Physiology and Pharmacology, 12 (3), 201 - 208
Fall 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Evaluation of plasma concentration changes of nitric oxide metabolites during glucose tolerance test in type II diabetic rats

Asghar Ghasemi [1], Hamid Farahani [2], Saleh Zahesi Asl [1*]

1- Endocrine Physiology Lab., Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University (M.C.) Tehran, Iran.
2. Dept. Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University (M.C.) Tehran, Iran.

Received: 5 May 2008 Revised: 9 Sep 2008 Accepted: 10 Sep 2008

Abstract

Introduction: Repeated hyperglycemia play an important role in development of atherosclerosis in diabetic patients. Endothelium is the first-line defense against atherosclerosis and nitric oxide has a major role in this task. In this study, changes in plasma concentration of nitric oxide metabolites (NO_x) during glucose tolerance test were evaluated in type II diabetic rats.

Methods: Male neonatal Wistar rats were divided into control and diabetic groups. Type II diabetes was induced by administration of Streptozotocin (100 mg/kg, i.p.) to neonatal rats on day 2. Plasma glucose and NO_x concentration were measured on days 7, 30, 45, 60, and 75. Intravenous glucose tolerance test was done in adult rats and blood samples were collected 0, 5, 10, 30, and 60 min after glucose infusion for determining plasma glucose, insulin, and NO_x. Two-way mixed (between-within) ANOVA was used for comparing data.

Results: Plasma glucose was returned to basal values 60 min after glucose injection in the control group, while in diabetic rats it was higher than basal levels ($P < 0.001$). After glucose injection, plasma insulin concentration was increased to 4.5 and 1.9 folds in control and diabetic groups, respectively. Basal NO_x concentration was higher in diabetic rats (50.4 ± 6.4 vs. 28.8 ± 3.8 μmol/l, $P < 0.05$). During glucose tolerance test there was 35 and 62 % fall in plasma NO_x concentration in control and diabetic groups, respectively. This reduction returned to basal values after 30 min in the control group, while in diabetic rats it was 17% less than basal levels 60 min after glucose injection.

Conclusion: Decreased nitric oxide production or increased degradation may be the cause of endothelial dysfunction and atherosclerosis in type II diabetes.

Keywords: Nitric oxide, Type II diabetes, Glucose tolerance test.

* Corresponding author e- mail: zahedi@endocrine.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۳)، ۲۰۱ - ۲۰۸
پاییز ۱۳۸۷

سنجش تغییرات سطح پلاسمایی متابولیت‌های اکسید نیتریک در موش صحرایی در طی تست تحمل گلوکز در دیابت نوع ۲

اصغر قاسمی[۱]، حمید فراهانی[۲]، صالح زاهدی اصل[۱*]

۱. آزمایشگاه فیزیولوژی غدد، مرکز تحقیقات غدد درون ریز، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۱۶ اردیبهشت ۸۷ بازبینی: ۱۹ شهریور ۸۷ پذیرش: ۲۰ شهریور ۸۷

چکیده

مقدمه: هیپرگلیسمی‌های مکرر نقش مهمی در گسترش آترواسکلروز در دیابت دارند. اندوتلیوم اولین سیستم دفاعی در برابر آترواسکلروز می‌باشد و اکسید نیتریک نقش مهمی در این دفاع دارد. هدف این مطالعه تعیین تغییرات سطح پلاسمایی متابولیت‌های اکسید نیتریک (NO_x) در طی تست تحمل گلوکز در موش‌های دیابتی نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

روش‌ها: نوزادان نر موش‌های صحرایی در دو گروه کنترل و دیابتی قرار گرفتند. برای ایجاد دیابت نوع ۲ استروپتوزوتوسین (۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی به نوزادان تزریق شد. گلوکز و NO_x پلاسما در روزهای ۷، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ اندازه‌گیری شد. پس از بالغ شدن حیوانات تست تحمل گلوکز وریدی انجام و نمونه‌های خون در فواصل ۰، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه برای اندازه‌گیری مقدار گلوکز، انسولین و NO_x تهیه شد. آنالیز واریانس دو طرفه مخلوط برای مقایسه داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: در گروه کنترل افزایش گلوکز در تست تحمل گلوکز پس از ۶۰ دقیقه به مقدار قبل از انجام تست بازگشت در حالیکه در گروه دیابتی همچنان بالا بود ($P<۰/۰۰۱$). افزایش انسولین پلاسما پس از تزریق گلوکز در گروه کنترل و دیابتی به ترتیب ۴/۵ و ۱/۹ برابر شد. مقادیر پایه NO_x در گروه دیابتی بالاتر بود (۶/۴ ± ۵۰/۴ در مقابل ۳/۸ ± ۲۸/۸ میکرومول در لیتر، $P<۰/۰۵$). بعد از تزریق گلوکز سطح پلاسمایی NO_x در گروه‌های کنترل و دیابتی به ترتیب ۳۵ و ۶۲ درصد کاهش داشت و در گروه کنترل پس از ۳۰ دقیقه تقریبا به مقدار اولیه بازگشت در حالیکه در گروه دیابتی در زمان ۶۰ دقیقه نیز ۱۷ درصد کمتر از مقدار پایه اولیه بود.

نتیجه‌گیری: کاهش تولید اکسید نیتریک یا افزایش تخریب آن در طی هیپرگلیسمی ممکن است دلیلی برای نقص عملکرد اندوتلیوم و آترواسکلروز در بیماران دیابتی باشد.

واژه‌های کلیدی: اکسید نیتریک، دیابت نوع ۲، تست تحمل گلوکز.

مقدمه

دیابت از شایعترین بیماری‌های مزمن است که به دو صورت نوع ۱ و ۲ وجود دارد و ۹۰ درصد موارد آن دیابت نوع ۲ می‌باشد [۱۴]. آترواسکلروز ناشی از دیابت یک مشکل بالینی عمده محسوب می‌شود به طوریکه در افراد دیابتی بروز بیماری عروق کرونر و ایسکمی میوکارد ۲ تا ۴ برابر و بروز بیماری شریان‌های تحتانی ۱۰ برابر افراد سالم می‌باشد [۵]. هیپرگلیسمی یک عامل خطر برای بیماری‌های قلبی – عروقی [۲۸] و یک عامل خطر مستقل برای اختلالات عروقی در دیابت محسوب می‌شود [۱۵].

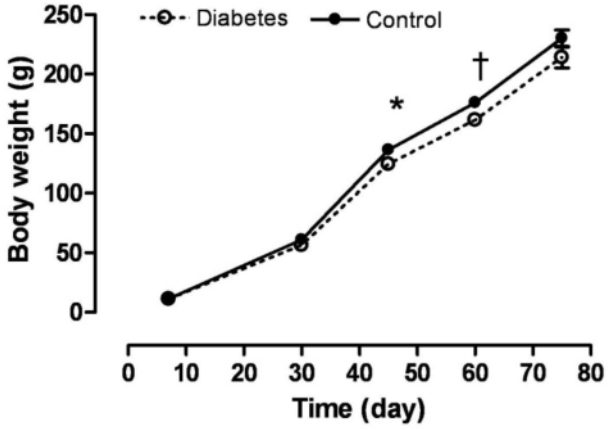
* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: zahedi@endocrine.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

نقص عملکرد آندوتلیوم در بیماران دیابتی در حالت ناشتا وجود دارد که پس از صرف غذا خود را واضح‌تر نشان می‌دهد [۲۸]. همچنین نشان داده شده است که در افرادیکه اختلال تحمل گلوکز دارند، عملکرد اندوتلیوم در حالت ناشتا طبیعی است اما به دنبال مصرف گلوکز نقص موقت عملکرد اندوتلیوم مشاهده می‌شود [۱۴]. هیپرگلیسمی‌های مکرر به دنبال صرف غذا ممکن است نقش مهمی در گسترش آترواسکلروز داشته باشد [۱۴]. هیپرگلیسمی سبب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود که به علت اتواکسیداسیون گلوکز و تشکیل محصولات نهایی تجزیه گلوکز است [۲۳]. پیشنهاد شده است که هیپرگلیسمی- از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو- علت اصلی عوارض عروقی در بیماران دیابتی می‌باشد [۷]. افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن به خصوص آنیون سوپر اکسید از طریق واکنش با اکسید نیتریک سبب غیر فعال شدن آن و اختلال در گشادی عروقی وابسته به اندوتلیوم می‌شود [۲۳]. اندوتلیوم به عنوان اولین سیستم دفاعی در برابر آترواسکلروز در نظر گرفته می‌شود و اکسید نیتریک رها شده از آن نقش مهمی در این دفاع دارد [۱۱]. اکسید نیتریک یک عامل گشادکننده رگی است و سبب مهار تجمع پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید و مهار مهاجرت و تکثیر سلولی می‌شود. این وقایع در پاتوژنز آترواسکلروز نقش دارند و اکسید نیتریک از طریق مهار آنها بر عملکرد قلب و عروق اثر محافظتی اعمال می‌کند [۴]. تولید اکسید نیتریک در دیابت افزایش پیدا می‌کند اما زیست فراهمی آن به طور ثانویه در اثر افزایش تخریب به علت واکنش با رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش پیدا می‌کند [۱۱]. بدلیل نیمه عمر کوتاه اندازه‌گیری اکسید نیتریک مشکل است، لذا اندازه‌گیری فرآورده‌های نهایی آن در خون یعنی نیترات و نیتریت (NO_x) به عنوان شاخصی از تولید اکسید نیتریک [۲۱] روشی برای ارزیابی عملکرد اندوتلیوم است [۱۷]. بین سطح سرمی NO_x و تولید اکسید نیتریک همبستگی قوی وجود دارد [۲۰] به طوریکه تعیین NO_x در خون مفیدترین روش کمی کردن تولید اکسید نیتریک در بدن گزارش شده است [۲۷]. هدف این مطالعه تعیین تغییرات سطح پلاسمایی NO_x در طی تست تحمل گلوکز در موش‌های دیابتی نوع ۲ و مقایسه آن با گروه کنترل می‌باشد. همچنین تغییرات سطح پلاسمایی NO_x در خون بدنبال دیابتی شدن از تولد تا بلوغ بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات در حیوان خانه پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با درجه حرارت ۳± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه نور ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند (خوراک دام پارس تهران). در این مطالعه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. حیوانات ماده بالغ زایمان نکرده با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم و حیوانات نر بالغ با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به منظور جفت‌گیری به مدت ۲۴ ساعت در یک قفس قرار گرفتند. پس از تولد نوزادان نر به طور تصادفی در دو گروه کنترل و دیابتی قرار گرفتند. روش ایجاد دیابت نوع ۲، تزریق داخل صفاقی استروپتوزوتوسین (۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تهیه شده از شرکت Pharmacia & Upjohn آمریکا) در روز دوم پس از تولد بود [۸]. در حیوانات گروه کنترل حلال استرپتوزوتوسین (بافر سیترات ۰/۱ مولار، pH، ۴/۴) با همان حجم تزریق گردید. یک هفته بعد خونگیری از طریق دم انجام شد و چنانچه قند خون بالاتر از ۱۸۰ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بود حیوان دیابتی تلقی گردید [۸]. تعداد حیوانات در هر یک از دو گروه کنترل و دیابتی ۷ سر بود. وزن حیوانات در روزهای ۷، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ با ترازوی A & D مدل EK-300i ساخت ژاپن و با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و در همین زمان‌ها نمونه خون جهت اندازه‌گیری قند خون و سطح پلاسمایی اکسید نیتریک گرفته شد. پس از رسیدت حیوانات به مرحله بلوغ (هفته ۱۰ تا ۱۲) تست تحمل گلوکز وریدی روی آنها انجام شد.

برای انجام تست تحمل گلوکز وریدی، حیوانات به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت ناشتا نگه داشته شدند [۱۶]. بعد از توزین، حیوان با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال (۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، تهیه شده از شرکت سیگما (آلمان)) بیهوش گردید [۱۲]. پس از تثبیت حیوان، ناحیه فمور باز، ورید و شریان از یکدیگر جدا و کاتتر هپارینه شده (با یکبار عبور دادن هپارین ۵۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر از کاتتر) در داخل شریان فمور تثبیت گردید. پس از تهیه اولین نمونه خون (زمان صفر) محلول گلوکز ۱۰ درصد (۰/۵ گرم به ازاء هر کیلوگرم) از طریق ورید فمور



شکل ۱- تغییرات وزن در حیوانات کنترل و دیابتی از زمان تولد تا بلوغ. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است (n=۷). *: P<۰/۰۵ و †: P< ۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل.

تزریق و سپس نمونه‌های خون شریانی (۰/۳ تا ۰/۵ میلی‌لیتر) در فواصل ۵،۱۰، ۳۰ و ۶۰ از راه کاتتر شریانی تهیه شد [۲۵, ۲۹]. نمونه‌های تهیه شده روی EDTA (۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر)، با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ، پلاسما جدا و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه نگهداری گردید.

سطح پلاسمایی NO_x با استفاده از روش گریس [۶ و ۲۰] اندازه‌گیری گردید. به طور خلاصه پس از اضافه کردن سولفات روی (۱۵ میلی گرم در هر میلی لیتر) جهت پروتیین زدایی، نمونه‌های پلاسما به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. یکصد میکرولیتر از فاز بالایی وارد یک چاهک میکروپلیت شد و ۱۰۰ میکرولیتر کلرید وانادیوم (III) (۸ میلی گرم در میلی لیتر، تهیه شده از شرکت فلوکا، سوئیس) به هر چاهک اضافه شد تا سبب احیای نیترات به نیتریت شود. سپس محلول گریس [(مخلوط ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید (۲ درصد) و ۵۰ میکرولیتر N- نفتالین اتیلن دی آمین دی‌هیدروکلرید (NEDD) (۰/۱ درصد)] به هر چاهک اضافه شد (NEDD و سولفانیل آمید از شرکت مرک آلمان خریداری شد). نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و جذب نوری آنها در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Sunrise ساخت کمپانی Tecan، اتریش) خوانده شد. غلظت نمونه‌های پلاسما براساس منحنی استاندارد خطی که از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکرومول در لیتر نیترات سدیم بدست آمده بود محاسبه گردید. ضرایب تغییرات برون و درون سنجش این اندازه‌گیری به ترتیب ۵/۲ و ۴/۴ درصد و بازیافت آن ۱/۵±۹۳ درصد بود.

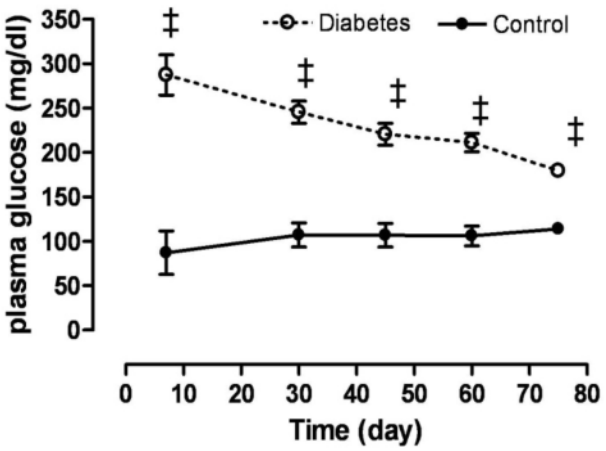
گلوکز پلاسما با روش رنگ سنجی آنزیمی گلوکز اکسیداز و با استفاده از کیت پارس آزمون (تهران ـ ایران) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییرات داخل و بین اندازه‌گیری برای گلوکز به ترتیب ۳/۷ و ۹/۰ درصد بود. انسولین با روش الایزا توسط کیت انسولین موش صحرایی (شرکت مرکودیا، سوئد) با ضریب تغییرات درون و برون سنجش به ترتیب ۶/۱ و ۹/۷ درصد اندازه‌گیری شد.

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شده اند. مقایسه وزن، سطح پلاسمایی اکسید نیتریک، گلوکز و انسولین در دو گروه دیابتی و کنترل در زمان‌های مختلف (روزهای ۷، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ برای وزن، سطح پلاسمایی اکسید نیتریک و گلوکز؛ دقایق ۰، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۶۰ در طی تست تحمل گلوکز برای انسولین، اکسید نیتریک و گلوکز) با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه مخلوط انجام شد. در این آنالیز گروه (دیابتی و کنترل) به عنوان متغیر بین گروهی بود و زمان‌های مختلف به عنوان متغیر درون گروهی (اندازه‌های تکراری) در نظر گرفته شد. مقادیر P دو دامنه کمتر از ۵ درصد معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در روز هفتم وزن حیوانات در دو گروه کنترل و دیابتی برابر بود (۰/۴ ± ۱۱/۴ در مقابل ۰/۳ ± ۱۱/۳ گرم). افزایش وزن در هر دو گروه در طول زمان مطالعه معنی دار بود (P<۰/۰۰۱) به طوریکه در روز ۷۵ وزن در گروه‌های کنترل و دیابتی به ترتیب ۸/۵ ± ۲۳۰/۲ و ۴/۱ ± ۲۱۴/۰ گرم بود. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که تقابل زمان – گروه وجود ندارد و وزن‌گیری گروه کنترل بیشتر از گروه دیابتی بوده است (P<۰/۰۵)، (شکل ۱).

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه برای گلوکز خون نشان دهنده اثر زمان (P<۰/۰۵)، اثر گروه (P<۰/۰۰۱) و تقابل این دو (P<۰/۰۱) می‌باشد. در روز هفتم مطالعه گلوکز خون در گروه دیابتی ۳/۳ برابر گروه کنترل بود (۳۰/۴± ۲۸۷/۳ در مقابل ۳/۵ ±۸۷/۲ میلی گرم در صد میلی لیتر، P<۰/۰۰۱). با گذشت زمان قند خون در گروه دیابتی کاهش و در گروه کنترل افزایش مختصری نشان داد به طوریکه در روز ۷۵ قند خون در گروه

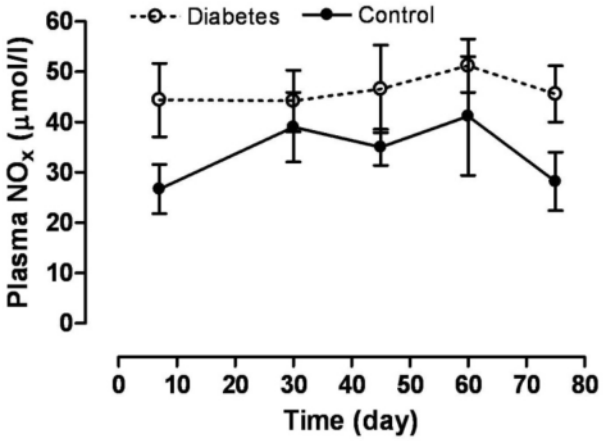


شکل ۲- تغییرات گلوکز پلاسما در حیوانات کنترل و دیابتی از زمان تولد تا بلوغ. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است (n=۷). ‡: P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل.

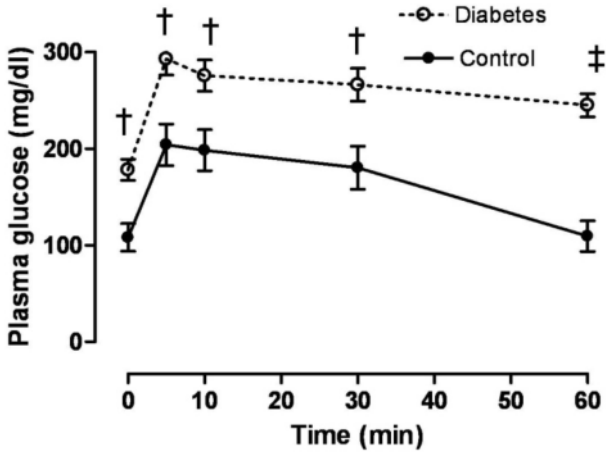
دیابتی ۲/۶ ± ۱۷۹/۴ و در گروه کنترل ۵/۲ ± ۱۱۴/۰ میلی گرم در صد میلی لیتر (P<۰/۰۰۱) بود (شکل ۲).

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که گروه دیابتی سطح پلاسمایی NO_x بالاتری نسبت به گروه کنترل در طی روزهای مختلف (۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵) دارند (P<۰/۰۵). (شکل۳).

بدنبال تزریق گلوکز سطح پلاسمایی آن در هر دو گروه کنترل و دیابتی افزایش پیدا کرد. در گروه کنترل پس از ۶۰ دقیقه سطح پلاسمایی گلوکز به مقدار قبل از انجام تست بازگشت در حالیکه در گروه دیابتی اگر چه اندکی کاهش یافت اما همچنان به طور معنی داری بالا بود (P<۰/۰۰۱). نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان دهنده بالاتر بودن گلوکز در گروه دیابتی



شکل ۳- تغییرات سطح پلاسمایی متابولیت های اکسید نیتریک (NO_x) در حیوانات کنترل و دیابتی از زمان تولد تا بلوغ. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است (n=۷). سطح زیر نمودار در گروه دیابتی بیشتر از گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

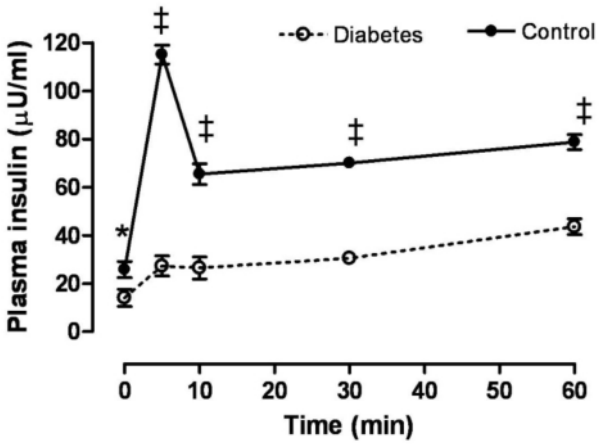


شکل ۴- تغییرات سطح پلاسمایی گلوکز پلاسما در طی تست تحمل گلوکز در گروه کنترل و دیابتی. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است (n=۷). †: P<۰/۰۱ و ‡: P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل.

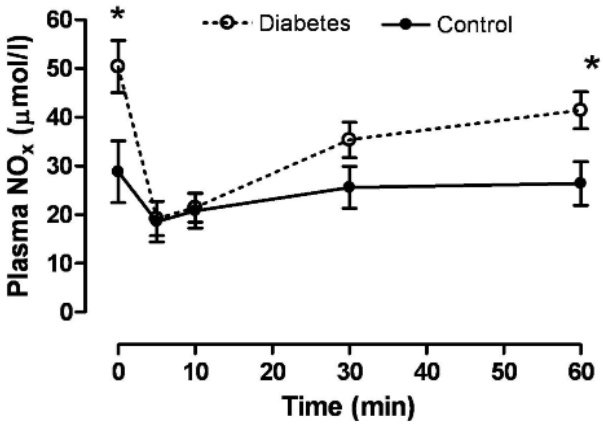
نسبت به کنترل در همه زمانها و همچنین معنی دار بودن اثر زمان در هر دو گروه است اما اثر متقابل گروه- زمان وجود نداشت (شکل ۴).

افزایش انسولین پلاسما ۵ دقیقه پس از تزریق گلوکز در گروه کنترل ۴/۵ برابر و در گروه دیابتی ۱/۹ برابر نسبت به غلظت قبل از تزریق گلوکز بود. در گروه کنترل انسولین در زمان ۱۰ دقیقه کاهش پیدا کرد اما دوباره روند افزایشی نشان داد. در گروه دیابتی پس از دقیقه ۵ انسولین روند کند افزایشی نشان داد. براساس نتایج آنالیز واریانس دوطرفه اثرات زمان، گروه و تقابل این دو معنی دار بودند (P<۰/۰۰۱) (شکل۵).

مقادیر پایه اکسید نیتریک در گروه دیابتی به طور معنی‌داری



شکل ۵- تغییرات سطح پلاسمایی انسولین پلاسما در طی تست تحمل گلوکز در گروه کنترل و دیابتی. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است (n=۷). *: P<۰/۰۵ و ‡: P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل.



شکل ۶- تغییرات سطح پلاسمایی متابولیت های اکسید نیتریک (NO_x) در طی تست تحمل گلوکز در گروه کنترل و دیابتی. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است (n=۷).*: P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل.

(P<۰/۰۵) بالاتر از گروه کنترل بود (۶/۴ ± ۵۰/۴ در مقابل ۳/۸ ± ۲۸/۸ میکرومول در لیتر). الگوی تغییرات در طی تست تحمل گلوکز در دو گروه مشابه بود به طوریکه اثر متقابل زمان-گروه مشاهده نشد. پنج دقیه بعد از تزریق گلوکز سطح پلاسمایی اکسید نیتریک در گروه‌های کنترل و دیابتی به ترتیب ۳۵ و ۶۲ درصد کاهش نشان داد. پس از این زمان اکسید نیتریک در هر دو گروه روند افزایشی داشت اما در گروه کنترل پس از ۳۰ دقیقه تقریبا به حد طبیعی بازگشت در حالیکه در گروه دیابتی حتی در زمان ۶۰ دقیقه نیز ۱۷ درصد کمتر از مقدار پایه اولیه بود (شکل۶).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که هیپر گلیسمی ایجاد شده در طی تست تحمل گلوکز سبب کاهش سطح پلاسمایی NO_x می‌گردد، این کاهش در موش‌های دیابتی نوع ۲ حتی پس از یک ساعت به اندازه قبل از تزریق گلوکز باز نمی‌گردد در حالیکه در موش‌های سالم در کمتر از ۳۰ دقیقه تقریبا به سطح اولیه خود باز می‌گردد. این یافته پیشنهاد می‌کند که در دیابت ممکن است هیپرگلیسمی بعد از صرف غذا به مدت طولانی تری رهایش اکسید نیتریک از اندوتلیوم را مهار کند که دلیلی برای بروز آترواسکلروز محسوب می‌شود.

تجویز استرپتوزوتوسین به موش صحرایی بلافاصله بعد از تولد منجر به تخریب سلول‌های بتا و رژنره شدن متعاقب آنها و ایجاد عدم تحمل گلوکز می‌شود [۹]. این روش که مدل نوزادی تجویز استرپتوزوتوسین (n-STZ) نامیده می‌شود مدل مناسبی برای ایجاد دیابت نوع ۲ می‌باشد [۲۶]. در این مدل رژنراسیون سلول‌های بتا بدنبال تجویز استرپتوزوتوسین ۳ تا ۵ روز بعد اتفاق می‌افتد [۳۰]. در این مطالعه موش‌های دیابتی، هیپرگلیسمی خفیف و تست تحمل گلوکز مختل و پاسخ کاهش یافته انسولینی به گلوکز داشتند که نشان دهنده خصوصیات دیابت نوع ۲ می‌باشد [۳۰, ۳۱] .در موش‌های دیابتی در دقیقه ۶۰ تست تحمل گلوکز قند خون به طور معنی داری بالا بود، علاوه بر کاهش ترشح انسولین ممکن است کاهش تعداد ترانسپورترهای شماره ۴ گلوکز در غشاء سلول‌ها در اثر هیپرگلیسمی حاد در دیابت دلیل این بالاتر بودن گلوکز باشد [۱۹].

بالا بودن غلظت گلوکز در روزهای اول بعد از تزریق استرپتوزوتوسین به تخریب سلول‌های بتا مربوط می‌شود اگر چه نشان داده شده است که افزایش غلظت گلوکاگن به دلیل حذف اثر مهاری پاراکرین انسولین بر ترشح گلوکاگن توسط سلول‌های آلفا نیز در ایجاد این هیپرگلیسمی نقش دارد [۹]. کاهش متعاقب قند خون در گروه دیابتی به علت رژنراسیون سلول‌های بتا می‌باشد. افزایش مشاهده شده در قند خون در گروه کنترل بین روزهای ۷ تا ۳۰ پس از تولد در این مطالعه با این گزارش قابل توجیه است که در طی تکامل عملکرد سلول‌های بتا در پانکراس مقدم بر عملکرد سلول‌های آلفا می‌باشد [۹]. همچنین در موش صحرایی در سه هفته اول بعد از تولد نسبت انسولین به گلوکاگن کم می‌شود [۳].

در این مطالعه غلظت انسولین سرم در روزهای مختلف اندازه‌گیری نشد اما انسولین زمان صفر در تست تحمل گلوکز در گروه دیابتی ۴۵ درصد کمتر بود. Hemmings و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده‌اند که انسولین در موش‌های دیابتی در زمان بلوغ ۱۷ درصد کمتر از کنترل بوده است [۹]. دلیل تفاوت مشاهده شده ممکنست دوز استرپتوزوتوسین باشد که در این مطالعه ۱۰۰ و در مطالعه Hemmings و همکاران ۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بوده است.

در مطالعه حاضر وزن‌گیری گروه دیابتی در مجموع ۸ درصد کمتر از گروه کنترل بوده است که مطابقت خوبی با نتایج Hemmings و همکاران (۲۰۰۰) دارد که این مقدار را ۱۰

درصد ذکر کرده اند. علت این کمتر بودن رشد کاهش عملکرد تیروئید به دلیل تزریق استرپتوزوتوسین عنوان شده است [۹].

در این مطالعه سطوح پلاسمایی NO_x در موش‌های دیابتی بالاتر بود که مطابق نتایج دیگر مطالعات می‌باشد [۱, ۱۷]. اثر دیابت بر متابولیسم اکسید نیتریک مورد اختلاف است. اکسید نیتریک به یک شمشیر دولبه تشبیه شده است که غلظت‌های پایین آن طبیعی تلقی می‌شود درحالیکه غلظت‌های خیلی کم و خیلی زیاد آن پاتولوژیک است. مقادیر کم اکسید نیتریک تولید شده توسط فرم ذاتی آنزیم سنتز کننده آن سبب جلوگیری از بیان فرم القایی آنزیم می‌شود. محرک‌های فرم القایی آنزیم سنتز کننده اکسید نیتریک سبب کاهش بیان فرم ذاتی آنزیم شده که با کاهش غلظت اکسید نیتریک داخل سلولی افزایش فعالیت فرم القایی را سبب می‌شوند [۲]. در دیابت نوع ۲ یک وضعیت پروآتروژنیک و التهابی ایجاد می‌شود و مقادیر سیتوکاین‌هایی همچون TNF-alpha و اینترلوکین ـ۱ بالا می‌رود [۱۳] که این‌ها می‌توانند سبب افزایش فعالیت فرم القایی آنزیم سنتز کننده اکسید نیتریک شوند [۲۴]. بنابراین می‌توان گفت که افزایش NO_x پلاسمایی در دیابت می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت فرم ذاتی آنزیم سنتز کننده آن و افزایش فعالیت فرم القایی این آنزیم باشد.

گشادی عروق وابسته به اندوتلیوم در طی هیپرگلیسمی در افراد طبیعی [۳۲] و دیابتی [۱۸] مختل می‌شود که علت آن کاهش فعالیت آنزیم سنتز کننده اکسید نیتریک در اندوتلیوم می‌باشد. هیپرگلیسمی تولید سوپراکسید در میتوکندری را افزایش و از طریق کاهش فسفریلاسیون آنزیم سنتز کننده اکسید نیتریک فعالیت آن را کم می‌کند [۵].

در این مطالعه سطح پلاسمایی NO_x بعد از تزریق گلوکز در طی تست تحمل گلوکز در هر دو گروه دیابتی و کنترل کاهش معنی داری پیدا کرد و سپس برگشت پیدا نمود اما برگشت در گروه کنترل سریعتر و کاملتر از گروه دیابتی بود. Kawano و همکاران (۱۹۹۹) نشان داده‌اند که در انسان گشادی عروقی وابسته به اندوتلیوم بدنبال هیپرگلیسمی ایجاد شده در تست تحمل گلوکز مختل می‌شود اما تغییری در سطح پلاسمایی NO_x مشاهده نکرده‌اند [۱۴]. دلیل تفاوت مطالعه حاضر با مطالعه Kawano و همکاران احتمالا مربوط به گونه استفاده شده است. Kawano و همکاران بررسی خود را در انسان انجام داده‌اند درحالیکه این مطالعه برروی موش انجام شده است. رژیم غذایی نقش مهمی در تعیین سطح پلاسمایی NO_x دارد [۱۰] و اگرچه ناشتا نگه داشتن افراد به مدت ۱۲ تا ۱۴ ساعت روشی برای کم کردن این اثر است [۲۲] اما علاوه بر آن باید محدودیت‌های رژیم غذایی نیز قایل شد [۱۰]. در حالیکه در موش به دلیل ثابت بودن رژیم غذایی سطوح پلاسمایی NO_x تخمین قابل قبول تری از عملکرد اندوتلیوم فراهم می‌کند.

در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بعد از تزریق گلوکز در تست تحمل گلوکز سطح پلاسمایی NO_x کاهش پیدا می‌کند و در موش‌های دیابتی روند برگشت آن به سطح طبیعی آهسته‌تر و با دامنه کمتری نسبت به موش‌های سالم می‌باشد که نشان می‌دهد هیپرگلیسمی‌های بعد از صرف غذا ممکنست دلیلی برای نقص عملکرد اندوتلیوم (از طریق کاهش رهایش اکسید نیتریک) و آترواسکلروز در بیماران دیابتی باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (طرح شماره ۱۷۷) انجام شد.

منابع

[1] Chien WY, Yang KD, Eng HL, Hu YH, Lee PY, Wang ST, Wang PW. Increased plasma concentration of nitric oxide in type 2 diabetes but not in nondiabetic individuals with insulin resistance. ***Diabetes Metab*** 31 (2005) 63-68.

[2] Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO. ***Trends Pharmacol Sci*** 21 (2000) 249-252.

[3] Di Marco PN, Ghisalberti AV, Martin CE, Oliver IT. Perinatal changes in liver corticosterone, serum insulin and plasma glucagon and corticosterone in the rat. ***Eur J Biochem*** 87 (1978) 243-247.

[4] Ding Y, Vaziri ND, Coulson R, Kamanna VS, Roh DD. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. ***Am J Physiol Endocrinol Metab*** 279 (2000) E11-17.

[5] Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide

synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. ***J Clin Invest*** 108 (2001) 1341-1348.

[6] Ghasemi A, Hedayati M, Biabani H. Protein Precipitation Methods Evaluated for Determination of Serum Nitric Oxide End Products by the Griess Assay. ***JMSR*** 2 (2007) 43-46.

[7] Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? ***Metabolism*** 44 (1995) 363-368.

[8] Grill V, Westberg M, Ostenson CG. B cell insensitivity in a rat model of non-insulin-dependent diabetes. Evidence for a rapidly reversible effect of previous hyperglycemia. ***J Clin Invest*** 80 (1987) 664-669.

[9] Hemmings SJ, Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. ***Int J Biochem Cell Biol*** 32 (2000) 905-919.

[10] Himeno M, Ishibashi T, Nakano S, Furuya K, Kigoshi T, Uchida K, Nishio M. A practical procedure for achieving a steady state of NOx concentration in plasma: with special reference to the NOx content of Japanese daily food. ***Tohoku J Exp Med*** 199 (2003) 95-110.

[11] Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ. Nitric oxide availability in diabetes mellitus ***Diabetes Metab Rev*** 14 (1998) 241-249.

[12] Incerpi S, Scapin S, D'Arezzo S, Spagnuolo S, Leoni S. Short-term effects of thyroid hormone in prenatal development and cell differentiation. ***Steroids*** 70 (2005) 434-443.

[13] Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. ***J Intern Med*** 262 (2007) 173-183.

[14] Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. ***J Am Coll Cardiol*** 34 (1999) 146-154.

[15] Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. ***Diabetes*** 48 (1999) 937-942.

[16] Lin JD, Chao TC. Vascular endothelial growth factor in thyroid cancers. ***Cancer Biother Radiopharm*** 20 (2005) 648–661.

[17] Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T, Nakagawa A, Kigoshi T, Ishibashi T, Nishio M, Uchida K. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects. Relationship to microvascular complications. ***J Diabetes Complications*** 15 (2001) 135-143.

[18] Makimattila S, Virkamaki A, Groop PH, Cockcroft J, Utriainen T, Fagerudd J, Yki-Jarvinen H. Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. ***Circulation*** 94 (1996) 1276-1282.

[19] Marette A, Dimitrakoudis D, Shi Q, Rodgers CD, Klip A, Vranic M. Glucose rapidly decreases plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. ***Endocrine*** 10 (1999) 13-18.

[20] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. ***Nitric Oxide*** 5 (2001) 62-71.

[21] Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. ***Clin Chem*** 41 (1995) 892-896.

[22] Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. ***Hypertension*** 30 (1997) 405-408.

[23] Noyman I, Marikovsky M, Sasson S, Stark AH, Bernath K, Seger R, Madar Z. Hyperglycemia reduces nitric oxide synthase and glycogen synthase activity in endothelial cells. ***Nitric Oxide*** 7 (2002) 187-193.

[24] Perreault M ,Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. ***Nat Med*** 7 (2001) 1138-1143.

[25] Ramos S, Goya L, Alvarez C, Martin MA, Agote M, Escriva F, Pascual-Leone AM. Different role of insulin in GLUT-1 and -4 regulation in heart and skeletal muscle during perinatal hypothyroidism. ***Am J Physiol Endocrinol Metab*** 28 (2001) E1073-1081.

[26] Rastelli VM, Akamine EH, Oliveira MA, Nigro D, Passaglia Rde C, Carvalho MH, Fortes ZB. Influence of insulin on the microvascular response to inflammatory mediators in neonatal streptozotocin diabetic rats. ***Inflamm Res*** 54 (2005) 173-179.

[27] Romitelli F, Santini SA, Chierici E, Pitocco D, Tavazzi B, Amorini AM, Lazzarino G, Di Stasio E. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess

assay. ***J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*** 851 (2007) 257-267.

[28] Schmoelzer I ,Wascher TC. Effect of repaglinide on endothelial dysfunction during a glucose tolerance test in subjects with impaired glucose tolerance. ***Cardiovasc Diabetol*** 5 (2006) 9.

[29] Tesseraud S, Metayer S, Duchene S, Bigot K, Grizard J, Dupont J. Regulation of protein metabolism by insulin: value of different approaches and animal models. ***Domest Anim Endocrinol*** 33 (2007) 142-143.

[30] Tourrel C, Bailbe D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B. Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. ***Diabetes*** 50 (2001) 1562-1570.

[31] Turner RC, Hattersley AT, Shaw JT, Levy JC. Type II diabetes: clinical aspects of molecular biological studies. ***Diabetes*** 44 (1995) 1-10.

[32] Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. ***Circulation*** 97 (1998) 1695-1701.