دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم - شماره ۷۸
دی ۱۳۸۷

وصول: ۸۶/۲/۹
ارسال اصلاحات: ۸۶/۸/۱۶
دریافت اصلاحات: ۸۶/۹/۲۵
پذیرش: ۸۷/۲/۱۰

بررسی اثر کاتچین، کافئین و اسید گالیک بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین در شرایط آزمایشگاهی

نویسندگان: امیر قریب[۱]، زهره فائزی‌زاده[۱]، محمدرضا مهرابی[۱] و محسن میرزایی[۳]

۱. مربی گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه شاهد

نویسنده مسئول: E-mail:gharib_fa@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت شیرین از شایع‌ترین بیماری‌ها در جوامع بشری است که مقابله با عوارض آن هزینه هنگفتی را به سیستم درمانی تحمیل می‌کند. مهم‌ترین و شاخص‌ترین علامت کلینیکی این بیماری، افزایش قند خون است که منجر به گلیکه‌شدن پروتئین‌های مختلف بدن می‌گردد و این امر، تغییر در ماهیت و ساختمان و عملکرد بیوشیمیایی آن‌ها را باعث می‌شود. یکی از راه‌های احتمالی درمان دیابت شیرین، کاهش یا مهار این واکنش است و به نظر می‌رسد استفاده از ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی گیاهان در این راه مفید و مؤثر است. در مطالعه حاضر، اثر سه ترکیب کاتچین، کافئین و اسید گالیک موجود در گیاه چای بر گلیکه‌شدن آلبومین بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی تأثیر کاتچین، کافئین و اسید گالیک بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین در برون تن در حضور غلظت‌های مختلف هر یک از این مواد مذکور، واکنش گلیکه‌شدن آلبومین در برون تن انجام شد و با روش تیوباربیتوریک اسید مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل نشان داد که کاتچین، کافئین و اسیدگالیک مورد مطالعه در غلظت‌های سه گانه ۱ گرم بر دسی‌لیتر، ۰/۲ گرم بر دسی‌لیتر و ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر دارای اثر مهاری بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین هستند و در این میان، کاتچین در غلظت ۱ گرم بر دسی‌لیتر دارای بیش‌ترین اثر مهاری است (۹۴/۷۴ درصد).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که هر سه ماده باعث کاهش واکنش گلیکه‌شدن آلبومین گردیدند و اثر مواد مذکور متناسب با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است. بنابر این می‌توان دریافت که مصرف گیاه چای به علت داشتن ترکیباتی نظیر کاتچین، اسیدگالیک و کافئین می‌تواند با مهار یا کاهش گلیکاسیون پروتئین‌ها، مثل آلبومین، مانع از بروز برخی از عوارض بیماری دیابت شیرین گردد.

واژه‌های کلیدی: دیابت شیرین، کاتچین، کافئین، اسیدگالیک، تیوباربیتوریک اسید

مقدمه

دیابت شیرین (Diabetes mellitus) از شایع‌ترین بیماری‌ها در جوامع بشری است که مقابله با عوارض آن، هزینه هنگفتی را به سیستم درمانی تحمیل می‌کند. شاخص‌ترین علامت کلینیکی این بیماری، افزایش قند خون است که منجر به گلیکوزیله‌شدن (Glycosylation) پروتئین‌های مختلف بدن می‌گردد[۱]. در اثر گلیکه‌شدن پروتئین‌ها، ماهیت و ساختمان فضایی آن‌ها تغییر می‌یابد و فعالیت بیوشیمیایی‌شان دچار تغییرات گوناگون می‌شود [۲و۳]. واکنش گلیکه‌شدن آلبومین در حقیقت اتصال گروه آلدئیدی قند با عوامل آمین آزاد ریشه جانبی لیزین و آرژنین موجود در ساختمان پروتئینی آلبومین است که به صورت آهسته انجام می‌گیرد. برای تشخیص آلبومین گلیکه شده، راه‌های مختلفی وجود دارد که یکی از مرسوم‌ترین آن‌ها، روش تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbitoric acid) است. این معرف با محصولات حاصل از واکنش گلیکه‌شدن آلبومین ترکیب می‌شود [٤و٥]. میزان گلیکه شدن آلبومین به عوامل مختلفی از جمله غلظت گلوکز، زمان انکوباسیون پروتئین با گلوکز وغیره بستگی دارد. با توجه به این‌که افزایش قند خون منجر به تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها می‌گردد لزوم مهار واکنش گلیکه‌شدن پروتئین‌ها به‌شدت احساس می‌شود. سال‌ها است که توجه محققین بر روی یافتن ترکیباتی که مانع از گلیکه‌شدن پروتئین‌ها گردند، بدون این‌که آثار جانبی نگران‌کننده‌ای داشته باشند معطوف گردیده‌است.

از این میان، توجه خاصی به فرآورده‌های گیاهی مختلف از جمله ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی شده[٦] و گیاه چای (*Camellia siensis*) به علت وجود ترکیباتی نظیر کاتچین، اسیدگالیک و کافئین در آن مورد توجه خاص قرار گرفته‌است [۷]. دو ترکیب اول، ساختمان فنلی داشته، ماده سوم یک آلکالوئید است. در این تحقیق آثار کاتچین، کافئین و اسیدگالیک بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) مورد بررسی قرار گرفته‌است.

مواد و روش‌ها

از مواد مهم مورد استفاده در این تحقیق می‌توان به آلبومین سرم گاوی، گلوکز، تیوباربیتوریک اسید اشاره کرد که همگی دارای درجه خلوص آزمایشگاهی بوده، از شرکت سیگما (Sigma) تهیه گردیده‌اند. بقیه محلول‌های مورد استفاده نیز با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت مرک (Merck) تهیه شده‌اند. برای انجام آزمایش نیز از دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی- ماورای بنفش (UV-VIS spectrophotometer) ساخت شرکت شیمیدزو (Shimidzu) ژاپن استفاده گردید. مراحل آزمایش‌ها با استفاده از روش Wu و همکارانش[۸] انجام شد:

الف) تهیه محلول ذخیره از کافئین، کاتچین و اسیدگالیک: مقدار ۰/۱ گرم از هر یک از مواد مذکور را در۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، به مدت یک ساعت بر روی شیکر به‌خوبی مخلوط کردیم و برای به دست آوردن محلول یکنواخت از کاغذ صافی عبور دادیم.

ب) تهیه محلول آلبومین و گلوکز: به ۱ میلی‌لیتر محلول ۷۵۰ میکرو مولار آلبومین ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱٦٦ مولار گلوکز اضافه شد و برای جلوگیری از هر نوع آلودگی، ۱ میلی‌لیتر محلول جنتامایسین با غلظت۱۰۰ میکرو مولار به آن اضافه گردید. تمام محلول‌های مذکور با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤) تهیه شدند.

ج) بررسی تأثیر کافئین، کاتچین، اسید گالیک بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین: از محلول ذخیره کافئین، کاتچین و اسیدگالیک غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۱ گرم در دسی‌لیتر تهیه و مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از آن‌ها به ۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده در قسمت «ب» اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای تعیین میزان اثر هر یک از غلظت‌های مواد مذکور، تست تیو باربیتوریک اسید (BA) انجام گرفت.

د) اندازه‌گیری میزان گلیکه شدن آلبومین: به محلول‌های به دست‌آمده از مرحله الف، ۱ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA)، ۲۰ درصد افزوده و پس از سانتریفوژ، محلول رویی آن دور ریخته شد. در ادامه به رسوب فوق ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۰/۵ میلی‌لیتر اسید اگزالیک ۰/۳ نرمال افزوده و به مدت یک ساعت در بن ماری ۱۰۰ درجه قرار داده شد. به هر لوله ۰/۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرو استیک ٤۰ درصد اضافه و بعد از سانتریفوژ، مایع رویی جدا و به ۱ میلی‌لیتر از مایع جدا شده ۰/۵ میلی‌لیتر محلول TBA ۰/۰۵ مولار اضافه گردید. آنگاه نیم ساعت در دمای ٤۰ درجه قرار گرفت و جذب نمونه در طول موج ٤٤۳ نانومتر اندازه‌گیری شد.

ه) تهیه محلول کنترل و شاهد: برای تهیه محلول کنترل، مانند قسمت «ب» و «ج» عمل شد، با این تفاوت که محلول‌های حاوی کافئین، کاتچین و اسیدگالیک به آن اضافه نگردید. برای تهیه محلول شاهد، مانند قسمت «ب» و «ج» عمل شد، با این تفاوت که محلول گلوکز به آن اضافه نگردید.

روش آماری مورد استفاده:

داده‌های حاصل در این تحقیق با کمک نرم‌افزار آماری SPSS به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) بیان گردیدند.به منظور مقایسه اثر ترکیبات مورد مطالعه در مهار گلیکه‌شدن آلبومین از تست آماری آنوا دو طرفه (Two way ANOVA) استفاده گردید. همچنین سطح معنادار $p<۰/۰۵$ برای تمام آنالیزها در نظر گرفته شد.

نتایج

در این تحقیق، آثار غلظت‌های سه ترکیب کاتچین، کافئین و اسیدگالیک بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین بررسی شده‌است. تمام ترکیبات در سه غلظت (۰/۱، ۰/۲ و ۱ گرم در دسی‌لیتر) مورد استفاده قرار گرفتند و برای تعیین میزان گلیکه‌شدن آلبومین از تست TBA استفاده شد.

نتایج حاصل از آثار ترکیبات فوق در جدول ۱ آمده‌است. مطابق این جدول، کاتچین در غلظت ۱ گرم در دسی‌لیتر دارای بیش‌ترین مهار (۹۰/۷٤ درصد) و کافئین با همین غلظت دارای کم‌ترین اثر مهارکنندگی (۳۰/۳۷ درصد) بود. ترتیب آثار مواد مورد نظر بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ و ۱ گرم درصد میلی‌لیتر به صورت‌های زیر آمده‌است:

در غلظت ۰/۱ گرم در دسی‌لیتر

کافئین < اسید گالیک < کاتچین

در غلظت ۰/۲گرم در دسی‌لیتر

کافئین < اسید گالیک < کاتچین

در غلظت ۱گرم در دسی‌لیتر

کافئین < اسید گالیک < کاتچین

مقایسه اثر مواد مورد مطالعه در غلظت‌های فوق نشان داد که در هر سه غلظت، تأثیر کاتچین بر میزان اثر مهار واکنش گلیکه‌شدن آلبومین متفاوت از اسید گالیک و کافئین است ($p=۰/۰۰۰$). همچنین در تمام غلظت‌های گفته شده نیز تأثیر اسید گالیک بر میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن آلبومین نسبت به کافئین دارای تفاوت معنادار است ($p=۰/۰۰۰$).

مقایسه تأثیر هر یک از مواد مورد مطالعه در سه غلظت به کار رفته نشان داد که کافئین نسبت به کاتچین و اسید گالیک کم‌ترین اثر را در مهار واکنش گلیکه‌شدن آلبومین دارد.

در مورد کاتچین و اسید گالیک، افزایش غلظت از ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر به ۱گرم بر دسی‌لیتر باعث افزایش مهار گلیکوزیلاسیون آلبومین شده‌است. همچنین از نظر آماری، تفاوت بین غلظت‌های مذکور از کافئین و مقدار مهار گلیکه‌شدن آلبومین معنادار نیست ($p=۰/۳۸۷$)؛ در حالی که در مورد کاتچین و اسید گالیک تفاوت بین غلظت‌های از، ۰/۲ و ۱گرم بر دسی‌لیتر این مواد و مهار گلیکه‌شدن آلبومین کاملاً مشخص و معنادار است ($p= ۰/۰۰۰$).

جدول ۱. مقایسه اثر کاتچین، کافئین و اسیدگالیک در میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن آلبومین برحسب غلظت‌های مختلف

نوع ماده	میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن در غلظت ۱ گرم بر دسی‌لیتر *Mean ± SD*	میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن در غلظت ۰/۲ گرم بر دسی‌لیتر *Mean ± SD*	میزان مهار واکنش گلیکه‌شدن در غلظت ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر *Mean ± SD*	p.value
کاتچین	۹۰/۷٤±۱/۷۵	۸۲/۲۲±۱/۲۷	٦۲/۷٤±۳/۱۳	$F_{(۲,۲۹)}$=٤۲۵/٤۰۳ p=۰/۰۰۰
اسیدگالیک	۷۷/۱۱±۵/۲۸	۷۰/۹۲±۲/۹۱	٥٤/۹٥±۳/۲۰	$F_{(۲,۲۹)}$=۸٤/۰٥٤ p=۰/۰۰۰
کافئین	۳۰/۳۷±٤/۳۲	۳۱/۸٦±۳/۹۸	۳۲/۹۱±۳/۹۱	$F_{(۲,۲۹)}$=۰/۹۸۳ p*=۰/۳۸۷
p.value	$F_{(۲,۲۹)}$=٦۰٤/٥۸۱ p=۰/۰۰۰	$F_{(۲,۲۹)}$=۸۰٦/۲۷٥ p=۰/۰۰۰	$F_{(۲,۲۹)}$=۲۰۲/٦۲۹ p=۰/۰۰۰	

*مقدار P.value بیش‌تر از ۰/۰۵ بوده که نشانه معنادار نبودن اختلاف تأثیر سه غلظت مختلف کافئین بر گلیکه‌شدن آلبومین است.

بحث و نتیجه‌گیری

ترکیبات گیاهی دارای ساختمان فنلی، توانایی واکنش مستقیم با برخی از پروتئین‌ها را دارند [٦]. در مطالعات گوناگونی که صورت گرفته فعالیت‌های مختلفی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی در برابر انواع واکنش‌های اکسیداسیون بیومولکول‌ها (نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و غیره)، از بین برندگی رادیکال‌های آزاد، مهارکنندگی واکنش تجمع پلاکت‌ها و تأثیر بر واکنش انتقال خون و در نهایت کمک به تنظیم متابولیسم قندها به آن‌ها نسبت داده شده‌است [۷و۸و۹].

گیاه چای حاوی ترکیباتی نظیر کاتچین، کافئین و اسیدگالیک است [۱۰]. کاتچین یک ترکیب پلی‌فنلی بوده، خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان می‌دهد. اسیدگالیک نیز یک ترکیب فنلی محسوب شده و کافئین، ترکیبی آلکالوئیدی است[۱۱]. تاکنون چندین مطالعه بر روی تأثیر مواد فنلی و آلکالوئیدی موجود در گیاهان بر واکنش گلیکه‌شدن آلبومین و پروتئین‌ها انجام گرفته‌است. در سال ۲۰۰۲ میلادی تحقیقات آلحادر (Akgader) و همکارانش بر روی ترکیبات پلی‌فنلی و آلکالوئیدی به دست‌آمده از گیاه رزماری (الکیل کوهی) *(Rosmarinus officinalis)* نشان داد که این ترکیبات قادر به کاهش گلیکاسیون پروتئین‌ها هستند [۱۲]. در سال ۲۰۰٤ میلادی دلرز (Delers) و همکارانش نشان دادند که بعضی از ترکیبات پلی فنلی موجود در گیاهان قادر به کاهش گلیکاسیون پروتئین‌های موجود در خون، نظیر هاپتوگلوبین هستند [۱۳]. در سال ۲۰۰٦ میلادی مطالعات مادهوجیت (Madhujith) و همکارانش نشان داد که عصاره دانه جو دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است [۱٤]. تحقیقات اردستانی و یزدان پرست نیز در سال ۲۰۰۷ میلادی نشان داد که عصاره استخراج شده گیاه *کالپوره (Teucrium polium)* با ماده اتیل‌استات در شرایط آزمایشگاهی از گلیکه‌شدن آلبومین جلوگیری می‌کند[۱۵].

مطالعه انجام شده نشان می‌دهد که کاتچین، اسیدگالیک و کافئین می‌توانند موجب مهار یا کاهش گلیکوزیلاسیون آلبومین گردند. دلیل این امر ممکن است

ناشی از رقابت این ترکیبات با گلوکز برای واکنش با آلبومین باشد که در مورد سایر ترکیبات پلی فنولی گیاهی نیز مشاهده گردیده‌است[۱۶]. در واقع، این ترکیبات با عوامل آمین پروتئین اتصال برقرار می‌کنند و با ایجاد باز شیف، مانع از اتصال گلوکز به آن می‌شوند و در نتیجه، گلیکه‌شدن آلبومین بدین صورت به‌طور چشمگیر کاهش می‌یابد[۱۷].

مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات پلی فنلی کاتچین و اسید گالیک در غلظت‌های به کار گرفته شده در مهار گلیکه‌شدن آلبومین نشان داد که کاتچین نسبت به اسید گالیک تأثیر قوی‌تری در این زمینه دارد (جدول ۱، ردیف‌های ۱و۲). شاید علت این امر، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تر کاتچین نسبت به اسید گالیک باشد [۱۶].

حداقل بودن میانگین مهار گلیکوزیلاسیون آلبومین توسط کافئین در مقایسه با دو ماده دیگر نیز اثباتی بر این مدعا است (جدول۱، ردیف ۳)؛ زیرا کافئین ترکیبی آلکالوئیدی بوده، فاقد خاصیت آنتی‌اکسیدانی است [۱]. بنابراین در این تحقیق، این نظریه که احتمالاً ارتباط مستقیمی بین مقدار خاصیت آنتی‌اکسیدانی ماده و مهار گلیکه‌شدن آلبومین وجود دارد اثبات می‌شود[۱۰].

نتایج حاصل از این تحقیق این است که مصرف گیاه چای به علت داشتن ترکیباتی نظیر کاتچین، اسیدگالیک و کافئین می‌تواند با مهار یا کاهش گلیکاسیون پروتئین‌ها مثل آلبومین، احتمالاً مانع از عوارض ناشی از دیابت شیرین گردد. پیشنهاد می‌گردد که ادامه تحقیقات در این زمینه به صورت درون تن (in vivo) نیز انجام گیرد تا مناسب‌ترین غلظت کاتچین، کافئین و اسیدگالیک که توانایی مهار یا کاهش واکنش عوارض ناشی از دیابت شیرین را داشته باشد مشخص گردد.

منابع

1. Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu JB, Sasaoka T, Kimura I. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic(ab/db) mice and on glucose methabolism in healthy humans.B M C Pharma 2004; 4:18-27.

2. Marotta E, Lapolla A, Fedele D, et al. Accurate mass measurements by Fourier transform mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides. J Mass Spectrom 2003;38:196–205.

3. Ahmed N, Dobler D, Dean M, Thornalley PJ. Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. J Biol Chem 2005;280:5724–32.

4. Howard MJ, Smales CM. NMR analysis of synthetic human serum albumin α-helix 28 identifies structural distortion upon Amadori modification. J Biol Chem 2005;280:22582–9.

5. Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem 2007;104:21–29.

6. Rizvi SI, Zaid MA, Anis R, Mishra N. Protective role tea catechins aganst oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. Clin Experi Pharmacol Physio 2005; 32:70-75.

7. Sabarimuthu DQ, Raghu PS. Effects of (-)-epicatechin,a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver , kidney and heart. Pharmacological Reports 2005;57:610-615.

8. Wu CH, Yen GC. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005; 53: 3167–3173.

9. Wu LY, Juan CC, Ho L, Hsu YP, Hwang LS. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in sprague-Dawley rats. J Agric Food Chem 2004;52:643-648.

10. Sabu MC, Smitha K, Kuttan R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes.J Ethnopharmacol 2002; 83:109-116.

11. Picerno P, Mencherini T, Lauro MR, Barbato F, Aquino R. Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003; 51:6423–6428.

12. Alhader AA, Hasan ZA, Agqel MB. Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects on Rosmarinus Offecinalis. J Ethnopharmocol 2002;43(3):217-21.

13. 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 terpen induced inflammation. Biochem Cell Biol 2004; 66 (3):208-17.

14. Madhujith T, Izydorczyk M, Shahidi, F. Antioxidant properties of pearled barley fractions. J Agric Food Chem. 2006; 54:3283–3289.

15. Ardestani A, Yazdanparast R. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxidation. Food Chem Toxicol 2007; 45: 2402-2411.

16. Nakagawa T, Yokozawa T, Terasawa K, Shu S, Juneja LR. Protective activity of green tea against free radical-and glucosemediated protein damage. J Agric Food Chem 2002; 50:2418–2422.

17. Lo CY, Li S, Tan D, Pan MH, Sang S, Ho CT. Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. Molecular Nutrition and Food Research 2006; 50: 1118–1128