

## ارتباط پلی مورفیسم پروموتور ژن ویسفاتین با اثرات متفاوت عصاره چای سبز (Camellia sinensis) بر کنترل اختلالات متابولیسی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲؛ مطالعه بالینی دو سوکور کنترل شده با دارونما

محمدجواد حسین زاده<sup>۱\*</sup>، خدیجه میرزایی<sup>۱</sup>، آرش حسین نژاد<sup>۲</sup>، مهرداد کریمی<sup>۳</sup>، نازیلا جعفری<sup>۴</sup>، محمد کامالی نژاد<sup>۵</sup>، اعظم نجم‌افشار<sup>۲</sup>، مظاهر رحمانی<sup>۶</sup>، محمدرضا اشراقیان<sup>۶</sup>

### چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر واریانت های پروموتور ژن ویسفاتین (SNP rs2110385) بر عملکرد عصاره چای سبز در کنترل بیماری دیابت در میان بیماران بود.

روش‌ها: در یک مطالعه بالینی دو سوکور کنترل شده با دارونما با استفاده از روش تصادفی Stratified، ۱۰۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲، به ۲ گروه مداخله با چای سبز و کنترل تقسیم شدند. به گروه مداخله به مدت ۸ هفته روزانه ۳ کپسول عصاره چای سبز ۵۰۰ میلی گرمی پس از هر وعده غذایی اصلی داده شد. گروه کنترل نیز به همین نحو در طول زمان مداخله کپسول دارونما دریافت می نمودند. ارزیابی های آزمایشگاهی و تن سنجی شامل HbA1C، 2hPP، FBG، پروفایل چربی، غلظت ویسفاتین، آدیپونکتین و انسولین در حالت ناشتا و نیز محاسبه BMI و WHR قبل و بعد از انجام مداخله بودند. ژنوتیپ پلی مورفیسم مورد مطالعه با استفاده از روش RFLP-PCR انجام گردید.

یافته‌ها: ارزیابی تاثیر عصاره چای سبز بر تغییرات پارامترهای بالینی اختلاف معناداری در کاهش سطوح تری گلیسرید، LDL و کلسترول تام بیماران با ژنوتیپ TT در مدت مداخله نشان داد. در ژنوتیپ GG فقط تغییرات کلسترول تام اختلاف معناداری پس از مداخله داشت. شواهد حاصل از مطالعه حاضر تغییرات معناداری در سطوح تری گلیسرید و آدیپونکتین با مداخله در میان دو گروه نشان داد که این تغییرات در میان ژنوتیپ ها معنادار نبود.

نتیجه گیری: پلی مورفیسم ژن ویسفاتین در اثرات چای سبز بر تعدیل اختلالات چربی خون در بیماران دیابتی موثر است. برای فهم چگونگی این ارتباط، انجام مطالعات تجربی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: چای سبز، ویسفاتین، پلی مورفیسم، دیابت نوع ۲، لیپید پروفایل

۱- دپارتمان تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دپارتمان طب سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- متخصص داخلی، سازمان تامین اجتماعی

۵- دپارتمان داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی

۶- دپارتمان آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\* نشانی: بلوار کشاورز، خیابان قدس، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، طبقه چهارم دپارتمان تغذیه و بیوشیمی، تلفن: ۰۹۱۲۴۳۷۹۶۷۰، پست الکترونیک: mirzaye\_mina@yahoo.com

## مقدمه

از جمله بزرگترین مشکلات بهداشت عمومی، افزایش شیوع چاقی در میان جمعیت است [۱]، که با افزایش خطر مقاومت به انسولین و نیز دیابت نوع ۲ همراه است [۲]. می توان چاقی را با افزایش میزان چربی بدن معادل دانست. در تحقیقات پیشین ارتباط بین تجمع بافت احشایی و نیز افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ شناخته شده است [۳]. از جمله ویژگی مهم متابولیکی بیماران دیابتی، چاقی به خصوص از نوع شکمی است [۴-۸].

آدیپوکلین ها، واسطه های شیمیایی هستند که توسط آدیپوسیت ها ترشح می شوند و به نظر می رسد در تنظیم عملکرد انسولین نقش دارند [۹]. ویسفاتین، پروتئینی است که به تازگی به عنوان آدیپوکلین شناخته شده و آن را در گذشته با نام عامل فزاینده کلونی پیش سلول های B<sup>۱</sup> می نامیدند و دریافته اند که بیشتر در بافت احشایی بیان می شود [۱۰]. نتایج بررسی های پیشین، افزایش غلظت پلاسمایی ویسفاتین را در افراد مبتلا به چاقی و دیابت نوع ۲ نشان داده اند [۱۱، ۱۲]. این شواهد بیان می دارند که ممکن است ویسفاتین، عامل میانجی فیزیولوژیکی مهمی میان ابتلا به چاقی و اختلالات متابولیکی حاصل از آن باشد.

از سوی دیگر، بر اساس یافته های حاصل از مطالعات بالینی اخیر، نشان داده شده که بین دریافت چای سبز و خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ ارتباط معکوسی وجود دارد [۱۳، ۱۴]. نتایج حاصل از مطالعات پیشین اثرات مهم ترکیبات عصاره چای سبز را در بهبود اختلالات مرتبط با بیماری دیابت نشان داده اند که از جمله این تاثیرات کاهش معناداری در سطوح گلوکز و انسولین با تزریق کاتچین به موشهای Zucker چاق و لاغر [۱۵]، افزایش متابولیسم گلوکز در آدیپوسیت ها [۱۶]، تقلید از عملکرد انسولین در تولید گلوکز کبدی و حفاظت از سلولهای پانکراس [۱۷]، بهبود عملکرد انسولین [۱۸] و ارتقای توانایی تولید انسولین [۱۹] و نیز کاهش پیشرفت بیماری دیابت در مبتلایان است [۱۴]. در مطالعات پیشین علاوه بر ویژگی های موثر آن در کنترل اختلالات متابولیکی حاصل

از بیماری دیابت، ویژگی مفید آن به عنوان عامل ضد چاقی از جمله کاهش وزن و توده چربی بدن و کاهش سطح چربی های خون در موش های با نقص گیرنده لپتین [۱۵، ۲۰]، تحریک ترموژنز [۲۱] و ترشح لیپید [۲۲]، تنظیم سیستم های اندوکراین انسولین-لپتین [۱۵] و مهار آنزیم های متابولیسم چربی مانند فتی اسید سنتاز<sup>۲</sup>، لیپاز کبدی<sup>۳</sup>، لیپاز معدی<sup>۴</sup>، استیل کوآکربوکسیلاز و لیپوکسیژناز [۲۲، ۲۳] نیز شناخته شده است.

مطالعات اندکی در زمینه تاثیر ترکیبات چای سبز بر بیان آدیپوکلین ها انجام شده است. در تحقیقات گذشته تاثیر ترکیبات چای سبز بر رزیستین [۲۴] و آدیپونکتین [۲۷-۲۵] ارزیابی شده؛ با این حال گزارشی در مورد تاثیر آن بر سطح ویسفاتین در مطالعات پیشین منتشر نشده است.

همچنین، علاوه بر شواهد فوق در فرضیه تاثیر احتمالی عصاره چای سبز بر سطح سرمی آدیپوکلین ها، شواهد ارائه شده از تحقیقات پیشین ویژگی مشترک میان "ویسفاتین و انسولین" [۲۸، ۱۰] و نیز "ترکیبات چای سبز و انسولین" [۲۹] را نشان می دهد که علاوه بر سایر آدیپوکلین ها، این تئوری را در مورد تاثیر احتمالی عصاره چای سبز بر سطح سرمی ویسفاتین تقویت می کند.

مطالعات اخیر در ناحیه پروموتر ژن ویسفاتین پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی را شناسایی کرده اند که تعدادی از آنها در ابتلا به دیابت نوع ۲ و کنترل گلوکز نقش دارند [۳۰]. ارتباط این پلی مورفیسم ها در ناحیه کد کننده و یا مناطق تنظیمی ژن ویسفاتین با سطح گلوکز پلاسما، قند خون ۲ ساعته و سطح انسولین، پروفایل چربی و نیز توده چربی بدن شناخته شده است [۳۱-۳۳].

بنابراین مطالعه حاضر به منظور ارزیابی ارتباط چند شکلی ساختاری ژن ویسفاتین بر میزان تاثیر عصاره چای سبز بر سطح سرمی ویسفاتین و نیز کنترل اختلالات متابولیکی حاصل از بیماری دیابت نوع ۲ در میان این بیماران طراحی شده است.

2-Fatty acid synthase

3 -Pancreatic lipase

4 -Gastric lipase

1-Pre-B cell colony-enhancing factor

## روش‌ها

## طراحی مطالعه و ارزیابی های تن سنجی

این مطالعه به صورت بالینی دوسوکور کنترل شده با دارونما بر روی ۱۰۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ که از بهمن سال ۱۳۸۶ تا خرداد سال ۱۳۸۷ به درمانگاه دیابت بیمارستان دکتر شریعتی مراجعه نمودند، انجام گردید. تشخیص دیابت در این بیماران بر اساس معیار سازمان جهانی بهداشت (WHO)<sup>1</sup> بود [۳۴]. معیار ورود به مطالعه شامل سن بیش از ۴۰ سال، نمایه توده بدنی (BMI) مساوی یا بالاتر از ۲۵ و حداقل گذشت زمان ۲ سال از زمان تشخیص دیابت بود. معیار عدم ورود به مطالعه شامل سابقه ابتلا به دیابت نوع ۱، انسولین درمانی و ابتلا به هر نوع بیماری مزمن دیگر (قلبی-عروقی، کبدی، کلیوی و سوءجذب) به جز دیابت نوع ۲ و نیز حساسیت به چای سبز بود.

پروتکل مطالعه به وسیله کمیته اخلاق مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم تصویب گردید. رضایت نامه آگاهانه از تمام افراد شرکت کننده پیش از ورود به مطالعه گرفته شد. بیماران طبق روش تصادفی Stratified به دو گروه مداخله و کنترل تقسیم شدند و به مدت ۸ هفته کپسول‌های عصاره چای سبز و یا دارونما دریافت کردند. برای هر یک از افراد شرکت کننده در مطالعه، پرسشنامه مربوط به ارزیابی های تن سنجی قبل و پس از مداخله تکمیل گردید.

متغیرهای مورد ارزیابی شامل قد (با دقت نزدیک به kg ۰/۱، قد، محیط دور کمر و باسن (با دقت ۰/۱ cm) بود. این ارزیابی ها در زمان ناشتایی افراد و در حالتی که لباس سبک بر تن داشتند و بدون کفش بودند انجام شد. با متر نواری نرم دور کمر افراد بین پایین ترین دنده و ستیغ ایلیاک و دور باسن شان در پهن ترین قسمت ناحیه کلوئتال اندازه گیری شد. نمایه توده بدنی و نسبت دور کمر به باسن افراد مورد مطالعه محاسبه گردید.

## ارزیابی های آزمایشگاهی

نمونه های خون وریدی بعد از ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی گرفته شد و پس از سانتریفیوژ و جدا کردن سرم در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سطح گلوکز پلازما (FBG<sup>2</sup>) با روش GOD/PAP، تری گلیسرید (TG<sup>3</sup>) با روش GPO-PAP، کلسترول تام با روش آنزیماتیک Endpoint، کلسترول لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL-C<sup>4</sup>) با ارزیابی کلرینس آنزیماتیک انجام شد. تمام مواد فوق با استفاده از کیت های آزمایشگاهی Randox انجام گردید (Hitachi 902). غلظت سرمی hs-CRP<sup>5</sup> که به عنوان شاخص التهابی شناخته شده، با ارزیابی های ایمنوتوربیدیمتریک<sup>6</sup> اندازه گیری شد (ارزیابی با حساسیت بالا، با دستگاه Hitachi 902).

آزمون تحمل گلوکز خوراکی (OGTT<sup>7</sup>) بر طبق استاندارد سازمان بهداشت جهانی [۳۵] انجام گردید. بر طبق آن به بیماران پس از ۱۲ ساعت ناشتایی ۷۵ گرم گلوکز محلول در ۲۵۰ میلی لیتر آب داده شد و نمونه گیری پس از ۱۲۰ دقیقه به منظور تعیین غلظت سرمی گلوکز با استفاده از روش GOD/PAP (روش آزمایشگاهی رندوکس) انجام شد. هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1C) با روش HPLC<sup>8</sup> تعویض یونی و با استفاده از دستگاه DS5 Inglad اندازه گیری شد و مقادیر به صورت درصد بیان شدند. سطح سرمی ویسفاتین با روش ELISA با حساسیت ۳۰ pg/ml و به ترتیب با ضریب تغییرات ارزیابی<sup>9</sup> درون گروهی<sup>۱۰</sup> و بین گروهی<sup>۱۱</sup> ۴/۳٪ و ۷/۵٪ تعیین گردید.

(Human visfatin ELISA kit, AdipoGen Pharmaceuticals, Belmont, Seoul Korea). سطح سرمی آدیپونکتین با روش ELISA با حساسیت ۱۰۰ pg/ml و به ترتیب با ضریب تغییرات ارزیابی درون گروهی و بین گروهی ۳/۸۲٪ و ۵/۱۵٪ تعیین گردید

2 -Fasting Blood glucose

3 - Triglyceride

4 - High density lipoprotein

5 - Hyper sensitivity c-reactive protein

6 - Imonoturbidimetric

7 - Oral glucose tolerance test

8 -High Pressure Liquid Chromatography

9 - Coefficient of variation

10 - Inter-assay

11 -Intra-assay

1 - World Health Organization

### آنالیزهای آماری

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده اند. از نرم افزار رایانه‌ای SPSS ویرایش ۱۵ برای آنالیزهای آماری استفاده شد. آزمون Paired t-test برای مقایسه گروه مداخله و کنترل به کار گرفته شد. آزمون T-test برای مقایسه متغیرهای کمی به کار گرفته شد. آنالیز تمام متغیرهای کیفی با آزمون Chi-square انجام گردید. همچنین از ANOVA برای مقایسه متغیرهای کمی در میان ژنوتیپ‌ها استفاده گردید. برای بررسی میزان تغییرات متغیرهای کمی در میان ژنوتیپ‌ها در بین دو گروه مداخله با چای سبز و گروه دارونما آزمون Two way analysis of variance به کار برده شد. سطح معناداری تمام آزمون‌ها با احتمال کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه در کل ۱۰۵ فرد شامل ۲۱ مرد (۲۰٪) و ۸۴ زن (۸۰٪) با میانگین سن، BMI و WHR به ترتیب  $54/6 \pm 9/9$  سال،  $29/18 \pm 4/24$  kg/m<sup>2</sup> و  $0/9 \pm 0/06$  بودند که از میان افراد شرکت کننده در مطالعه ۵۳ نفر در گروه مداخله و ۵۲ نفر در گروه دارونما قرار داشتند.

جدول شماره ۱ و ۲ مشخصات دموگرافیک و بیوشیمیایی جمعیت مورد بررسی را به تفکیک گروه‌های مداخله با چای سبز و گروه دارونما به ترتیب قبل و بعد از مداخله نشان می‌دهند.

یافته‌های حاصل از مطالعه نشان داد توزیع ژنوتیپ چند شکلی (rs2110385) در میان بیماران دیابت نوع ۲ در این مطالعه در مورد ژنوتیپ‌های GT,GG و TT به ترتیب ۳۱/۲٪، ۵۰/۵٪ و ۱۸/۳٪ بود. نتیجه آزمون معادله هاردی-وینبرگ<sup>۲</sup> در مطالعه ما در مورد پلی مورفیسم مورد بررسی معنادار نبود. شواهد حاصل از مطالعه حاضر تغییرات معناداری در سطوح FBG، تری گلیسرید و آدیپونکتین با مداخله در میان دو گروه نشان داد که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

(Human Adiponectin ELISA kit, AdipoGen Pharmaceuticals, Belmont, Seoul, Korea). غلظت پلاسمایی انسولین با روش ELISA با حساسیت  $1/76$   $\mu$ IU/ml و به ترتیب با ضریب تغییرات درون گروهی و بین گروهی ۲/۱۹٪ و ۴/۴٪ ارزیابی شد (Human insulin ELISA kit, DRG Pharmaceuticals, GmbH, Germany).

### روش تهیه و تجویز کپسول‌های عصاره چای سبز و دارونما

برگ‌های گیاه چای سبز (Camellia sinensis) در تیر ماه سال ۱۳۸۶ از لاهیجان جمع‌آوری گردید. این گیاه پس از جمع‌آوری، نمونه آن با شماره F.P. 28 در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران ثبت گردید. گروه کنترل کپسول‌های تهیه شده از سلولز میکروکریستالین<sup>۱</sup> خالص را دریافت نمودند. به گروه مداخله کپسول‌های عصاره چای سبز ۵۰۰ میلی گرمی (حاوی ۵۰ میلی گرم کافئین و ۸۰ میلی گرم پلی فنول‌ها) تجویز شد. نحوه تجویز کپسول‌ها به صورت یک کپسول ۵۰۰ میلی گرمی عصاره چای سبز و یا سلولز بعد از هر وعده غذای اصلی به مدت ۸ هفته بود.

### استخراج DNA

برای استخراج DNA از خون کامل از کیت استخراج DNA با نام تجاری FlaxiGen (QIAGENkit Inc. Valencia, CA) استفاده گردید. DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش‌های PCR و RFLP در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### تعیین ژنوتیپ

DNA ژنومیک تمام افراد به منظور تعیین نوکلئوتید G یا T در موقعیت 4689G/T-ژن ویسفاتین با روش RFLP-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. ژنوتیپ ویسفاتین با استفاده از کیت ژنوتیپ ویسفاتین RS2110385 طراحی شده توسط نویسندگان (با شماره ثبت ۵۹۹۲۱) تعیین گردید.

<sup>2</sup> Hardy-Weinberg equilibrium

1- Microcrystalline cellulose

جدول ۱- مشخصات دموگرافیک و بیوشیمیایی گروه‌های مورد بررسی قبل از مداخله

متغیرها	گروه مداخله با چای سبز (تعداد=۴۶)	گروه دارونما (تعداد=۴۶)
سن (سال)*	۵۵±۱۱	۵۴±۹
نمایه توده بدنی (kg/m <sup>2</sup> )*	۲۸/۶±۴/۲	۲۹/۵±۴/۲
WHR*	۰/۹۱±۰/۰۶	۰/۹۰±۰/۰۵
گلوکز پلاسما در حالت ناشتا (mg/dl)*	۱۷۸±۴۹	۱۶۶±۵۴
تست تحمل گلوکز خوراکی (mg/dl)*	۲۰۲±۶۹	۱۹۹±۷۰
LDL (mg/dl)*	۱۰۹±۲۷	۱۱۱±۲۵
HDL (mg/dl)*	۴۵±۱۲	۴۴±۱۰
TC (mg/dl)*	۱۸۸±۴۰	۱۹۲±۳۴
TG (mg/dl)*	۱۶۲±۱۱۰	۱۹۰±۱۲۷
hsCRP †	۲/۳۱±۲/۱۷	۲/۳۸±۳/۰۵
Hb A1C (%)*	۸/۳۳±۱/۹۶	۸/۱۵±۲/۰۸
سطح سرمی انسولین در حالت ناشتا (μU/ml) †	۱۴/۵۴±۶/۸۷	۱۶/۱۲±۵/۱۵
آدیپونکتین (μg/ml)*	۷/۲۰±۳/۸۷	۷/۳۷±۴/۷۰
سطح سرمی ویسفاتین (ng/ml)*	۱۷/۹۸±۱۵/۹۲	۱۸/۳۲±۱۶/۳۱

WHR: Waist -Hip Ratio

\* مقادیر P معنی دار نبود (P> ۰/۰۵)

† مقادیر P معنی دار بود (P< ۰/۰۵)

جدول ۲- مشخصات دموگرافیک و بیوشیمیایی گروه‌های مورد بررسی بعد از مداخله

متغیرها	گروه مداخله با چای سبز (تعداد=۴۶)	گروه دارونما (تعداد=۴۶)
سن (سال)*	۵۵±۱۱	۵۴±۹
نمایه توده بدنی (kg/m <sup>2</sup> )*	۲۸/۴±۴/۴	۲۹/۲±۳/۹
WHR*	۰/۸۹±۰/۰۶	۰/۹۰±۰/۰۵
گلوکز پلاسما در حالت ناشتا (mg/dl)*	۱۶۹±۶۰	۱۸۴±۶۴
تست تحمل گلوکز خوراکی (mg/dl)*	۲۰۱±۷۱	۲۱۵±۷۲
LDL (mg/dl)*	۱۰۷±۲۱	۱۰۷±۲۲
HDL (mg/dl)*	۴۶±۱۰	۴۲±۱۰
TC (mg/dl)*	۱۸۲±۳۶	۱۸۴±۳۸
TG (mg/dl)*	۱۷۱±۱۲۵	۲۲۸±۱۷۶
hsCRP*	۲/۳۵±۲/۷۴	۲/۳۹± ۱/۷۷
Hb A1C (%)*	۷/۱۵±۱/۶۱	۸/۳۷±۲/۱۸
سطح سرمی انسولین در حالت ناشتا (μU/ml)*	۱۶/۶۵±۷/۶۹	۱۵/۷۹± ۶/۲۹
آدیپونکتین (μg/ml)*	۸/۴۲±۳/۸۱	۷/۳۷±۴/۹۱
سطح سرمی ویسفاتین (ng/ml)*	۲۹/۲۳±۲۳/۴۷	۲۱/۱۷±۲۰/۸۱

Hip Ratio-WHR: Waist

\* مقادیر P معنی دار نبود (P> ۰/۰۵)

جدول ۳- سطح معناداری تغییرات معیار در متغیرهای مورد بررسی در گروه‌های مداخله و کنترل پس از مدت مداخله در میان ژنوتیپ‌های مختلف

میزان تغییر در گروه دارونما (mean±SD)	میزان تغییر در گروه چای سبز (mean±SD)	ژنوتیپ	اختلاف متغیرها §
-۰/۱۵±۱/۷۴	۰/۹۲±۱/۳۸	TT	وزن (kg)
۱/۳۱±۲/۶۷	۰/۱۱±۱/۹۷	GG	
۰/۷۰±۲/۳۵	-۰/۱۹±۱/۹۶	GT	
۰/۰۲±۰/۰۱	-۰/۰۱۴±۰/۰۲	TT	نسبت دور کمر به باسن
۰/۰۲±۰/۰۲	-۰/۰۱۴±۰/۰۲	GG	
۰/۰۱۷±۰/۰۳۱	-۰/۰۰۵±۰/۰۲	GT	
-۰/۱۱۲±۰/۸۳	-۰/۴۱۶±۰/۷۱	TT	نمایه توده بدنی (kg/m <sup>2</sup> )
۰/۴۰±۰/۹۹	۰/۱۱۶±۰/۹۰	GG	
-۰/۰۷±۰/۷۱	-۰/۱۰۳±۰/۷۱	GT	
-۹/۴۲±۲۳/۷۲	-۳/۰۰±۰/۰۰	TT	گلوکز خون ناشتا (mg/dl)
۴۱/۸۰±۳۵/۸۰	۱۰/۱۸±۲۸/۳۲	GG	
۱/۳۸±۴۸/۲۹	۹/۰۶±۳۵/۳۱	GT	
-۱۶/۳۰±۳۱/۰۰	-۶/۳۲±۷۵/۷۶	TT	آزمون تحمل گلوکز خوراکی (mg/dl)
۲۱/۴۶±۵۱/۴۳	-۱۹/۴۵±۹۵/۷۶	GG	
۴/۷۶±۸۴/۲۳	۲۶/۱۳±۶۱/۵۴	GT	
۶/۸۶±۲۵/۲۴	-۱/۴۰±۰/۰۰	* TT	LDL-C (mg/dl)
-۴/۲۲±۶/۵۷	-۴/۰۷±۱۳/۴۰	GG	
-۱۵/۰۲±۸/۴۸	۴/۲۹±۱۳/۵۵	GT	
۱/۲۰±۶/۰۵	۱/۰۰±۰/۰۰	TT	HDL-C (mg/dl)
۱/۱۴±۶/۷۸	-۱/۱۱±۵/۹۴	GG	
۱/۹۰±۶/۷۶	۲/۷۳±۷/۰۸	GT	
۵/۴۶±۲۱/۹۳	-۷/۴۰±۰/۰۰	TT	کلسترول تام (mg/dl)
-۸/۸۲±۱۰/۴۷	-۱۰/۷۰±۲۶/۴۱	* GG	
-۲۷/۱۰±۲/۶۰	-۰/۶۲±۱۹/۲۷	GT	
۷۵/۳۶±۱۱۴/۹۵	-۴۱/۱۰±۰/۰۰	* TT	تری‌گلیسرید (mg/dl)
-۱۱/۳۱±۶۴/۱۴	۶/۲۶±۷۷/۱۵	GG	
-۶۱/۹۲±۱۴/۳۳	-۶/۲۶±۵۲/۰۴	* GT	
-۲/۸۳±۴/۷۴	۰/۹۴±۰/۰۰	TT	Hs-CRP
-۰/۱۹±۲/۶۱	-۰/۷۰±۱/۵۱	GG	
-۱/۲۸±۱/۵۴	-۰/۰۴±۲/۵۰	GT	
۳/۴۴±۵/۶۴	۵/۹۰±۰/۰۰	TT	انسولین ناشتا (µU/ml)
-۱/۲۰±۲/۹۶	۱/۴۵±۴/۲۴	GG	
۲/۷۶±۶/۶۰	۱/۱۴±۶/۱۳	GT	
-۴/۲۶±۷/۸۶	۰/۴۰±۰/۰۰	TT	آدیپونکتین (µg/ml)
۰/۱۶۶±۲/۵۴	۲/۲۳±۱/۳۲	GG	
۱/۸۶±۲/۳۹	۱/۳۳±۲/۴۴	GT	
۴/۰۸±۹/۳۵	-۴/۱۰±۰/۰۰	TT	ویسفاتین (ng/ml)
-۲/۰۲±۱/۲۷	۱۴/۳۳±۴/۲۸	GG	
-۶/۲۷±۱/۷۱	۱۴/۱۲±۰/۹۴	GT	

§ Dif اختلاف مقادیر متغیرهای مورد بررسی بین قبل و بعد از مداخله است

\* فقط در این موارد مقادیر P از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

در بررسی تاثیر چای سبز بر گلوکز پلاسما در راستای نتایج مطالعه حاضر بود.

همچنین تحقیق Fukino و همکارانش [۴۷] بر روی بیماران مبتلا به دیابت که به مدت دو ماه مکمل پلی فنولی دریافت می نمودند، تغییر معناداری در سطوح گلوکز، انسولین و HbA1c نشان نداد و در بیان نتایج شان کاهش اندکی در سطوح هر یک از متغیرهای عنوان شده گزارش نمودند. محققان علت این نتایج را به فقدان محدودیت در نوشیدن چای سبز در گروه کنترل مرتبط دانستند که ممکن است عاملی در پوشاندن تغییرات بالقوه ایجاد شده باشد. هرچند یافته های حاصل از مطالعه حاضر نیز چنین بود اما میزان تغییرات HbA1c پس از مداخله بین دو گروه معنادار نبود. از آنجایی که این یافته نشان می دهد مقادیر شاخص کنترل قند خون طولانی مدت تغییر معناداری در مدت مداخله نداشته، مهم است و نشان می دهد با وجود تغییرات گلوکز خون، تغییرات آن در طولانی مدت معنادار نبود که با یافته های مطالعه حاضر همراهی دارد [۴۶].

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که میزان تغییر سطح سرمی آدیپونکتین در طول مدت مداخله در میان دو گروه معنادار بود. آدیپونکتین، آدیپوکینی است که از آدیپوسیت ها ترشح می شود. سطح سرمی آدیپونکتین در افراد مبتلا به چاقی، بیماری شریان کرونری و دیابت نوع ۲ کاهش می یابد [۵۰-۵۳]. این آدیپوکین در مطالعات مختلف به عنوان عامل آنتی دیابتیک و آنتی آتروژنیک [۵۴،۵۵] مطرح شده و اثرات ضد التهابی [۵۸-۵۵] و آنتی ایزوژنیک [۵۹،۶۰] شناخته شده ای دارد. مطالعات پیشین در بررسی اثرات ترکیبات چای سبز بر آدیپونکتین به عنوان نشانگر زیستی مفید، افزایش غلظت آن را در حیوانات [۶۱،۶۲] و نیز انسان [۶۳] نشان داده اند. یافته های مطالعه حاضر نیز در با نتایج مطالعات فوق همراهی دارد. علاوه بر آن Cho و همکارانش [۲۵] سطوح بیان و ترشح آدیپونکتین را با تزریق هر یک از پلی فنول های چای سبز در آدیپوسیت سنجیدند. نتایج مطالعه بالینی حاضر با یافته های مطالعه *In vitro* همخوانی دارد. شواهد حاصل از این بررسی، اختلاف معناداری در میزان تغییر سطوح HDL، LDL و کلسترول تام پس از

شواهد حاصل از مطالعه حاضر تغییرات معناداری در سطوح FBG، تری گلیسرید و آدیپونکتین با مداخله در میان دو گروه نشان داد. ارزیابی تاثیر عصاره چای سبز بر تغییرات پارامترهای بالینی اختلاف معناداری در کاهش سطوح تری گلیسرید، LDL و کلسترول تام بیماران با ژنوتیپ TT در مدت مداخله نشان داد. در ژنوتیپ GG فقط تغییرات کلسترول تام اختلاف معناداری پس از مداخله داشت (جدول ۳). سطح سرمی ویسفاتین در ژنوتیپ TT گروه مداخله با عصاره چای سبز به میزان ۴/۱ ng/ml کاهش داشت، در حالی که بیماران با ژنوتیپ GG و GT این گروه به ترتیب ۱۴/۳۳ و ۱۴/۱۲ ng/ml افزایش نشان دادند.

## بحث

شیوع بیماری دیابت به علت افزایش شیوع چاقی و سایر عوامل خطر متابولیکی، به سرعت در حال افزایش است [۳۶-۳۸]. شواهد حاصل از مطالعات پیشین اثرات مفید ترکیبات چای سبز را در کنترل چاقی و دیابت نشان داده اند [۳۹-۴۲]. ویسفاتین آدیپوکینی است که به نظر می رسد نقش مهمی در هموستاز گلوکز خون ایفا می کند [۴۳].

چندین مطالعه اثرات ترکیبات چای سبز را بر کنترل گلوکز خون ارزیابی نموده اند [۴۴-۴۷] که شواهد حاصل از آنها نتایج ضد و نقیضی در این زمینه داشته است، با وجود این یافته های اغلب آنها اثرات مفید و محافظتی ترکیبات چای سبز را بر اختلالات متابولیکی حاصل از بیماری دیابت را در طولانی مدت بیان داشته اند که از آن جمله می توان به نتایج تحقیقات Rizvi و همکارانش [۴۸] و نیز Nakachi و همکارانش [۴۹] اشاره نمود. شواهد حاصل از مطالعه حاضر، اختلاف معناداری در میزان تغییرات گلوکز خون ناشتا در مدت مداخله بین دو گروه نشان می دهد. اگرچه میزان تغییرات سطوح قند دوساعته، انسولین و HbA1c بین دو گروه معنادار نبود. یافته های حاصل از بررسی Tsuneki و همکارانش [۴۵]

مداخله بین دو گروه نشان نداد. با این حال این تغییرات در بین ژنوتیپ های مختلف متفاوت بود.

یافته های این مطالعه نشان داد که در بیماران با ژنوتیپ TT میزان کاهش تری گلیسرید، LDL و کلسترول تام در گروه مداخله با چای سبز نسبت به دارونما معنادار است. در بیماران با ژنوتیپ GG فقط کلسترول تام کاهش معناداری در گروه مداخله نسبت به کنترل نشان داد. مطالعات پیشین تاثیر مفید ترکیبات چای سبز بر کلسترول و تری اسیل گلیسرول ها را نشان داده اند [۴۹،۶۴]. مطالعات بر روی حیوانات نیز نشان داده که عصاره چای سبز، سطوح LDL کلسترول و تری گلیسرید را کاهش می دهد [۶۵،۶۶]. سازوکار دقیق این تاثیر تاکنون شناخته نشده است.

یافته های حاصل از یک مطالعه In vivo در توجیه احتمالی تاثیر ترکیبات چای سبز، این پدیده را در تجمع چربی در حین تکامل سلول های پره آدیپوسیت وابسته به دوز گزارش نموده است [۶۷]. در مطالعه ای که بر روی مردان توسط Nagao و همکارانش [۶۸] انجام شد، دریافتند که دریافت عصاره چای سبز باعث کاهش سطوح مالون دی آلدئید LDL می شود اما بر میزان تغییرات چربی های خون اختلاف معنادار نداشت.

آنها اظهار داشتند که این یافته ممکن است به علت دوز ناکافی عصاره چای سبز باشد که تغییر معناداری در میان دو گروه مورد بررسی نشان نداد. یافته های مطالعه کاهش سطوح تری گلیسرید، LDL و کلسترول تام را تنها در ژنوتیپ TT نشان می دهد. به نظر می رسد که چندشکلی ویسفاتین عامل مهمی در کنترل پروفایل های چربی در بیماران مبتلا به دیابت گروه مداخله با چای سبز می باشد. بنابر یافته های حاصل از این مطالعه می توان بیان داشت که علاوه بر دوز عصاره چای سبز، تفاوت جنسیت، نحوه تجویز و مدت زمان آن که در مطالعات پیشین به تاثیر آنها در علت پاسخ های متفاوت به درمان اشاره شده، چند شکلی ژن ویسفاتین نیز عامل مهمی است که از دستاوردهای مهم مطالعه حاضر می باشد.

شواهد به دست آمده از این بررسی، تغییر معناداری در سطح سرمی ویسفاتین پس از مداخله بین دو گروه نشان

نداد. مطالعات اندکی اخیراً به صورت In vivo به بررسی نقش عوامل مختلف بر تغییر میزان تولید ویسفاتین پرداخته اند.

نتایج این مطالعات نشان داده که بیان ژن ویسفاتین تحت تاثیر پیغام های خارج سلولی مختلفی از جمله ایتروکین-۶ [۶۹]، ایکوزاپنتانوئیک اسید [۷۰] و فاکتور نکروز توموری آلفا [۷۱] می باشد، اگر چه در اغلب موارد ارتباط این عوامل با میزان بیان و ترشح ویسفاتین به روشنی شناخته نشده است. نتایج ارزیابی تاثیر EPA<sup>1</sup> بر تولید ویسفاتین در سلول های آدیپوسیت [۷۰] اثر تحریکی آن را در تولید ویسفاتین نشان داد.

تحقیق دیگری در این زمینه اثرات مهار ایتروکین-۶ [۶۹] را در بیان ویسفاتین نشان داد. تحقیق بسیار جدیدی که به بررسی اثر فاکتور نکروز توموری آلفا [۷۱] روی ژن های مربوط به متابولیسم چندین آدیپوکین درگیر در مقاومت به انسولین پرداخته نیز نشان داده که سطح ویسفاتین پلاسما و نیز میزان بیان mRNA آن به طور معناداری با فاکتور نکروز توموری آلفا تنظیم کاهشی<sup>۲</sup> می یابد.

بر اساس شواهد حاصل از بیان سازوکار تنظیم غلظت ویسفاتین در مطالعات پیشین، به نظر می رسد که عوامل التهابی مانند ایتروکین-۶ و فاکتور نکروز توموری آلفا، اثر مهاری در تولید ویسفاتین دارند. از سوی دیگر در تایید فرضیه فوق، EPA به عنوان فاکتور ضد التهابی [۷۲،۷۳] اثر القایی در تولید این آدیپوکین دارد.

در مطالعه حاضر عصاره چای سبز به عنوان یک فاکتور ضد التهابی [۷۴،۷۵]، باعث افزایش سطح سرمی ویسفاتین در گروه چای سبز در مدت مداخله گردید، اگر چه این افزایش معنادار نبود. ارزیابی ارتباط ژنوتیپ در میزان تغییرات سطح ویسفاتین در اثر مداخله با چای سبز، تغییر در دو جهت مختلف را در میان ژنوتیپ ها نشان داد و غلظت ویسفاتین در ژنوتیپ TT کاهش و در GG افزایش داشت. به نظر می رسد که مداخله با عصاره چای سبز باعث ایجاد تغییرات متفاوتی بر سطح سرمی ویسفاتین بر اساس

1 -Eicosa pentanoic acid

2- Down-regulate

### سیاسگزاری

این مطالعه تحت حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. همکاران پروژه از جناب آقای مهندس محمد کمالی نژاد در خصوص همکاری صمیمانه ایشان در خصوص جمع آوری گیاه و تهیه کپسول چای سبز کمال تشکر را دارند.

ژنوتیپ آن می شوند. در مجموع، تحقیق حاضر اولین مطالعه ای است که به بررسی کنترل پروفایل چربی با چای سبز در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ با توجه به تفاوت های ژنتیکی آنها پرداخته که ممکن است این اثر تحت تاثیر غلظت های متفاوت این پروتئین در میان ژنوتیپ های مختلف باشد. این که آیا عصاره چای سبز بر سازوکار تولید ویسفاتین و یا تنظیم عملکرد آن تاثیر می گذارد ناشناخته است. آشکار است که مطالعات بیشتری در این زمینه برای روشن شدن عملکرد هریک از ترکیبات چای سبز بر بیان ژن ویسفاتین ضروری است.

### ماخذ

- Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP: The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991–1998. *JAMA* 1999 ; 282:1519–1522
- Cummings DE, Schwartz MW, Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med* 2003;54:453–471.
- Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C: Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 1990; 10:497–511.
- Susan Sam, Steven Haffner, Michael H. Davidson, Ralph B. D'Agostino, Sr., Steven Feinstein, George Kondos, Alfonso Perez, and Theodore Mazzone, Relationship of Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue with Lipoprotein Particle Number and Size in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2008;57:2022-2027.
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34(1):2-11.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548–2556.
- Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Rahmani M, Shafaei AR, Larijani B. Relationship between leptin concentration and insulin resistance. *Horm Metab Res* 2007;39(12):903-7.
- Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911–919.
- Havel PJ: Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:51–59.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307:426–430.
- Fonseca-Alaniz, M.H., Takada, J., Alonso-Vale, M.I., Lima, F.B., Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83(Suppl 5):S192-203.
- Jerzy Bełtowski. Apelin and visfatin: Unique “beneficial” adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* 2006; 12(6): RA 112-9.
- Büyükbalcı A, El SN. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods Hum Nutr* 2008;63(1):27-33.
- H. Iso, C. Date, K. Wakai, M. Fukui and A. Tamakoshi, The Relationship between Green Tea and Total Caffeine Intake and Risk for Self-Reported Type 2 Diabetes among Japanese Adults. *Ann Intern Med* 2006;144:554–562.
- Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 2000; 141: 980–987.
- Broadhurst CL, Polansky MM, Anderson RA. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem* 2000;48: 849–852.
- Song EK, Hur H, and Han MK. Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *Arch Pharm Res* 2003;26: 559–563.
- Anderson RA and Polansky M. Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem* 2002;50: 7182–7186.
- Nagao, T., Meguro, S., Hase, T., Otsuka, K., et al, A Catechin-rich Beverage Improves Obesity and Blood Glucose Control in Patients With Type 2 Diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17(2) :310-317.

- 20- Kao YH, Hippakka RA, and Liao S. Modulation of obesity by a green tea catechin. *Am J Clin Nutr* 2000;72: 1232–1241.
- 21- Dulloo AG, Duret C, Rohrer D, Girardier L, Mensi N, Fathi M, Chantre P, and Vandermander J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 1040–1045.
- 22- Liao S, Kao YH, and Hippakka RA. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam Horm* 2001;62: 1–94.
- 23- Wang X and Tian W. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288: 1200–1206.
- 24- Liu HS, Chen YH, Hung PF, Kao YH. Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 ;290(2):E273-81.
- 25- Cho, S.Y., Park, P.J., Shin, H.J., Kim, Y.K., et al, (-)-Catechin suppresses expression of Kruppel-like factor 7 and increases expression and secretion of adiponectin protein in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292(4) :E1166-72.
- 26- Shirai N, Suzuki H. Effects of simultaneous intakes of fish oil and green tea extracts on plasma, glucose, insulin, C-peptide, and adiponectin and on liver lipid concentrations in mice fed low- and high-fat diets. *Ann Nutr Metab* 2008;52(3):241-9.
- 27- Serisier S, Leray V, Poudroux W, Magot T, Ouguerram K, Nguyen P. Effects of green tea on insulin sensitivity, lipid profile and expression of PPARalpha and PPARgamma and their target genes in obese dogs. *Br J Nutr* 2008;99(6):1208-16.
- 28- Hug C, Lodish HF, Visfatin: a new adipokine. *Science* 2005;307:366–367.
- 29- Mary E, Waltner-Law, Xiaohui L, Wang, Brian K, Law, Robert K, Hall, Masao Nawano, and Daryl K. Granner. Epigallocatechin Gallate, a Constituent of Green Tea, Represses Hepatic Glucose Production. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 34933–34940.
- 30- Zhang YY, Gottardo L, Thompson R, Powers C, Nolan D, Duffy J, Marescotti MC, Avogaro A, Doria A, A visfatin promoter polymorphism is associated with low-grade inflammation and type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2006 ;14(12):2119-26.
- 31- Bailey SD, Loreda-Osti JC, Lepage P, Faith J, Fontaine J, Desbiens KM, Hudson TJ, Bouchard C, Gaudet D, Pérusse L, Vohl MC, Engert JC. Common polymorphisms in the promoter of the visfatin gene (PBEF1) influence plasma insulin levels in a French-Canadian population. *Diabetes* 2006; 55(10): 2896-902.
- 32- Körner A, Böttcher Y, Enigk B, Kiess W, Stumvoll M, Kovacs P. Effects of genetic variation in the visfatin gene (PBEF1) on obesity, glucose metabolism, and blood pressure in children. *Metabolism* 2007; 56(6):772-7.
- 33- Jian WX, Luo TH, Gu YY, Zhang HL, Zheng S, Dai M, Han JF, Zhao Y, Li G, Luo M. The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabet Med* 2006;23(9):967-73.
- 34- Alberti KG, Zimmet PZ, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15:539–553.
- 35- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412–419.
- 36- King H., Aubert R.E., Herman W.H.: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
- 37- Hedley A.A., Ogden C.L., Johnson C.L., et al: Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA* 2004; 291: 2847-2850.
- 38- Narayan K.M., Boyle J.P., Thompson T.J., et al: Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *JAMA* 2003;290:1884-1890.
- 39- Lambert et al., 2003 J.D. Lambert, M.J. Lee, H. Lu, X. Meng, J.J. Hong, D.N. Seril, M.G. Sturgill and C.S. Yang, Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *J Nutr* 2003;133 : 4172–4177.
- 40- S. Mandel, O. Weinreb, T. Amit and M.B. Youdim, Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 2004; 88 : 1555–1569.
- 41- Moyers and Kumar, 2004 S.B. Moyers and N.B. Kumar, Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. *Nutr Rev* 2004; 62: 204–211.
- 42- Park and Surh, 2004 O.J. Park and Y.J. Surh, Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicol Lett* 2004; 150 : 43–56.
- 43- Fantuzzi G Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:911–919.
- 44- H. Iso, C. Date, K. Wakai, M. Fukui and A. Tamakoshi, The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type-2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med* 2006; 144:554–562.
- 45- H. Tsuneki, M. Ishizuka, M. Terasawa, J.B. Wu, T. Sasaoka and I. Kimura, Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose

- metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol* 2004; 4 :18.
- 46- Y. Fukino, A. Ikeda, K. Maruyama, N. Aoki, T. Okubo and H. Iso, Randomized controlled trial for an effect of green tea-extract powder supplementation on glucose abnormalities. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62:953–960.
  - 47- Y. Fukino, M. Shimbo, N. Aoki, T. Okubo and H. Iso, Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005; 51:335–342.
  - 48- S.I. Rizvi, M.A. Zaid, R. Anis and N. Mishra, Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 70–75.
  - 49- K. Nakachi, S. Matsuyama, S. Miyake, M. Sukanuma and K. Imai, Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 2000;13:49–54.
  - 50- Arita, Y; Kihara, S; Ouchi, N; Takahashi, M; Maeda, K; Miyagawa, J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79–83.
  - 51- Miyazaki T, Shimada K, Mokuno H, Daida H, Adipocyte derived protein, adiponectin, is associated with smoking status in patients with coronary artery disease. *Heart* 2003;89:663–664.
  - 52- Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimoura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y, Osaka CAD Study Group Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:85–89.
  - 53- Hu, E; Liang, P; Spiegelman, BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697–10703.
  - 54- Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002 ; 26:106(22):2767-70.
  - 55- Ouchi, N; Kihara, S; Arita, Y; Okamoto, Y; Maeda, K; Kuriyama, H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102:1296–1301.
  - 56- Wolf, AM; Wolf, D; Rumpold, H; Enrich, B; Tilg, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. 2004;323:630–635.
  - 57- Wulster-Radcliffe, MC; Ajuwon, KM; Wang, J; Christian, JA; Spurlock, ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:924–929.
  - 58- Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; 96:1723–1732
  - 59- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:1304–1309.
  - 60- Shibata, R; Ouchi, N; Kihara, S; Sato, K; Funahashi, T; Walsh, K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2004;279:28670–28674.
  - 61- M. Shimada, K. Mochizuki, N. Sakurai and T. Goda, Dietary supplementation with epigallocatechin gallate elevates levels of circulating adiponectin in non-obese Type-2 diabetic Goto-Kakizaki rats, *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71 :2079–2082.
  - 62- M.A. Potenza, F.L. Marasciulo, M. Tarquinio, E. Tiravanti, G. Colantuono and A. Federici et al., EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:1378–1387.
  - 63- Chung-Hua Hsu, Tung-Hu Tsai, Yung-Hsi Kao, Kung-Chang Hwang, Ting-Yu Tseng and Pesus Chou, Effect of green tea extract on obese women: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Nutr* 2008 ;27 (3): 363 -70.
  - 64- Imai and Nakachi, 1995 K. Imai and K. Nakachi, Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ* 1995; 310: 693–696.
  - 65- T. Yokozawa, T. Nakagawa and K. Kitani, Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3549–3552.
  - 66- Y. Miura, T. Chiba, I. Tomita, H. Koizumi, S. Miura and K. Umegaki et al., Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 2001; 131:27–32.
  - 67- J.K. Lin and S.Y. Lin-Shiau, Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50:211–217.
  - 68- T. Nagao, Y. Komine, S. Soga, S. Meguro, T. Hase, Y. Tanaka and I. Tokimitsu, Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 122–129.
  - 69- Susan Kralisch, Johannes Klein, Ulrike Lossner, Matthias Bluher, Ralf Paschke, Michael Stumvoll, and Mathias Fasshauer, Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289: E586-E590

- 70- Lorente-Cebrián S, Bustos M, Marti A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Mar 18.
- 71- Li L, Yang G, Shi S, Yang M, Liu H, Boden G. The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in vivo. *Cytokine* 2009;45(1):12-9.
- 72- Farzaneh-Far R, Harris WS, Garg S, Na B, Whooley MA. Inverse association of erythrocyte n-3 fatty acid levels with inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* 2008 Dec 14. [Epub ahead of print }
- 73- Micallef MA, Munro IA, Garg ML. An inverse relationship between plasma n-3 fatty acids and C-reactive protein in healthy individuals. *Eur J Clin Nutr* 2009 Apr 8. [Epub ahead of print]
- 74- Cao H, Kelly MA, Kari F, Dawson HD, Urban JF Jr, Coves S, Roussel AM, Anderson RA. Green tea increases anti-inflammatory tristetraproline and decreases pro-inflammatory tumor necrosis factor mRNA levels in rats. *J Inflamm (Lond)* 2007 ; 5:4:1
- 75- Paterniti I, Genovese T, Crisafulli C, Mazzon E, Di Paola R, Galuppo M, Bramanti P, Cuzzocrea S. Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 380(2):179-92.