

## تأثیر نیکوتین و کوتینین بر حساسیت LDL نسبت به اکسیداسیون و

## گلیکوزیلاسیون هموگلوبین

دکتر صدیقه عسگری\* دکتر غلامعلی نادری\*\* مژگان قاری پور\*\*\* دکتر علیرضا خسروی\*\*\*\*

## In vitro effect of nicotine and cotinine on susceptibility of LDL to oxidation and hemoglobin glycosylation

S. Asgari☆ G. Naderi M. Gharipour A. Khosravi

## \*Abstract

**Background:** Nicotine, a major component of cigarette smoke, plays an important role in development of cardiovascular disease and lung cancer in smokers.**Objective:** This study was designed to determine the in vitro effects of nicotine and its metabolite, cotinine on the susceptibility of LDL to oxidation and hemoglobin glycosylation.**Methods:** Three different concentrations of each component (10,15,25µg/ml) were used. The glycosylation rate of hemoglobin in the presence and absence of nicotine and cotinine were measured by colorimetric method. The susceptibility of LDL to in vitro oxidation was assessed by the Regnstrom technique.**Findings:** Our data showed that nicotine and cotinine are inhibitors for Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation but also increased the glycosylation rate of hemoglobin. Nicotine at final concentrations of (10, 15, and 25µg/ml) increased the rate of hemoglobin glycosylation by 25%, 32% and 47%, respectively. Cotinine at similar concentrations, also increased the rate of glycosylation by 8, 10 and 12%, respectively.**Conclusion:** Based on data obtained in our study, smoking can result in higher levels of hemoglobin glycosylation which in turn increases the risk of cardiovascular diseases.**Keywords:** Cardiovascular Diseases, Nicotine, Hemoglobins, Glycosylation

## \*چکیده

**زمینه:** نیکوتین به عنوان ترکیب اصلی سیگار، نقش مهمی در پیشرفت بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان ریه دارد.  
**هدف:** مطالعه به منظور تعیین اثرات نیکوتین و متابولیت آن کوتینین بر میزان حساسیت LDL به اکسیداسیون و گلیکوزیلاسیون هموگلوبین انجام شد.**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۱ در مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان به روش in vitro انجام شد. تأثیر غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیکوتین و کوتینین بر میزان گلیکوزیلاسیون هموگلوبین با روش کالری‌متریک اندازه‌گیری شد. حساسیت LDL نسبت به اکسیداسیون نیز با روش Regnstrom تعیین شد. داده‌ها با آزمون آماری t تجزیه و تحلیل شدند.**یافته‌ها:** نیکوتین و کوتینین اکسیداسیون LDL وابسته به مس را مهار می‌کردند، ولی میزان گلیکوزیلاسیون هموگلوبین را افزایش می‌دادند. نیکوتین در غلظت‌های نهایی (۱۰، ۱۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) میزان گلیکوزیلاسیون را به ترتیب ۲۵٪، ۳۲٪ و ۴۷٪ افزایش داد و کوتینین نیز در غلظت‌های نهایی (۱۰، ۱۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب ۸٪، ۱۰٪ و ۱۲٪ گلیکوزیلاسیون را افزایش داد.**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌ها می‌توان گفت یکی از مهم‌ترین علل افزایش وقوع بیماری‌های قلبی-عروقی در افراد سیگاری گلیکوزیلاسیون هموگلوبین است.**کلیدواژه‌ها:** بیماری‌های قلب و عروق، نیکوتین، هموگلوبین‌ها، گلیکوزیلاسیون

\*\* دانشیار بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان

\* دانشیار فارماکولوژی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان

\*\*\*\* استادیار قلب و عروق مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان

\*\*\* کارشناس بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان

آدرس مکاتبه: اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق، صندوق پستی ۱۱۴۸-۸۱۴۶۵

☆Email: S. [asgari@crc.mui.ac.ir](mailto:asgari@crc.mui.ac.ir)

## \* مقدمه :

در بسیاری از مطالعه‌های همه‌گیرشناختی رابطه بین مصرف سیگار و افزایش وقوع بیماری‌های قلبی-عروقی به اثبات رسیده است، ولی مکانیسم‌های مربوط به آن به خوبی شناخته نشده‌اند.<sup>(۱ و ۲)</sup> سیگار کشیدن سبب القا برخی از مکانیسم‌های آتروژنیک می‌شود، از جمله افزایش تری‌گلیسرید سرمی، کاهش HDL، وازواسپاسم، افزایش فیبرینوژن، افزایش تجمع پلاکت‌ها، بهبود فیبرینولیز و مقاومت به انسولین.<sup>(۳ و ۴)</sup> همچنین افزایش مقدار هموگلوبین A<sub>1c</sub> در افراد سیگاری با فشارخون بالا یا فشار خون طبیعی گزارش شده است.<sup>(۵)</sup> اکنون اکسیداسیون LDL به‌عنوان یک عامل پاتوژنیک مهم در روند آترواسکلروز شناخته شده است. در برخی مطالعه‌ها LDL جدا شده از افراد سیگاری نسبت به اکسیداسیون حساس‌تر از LDL افراد غیر سیگاری بوده است.<sup>(۶ و ۷)</sup> ولی در چندین مطالعه نیز مقاومت LDL نسبت به اکسیداسیون در بین دو گروه سیگاری و غیرسیگاری تفاوت معنی‌داری نداشته است.<sup>(۸ و ۹)</sup> بیش از هزار نوع ترکیب شیمیایی در سیگار وجود دارد از جمله نیکوتین، مونوکسیدکربن، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و نیز گلیکوپروتئین‌های تنباکو که انتظار می‌رود برخی از آنها وقوع بیماری‌های قلبی-عروقی را در افراد سیگاری القاء کنند. به هر حال میزان مقاومت LDL نسبت به اکسیداسیون در افراد سیگاری در مقایسه با افراد غیر سیگاری مورد بحث است. نیکوتین از لحاظ دارویی، یکی از فعال‌ترین ترکیب‌های محصولات دخانی است.<sup>(۱۰ و ۱۱)</sup> این مطالعه با هدف یافتن اثرات *invitro* نیکوتین به‌عنوان ترکیب اصلی سیگار و متابولیت آن کوتینین بر حساسیت LDL نسبت به اکسیداسیون و نیز گلیکوزیلاسیون هموگلوبین انجام شد.

## \* مواد و روش‌ها :

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۱ در مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان به صورت *invitro* انجام شد. خون از داوطلبان سالم تهیه و EDTA به‌عنوان ضد انعقاد به آن افزوده شد. گلبول‌های قرمز سه بار با NaCl ۰/۱۴ مولار شسته و ۱ حجم سوسپاسیون گلبول قرمزلیز شده با ۲ حجم بافر فسفات ۰/۱، pH=۷/۴، مولار و نیز ۰/۵ حجم CCL<sub>4</sub> مخلوط شد. سپس گلبول‌های همولیز شده به‌وسیله سانتریفوژ از لایه فوقانی جدا و غلظت هموگلوبین به‌وسیله روش Drabkin اندازه‌گیری شد.<sup>(۱۲ و ۱۳)</sup> یک میلی‌لیتر از محلول هموگلوبین (۱۰۰ میلی‌لیتر بر ۵ گرم) و ۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی گلوکز (۱۰۰ میلی‌لیتر بر ۲ گرم) حاوی جنتامایسین (۱۰۰ میلی‌لیتر بر ۲۰ میلی‌گرم) در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH=۷/۴ در تاریکی در حرارت اتاق انکوبه شد. سپس درجه گلیکوزیلاسیون هموگلوبین در حضور و عدم حضور نیکوتین و کوتینین به‌وسیله روش کالری‌متریک اندازه‌گیری شد.<sup>(۱۴ و ۱۵)</sup>

حساسیت LDL به اکسیداسیون با روش Regnstrom و همکاران اندازه‌گیری شد.<sup>(۱۶)</sup> LDL تهیه شده در بافر فسفات ۰/۰۲ مولار، pH=۷/۴ و NaCl ۰/۱۶ مولار (محلول دیالیز) ۱۰۰ برابر غلیظ شد و تحت تأثیر نیتروژن به مدت ۱۵ ساعت در تاریکی و حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بافر سه بار تعویض و در نهایت LDL بدون EDTA توسط بافر دیالیز رقیق و به غلظت نهایی (۱۰۰ میلی‌لیتر بر ۲۵ میکروگرم) رسانده و روند اکسیداسیون با افزودن محلول آبی CuSO<sub>4</sub> با غلظت ۱/۶۶ میلی‌مول بر لیتر آغاز می‌شد. اکسیداسیون LDL به وسیله تغییر جذب در طول موج ۲۳۴ نانومتر در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu نشان داده

هموگلوبین به صورت وابسته به دوز تأثیر داشت. نیکوتین در غلظت‌های نهایی (۱۰، ۱۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سبب افزایش گلیکوزیلاسیون هموگلوبین به ترتیب به میزان ۲۵، ۳۲ و ۴۷ درصد شد، در حالی که کوتینین در همین غلظت‌ها گلیکوزیلاسیون هموگلوبین را به میزان ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد افزایش داد.

نیکوتین و کوتینین بر میزان حساسیت LDL به اکسیداسیون تحت القا مس اثر گذاشت (جدول شماره ۱). نیکوتین و کوتینین به‌طور معنی‌دار Lag time را قبل از آغاز تشکیل دی‌ان‌های کونژوگه افزایش داد ( $p < 0.05$ ). افزایش طول Lagtime به صورت وابسته به دوز بود ( نمودار شماره ۱).

می‌شود و دی‌ان‌هایی که طی اکسیداسیون LDL تولید می‌شوند سبب ایجاد قله‌هایی در طول موج ۲۳۴ نانومتر بدون تغییرات interindividual می‌شوند. جذب آغازین در ۲۳۴ نانومتر به‌عنوان خط پایه و تغییرات جذب در حضور نیکوتین و کوتینین و نیز بدون آنها (شاهد) طی ۳۰ دقیقه به مدت ۴ ساعت ثبت می‌شد.

هر آزمایش سه بار تکرار و میانگین مقادیر به دست آمده گزارش می‌شد. تجزیه و تحلیل به وسیله آزمون آماری t انجام و  $p < 0.05$  به عنوان موارد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

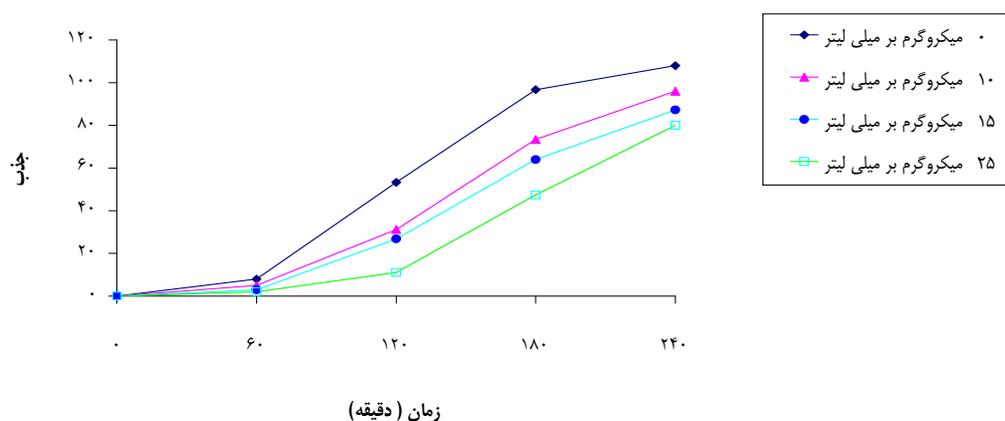
### \* یافته‌ها :

نیکوتین و کوتینین بر گلیکوزیلاسیون

جدول ۱- اثرات نیکوتین و کوتینین بر حساسیت LDL نسبت به اکسیداسیون تحت القای مس به صورت *in vitro*

Lag time (دقیقه)				غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	ترکیبات
۲۵	۱۵	۱۰	(کنترل)		
۱۰۸/۷ ± ۱۲/۴	۹۳ ± ۴/۳	۸۵ ± ۴/۵	۵۵/۲ ± ۲/۶	نیکوتین	
۸۳ ± ۴/۳	۷۶/۳ ± ۵/۶	۶۹/۹ ± ۴/۹	۵۸/۱ ± ۳/۰	کوتینین	

نمودار ۱- مقایسه تغییرات جذب نوری ناشی از اکسیداسیون LDL توسط یون مس در نمونه کنترل و نمونه حاوی نیکوتین در طول موج ۲۳۴ نانومتر



**\* بحث و نتیجه گیری :**

این مطالعه نشان داد که نیکوتین و کوتینین به عنوان مهار کننده های اکسیداسیون LDL تحت القای مس عمل می کنند. اگرچه ساختار شیمیایی آنها به عمل کردن این ترکیبها به عنوان آنتی اکسیدان منجر می شود، اعتقاد بر آن است که پراکسیدازهایی که سبب اکسید کردن LDL در *in vitro* می شوند تولید پراکسیدانها از آنتی اکسیدانها را القاء می کنند.<sup>(۱۰ و ۹)</sup> بنابراین اثرات *in vivo* این دو ماده ممکن است از اثرات *in vitro* آنها متفاوت باشد. البته ممکن است سایر ترکیبهای موجود در سیگار باعث افزایش اکسیداسیون LDL شوند و با مکانیسمهایی متفاوت از اکسیداسیون LDL، به پیشرفت بیماریهای آترواسکلروز منجر شوند.

یافته های حاضر نشان داد که نیکوتین و کوتینین سبب افزایش گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی هموگلوبین می شود که یکی از مکانیسمهایی است که به دنبال استعمال سیگار به آترواسکلروز منجر می شوند. از آنجا که گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی پروتئینهای بدن یکی از مهم ترین عوامل ایجاد عوارض در بیماری دیابت است استعمال سیگار به ویژه در میان دیابتیها بحث بسیار پیچیده تری را ایجاد می کند.

اثرات داروی نیکوتین و کوتینین نه تنها برای افراد سیگاری حائز اهمیت است، بلکه این مشاهدات به دلیل استفاده وسیعی که از محصولات دکانی بدون دود می شود از لحاظ بالینی نیز اهمیت دارد.<sup>(۲۱)</sup>

امروزه مصرف آدامسهای حاوی نیکوتین در ترک سیگار بسیار رایج است.<sup>(۲۲)</sup> مطالعه ها نشان داده است که استفاده از محصولات دکانی بدون دود به دلیل وجود نیکوتین سبب افزایش خطر بیماریهای قلبی- عروقی در مردان جوان می شود.<sup>(۲۳)</sup>

اگرچه اطلاعات کمی در مورد اثرات جایگزینی نیکوتین بیماریهای قلبی- عروقی در برنامه های ترک سیگار موجود است. نیکوتین مقادیر کلسترول HDL، LDL و نیز مقادیر سرمی توتال کلسترول را با افزایش تولید و ترشح لیپوپروتئینهای غنی از تری گلیسرید افزایش می دهد.<sup>(۲۴)</sup> برخی از مطالعات ثابت کرده اند که مصرف سیگار اکسیداسیون LDL را افزایش می دهد. علاوه بر این نشان داده شده است که استعمال سیگار باعث افزایش اتوآنتی بادیهای علیه OX-LDL می شود ولی ارتباط مستقیم بین مصرف سیگار و افزایش اکسیداسیون LDL وجود ندارد.<sup>(۲۵)</sup>

**\* مراجع :**

1. Diez-Roux AV, Nieto FJ, Comstock GW, Howard G, Szklo M. The relationship of active and passive smoking to carotid atherosclerosis 12-14 years later. *Prev Med* 1995; 24: 48-55
2. Taylor AE, Johnson DC, Kazemi H: Environmental tobacco smoke and cardiovascular disease a position paper from the council on cardiopulmonary and critical care, *Am Heart Asso Circulation* 1992; 86: 699-702
3. Tell Gs, Polak JF, Ward BJ, Kittner SJ, Savage PJ, Robbins J. Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults: the cardiovascular health study. *Circulation* 1994; 90: 2905-8
4. Attval S, Fowelin J, Lager I. Smoking induces insulin resistance a potential link with the insulin resistance syndrome. *J Int Med* 1993; 233: 327-32
5. Winnifred MD. Smoking and cardiovascular function. *J hypertens* 1996; suppl, 8: 817-23

6. Nilsson PM, Lind L, Pollare T, Berne C, Lithell HO. Increased level of hemoglobin A1c but not impaired insulin sensitivity, found in hypertensive and normotensive smokers. *Metabolism* 1995; 44(5): 557-61
7. Harats D, Ben-Naim M, Dabach Y, Hollaader G, Stein O, Stein Y M. Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages. *Atherosclerosis* 1989; 79: 245-52
8. Princen HMG, Van Poppel G, Vogelzang C, Buytenhek R, Kok FJ. Supplementation with vitamin E but not B-carotene in vivo protects low-density lipoproteins from lipid peroxidation in vitro. *Arterioscler Thromb*, 1992; 12: 554-62
9. Scheffler E, Hube L, Fruhbis J, Schulz I, Ziegler R, Dresel HA. Alteration of plasma low-density lipoprotein from smoker. *Atherosclerosis* 1990; 82: 261-5
10. Scheffler E, Wiest E, Woehrle J, Otto I, Schulz I, Haber L. Smoking influences the atherogenic potential of low-density lipoprotein. *Clin Invest* 1992; 70: 263-8
11. Siekmeier R, Wulfroth P, Wieland H, Groß W, Marz W. Low-density lipoprotein susceptibility of in vitro oxidation in healthy smokers and non smokers. *Clin Chem* 1996; 42(4): 524-30
12. Jerry B J, Xianobang Y. Mechanism of the hypertensive response to central injection of nicotine in conscious rats. *Brain Res Bull* 1993; 32: 35-41
13. Lidia A, Peyton III J, Marc H, Neal L B. Divergent tolerance to metabolic and cardiovascular effects of nicotine in smokers with low and high levels of cigarette consumption. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 56: 55-64
14. Siegel D, Benowitz N L, Ernster V L, Grady D G, Hauck W W. Smokeless tobacco, cardiovascular risk factors and nicotine and cotinine levels in professional baseball players. *Am J Public Health* 1992; 82: 417-21
15. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER, (eds). *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed, Philadelphia, WB Saunders co, 1994, 2020-30
16. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Adv Clin Chem* 1965; 8: 1414-17
17. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, Rafiei M, Arefian A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharm Acta Helv* 1999; 73(5): 223-6
18. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Vakili R. The inhibitory effects of pure flavonoids on in vitro protein glycosylation. *Herbal Pharmacotherapy* 2002; 2(2): 47-57
19. Fluckiger R, Winter Halter KH. Biochemical and clinical aspects of hemoglobin abnormalities. New York, Academic Press, 1978, 208
20. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landon C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992; 339: 1183-4
21. Rafique M. Clinico-pathological features of bladder Carcinoma in women in Pakistan and smokeless tobacco as a possible risk factor. *World J surg Oncol* 2005 Aug 5; 3(1): 53
22. Russel M A, Wilson C, Feyerabend C, Cole P V. Effect of nicotine chewing gum on smoking behavior and as aid to cigarette withdrawal. *Br Med J* 1976; 2: 391-3

23. Johansson SE, Sundquist K, Qvist J, Sundquist J. Smokeless tobacco and Coronary heart disease: a 12-year follow-up study Eur J Cardiovasc prev Rehabil- 2005 Aug; 12(4): 387-92

24. Ashakumary L, Vijayammal P L. Effect of nicotine on lipoprotein metabolism in rats. Lipids 1997; 32(3): 311-5

25. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia, Role of oxidized LDL. Circulation 1996; 93(7): 1346-53