز الدم الصيامية ومستويات الكوليسترول الكلي و كوليسترول الLDL و البروتين التفاعلي C عند مشاركته مع الأدوية الخافضة لغلوكوز الدم الفموية لدى مرضى T2DM مما يؤدي إلى ضبط أفضل للداء السكري من النمط الثاني وإبطاء تطور مضاعفاته.

الاستنتاجات والتوصيات

من خلال نتائج هذا البحث تم التوصل إلى وجود محتوى جيد من المركبات الفينولية في مستحضر بذور العنب المسوّق تجارياً قد تُعزى له الفعالية المضادة للأكسدة المُقاسة التي يتمتع بها، كما أن مشاركته مع الأدوية الفموية الخافضة لغلوكوز الدم لدى مرضى الداء السكري من النمط الثاني المُشخّصين حديثاً قد يؤمن الوصول إلى ضبط أفضل للداء السكري ومنع تطور مضاعفاته من خلال ضبط مستويات كوليسترول الدم وخفض شدة الإجهاد التأكسدي والاستجابة الالتهابية المرافقة. لابد من الإشارة إلى أنه لم يتم في هذا البحث تحديد التوافر الحيوي للمواد الفينولية المتناولة وتأثيرها على الفعالية المضادة للأكسدة المصلية عند المشاركين في هذه الدراسة، كما لم يتم ضبط النظام الغذائي للمشاركين على الرغم من أنه قد طُلب منهم عدم تغيير ما اعتادوا على تناوله قبل البدء بالدراسة، أو توحيد أعمارهم مما يفسح المجال أمام المزيد من الأبحاث التي تركز على هذه النقاط وتشمل عدداً أكبر من المشاركين للوصول إلى نتائج أعم وأشمل.

Reference

[1] "IDF Diabetes Atlas 2021 | IDF Diabetes Atlas." https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/ (accessed Apr. 29, 2023).

[2] D. Care and S. S. Suppl, "2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021," *Diabetes Care*, vol. 44, no. January, pp. S15–S33, 2021, doi: 10.2337/dc21-S002.

[3] A. M. Freeman and N. Pennings, "Insulin resistance," *StatPearls [Internet]*, 2021.

[4] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci, "Oxidative stress and antioxidant defense," *World Allergy Organ. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 9–19, 2012.

[5] T. Ariga, "The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins," *Biofactors*, vol. 21, no. 1-4, pp. 197–201, 2004.

[6] B. Pourghassem-Gargari, S. Abedini, H. Babaei, A. Aliasgarzadeh, and P. Pourabdollahi, "Effect of supplementation with grape seed (Vitis vinifera) extract on antioxidant status and lipid peroxidation in patient with type II diabetes," *J Med Plants Res*, vol. 5, no. 10, p. 2029e34, 2011.

[7] D. Li, Y. Zhang, Y. Liu, R. Sun, and M. Xia, "Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients," *J. Nutr.*, vol. 145, no. 4, pp. 742–748, 2015.
[8] J. L. Evans, B. A. Maddux, and I. D. Goldfine, "The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 7, no. 7–8, pp. 1040–1052, 2005.
[9] S. Sapwarobol, S. Adisakwattana, S. Changpeng, W. Ratanawachirin, K. Tanruttanawong, and W. Boonyarit, "Postprandial blood glucose response to grape seed extract in healthy participants: A pilot study," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 8, no. 31, p. 192, 2012.
[10] V. Sekar and H. R. Vasanthi, "Grape Seed Extract and its Effects on Diabetes and its Complications," *Curr. Res. Diabetes Obes. J.*, vol. 2, no. 2, pp. 30–33, 2017.
[11] L. Marselli *et al.*, "Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes?," *Diabetologia*, vol. 57, pp. 362–365, 2014.
[12] R. Bilous and R. Donnelly, *Handbook of Diabetes: Fourth Edition*. 2010. doi: 10.1002/9781444391374.
[13] د. الدياب and ن. الأسعد، "تحديد سويات المركبات الفينولية وفعاليتها المضادة للأكسدة في بعض العصائر الوظيفية المحلِّيَّة," *Tishreen Univ. Journal-Medical Sci. Ser.*, vol. 37, no. 1, 2015.
[14] ز.صارم and ر.الصوا، "مقارنة الفعالية الغذائية المضادة للأكسدة مخبرياً لبعض الزيوت النباتية المتوفرة محلياً," *Tishreen Univ. Journal-Medical Sci. Ser.*, p. 83, 2021.
[15] M. Pinelo, M. Rubilar, M. Jerez, J. Sineiro, and M. J. Núnez, "Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 2111–2117, 2005.
[16] T. Ariga, I. Koshiyama, and D. Fukushima, "Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans in aqueous systems," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 52, no. 11, pp. 2717–2722, 1988.
[17] T. Ariga and M. Hamano, "Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxyl radicals," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 54, no. 10, pp. 2499–2504, 1990.
[18] J. Sung and J. Lee, "Antioxidant and antiproliferative activities of grape seeds from different cultivars," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 19, pp. 321–326, 2010.
[19] H. H. H. Feringa, D. A. Laskey, J. E. Dickson, and C. I. Coleman, "The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: a meta-analysis of randomized controlled trials," *J. Am. Diet. Assoc.*, vol. 111, no. 8, pp. 1173–1181, 2011.
[20] H. Babaei, A. Aliasgarzadeh, and P. Poorabdollahi, "Effect of supplementation with grape seed extract (vitis vinifera) on serum lipid profiles in patient with type 2 diabetes," *Iran. J. Endocrinol. Metab.*, vol. 15, no. 1, pp. 59–66, 2013.
[21] P. Kar, D. Laight, H. K. Rooprai, K. M. Shaw, and M. Cummings, "Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity," *Diabet. Med.*, vol. 26, no. 5, pp. 526–531, 2009.
[22] X. Terra *et al.*, "Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 20, no. 3, pp. 210–218, 2009.

[23] E. Revilla, E. Alonso, and V. Kovac, "The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices," ACS Publications, 1997.
[24] J. C. Espín, A. González-Sarrías, and F. A. Tomás-Barberán, "The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 139, pp. 82–93, 2017.
[25] N. Poklar Ulrih, "Analytical techniques for the study of polyphenol–protein interactions," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 10, pp. 2144–2161, 2017.
[26] D. S. Diabetes Prevention Program Research Group [Prepared by Jill Crandall Yong Ma, Wilfred Y. Fujimoto, Elizabeth Barrett-Connor, Sarah Fowler, Sam Dagogo-Jack, Reubin Andres], "The influence of age on the effects of lifestyle modification and metformin in prevention of diabetes," *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 61, no. 10, pp. 1075–1081, 2006.