

اثر تجویز طولانی مدت نیترات سدیم خوراکی بر غلظت آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع ۲

مجید شکری^۱، دکتر سجاد جدی^۲، دکتر حسن فرید نوری^۱، دکتر اصغر قاسمی^۲

۱) دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران، ۲) مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسؤل: تهران، ولنجک، خیابان یمن، ابتدای خیابان پروانه، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دکتر اصغر قاسمی؛ e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: اختلالات کبدی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ عمدتاً همراه با افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر تجویز نیترات بر سطح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالن فسفاتاز (ALP) در موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ می‌باشد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار به ۴ گروه تقسیم شدند: شاهد، شاهد + نیترات، دیابت و دیابت + نیترات. دیابت نوع ۲ با استفاده از رژیم غذایی پرچرب و تزریق استرپتوزوتوسین (۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) القا شد. موش‌های گروه درمان با نیترات، به مدت ۶ ماه نیترات سدیم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) دریافت کردند. میزان ALT، AST و ALP در سرم در شروع مطالعه، سه و شش ماه پس از تجویز نیترات اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: موش‌های دیابتی دارای سطح سرمی افزایش یافته ALT، AST و ALP بودند و تجویز نیترات منجر به کاهش ALT به میزان ۱۷/۶ درصد (۶۵/۷±۴/۸) در مقابل ۵۵/۸±۲/۳ واحد بین‌المللی در لیتر، (p=۰/۰۶۵۹)، AST به میزان ۵۲/۲ درصد (۱۶۱/۳±۱۳/۳) در مقابل ۱۰۶/۰±۶/۱ واحد بین‌المللی در لیتر، (p<۰/۰۰۰۱) و ALP به میزان ۱۵/۱ درصد (۶۰۶/۲±۳۵/۵) در مقابل ۵۱۴/۴±۱۲/۶ واحد بین‌المللی در لیتر، (p=۰/۰۳۳۹) در ماه ششم گردید. نتیجه‌گیری: تجویز طولانی مدت نیترات با دوز کم منجر به بهبود شاخص‌های عملکرد کبد در موش‌های با دیابت نوع ۲ گردید که با کاهش سطح سرمی ALT، AST و ALP همراه بود.

واژگان کلیدی: نیترات، دیابت نوع ۲، آنزیم‌های کبدی

دریافت مقاله: ۹۹/۲/۲۰ - دریافت اصلاحیه: ۹۹/۴/۳۰ - پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۸

مقدمه

نامطلوب می‌باشند، بنابراین تحقیقات بیشتر برای ارائه درمان‌های مؤثرتر ضروری به نظر می‌رسد.^۷

اکسید نیتریک (NO) یک مولکول با نقش‌های بیولوژیک متعدد در بدن است.^۸ کاهش فراهمی زیستی NO در دیابت نوع ۲ گزارش شده است.^۹ آنزیم‌های ترانس آمیناز شامل آسپاراتات آمینو ترانسفراز (ASTⁱⁱ) و آلانین آمینوترانسفراز (ALTⁱⁱⁱ) به عنوان شاخص عملکرد کبد از چند دهه قبل مورد استفاده قرار گرفته است.^{۱۰} هم‌چنین افزایش سطح سرمی آنزیم آلکالن فسفاتاز (ALP)، AST و ALT به عنوان شاخص‌های آسیب به سلول‌های کبدی در بیماران^{۱۱-۱۳} و حیوانات^{۱۴،۱۵} مبتلا به دیابت نوع ۲ گزارش شده است. کاهش

دیابت نوع ۲ شایع‌ترین نوع دیابت است و ۹۰ تا ۹۵ درصد بیماران دیابتی را شامل می‌شود.^۱ پیش‌بینی می‌شود که به علت گسترش شهرنشینی و تغییر سبک زندگی، تعداد مبتلایان به دیابت از ۶۶۳ میلیون نفر در سال ۲۰۱۹، به حدود ۷۰۰ میلیون نفر در سال ۲۰۴۵ برسد.^۲ شیوع اختلالات کبدی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ بین ۲۳ الی ۵۵ درصد گزارش شده است.^۳ هم‌چنین بیماری‌های کبدی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ (۲ تا ۳ برابر^۴) بوده^۵ و سالانه منجر به مرگ حدود ۲ میلیون نفر می‌گردد.^۶ روش‌های درمانی مختلفی برای درمان بیماری کبدی وجود دارد که برخی از آن‌ها دارای عوارض جانبی

i- Nitric oxide

ii-Aspartate amino-transferase

iii -Alanine amino-transferase

مواد و روش‌ها

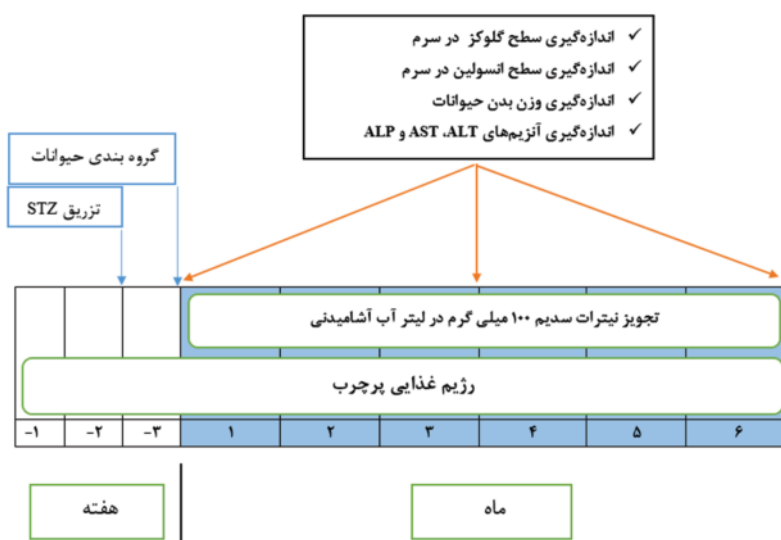
حیوانات

۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن دو ماه (میانگین وزن: $187/2 \pm 8/9$ گرم) در حیوانخانه پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در رطوبت 50 ± 6 درصد، دمای 22 ± 2 درجه سلسیوس و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. تمامی روش‌های آزمایشگاهی در این مطالعه مطابق با قوانین کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، با کد اخلاق کار با حیوانات به شماره - IR-SBMU-ENDO.CINE.1398.034 انجام گرفته است.

روش اجرای مطالعه

نمای کلی از مراحل اجرای مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. بعد از القای دیابت نوع ۲، نیترات سدیم با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در گروه‌های درمان به مدت ۶ ماه تجویز گردید. سطح سرمی گلوکز، انسولین و همچنین آنزیم‌های ALT، AST و ALP در ابتدای مطالعه، در انتهای ماه سوم و ماه ششم اندازه‌گیری گردید. همچنین وزن حیوانات هر ۳ ماه یکبار با استفاده از ترازوی دیجیتال با حساسیت ۱ گرم (Tefal, Sarcelles, فرانسه) اندازه‌گیری شد.

NO در کبد موش‌های سوری منجر به افزایش AST و ALT و افزایش احتمال ایجاد بیماری کبدی در آن‌ها می‌گردد.^{۱۸،۱۷} بنابراین کاهش فراهمی زیستی NO می‌تواند به عنوان یک عامل خطر برای ایجاد بیماری‌های مرتبط با دیابت نوع ۲، از جمله بیماری کبدی، در نظر گرفته شود.^{۱۸،۱۹} نیترات و نیتريت معدنی با تبدیل شدن به NO منجر به جبران سطوح کاهش یافته‌ی NO در دیابت نوع ۲ می‌گردند.^۱ نیترات و نیتريت دارای اثرات مفید مختلف در بیماری کبدی می‌باشند به این صورت که تجویز نیترات باعث بهبود عملکرد کبد و کاهش آسیب کبدی در موش‌های سوری تغذیه شده با غذای پرچرب^{۲۰} و بیماران با پیوند کبد می‌گردد.^{۲۱} تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر تجویز نیترات و نیتريت بر آنزیم‌های کبدی در دیابت، گزارش نشده است ولی گزارش شده است که تجویز نیتريت در موش‌های سوری سالم^{۲۲} و همچنین موش‌های سوری فاقد آنزیم eNOS^{۲۳} منجر به کاهش آسیب ایسکمی در کبد آن‌ها می‌گردد که این بهبود همراه با کاهش سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST در این موش‌ها بود. نتایج مشابهی در موش‌های صحرایی سالم گزارش شده است.^{۲۴} هدف مطالعه حاضر تعیین اثر تجویز نیترات سدیم خوراکی با دوز کم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۶ ماه (مزمین) بر شاخص‌های آسیب به سلول‌های کبدی در موش صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد.



شکل ۱- مراحل انجام مطالعه. تجویز نیترات سدیم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۶ ماه در گروه‌های آزمون صورت گرفت. ALT: Alanine amino-transferase, AST: Aspartate amino-transferase, STZ: Streptozotocin ALP: Alkaline phosphatase

القای دیابت و گروه‌بندی حیوانات

جهت القای دیابت نوع ۲ از روش تجویز استرپتوزوسین با دوز کم به همراه رژیم غذایی پرچرب (HFD-STZ)^۱ استفاده شد.^{۲۰} حیوانات به مدت دو هفته تحت رژیم غذایی پرچرب قرار گرفتند. نحوه تهیه غذای پرچرب و ترکیب آن پیشتر با جزییات چاپ شده است.^{۲۰} بعد از ۱۴ روز مصرف رژیم پرچرب، STZ با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه شاهد بافر سیترات (حلال STZ) را مشابه با حجم STZ دریافت شده در گروه دیابت دریافت کرد. یک هفته پس از تزریق STZ، حیوانات با استفاده از پنتوباربیتال (۶۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن حیوان) بیهوش شدند و خون‌گیری از دم آن‌ها انجام شد. حیواناتی که قند خون بالای ۱۵۰ میلی‌گرم در دسی لیتر داشتند به عنوان حیوانات دیابتی در نظر گرفته شدند.^{۲۰}

در این مطالعه حیوانات به چهار گروه شاهد، شاهد+نیترات، دیابت و دیابت+نیترات (در هر گروه ۶ موش صحرایی) تقسیم‌بندی شدند. از روز صفر مطالعه نیترات سدیم ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در آب آشامیدنی به مدت ۶ ماه در دو گروه درمان با نیترات شامل شاهد+نیترات، و دیابت+نیترات تجویز گردید. رژیم پرچرب نیز تا انتهای مطالعه برای موش‌های صحرایی با دیابت نوع ۲ استفاده گردید. در مطالعه حاضر مقدار نیترات در رژیم معمولی و پرچرب به ترتیب حدود ۱۱۲ و ۸۸ میلی‌گرم در کیلوگرم و در آب آشامیدنی در حدود ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر بود؛ بنابراین مقدار نیترات دریافت شده در گروه کنترل، کنترل نیترات، دیابت و دیابت نیترات به ترتیب حدود ۰/۲۱، ۰/۶، ۱/۳ و ۳/۷ میلی‌گرم در روز در هر موش صحرایی بود.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم

پس از ۱۲-۱۴ ساعت ناشتایی حیوانات با استفاده از پنتوباربیتال (۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش شدند و نمونه‌های خون از دم موش‌های صحرایی در همه گروه‌ها جمع‌آوری شد و به مدت ۱۰ دقیقه با RCFⁱⁱ ۳۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد و سرم جهت اندازه‌گیری گلوکز و انسولین جدا گردید. گلوکز و انسولین سرم در ابتدای مطالعه، در پایان ماه سوم و ششم مطالعه اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری گلوکز سرم با استفاده دستگاه اتوآنالایزر

Selectra E و کیت شرکت پارس آزمون (حساسیت ۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) صورت گرفت. سطح انسولین سرمی با استفاده از کیت الایزای مخصوص موش صحرایی (حساسیت ۲۶/۱ پیکو-مول در لیتر، Mercodia, Sylveniusgatan Sweden) اندازه‌گیری شد. آنزیم‌های ALT، AST و ALP با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر Selectra E و کیت شرکت پارس آزمون (حساسیت برای ALT، AST و ALP به ترتیب ۴، ۲ و ۳ واحد بین‌المللی در لیتر می‌باشد) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییرات درون آزمونی برای سطح سرمی گلوکز و انسولین به ترتیب ۳/۴ و ۴/۱ درصد بود. هم‌چنین ضریب تغییرات درون آزمونی برای سطح سرمی ALT، AST و ALP به ترتیب ۱ و ۲ و ۲ درصد بود.

آنالیز آماری

تحلیل آماری یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶ انجام شد. یافته‌های کمی به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. از آزمون آنالیز واریانس دوطرفهⁱⁱⁱ برای تحلیل داده‌های وزن، گلوکز، انسولین و آنزیم‌های ALT، AST و ALP استفاده گردید. جهت تعیین اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های مختلف از آزمون تعقیبی فیشر^{iv} استفاده شد. هم‌چنین نتایج مربوط به سطح زیر منحنی با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه^v آنالیز شد. P دو دامنه کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر تجویز نیترات سدیم بر وزن بدن

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و دیابت از نظر وزن بدن در ابتدای مطالعه وجود نداشت، اما دیابت منجر به افزایش معنی‌دار وزن بدن در ماه سوم (۳۱۴/۲±۱۳/۸ گرم در مقابل ۳۵۹/۰±۱۰/۰ گرم، P=۰/۰۱۱۶) و ماه ششم (۳۴۵/۰±۲۸/۷ گرم در مقابل ۳۹۶/۴±۷/۷ گرم، P=۰/۰۱۶۸) در موش‌های صحرایی گردید. تجویز نیترات سدیم منجر به کاهش وزن در گروه دیابتی در ماه سوم (۱۳/۸ درصد، P=۰/۰۱۳۸) و هم‌چنین ماه ششم (۱۲/۷ درصد، P=۰/۰۱۱۹) گردید. هم‌چنین

iii -Two-way ANOVA

iv -Fisher

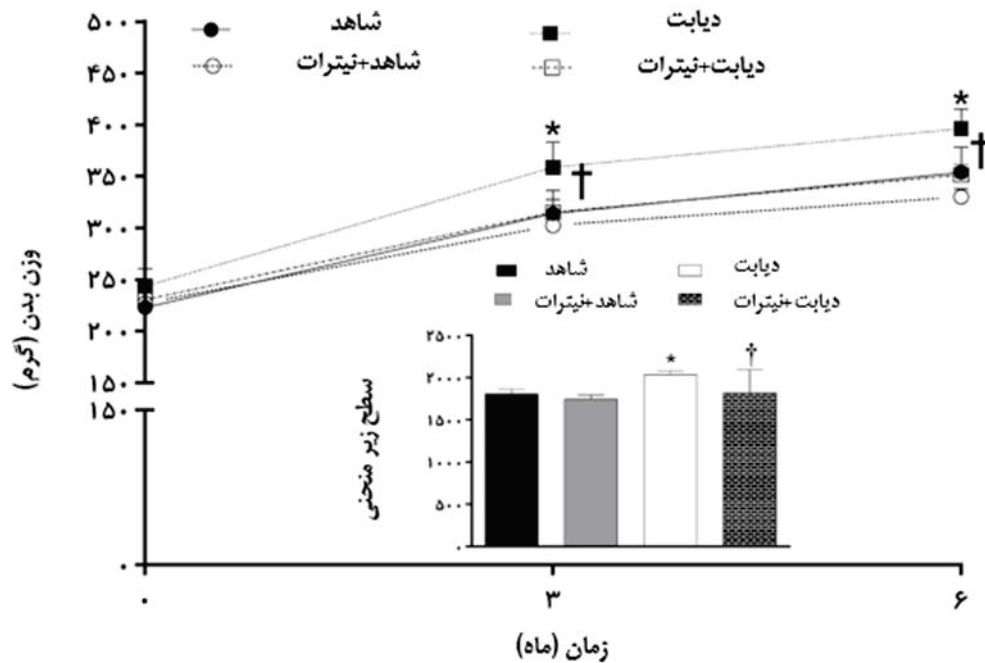
v -One-way ANOVA

i -High fat diet-streptozotocin

ii -Relative centrifuge force

گردید. تجویز نیترات سدیم منجر به کاهش وزن در گروه دیابتی به میزان ۱۱/۹ درصد ($P=0/0206$) شد. تجویز نیترات سدیم در گروه شاهد اثری بر وزن بدن نداشت.

نمودار ستونی سطح زیر منحنی نشان داد که دیابت منجر به افزایش معنی‌دار وزن نسبت به گروه شاهد ($230.7 \pm 120/4$) در مقابل ($P=0/0283, 180.8 \pm 139/3$) در تمام مدت مطالعه



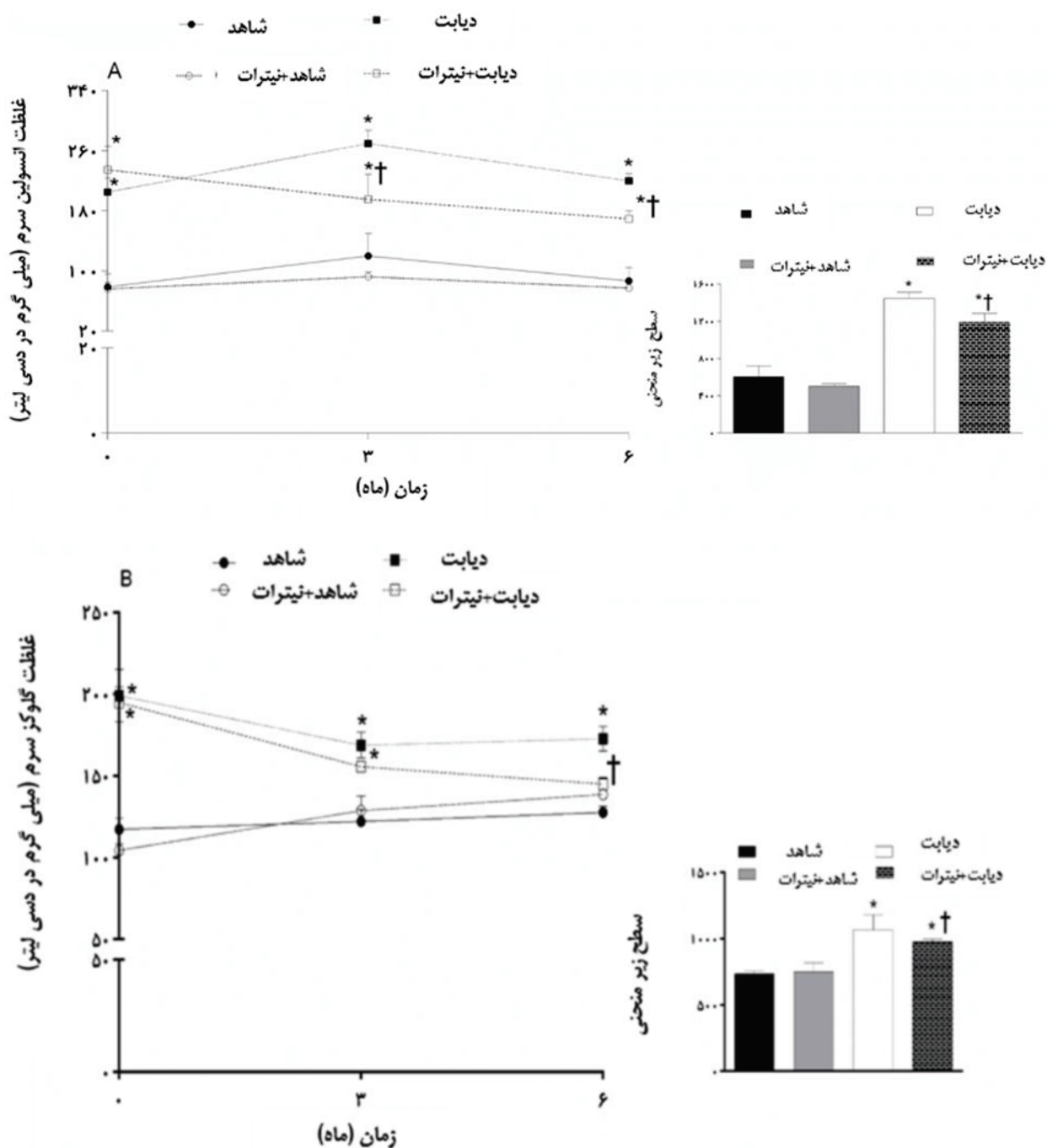
نمودار ۱- اثر تجویز طولانی نیترات سدیم بر وزن بدن در موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع ۲. نمودار ستونی بیانگر سطح زیر منحنی است. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و \dagger تفاوت معنی‌دار با گروه دیابت را نشان می‌دهند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر است.

منحنی نشان داد که گروه دیابتی سطح سرمی گلوکز و انسولین بالاتر ($106.6 \pm 46/7$) در مقابل 73.3 ± 24 ، $p < 0/0001$ برای گلوکز و $144.6 \pm 168/4$ در مقابل $60.8 \pm 118/4$ (برای انسولین) نسبت به گروه شاهد در طول مطالعه داشت و تجویز نیترات منجر به کاهش ۹ درصدی سطح سرمی گلوکز ($p=0/0569$) و ۲۱/۳ درصدی سطح سرمی انسولین ($p=0/0451$) در طول مطالعه گردید. کاهش ۹ درصدی سطح سرمی گلوکز توسط نیترات منجر به نزدیک‌تر شدن گلوکز سرمی در گروه دیابت درمان شده با نیترات به سطح طبیعی می‌گردد ولی هنوز اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد مشاهده می‌شود و سطح سرمی گلوکز در مرز دیابتی بودن قرار دارد ($p < 0/0001$).

اثر تجویز نیترات سدیم بر سطح سرمی گلوکز و

انسولین

همان‌طور که در نمودار ۲ قابل مشاهده است، در گروه دیابتی در شروع مطالعه سطح سرمی گلوکز ($199/0 \pm 16/1$) میلی‌گرم در دسی‌لیتر در مقابل $117/2 \pm 6/8$ میلی‌گرم در دسی‌لیتر، و سطح سرمی انسولین ($204/1 \pm 18/7$) پیکومول در لیتر در مقابل $78/8 \pm 17/1$ پیکومول در لیتر، $P < 0/0001$ بالاتر از گروه شاهد بود و الگوی مشابهی در ماه سوم و ششم نیز مشاهده گردید. تجویز نیترات با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش سطح سرمی گلوکز به میزان ۱۹/۲ درصد ($p=0/0127$) و کاهش سطح سرمی انسولین به میزان ۲۹/۸ درصد ($p=0/0707$) در ماه ششم گردید. هم‌چنین نمودار سطح زیر



نمودار ۲- اثر تجویز طولانی نیترات سدیم بر غلظت سرمی انسولین (A) و گلوکز (B) در موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع ۲. نمودار ستونی بیانگر سطح زیر منحنی است. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و † تفاوت معنی‌دار با گروه دیابت را نشان می‌دهند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر است.

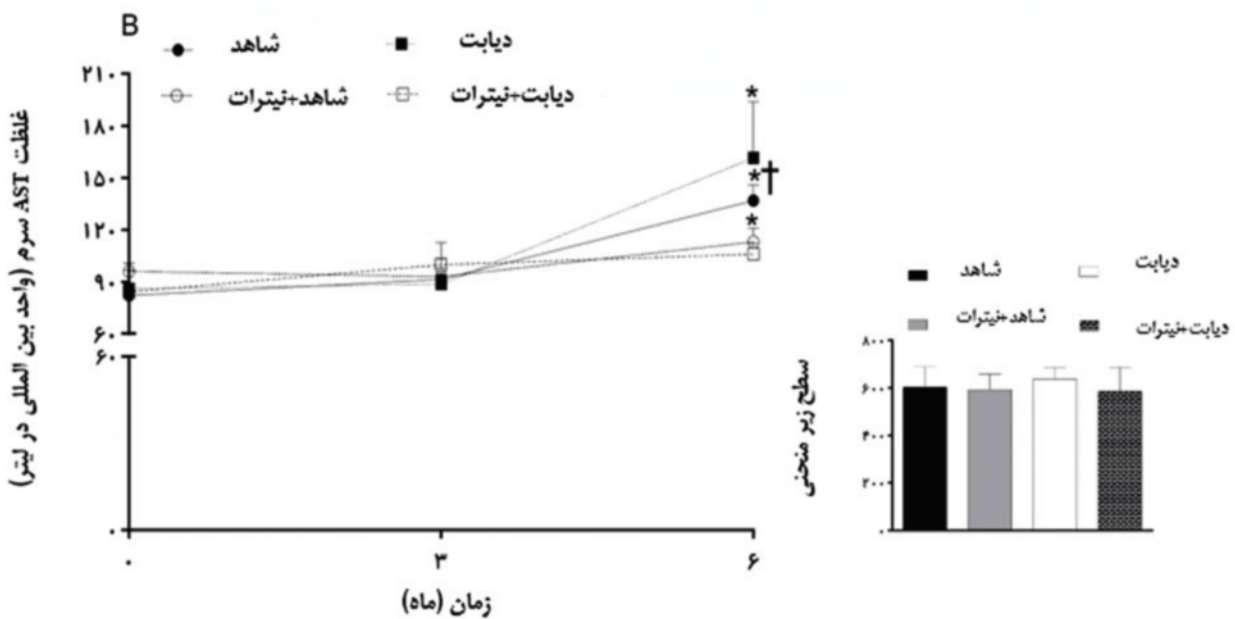
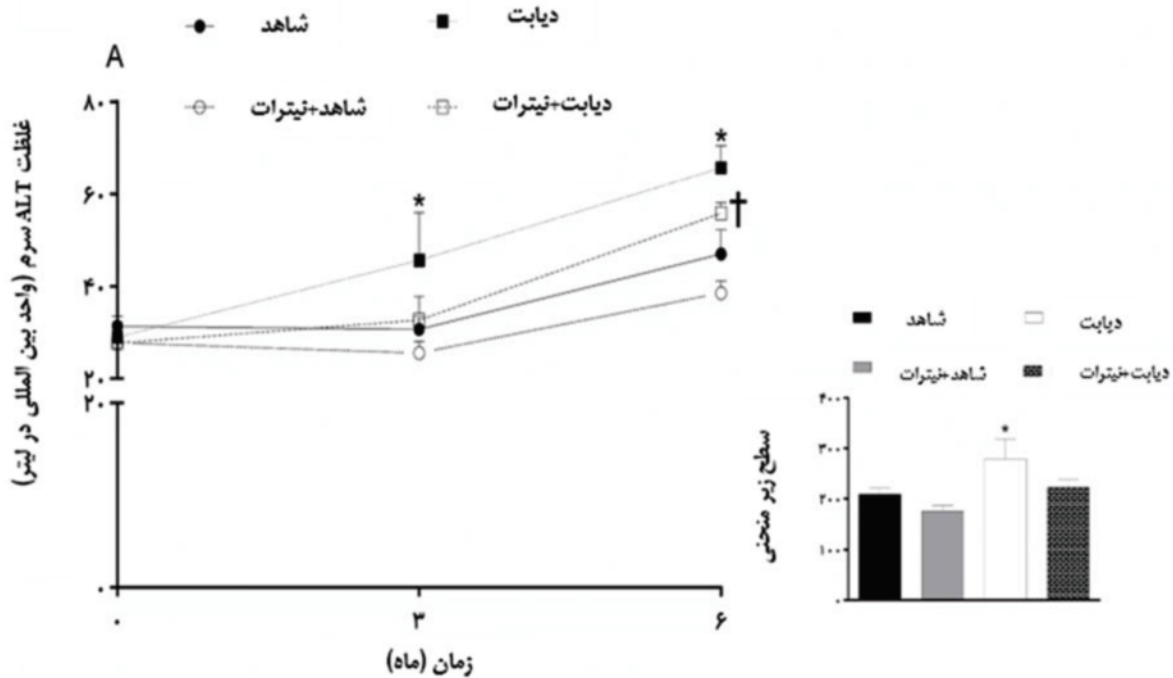
مقدار آنزیم AST ($136/8 \pm 9/1$) واحد بین‌المللی در لیتر در مقابل ($161/3 \pm 13/2$ واحد بین‌المللی در لیتر، $P < 0.0001$) و ALP ($302/4 \pm 13/1$) واحد بین‌المللی در لیتر در مقابل ($606/2 \pm 35/5$ واحد بین‌المللی در لیتر، $P < 0.0001$) سرم در ماه ششم در گروه دیابتی نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. تجویز نیترات سدیم در گروه دیابتی باعث کاهش $17/6$ درصدی در سطح سرمی ALT ($P = 0.069$) و کاهش $52/2$ درصدی در سطح سرمی AST ($P < 0.0001$) و کاهش 15

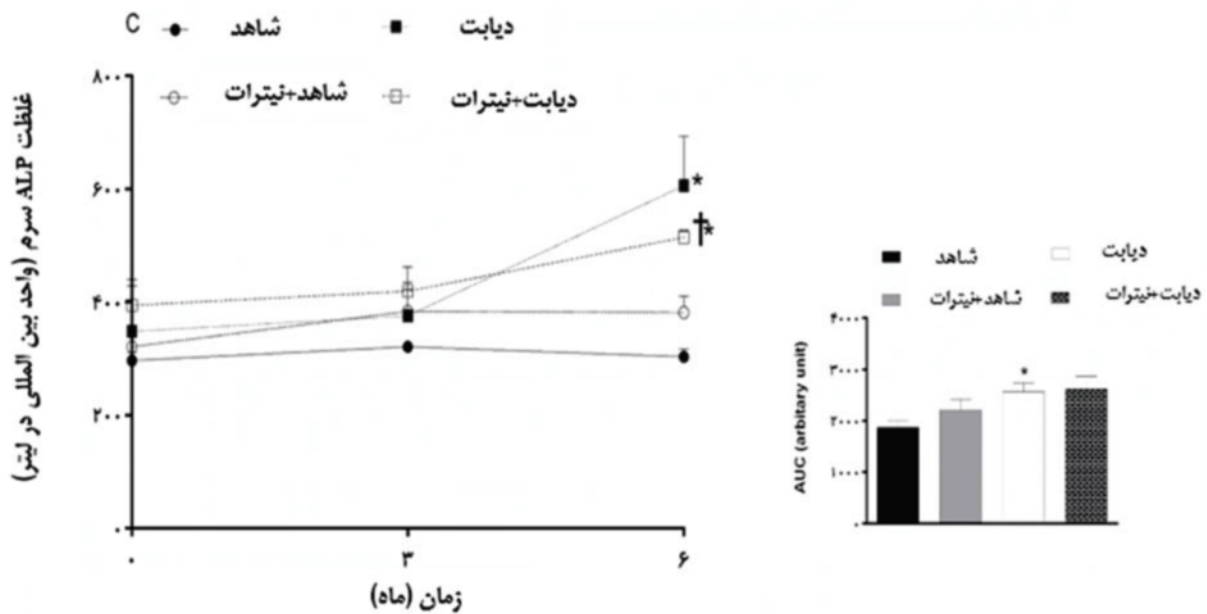
اثر تجویز نیترات سدیم بر آنزیم‌های ALT، AST و ALP

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گروه دیابتی مقدار آنزیم ALT سرم در پایان ماه سوم ($p = 0.067$) و ششم ($p = 0.011$) بالاتر از گروه شاهد بود. برای گروه شاهد در ماه سوم و ششم به ترتیب $30/7 \pm 2/8$ و $47/0 \pm 5/2$ واحد بین‌المللی در لیتر در مقابل برای گروه دیابت به ترتیب $65/7 \pm 4/8$ و $45/7 \pm 10/3$ هم‌چنین

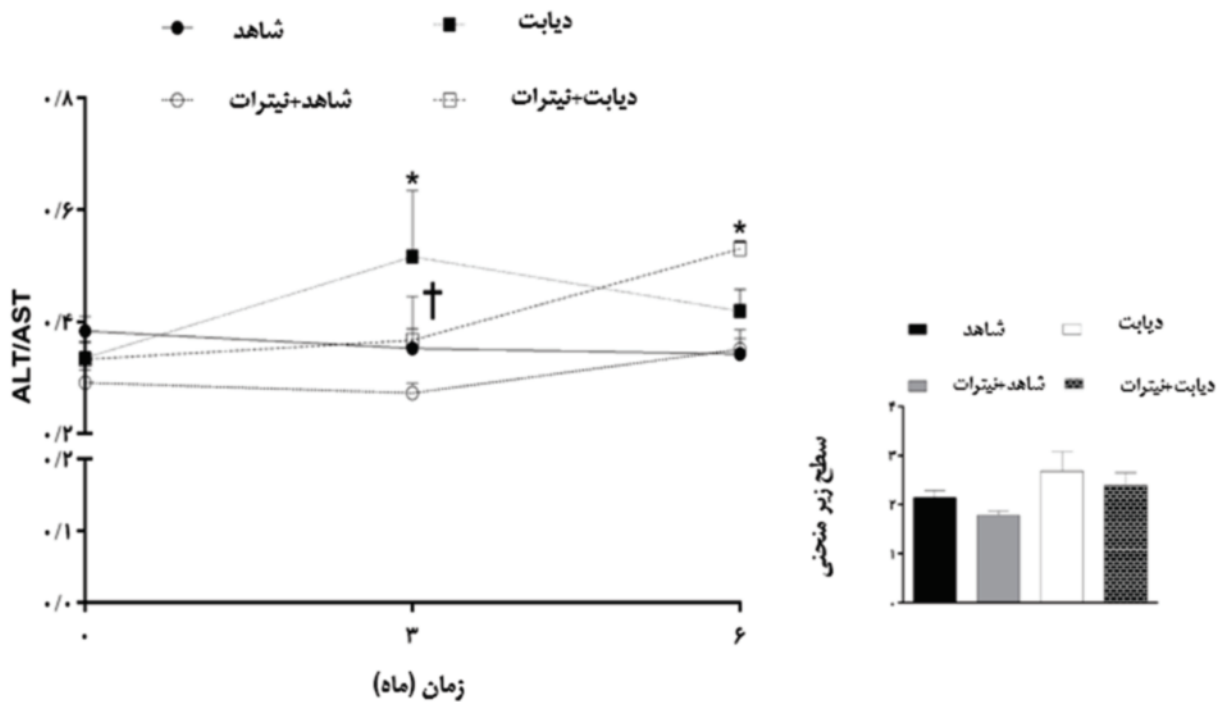
گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل در طول مطالعه بالاتر بود. تجویز نیترات منجر به کاهش سطح سرمی آنزیم ALT به میزان ۲۵/۱۱ درصد ($P=0/1008$) در طول مطالعه گردید.

درصد ALP ($P=0/0339$) در ماه ششم گردید. نمودار سطح زیر منحنی نشان داد که سطح سرمی آنزیم ALT ($279 \pm 39/66$) در مقابل ($209/5 \pm 12/52$, $P=0/0444$) و ALP ($2509 \pm 71/9$) در مقابل ($1864/0 \pm 52/052$, $P<0/0001$) در





نمودار ۳- اثر تجویز طولانی نیترات سدیم بر سطح سرمی آنزیم ALT (A) AST (B) و ALP (C) موش‌های صحرائی نر دیابتی نوع ۲. نمودار ستونی بیانگر سطح زیر منحنی است. یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف از معیار بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و † تفاوت معنی‌دار با گروه دیابت را نشان می‌دهند. تعداد موش صحرائی در هر گروه ۶ سر است.



نمودار ۴- اثر تجویز طولانی نیترات سدیم بر سطح سرمی آنزیم نسبت ALT به AST در موش‌های صحرائی نر دیابتی نوع ۲. نمودار ستونی بیانگر سطح زیر منحنی است. یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف از معیار بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و † تفاوت معنی‌دار با گروه دیابت را نشان می‌دهند. تعداد موش صحرائی در هر گروه ۶ سر است.

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که دیابت نوع ۲ منجر به افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌گردد، تجویز بلندمدت نیترات سدیم منجر به کاهش سطح سرمی این آنزیم‌ها در ماه ششم مطالعه گردید. این کاهش همراه با کاهش سطح سرمی گلوکز، انسولین و وزن بدن در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ بود.

در این مطالعه تجویز بلند مدت نیترات باعث کاهش گلوکز و انسولین سرم به ترتیب به میزان ۱۹/۲ و ۲۹/۸ درصد در پایان ماه ششم مطالعه گردید. کاهش گلوکز و انسولین سرم ناشتا در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ در مطالعات قبلی به واسطه تجویز نیترات و نیتريت به مدت ۱ هفته^{۲۶}، ۴ هفته^{۱۸}، ۸ هفته^{۲۷}، ۱۰ هفته^{۲۸،۲۹} و ۱۲ هفته^{۳۰،۳۱} گزارش شده است که مطالعه ما به مدت ۲۸ هفته می‌باشد. در مطالعه حاضر هم‌چنین تجویز نیترات منجر به کاهش ۱۳/۸ و ۱۲/۷ درصد وزن بدن به ترتیب در پایان ماه سوم و ششم مطالعه گردید. اثر نیترات بر وزن بدن به طور کامل مشخص نشده است و موافق و مخالف نتایج ما گزارشاتی وجود دارد. به این صورت که تجویز نیترات سدیم به مدت ۶، ۳^۲ و ۳^۳ ماه^{۲۷} منجر به کاهش وزن موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ می‌گردد. نیترات و نیتريت با تبدیل شدن به NO باعث افزایش cGMPⁱ شده که باعث افزایش قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید^{۳۰،۳۴} و افزایش بیوژنز میتوکندری می‌گردد^{۳۵} که هر دو نقش مهمی در کاهش وزن دارند. قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید و افزایش cGMP در بافت چربی سفید به واسطه تجویز نیترات^{۳۴} و نیتريت^{۳۰} در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ گزارش شده است. در این مطالعه از دوز پایین نیترات استفاده شد که مشابه با مقدار NO تولید شده توسط آنزیم eNOS در شرایط طبیعی است.^{۲۸} هم‌چنین این دوز با استفاده از مصرف سبزیجات و میوه‌ها در انسان قابل دستیابی است^{۲۸،۳۶} و می‌تواند به عنوان یک رویکرد مقرون به صرفه مبتنی بر درمان با مواد غذایی برای مدیریت دیابت در نظر گرفته شود.^{۳۶}

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیابت نوع ۲ منجر به افزایش سطح سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP می‌گردد. هم جهت با این مطالعه مشاهده شده است که در

موش‌های صحرایی دیابتی فعالیت و غلظت سرمی آنزیم‌های ALT و AST افزایش می‌یابد.^{۱۳،۱۴} گزارش شده است که غلظت آنزیم ALP در موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ افزایش می‌یابد.^{۱۵} هم‌چنین در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نیز بیان آنزیم‌های ALT و AST افزایش می‌یابد.^{۱۱،۱۲} مقاومت به انسولین در بیماران کبدی باعث افزایش غلظت سرمی تری‌گلیسرید می‌شود^{۳۷} که می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد کبد و افزایش تولید آنزیم‌های کبدی گردد.^{۱۱} هم‌چنین نشان داده شده است که افزایش ALT با افزایش سن، چاقی و افزایش تری‌گلیسرید سرم مرتبط است.^{۱۱}

در مطالعه حاضر تجویز نیترات در گروه دیابتی منجر به کاهش آنزیم‌های ALT و AST به ترتیب ۵۲/۲ درصد و ۱۷/۶ درصد در پایان ماه ششم گردید. اگرچه تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر نیترات بر آنزیم‌های کبدی در بستر دیابت گزارش نشده است ولی در مطالعات مختلف ارتباط بین تجویز نیترات با آنزیم‌های کبدی مشاهده شده است به این صورت که تجویز نیترات منجر به کاهش آنزیم‌های ALT و AST در کبد موش‌های سوری پیر^{۳۷} و بافت ایسکمیک کبد می‌گردد.^{۳۸} هم‌چنین تجویز نیترات باعث بهبود عملکرد کبدی و کاهش آسیب کبدی در موش‌های سوری تغذیه شده با غذای پرچرب می‌گردد.^{۲۰} مخالف با مطالعه حاضر گزارش شده است که مصرف نیترات به صورت خوراکی (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث آسیب کبدی و افزایش آنزیم‌های ALT و AST در موش‌های سالم می‌شود^{۳۹} که به نظر می‌رسد علت تفاوت در دوز بالای نیترات مصرف شده باشد. گزارش شده است که نیترات منجر به بهبود عملکرد کبدی می‌شود و قسمتی از این عملکرد مربوط به مهار کمپلکس I زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری با نیتروزیله کردن آن و هم‌چنین کاهش فعالیت آنزیم NADPH oxidase در کبد و کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS^{••}) در بافت کبدی است.^{۲۸،۴۰،۴۱} هم‌چنین گزارش شده است که اثرات حفاظتی نیترات و نیتريت در عملکرد کبد ممکن است مربوط به اثرات ضد التهابی و ضد استرس اکسیداتیو آن‌ها باشد.^{۲۰،۴۲،۴۳} افزون بر این، اکسید نیتريك باعث افزایش گردش خون در کبد شده که می‌تواند منجر حذف لیپیدهای پراکسید گردد.^{۴۴}

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مساعدت و همکاری مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در انجام این پژوهش ابراز می‌دارند. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

در موش‌های صحرایی دیابتی، تجویز طولانی مدت نیترات منجر به کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌گردد. اثرات مفید نیترات در کاهش سطح سرمی شاخص‌های آسیب کبدی در مبتلایان به دیابت نوع ۲ می‌تواند در مطالعات انسانی مد نظر قرار گیرد.

References

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice* 2018; 138: 271-81.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Available from: URL: <http://www.diabetesatlas.org>.
3. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2019; 71: 793-801.
4. Zoppini G, Fedeli U, Gennaro N, Saugo M, Targher G, Bonora E. Mortality from chronic liver diseases in diabetes. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 1020-5.
5. De Marco R, Locatelli F, Zoppini G, Verlato G, Bonora E, Muggeo M. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999; 22: 756-61.
6. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol* 2019; 70: 151-71.
7. Munteanu MA, Nagy GA, Mircea PA. Current Management of NAFLD. *Clujul Med* 2016; 89: 19-23.
8. Ghasemi A, Zahediasl S. Is nitric oxide a hormone? *Iran Biomed J* 2011; 15: 59-65.
9. Bahadoran Z, Mirmiran P, Ghasemi A. Role of Nitric Oxide in Insulin Secretion and Glucose Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2020; 31: 118-30.
10. Newsome PN, Cramb R, Davison SM, Dillon JF, Foulerton M, Godfrey EM, et al. Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut* 2018; 67: 6-19.
11. Saligram S, Williams EJ, Masding MG. Raised liver enzymes in newly diagnosed Type 2 diabetes are associated with weight and lipids, but not glycaemic control. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; 16: 1012-4.
12. Mandal A, Bhattarai B, Kafle P, Khalid M, Jonnadula SK, Lamichane J, et al. Elevated Liver Enzymes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Cureus* 2018; 10: e3626.
13. Safhi MM, Alam MF. Hepatoprotective Potential of *Sargassum muticum* against STZ-Induced Diabetic Liver Damage in Wistar Rats by Inhibiting Cytokines and the Apoptosis Pathway. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2019; 2019: 7958701.
14. El-Wakf AM, Hassan HA, Mahmoud AZ, Habza MN. Fenugreek potent activity against nitrate-induced diabetes in young and adult male rats. *Cytotechnology* 2015; 67: 437-47.
15. Gheibi S, Jeddi S, Carlström M, Kashfi K, Ghasemi A. Hydrogen sulfide potentiates the favorable metabolic effects of inorganic nitrite in type 2 diabetic rats. *Nitric Oxide* 2019; 92: 60-72.
16. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-50.
17. Wang H, Hu L, Li L, Wu X, Fan Z, Zhang C, et al. Inorganic nitrate alleviates the senescence-related decline in liver function. *Sci China Life Sci* 2018; 61: 24-34.
18. Jiang H, Torregrossa AC, Potts A, Pierini D, Aranke M, Garg HK, et al. Dietary nitrite improves insulin signaling through GLUT4 translocation. *Free Radic Biol Med* 2014; 67: 51-7.
19. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008; 47: 1248-56.
20. Cordero-Herrera I, Guimaraes DD, Moretti C, Zhuge Z, Han H, McCann Haworth S, et al. Head-to-head comparison of inorganic nitrate and metformin in a mouse model of cardiometabolic disease. *Nitric oxide* 2020; 97: 48-56.
21. Lang JD Jr, Teng X, Chumley P, Crawford JH, Isbell TS, Chacko BK, et al. Inhaled NO accelerates restoration of liver function in adults following orthotopic liver transplantation. *J Clin Invest* 2007; 117: 2583-91.
22. Li W, Meng Z, Liu Y, Patel RP, Lang JD. The hepatoprotective effect of sodium nitrite on cold ischemia-reperfusion injury. *Journal of Transplantation* 2012; 2012.
23. Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest* 2005; 115: 1232-40.
24. Björnsson B, Bojmar L, Olsson H, Sundqvist T, Sandström P. Nitrite, a novel method to decrease ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 1775-83.
25. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomedicine Pharmacother* 2017; 95: 605-13.
26. Singamsetty S, Watanabe Y, Guo L, Corey C, Wang Y, Tejero J, et al. Inorganic nitrite improves components of the metabolic syndrome independent of weight change in a murine model of obesity and insulin resistance. *J Physiol* 2015; 593: 3135-45.
27. Gheibi S, Jeddi S, Carlstrom M, Gholami H, Ghasemi A. Effects of long-term nitrate supplementation on carbohydrate metabolism, lipid profiles, oxidative stress, and inflammation in male obese type 2 diabetic rats. *Nitric Oxide* 2018; 75: 27-41.
28. Carlstrom M, Larsen FJ, Nystrom T, Hezel M, Borniquel S, Weitzberg E, et al. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial

- nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 17716-20.
29. Ohtake K, Nakano G, Ehara N, Sonoda K, Ito J, Uchida H, et al. Dietary nitrite supplementation improves insulin resistance in type 2 diabetic KKA(y) mice. *Nitric Oxide* 2015; 44: 31-8.
 30. Varzandi T, Abdollahifar MA, Haeri Rohani SA, Piryaei A, Zadeh-Vakili A, Jeddi S, et al. Effect of long-term nitrite administration on browning of white adipose tissue in type 2 diabetic rats: A stereological study. *Life Sci* 2018; 207: 219-26.
 31. Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, Hughan KS, Vanderpool RR, Goncharov DA, et al. SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 2016; 133: 717-31.
 32. Khorasani V, Jeddi S, Yaghmaei P, Tohidi M, Ghasemi A. Effect of long-term sodium nitrate administration on diabetes-induced anemia and glucose homeostasis in obese type 2 diabetic male rats. *Nitric oxide* 2019; 86: 21-30.
 33. Chaoui AA, Zaki A, Talibi A, Chait A, Derouiche A, Aboussaouira T, et al. Effects of inorganic nitrates on thyroid gland activity and morphology in female rats. *Therapie* 2004; 59: 471-5.
 34. Roberts LD, Ashmore T, Kotwica AO, Murfitt SA, Fernandez BO, Feelisch M, et al. Inorganic nitrate promotes the browning of white adipose tissue through the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Diabetes* 2015; 64: 471-84.
 35. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003; 299: 896-9.
 36. Lundberg JO, Carlstrom M, Weitzberg E. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. *Cell Metab* 2018; 28: 9-22.
 37. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-9.
 38. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, et al. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med* 2007; 204: 2089-102.
 39. Ogur R, Coskun O, Korkmaz A, Oter S, Yaren H, Hasde M. High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of alpha-tocopherol. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 20: 161-6.
 40. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658: 44-9.
 41. Peleli M, Hezel M, Zollbrecht C, Persson AE, Lundberg JO, Weitzberg E, et al. In adenosine A2B knockouts acute treatment with inorganic nitrate improves glucose disposal, oxidative stress, and AMPK signaling in the liver. *Front Physiol* 2015; 6: 222.
 42. Tan G, Pan S, Li J, Dong X, Kang K, Zhao M, et al. Hydrogen sulfide attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, liver cirrhosis and portal hypertension in rats. *PLoS One* 2011; 6: e25943.
 43. Tateya S, Rizzo NO, Handa P, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Daum G, et al. Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. *Diabetes* 2011; 60: 2792-801.
 44. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 527-31.

Original Article

Effects of Long-term Administration of Oral Sodium Nitrate on Liver Enzyme Concentrations in Type 2 Diabetic Male Rats

Shokri M¹, Jeddi S², Faridnouri H¹, Ghasemi A²

¹School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran, ²Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

Received: 09/05/2020, Accepted: 29/07/2020

Abstract

Introduction: Liver disorders in patients with type 2 diabetes (T2D) are mostly associated with higher serum levels of liver enzymes. This study aimed to investigate the effect of nitrate administration on the serum levels of alanine amino transferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) in rats with T2D. **Materials and Methods:** In this study, 24 male Wistar rats were divided into four groups: control, control+nitrate, diabetes, and diabetes+nitrate. T2D was induced using a combination of high-fat diet and injection of low-dose streptozotocin (30 mg/kg). The rats in the nitrate-treated groups received sodium nitrate (100 mg/L in drinking water) for six months. The serum levels of ALT, AST, and ALP were measured at the beginning of the study and at three and six months after nitrate administration. **Results:** Diabetic rats showed increased levels of ALT, AST, and ALP in the serum at six months. Nitrate decreased the serum level of ALT by 17.6% (65.7±4.8 vs. 55.8±2.3 UI/L; P=0.0659), AST by 52.2% (161.3±13.3 vs. 106.0±6.1 UI/L; P<0.0001), and ALP by 15.1% (606.2±35.5 vs. 514.4±12.6 UI/L; P=0.0339) within six months. **Conclusion:** Long-term and low-dose nitrate administration improved the liver function of rats with T2D, as reflected by the reduced serum levels of ALT, AST, and ALP.

Keywords: Nitrate, Type 2 diabetes, Liver enzymes