تأثیر نیکوتین و کوتینین بر حساسیت LDL نسبت به اکسیداسیون و گلیکوژیلاسیون هموگلوبین

دکتر صدیقه عسگری* دکتر غلامعلی نادری** مژگان قاری‌پور*** دکتر علیرضا خسروی****

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

S. Asgary✡ G. Naderi M. Gharipoor 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^{2+}-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 increasd 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 ـ عروقی و سرطان ریه دارد.

هدف : مطالعه به‌منظور 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 ـ عروقی در افراد سیگاری گلیکوزیلاسیون هموگلوبین است.

کلیدواژه‌ها : بیماری‌های قلب و عروق، نیکوتین، هموگلوبین‌ها، گلیکوزیلاسیون

* دانشیار فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
** دانشیار بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
*** کارشناس بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
**** استادیار قلب و عروق مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
آدرس مکاتبه : اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق، صندوق پستی ۱۱۴۸- ۸۱۴۶۵
✡Email: Sasgari@crc.mui.ac.ir_

*** مقدمه :**

در بسیاری از مطالعه‌های همه‌گیرشناختی رابطهٔ بین مصرف سیگار و افزایش وقوع بیماری‌های قلبی- عروقی به اثبات رسیده است، ولی مکانیسم‌های مربوط به آن به خوبی شناخته نشده‌اند.[۱و۲و۳] سیگار کشیدن سبب القا برخی از مکانیسم‌های آتروژنیک می‌شود، از جمله افزایش تری‌گلسیرید سرمی، کاهش HDL، وازواسپاسم، افزایش فیبرینوژن، افزایش تجمع پلاکت‌ها، بهبود فیبرینولیز و مقاومت به انسولین.[۴و۵] همچنین افزایش مقدار هموگلوبین A_{1C} در افراد سیگاری با فشارخون بالا یا فشار خون طبیعی گزارش شده است.[۶] 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.[۷و۸و۹] ولی در چندین مطالعه نیز مقاومت LDL نسبت به اکسیداسیون در بین دو گروه سیگاری و غیرسیگاری تفاوت معنی‌داری نداشته است.[۱۰و۱۱] 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.[۱۲و۱۳و۱۴] 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 وعروق 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 از بافر فسفات pH=۷/۴، ۰/۱ مولار و نیز ۰/۵ حجم CCL_4 مخلوط شد. سپس گلبول‌های هموليز شده به‌وسیلهٔ سانتریفوژ از لایهٔ فوقانی جدا و غلظت هموگلوبین به‌وسیله روش Drabkin اندازه‌گیری شد.[۱۵و۱۶] یک میلی‌لیتر از محلول هموگلوبین (۱۰۰میلی‌لیتر بر ۵ گرم) و ۱میلی‌لیتر از محلول حاوی گلوکز (۱۰۰میلی‌لیتر بر ۲ گرم) حاوی جنتامایسین (۱۰۰میلی‌لیتر بر ۲۰ میلی‌گرم) در بافر فسفات۰/۱ مولار و pH=۷/۴ در تاریکی در حرارت اطاق انکوبه شد. سپس درجه گلیکوزیلاسیون هموگلوبین در حضور و عدم حضور نیکوتین و کوتینین به‌وسیله روش کالری‌متریک اندازه‌گیری شد.[۱۵و۱۶و۱۷و۱۸و۱۹]

حساسیت LDL به اکسیداسیون با روش Regnstrom و همکاران اندازه گیری شد.[۲۰]

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 (۱۰۰میلی‌لیتر بر ۲۵ میکروگرم) رسانده و روند اکسیداسیون با افزودن محلول آبی CuSO4 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 وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومترShimadzu نشان داده

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 وسیلهٔ آزمون آماری t انجام و $p<0/05$ به عنوان موارد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

*** یافته‌ها :**

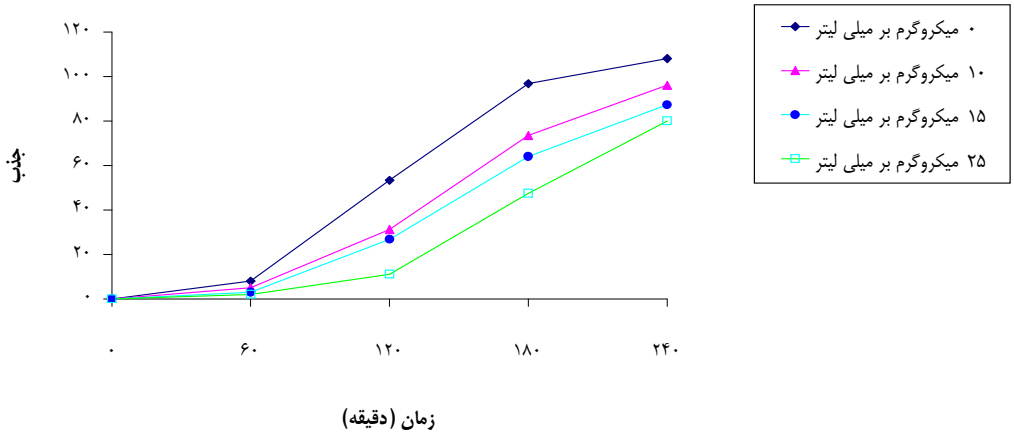
نیکوتین و کوتینین بر گیلکوزیلاسیون هموگلوبین به صورت وابسته به دوز تأثیر داشت. نیکوتین در غلظت‌های نهایی (۱۰، ۱۵ و ۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر) سبب افزایش گلیکوزیلاسیون هموگلوبین به ترتیب به میزان ۲۵، ۳۲ و ۴۷ درصد شد، در حالی‌که کوتینین در همین غلظت‌ها گلیکوزیلاسیون هموگلوبین را به میزان ۸ ، ۱۰ و ۱۲ درصد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

نیکوتین و کوتینین بر میزان حساسیت LDL به اکسیداسیون تحت القا مس اثر گذاشت(جدول شماره ۱). نیکوتین و کوتینین به‌طور معنی‌دار time Lag را قبل از آغاز تشکیل دی‌ان‌های کونژوگه افزایش داد($p<0/05$). افزایش طول Lagtime به صورت وابسته به دوز بود (نمودار شماره ۱).

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

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

نمودار ۱- مقایسه تغییرات جذب نوری ناشی از اکسیداسیون LDL توسط یون مس در نمونه کنترل و نمونه حاوی نیکوتین در طول موج ۲۳٤ نانومتر



*** بحث و نتیجه‌گیری :**

این مطالعه نشان داد که نیکوتین و کوتینین به‌عنوان مهار کننده‌های اکسیداسیون LDL تحت القای مس عمل می‌کنند. اگرچه ساختار شیمیایی آنها به عمل کردن این ترکیب‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان منجرمی‌شود، اعتقاد بر آن است که پراکسیدازهایی که سبب اکسید کردن LDL در in vitro می‌شوند تولید پراکسیدان‌ها از آنتی‌اکسیدان‌ها را القاء می‌کنند.[۸و۹و۱۰] بنابراین اثرات in vivo این دو ماده ممکن است از اثرات invitro 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.

یافته‌های حاضر نشان داد که نیکوتین و کوتینین سبب افزایش گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی هموگلوبین می‌شود که یکی از مکانیسم‌هایی است که به دنبال استعمال سیگار به آترواسکلروز منجر می‌شوند. از آنجا که گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌های بدن یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد عوارض در بیماری دیابت است استعمال سیگار به ویژه در میان دیابتی‌ها بحث بسیار پیچیده‌تری را ایجاد می‌کند.

اثرات داروی نیکوتین و کوتینین نه تنها برای افراد سیگاری حائز اهمیت است، بلکه این مشاهدات به دلیل استفاده وسیعی که از محصول‌های دخانی بدون دود می‌شود از لحاظ بالینی نیز اهمیت دارد.[۲۱]

امروزه مصرف آدامس‌های حاوی نیکوتین در ترک سیگار بسیار رایج است.[۲۲] مطالعه‌ها نشان داده است که استفاده از محصول‌های دخانی بدون دود به دلیل وجود نیکوتین سبب افزایش خطر بیماری‌های قلبی- عروقی درمردان‌جوان‌می‌شود.[۲۳]

اگرچه اطلاعات کمی در مورد اثرات جایگزینی نیکوتین بیماری‌های قلبی- عروقی در برنامه‌های ترک سیگار موجود است. نیکوتین مقادیر کلسترول HDL، LDL و نیز مقادیر سرمی توتال کلسترول را با افزایش تولید و ترشح لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌گلیسرید افزایش می‌دهد.[۲۴] برخی از مطالعات ثابت کرده‌اند که مصرف سیگار اکسیداسیون LDL را افزایش می‌دهد. علاوه بر این نشان داده شده است که استعمال سیگار باعث افزایش اتوآنتی‌بادی‌های علیه OX -LDL می‌شود ولی ارتباط مستقیم بین مصرف سیگار و افزایش اکسیداسیون LDL وجود ندارد.[۲۵]

*** 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. Supplementetion 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 atherognic potential of low-density lipoprotein. Clin Invest1992; 70: 263-8

11. Siekmeier R, Wulfroth P, Wieland H, Groβ 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 Chem1965;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. NewYork, 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.Rafigue M. Clinico-pathological features of bladder Carcinoma in women in Pakistan and smokeless tobacco asa possible risk factor. World J surg Oncol 2005 Aug 5;3(1):53

22. Russel M A, Wilson C, Feyerbend 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