

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

نویسندگان: امیر قریب^۱، زهره فائزی زاده^۱، محمدرضا مهرابی^۱ و محسن میرزایی^۲

۱. مربی گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد

۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه شاهد

E-mail: gharib_fa@yahoo.com

نویسنده مسئول:

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 گلیکته شدن 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 گلیکته شدن آلبومین بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی تأثیر کاتچین، کافئین و اسید گالیک بر واکنش گلیکته شدن آلبومین در برون تن در حضور غلظت‌های مختلف هر یک از این مواد مذکور، واکنش گلیکته شدن آلبومین در برون تن انجام شد و با روش تیوباربیتریک 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 مهار بر واکنش گلیکته شدن آلبومین هستند و در این میان، کاتچین در غلظت ۱ گرم بر دسی‌لیتر دارای بیش‌ترین اثر مهار بر واکنش گلیکته شدن آلبومین است (۹۴/۷۴ درصد).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که هر سه ماده باعث کاهش واکنش گلیکته شدن 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، تیوباربیتریک اسید

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم - شماره ۲۸
دی ۱۳۸۷

وصول: ۸۶/۲/۹

ارسال اصلاحات: ۸۶/۸/۱۶

دریافت اصلاحات: ۸۶/۹/۲۵

پذیرش: ۸۷/۲/۱۰

مقدمه

دیابت شیرین (Diabetes mellitus) از شایع‌ترین بیماری‌ها در جوامع بشری است که مقابله با عوارض آن، هزینه‌های هنگفتی را به سیستم درمانی تحمیل می‌کند. شاخص‌ترین علامت کلینیکی این بیماری، افزایش قند خون است که منجر به گلیکوزیله شدن (Glycosylation) پروتئین‌های مختلف بدن می‌گردد [۱]. در اثر گلیکته شدن پروتئین‌ها، ماهیت و ساختمان فضایی آن‌ها تغییر می‌یابد و فعالیت بیوشیمیایی‌شان دچار تغییرات گوناگون می‌شود [۲ و ۳]. واکنش گلیکته شدن آلبومین در حقیقت اتصال گروه آلدئیدی قند با عوامل آمین آزاد ریشه‌جانبی لیزین و آرژنین موجود در ساختمان پروتئینی آلبومین است که به صورت آهسته انجام می‌گیرد. برای تشخیص آلبومین گلیکته شده، راه‌های مختلفی وجود دارد که یکی از مرسوم‌ترین آن‌ها، روش تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbitoric acid) است. این معرف با محصولات حاصل از واکنش گلیکته شدن آلبومین ترکیب می‌شود [۴ و ۵]. میزان گلیکته شدن آلبومین به عوامل مختلفی از جمله غلظت گلوکز، زمان انکوباسیون پروتئین با گلوکز و غیره بستگی دارد. با توجه به این که افزایش قند خون منجر به تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها می‌گردد لزوم مهار واکنش گلیکته شدن پروتئین‌ها به شدت احساس می‌شود. سال‌ها است که توجه محققین بر روی یافتن ترکیباتی که مانع از گلیکته شدن پروتئین‌ها گردند، بدون این که آثار جانبی نگران‌کننده‌ای داشته باشند معطوف گردیده است.

از این میان، توجه خاصی به فرآورده‌های گیاهی مختلف از جمله ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی شده [۶] و گیاه چای (*Camellia siensis*) به علت وجود ترکیباتی نظیر کاتچین، اسید گالیک و کافئین در آن مورد توجه خاص قرار گرفته است [۷]. دو ترکیب اول، ساختمان فنلی داشته، ماده سوم یک آلکالوئید است. در این تحقیق آثار کاتچین، کافئین و اسید گالیک بر واکنش گلیکته شدن آلبومین در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) مورد بررسی قرار گرفته است.

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

اسید گالیک: مقدار ۰/۱ گرم از هر یک از مواد مذکور را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، به مدت یک ساعت بر روی شیکر به خوبی 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 ۰/۱۶۶ مولار گلوکز اضافه شد و برای جلوگیری از هر نوع آلودگی، ۱ میلی‌لیتر محلول جنتامایسین با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار به آن اضافه گردید. تمام محلول‌های مذکور با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۱ مولار با $pH=7.4$) تهیه شدند.

ج) بررسی تأثیر کافئین، کاتچین، اسید گالیک بر

واکنش گلیکته شدن آلبومین: از محلول ذخیره کافئین، کاتچین و اسید گالیک 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 تیوباربیتوریک اسید (BA) انجام گرفت.

نتایج حاصل از آثار ترکیبات فوق در جدول ۱ آمده است. مطابق این جدول، کاتچین در غلظت ۱ گرم در دسی لیتر دارای بیشترین مهار (۹۰/۷۴ درصد) و کافئین با همین غلظت دارای کمترین اثر مهارکنندگی (۳۰/۳۷ درصد) بود. ترتیب آثار مواد مورد نظر بر واکنش گلیکته شدن آلبومین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ و ۱ گرم درصد میلی لیتر به صورت‌های زیر آمده است:

در غلظت ۰/۱ گرم در دسی لیتر

کافئین > اسید گالیک > کاتچین

در غلظت ۰/۲ گرم در دسی لیتر

کافئین > اسید گالیک > کاتچین

در غلظت ۱ گرم در دسی لیتر

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 و واکنش گلیکته شدن آلبومین متفاوت از اسید گالیک و کافئین است ($p=0/000$). همچنین در تمام غلظت‌های گفته شده نیز تأثیر اسید گالیک بر میزان مهار و واکنش گلیکته شدن آلبومین نسبت به کافئین دارای تفاوت معنادار است ($p=0/000$).

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 و واکنش گلیکته شدن آلبومین دارد.

در مورد کاتچین و اسید گالیک، افزایش غلظت از ۰/۱ گرم بر دسی لیتر به ۱ گرم بر دسی لیتر باعث افزایش مهار گلیکوزیلاسیون آلبومین شده است. همچنین از نظر آماری، تفاوت بین غلظت‌های مذکور از کافئین و مقدار مهار گلیکته شدن آلبومین معنادار نیست ($p=0/387$)؛ در حالی که در مورد کاتچین و اسید گالیک تفاوت بین غلظت‌های از ۰/۲ و ۱ گرم بر دسی لیتر این مواد و مهار گلیکته شدن آلبومین کاملاً مشخص و معنادار است ($p=0/000$).

(د) اندازه‌گیری میزان گلیکته شدن آلبومین: به محلول‌های به دست آمده از مرحله الف، ۱ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA)، ۲۰ درصد افزوده و پس از سانتریفوژ، محلول رویی آن دور ریخته شد. در ادامه به رسوب فوق ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات و ۰/۵ میلی لیتر اسید اگزالیک ۰/۳ نرمال افزوده و به مدت یک ساعت در بن ماری ۱۰۰ درجه قرار داده شد. به هر لوله ۰/۵ میلی لیتر اسید تری کلرو استیک ۴۰ درصد اضافه و بعد از سانتریفوژ، مایع رویی جدا و به ۱ میلی لیتر از مایع جدا شده ۰/۵ میلی لیتر محلول TBA ۰/۰۵ مولار اضافه گردید. آنگاه نیم ساعت در دمای ۴۰ درجه قرار گرفت و جذب نمونه در طول موج ۴۴۳ 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 اسید گالیک 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 \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) بیان گردیدند. به منظور مقایسه اثر ترکیبات مورد مطالعه در مهار گلیکته شدن آلبومین از تست آماری آنوا دو طرفه (Two way ANOVA) استفاده گردید. همچنین سطح معنادار $p < 0/05$ برای تمام آنالیزها در نظر گرفته شد.

نتایج

در این تحقیق، آثار غلظت‌های سه ترکیب کاتچین، کافئین و اسید گالیک بر واکنش گلیکته شدن آلبومین بررسی شده است. تمام ترکیبات در سه غلظت (۰/۱، ۰/۲ و ۱ گرم در دسی لیتر) مورد استفاده قرار گرفتند و برای تعیین میزان گلیکته شدن آلبومین از تست TBA استفاده شد.

جدول ۱. مقایسه اثر کاتچین، کافئین و اسید گالیک در میزان مهار واکنش گلیکده شدن آلبومین بر حسب غلظت‌های مختلف

نوع ماده	میزان مهار واکنش گلیکده شدن در غلظت ۱/۱ گرم بر دسی لیتر <i>Mean ± SD</i>	میزان مهار واکنش گلیکده شدن در غلظت ۲/۲ گرم بر دسی لیتر <i>Mean ± SD</i>	میزان مهار واکنش گلیکده شدن در غلظت ۱ گرم بر دسی لیتر <i>Mean ± SD</i>	p.value
کاتچین	۶۲/۷۴±۳/۱۳	۸۲/۲۲±۱/۲۷	۹۰/۷۴±۱/۷۵	$F_{(۲,۲۹)}=۴۲۵/۴۰۳$ $p=۰/۰۰۰$
اسید گالیک	۵۴/۹۵±۳/۲۰	۷۰/۹۲±۲/۹۱	۷۷/۱۱±۵/۲۸	$F_{(۲,۲۹)}=۸۴/۰۵۴$ $p=۰/۰۰۰$
کافئین	۳۲/۹۱±۳/۹۱	۳۱/۸۶±۳/۹۸	۳۰/۳۷±۴/۳۲	$F_{(۲,۲۹)}=۰/۹۸۳$ $p*=۰/۳۸۷$
p.value	$F_{(۲,۲۹)}=۲۰۲/۶۲۹$ $p=۰/۰۰۰$	$F_{(۲,۲۹)}=۸۰۶/۲۷۵$ $p=۰/۰۰۰$	$F_{(۲,۲۹)}=۶۰۴/۵۸۱$ $p=۰/۰۰۰$	

*مقدار P.value بیش تر از ۰/۰۵ بوده که نشانه معنادار نبودن اختلاف تأثیر سه غلظت مختلف کافئین بر گلیکده شدن آلبومین است.

بحث و نتیجه گیری

ترکیبات گیاهی دارای ساختمان فنلی، توانایی واکنش مستقیم با برخی از پروتئین‌ها را دارند [۶]. 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 بردگی رادیکال‌های آزاد، مهارکنندگی واکنش تجمع پلاکت‌ها و تأثیر بر واکنش انتقال خون و در نهایت کمک به تنظیم متابولیسم قندها به آن‌ها نسبت داده شده است [۷ و ۹].

گیاه چای حاوی ترکیباتی نظیر کاتچین، کافئین و اسید گالیک است [۱۰]. کاتچین یک ترکیب پلی‌فنلی بوده، خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان می‌دهد. اسید گالیک 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 گلیکده شدن آلبومین و پروتئین‌ها انجام گرفته است. در سال ۲۰۰۲ میلادی تحقیقات الحاد

(Akgader) و همکارانش بر روی ترکیبات پلی‌فنلی و آلکالوئیدی به دست آمده از گیاه رزماری (الکیل کوهی) (*Rosmarinus officinalis*) نشان داد که این ترکیبات قادر به کاهش گلیکاسیون پروتئین‌ها هستند [۱۲]. در سال ۲۰۰۴ میلادی دلرز (Delers) و همکارانش نشان دادند که بعضی از ترکیبات پلی‌فنلی موجود در گیاهان قادر به کاهش گلیکاسیون پروتئین‌های موجود در خون، نظیر هاپتوگلوبین هستند [۱۳]. در سال ۲۰۰۶ میلادی مطالعات ماده‌وجیت (*Madhujiith*) و همکارانش نشان داد که عصاره دانه جو دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است [۱۴]. 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 گلیکده شدن آلبومین جلوگیری می‌کند [۱۵].

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

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 Ethnopharmacol* 2002;43(3):217-21.
13. 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 terpen induced inflammation. *Biochem Cell Biol* 2004; 66 (3):208-17.

ناشی از رقابت این ترکیبات با گلوکز برای واکنش با آلبومین باشد که در مورد سایر ترکیبات پلی فنولی گیاهی نیز مشاهده گردیده است [۱۶]. در واقع، این ترکیبات با عوامل آمین پروتئین اتصال برقرار می کنند و با ایجاد باز شیفت، مانع از اتصال گلوکز به آن می شوند و در نتیجه، گلیکشدن آلبومین بدین صورت به طور چشمگیر کاهش می یابد [۱۷].

مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات پلی فنولی کاتچین و اسید گالیک در غلظت های به کار گرفته شده در مهار گلیکشدن آلبومین نشان داد که کاتچین نسبت به اسید گالیک تأثیر قوی تری در این زمینه دارد (جدول ۱، ردیف های ۱ و ۲). شاید علت این امر، خاصیت آنتی اکسیدانی بیش تر 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 (جدول ۱، ردیف ۳)؛ زیرا کافئین ترکیبی آلکالوئیدی بوده، فاقد خاصیت آنتی اکسیدانی است [۱]. بنابراین در این تحقیق، این نظریه که احتمالاً ارتباط مستقیمی بین مقدار خاصیت آنتی اکسیدانی ماده و مهار گلیکشدن آلبومین وجود دارد اثبات می شود [۱۰].

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

- 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
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-

Archive of SID