مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و پنجم، شماره‌ی ۵، صفحه‌های ۴۰۶ ـ ۳۹۹ (آذر ـ دی ۱۴۰۲)

مقاله‌ی پژوهشی

اثر تجویز نیتریت سدیم بر بیان ژن‌های *Nrf2* و *Prdx4* در جزایر جدا شده از پانکراس در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

دکتر سجاد جدی، دکتر اصغر قاسمی

مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران،

نشانی مکاتبه با نویسنده مسئول: تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان شهید اعرابی، پلاک ۲۳، دکتر اصغر قاسمی؛
e-mail: Ghasemi@sbmu.ac.ir

چکیده

مقدمه: نیتریت یک دهنده نیتریک اکسید است که منجر به افزایش ترشح انسولین از جزایر پانکراس در موش صحرایی با دیابت نوع ۲ (**T2D**) می‌گردد. سازوکار پیشنهادی برای این اثر، کاهش استرس اکسیداتیو است. هدف این مطالعه بررسی تاثیر نیتریت بر بیان دو ژن دخیل در فرایند استرس اکسیداتیو ناشی از **T2D** در جزایر پانکراس موش‌های صحرایی است. مواد و روش‌ها: دیابت نوع ۲ در موش‌های صحرایی نر با تجویز رژیم غذایی پر چرب و تزریق مقادیر کم استرپتوزوتوسین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ایجاد شد. موش‌های صحرایی به سه گروه (٦ موش صحرایی در هر گروه) تقسیم شدند: شاهد، دیابت و دیابت+نیتریت. گروه دیابت+نیتریت، برای هشت هفته آب آشامیدنی حاوی نیتریت سدیم (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) دریافت کرد. در پایان مطالعه، سطوح **mRNA** فاکتور هسته‌ای فاکتور مرتبط با اریتروئید ۲ (**Nrf2**) و پراکسی‌ردوکسین-٤ (**Prdx4**) در جزایر پانکراس جدا شده اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: در جزایر جدا شده از موش‌های صحرایی مبتلا به **T2D**، بیان **mRNA** ژن ***Nrf2*** و **Prdx4** به ترتیب ۵۵ (**P=۰/۰۰۵**) و ۷۷ درصد (**P<۰/۰۰۱**) کمتر از گروه شاهد بود. تجویز نیتریت موجب افزایش ٦١ درصدی بیان ***Nrf2*** (**P=۰/۰۵۰**) و ٩٤ درصدی بیان ژن **Prdx4** (**P=۰/۰۰۹**) در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با **T2D** گردید. نتیجه‌گیری: اثرات مفید نیتریت در کاهش استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط **T2D** در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی، با افزایش بیان **mRNA** ژن ***Nrf2*** و **Prdx4** در ارتباط است.

واژگان کلیدی: نیتریت، نیتریک اکسید، فاکتور هسته‌ای فاکتور مرتبط با اریتروئید ۲، استرس اکسیداتیو، جزایر پانکراس، پراکسی-ردوکسین-٤، موش صحرایی، دیابت نوع ۲

دریافت مقاله: ١٤٠٣/٤/١٩ـ دریافت اصلاحیه: ١٤٠٣/٦/١٩ ـ پذیرش مقاله: ١٤٠٣/٦/١٩

مقدمه

در سال ۲۰۲۱ حدود ۵۳۷ میلیون نفر از جمعیت جهان (۱۰/۵ درصد) دیابت نوع ۲ (T2D[i]) داشتند[۱] و پیش بینی می‌شود این عدد تا سال ۲۰٤٥ به ۷۸۳ میلیون نفر (۱۲/۲ درصد) برسد.[۲] این بیماری تا سال ۲۰٤۰ به هفتمین علت اصلی از دست دادن سال‌های زندگی تبدیل خواهد شد.[۳] شیوع دیابت در جمعیت بزرگسال ایران ۹/۱ درصد است و برآورد می‌شود که تا سال ۲۰٤٥ به ۱۰/٦ درصد برسد.[٤] شیوع عوارض دیابت نیز در حال افزایش است و حدود ۵۳ درصد از بیماران مبتلا به T2D از عوارض میکروواسکولار و ۲۷ درصد از بیماران از عوارض ماکروواسکولار این بیماری رنج می‌برند.[۵] علی‌رغم در دسترس بودن داروهای ضد دیابت مختلف، کارآیی این داروها در دستیابی به سطح مطلوب قندخون؛ ضعیف است.[٦،۷] همچنین، اثربخشی داروهای ضد دیابت خوراکی در کنترل قند خون، در طول زمان کاهش می‌یابد.[۸] این داده‌ها اهمیت بررسی روش‌های درمانی جدید در T2D را برجسته می‌کند.

افزایش قند خون سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS[ii]) در T2D می‌شود.[۹] ظرفیت محافظتی

i-Type 2 Diabetes

ii-Reactive Oxygen Spicies

سلول‌های بتا پانکراس برای مقابله با استرس اکسیداتیو پایین[۱۰] و حساسیت جزایر به استرس اکسیداتیو بالا[۱۱] می‌باشد. بنابراین، استرس اکسیداتیو در کاهش ترشح انسولین، مرگ سلول‌های بتا و ایجاد T2D نقش دارد.[۱۲،۱۳] فاکتور هسته‌ای فاکتور مرتبط با اریتروئید ۲ (*Nrf2*[i]) به عنوان یک عامل رونویسی اصلی نقش مرکزی در محافظت از سلول‌های بتا پانکراس در برابر استرس اکسیداتیو دارد.[۱۴] پروتئین NRF2 بیان حدود ۱۰۰ ژن مرتبط با استرس اکسیداتیو را تنظیم می‌کند.[۹،۱۵] یکی از این ژن‌ها پراکسی‌ردوکسین-٤ (*Prdx4*[ii]) است[۱۶] که عملکرد اصلی آن تشکیل پیوندهای دی-سولفیدی در مسیر ساخت انسولین، با استفاده از هیدروژن پراکسید (H_2O_2) است.[۱۷] افزایش بیان *Prdx4* منجر به افزایش ظرفیت ترشح انسولین به دلیل افزایش رونویسی mRNA پروانسولین نیز می‌شود.[۱۸] بنابراین، فعال کردن *Nrf2* به عنوان رویکرد درمانی برای T2D پیشنهاد شده است.[۹]

دیابت نوع ۲ با کاهش فراهم زیستی نیتریک اکسید (NO[iii]) همراه است.[۱۹] نیتریت و نیترات (به عنوان دهنده‌های NO) در مسیر نیترات-نیتریت- NO به NO تبدیل، منجر به افزایش فراهم زیستی NO گشته[۱۹] و کاهش مقاومت به انسولین[۱۲،۱۳] و افزایش ترشح انسولین[۲۰،۲۱] را در موش‌های صحرایی مبتلا به T2D به‌دنبال دارد. نیتریت، با فعال کردن مسیر *Nrf2*، بیان ژن‌های درگیر در کاهش استرس اکسیداتیو را در شریان‌های مزانتریک[iv] موش‌های مبتلا به پر فشاری خون[۲۲] و در میوکارد موش‌های با نارسایی قلب افزایش می‌دهد.[۲۳] نیتریت منجر به کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از T2D در جزایر پانکراس موش‌های صحرایی می‌گردد.[۲۴] فرضیه این مطالعه این است که نیتریت با افزایش بیان mRNA ژن *Nrf2*، به عنوان یک ژن بالادستی در کنترل استرس اکسیداتیو، سبب کاهش استرس اکسیداتیو ایجاد شده در جزایر لانگرهانس موش‌های مبتلا به T2D می‌گردد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

هجده سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (محدوده وزن ۲۰۰-۱۹۰ گرم) در حیوان‌خانه پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در دمای ۲±۲۳ 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 غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بوده و کد اخلاق کار با حیوانات IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1400.055 و IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1403.055 دریافت شده است.

القای دیابت و گروه‌بندی حیوانات

جهت القا T2D از تجویز استرپتوزوتوسین، در مقادیر کم، همراه با رژیم غذایی پرچرب (HFD-STZ[v]) استفاده شد.[۲۵] حیوانات به مدت دو هفته تحت رژیم غذایی پر چرب قرار گرفتند. نحوه تهیه غذای پرچرب و ترکیب آن پیشتر با جزییات بیشتری چاپ شده است.[۲۶] بعد از ١٤ روز مصرف رژیم پرچرب، STZ به مقدار ۲۵ میلی‌گرم به ازای 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[vi] (٦٠ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند و خونگیری از دم آن‌ها انجام شد. حیواناتی که قند خون ناشتای بالای ۱۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند به عنوان حیوانات دیابتی در نظر گرفته شدند. در این مطالعه، حیوانات به صورت تصادفی در سه گروه شاهد، دیابت و دیابت+نیتریت (در هر گروه ٦ موش صحرایی) تقسیم شدند. برای تصادفی‌سازی از نرم‌افزار اکسل استفاده شد؛ به این صورت که ابتدا شماره موش‌های صحرایی در ستون A در اکسل (از شماره ۱ تا ۱۸) و نام گروه‌های مطالعه در ستون B (٦ ردیف اول شاهد، ٦ ردیف دوم دیابت و ٦ ردیف سوم دیابت+نیتریت) به صورت غیر تصادفی نوشته شد. سپس از مولد اعداد تصادفی اکسل برای ایجاد اعداد تصادفی بین ۰ و ۱ در ستون C اکسل در ردیف‌های ۱ تا ۱۸ استفاده شد. شکل دستوری این تابع به صورت ( ) RAND است. فرمول در خانه‌های C1 تا C18 اعمال شده و یک فهرست از ۱۸ عدد تصادفی بین ۰ و ۱ در ستون C اکسل ایجاد شد. در ادامه ستون ستون B و ستون C انتخاب و با استفاده از دستور اکسل Data → Sort، ستون B بر اساس ستون C مرتب

i-Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor (Nrf2)
ii-Peroxiredoxin-4
iii-Nitric Oxide
iv-Mesenteric
v-High Fat Diet-Streptozotocin
vi-Pentobarbital

گردید. این کار منجر به تخصیص یک عدد به طور تصادفی به موش‌های صحرایی شده و تقسیم‌بندی تصادفی انجام می‌شود. جزئیات این روش تصادفی سازی، همراه با شکل، پیشتر چاپ شده است.[۲۷] از روز صفر مطالعه، نیتریت سدیم (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در آب آشامیدنی) به مدت ۸ هفته در گروه دیابت+نیتریت تجویز گردید. مقدار نیتریت در مطالعه حاضر، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود که معادل ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی در هر روز است. این مقدار با توجه به میزان مصرف آب (حدود ۳۵ میلی‌لیتر در روز) و وزن بدن موش‌های صحرایی (حدود ۲۵۰ گرم) بدست آمده است. این مقدار در محدوده مقدار مؤثر و مفید نیتریت (۰/۱ تا ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هر روز) قرار دارد که بسیار پایین‌تر از مقادیر لازم برای ایجاد اثرات مضر احتمالی ناشی از مصرف نیتریت (تولید مت-هموگلوبین[i] و ترکیبات نیتروزآمین[ii]) قرار دارد.[۲۸] نشان داده شده است که مقدار ۵۰-۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر از نیتریت و نیترات سدیم اثر نامطلوب بر عملکرد غده تیروئید،[۲۹] سیستم قلبی-عروقی[۳۰] و کبد[۳۱] ندارد. با توجه به مطالعات پیشین، عمده مطالعات انجام شده در مورد اثرات ضد دیابتی نیتریت در کوتاه مدت (کمتر از یک ماه) انجام شده است و هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات طولانی مدت نیتریت در بستر بیماری دیابت نوع ۲ بود. رژیم پرچرب نیز تا انتهای مطالعه برای موش‌های صحرایی با T2D استفاده گردید.

اندازه‌گیری گلوکز سرم

پس از ۱۲ساعت ناشتایی، حیوانات با استفاده از پنتوباربیتال (۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش شدند و نمونه‌های خون از دم موش‌های صحرایی در همه گروه‌ها جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم جهت اندازه‌گیری گلوکز جدا گردید. گلوکز سرم در ابتدای مطالعه برای تأیید ایجاد مدل دیابت اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری گلوکز سرم با استفاده دستگاه خوانشگر الایزا سان‌رایز[iii](تکان[iv]، سوئیس) و کیت شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) صورت گرفت. ضریب تغییرات درون آزمونی برای سطح سرمی گلوکز زیر ۵ درصد بود.

i-Methemoglobinemia
ii-Nitrosamine
iii-Sunrise
iv-Tecan

اندازه‌گیری بیان mRNA ژن‌های هدف

جداسازی جزایر،[۳۲] و همچنین استخراج RNA، سنتز cDNA و اندازه‌گیری بیان ژن‌ها با جزییات کامل در مطالعه قبلی ارائه شده است.[۲۴] به طور خلاصه، در انتهای مطالعه و بعد از بیهوشی کامل حیوانات، جزایر از موش‌های صحرایی جدا و بلافاصله در بسته‌های ۵ تایی به فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد. ابتدا استخراج RNA انجام شد؛ به این صورت که به کمک کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن، تهران، ایران)، RNA تام استخراج شد. از اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ۱۰۰۰ (ترموساینتیفیک[v]، آمریکا) برای تعیین خلوص و کمیت RNA کل استخراج شده استفاده شد. در ادامه، برای ساخت cDNA، ۱ میکروگرم RNA تام با استفاده از آغازگرهای تصادفی شش تایی و آنزیم رونوشت بردار معکوس توسط کیت سنتز cDNA (شرکت اس ام بایو،[vi] تایوان) ساخته شد. در نهایت بیان mRNA ژن‌های هدف با استفاده از دستگاه Real Time PCR (دستگاه روتور ژن ۶۰۰۰[vii]- کوربت[viii] استرالیا) و مسترمیکس سایبرگرین (شرکت فرمنتاز[ix]، آمریکا) اندازه‌گیری شد. همه مراحل طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت‌ها انجام شد. واکنش PCR حاوی ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمر (پیش‌رو و معکوس)، ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس، و ۵/۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC بود که حجم کلی ۱۵ میکرولیتر را به دست آورد. چرخه‌های PCR مشتمل بود بر: مرحله واسرشت سازی اولیه (۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس)، ۴۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت (۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس)، جفت شدن (۴۵ ثانیه در ۵۸ درجه سلسیوس) و طویل‌سازی (یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس). به منظور افزایش دقت، Real time PCR برای هر نمونه به صورت دوتایی انجام شد. برای اطمینان از عدم آلودگی نمونه ها با DNA بیگانه و عدم وجود پرایمر دوتایی، از نمونه شاهد منفی (حاوی تمامی مواد شرکت‌کننده در واکنش به استثناء cDNA) استفاده شد. ژن بتا-اکتین (یکی از متداول ترین ژن‌های مورد استفاده و دارای پایداری بالا در جزایر جدا شده از پانکراس موش‌های صحرایی با T2D[۲۱،۲۴]) به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد. پرایمرهای اختصاصی

v-Thermo Scientific
vi-SMOBIO
vii-Rotor gene 6000
viii-Corbett
ix-Fermentas

برای ژن‌های مورد نظر طراحی و برای اطمینان از یکتا بودن محل اتصال جفت پرایمرها و ساختمان فضایی آن ها، توالی‌های آن‌ها با استفاده از سایت NCBI، BLAST شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده در برای بررسی بیان mRNA

ژن	شماره دسترسی در بانک ژنی	توالی پرایمر (´3→´5)	اندازه محصول
Nrf2	NM_031789.1	F: CAGGTTGCCCACATTCCCAA R: ATCCAGGGCAAGCGACTCAT	۱۰۸
Prdx4	NM_053512.2	F: CTGTTACAGACTGAAGCTTTGC R: TGATCTGCGACCGAAACCC	۱۳۱
ß-actin	NM_031144.3	F: CACCCGCGAGTACAACCTTC R: CCCATACCCACCATCACACC	۲۰۷

Nrf2, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; *Prdx4*, Peroxiredoxin-4

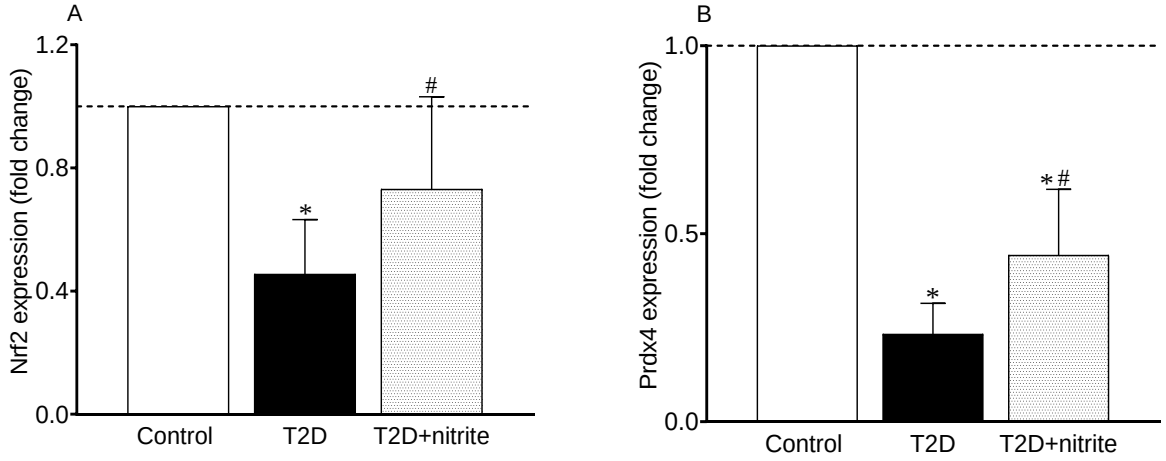
آنالیز آماری

تحلیل آماری یافته‌های مربوط به بیان ژن توسط نرم‌افزار رست[i] انجام شد و با استفاده از نرم‌افزارگرف‌پد-پریزم[ii] نسخه ۸ رسم نمودار صورت گرفت. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر دیابت نوع ۲ بر بیان mRNA ژن‌های *Nrf2* و *Prdx4*

در مقایسه با گروه شاهد، دیابت نوع ۲ موجب کاهش ۵۵ درصدی (بیان نسبی=۰/۴۵ برابر) بیان *Nrf2* (P=۰/۰۰۵) و ۷۷ درصدی (بیان نسبی=۰/۲۳ برابر) بیان *Prdx4* (P<۰/۰۰۱) در جزایر جدا شده از پانکراس موش‌های صحرایی گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر تجویز نیتریت بر بیان mRNA فاکتور هسته‌ای فاکتور مرتبط با اریتروئید ۲ (Nrf2) و پراکسی‌ردوکسین-۴ (Prdx4) در موش‌های صحرایی با دیابت نوع ۲. *تغییر معنی‌دار نسبت به گروه شاهد و # تغییر معنی‌دار نسبت به گروه دیابت نوع ۲. تعداد=۶ موش صحرایی در هر گروه.
T2D, type 2 diabetes; *Nrf2*, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; *Prdx4*, Peroxiredoxin-4

اثر تجویز نیتریت بر بیان mRNA ژن‌های *Nrf2* و *Prdx4* در موش‌های صحرایی با دیابت نوع ۲

در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده، تجویز نیتریت موجب افزایش ۶۱ درصدی (بیان نسبی=۱/۶۱ برابر) بیان *Nrf2* (P=۰/۰۵۰) و ۹۴ درصدی (بیان نسبی=۱/۹۴ برابر) بیان ژن *Prdx4* (P=۰/۰۰۹) در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با T2D گردید (نمودار ۱).

i-REST (Relative Expression Software Tool)
i-GraphPad Prism

بحث

ما پیشتر نشان دادیم که نیتریت در موش‌های مبتلا به T2D اثرات ضد دیابت دارد.[۳۲،۳۳] در مطالعات پیشین، نتایج اثر نیتریت در بهبود متابولیسم کربوهیدرات از طریق افزایش ترشح انسولین،[۳۲] سازوکار اثر نیتریت در افزایش ترشح انسولین،[۲۱] و همچنین، اثر نیتریت در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت در موش های مبتلا به دیابت نوع ۲ [۲۴] نشان داده شده است. اثرات ضد دیابتی نیتریت از طریق کاهش سطح سرمی گلوکز و انسولین،[۳۲] افزایش ترشح انسولین تحریک شده با گلوکز[i،۳۲] افزایش سطوح mRNA انسولین،[۲۱] افزایش محتوای انسولین جزایر[۳۲] و افزایش بیان mRNA پروتئین‌های دخیل در برون‌رانی انسولین[۲۱] انجام می‌شود. همچنین تجویز نیتریت منجر به کاهش وزن بدن و افزایش قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید در موش‌های صحرایی با دیابت نوع ۲ نیز می‌شود.[۳۳] نتایج پژوهش های پیشین گروه ما نشان داده است که بخشی از اثر نیتریت در تحریک ترشح انسولین؛ ناشی از کاهش استرس اکسیداتیو در جزایر لانگرهانس جدا شده از پانکراس است.[۲۴] این اثرات ضد استرس اکسیداتیو نیتریت در موش‌های صحرایی با کاهش بیان ژن *Napdh* اکسیداز ۱ و ٤ (٦٠ و ٧٨ درصد)، افزایش بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز [ii]۱ و ۲ (۱۲۲ و ۱۸۰ درصد)، کاتالاز[iii] (۱۷۰ درصد)، گلوتاتیون پراکسیداز [iv]۱ و ۷ (۱۲۰ و ۵۰۰ درصد)، گلوتاتیون ردوکتاز[v] (۲۰۰ درصد)، تیوردوکسین[vi] ۱ (۱۱۰ درصد)، و تیوردوکسین ردوکتاز[vii] ۱ (۱۳۰ درصد) در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با T2D نسبت به گروه شاهد نشان داده شده است.[۲۵] آنچه این مطالعه برای اولین بار اضافه می‌کند این است که تجویز ۸ هفته‌ای نیتریت بیان mRNA ژن *Nrf2* در جزایر لانگرهانس را به عنوان یک ژن بالادستی در کنترل استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهد.

در مطالعه حاضر، T2D موجب کاهش ۵۵ درصدی بیان *Nrf2* در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با T2D نسبت به گروه شاهد گردید. داده‌های متناقضی در مورد اثر T2D بر بیان ژن *Nrf2* وجود دارد. افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیو هم‌زمان با افزایش بیان *NRF2* در تکه‌برداری از بافت کلیوی بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی[۳٤] و همچنین افزایش mRNA و پروتئین NRF2 در شبکیه بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی[۳۵] گزارش شده است. در مقابل، کاهش NRF2 در پوست بیماران[۳٦] و فیبروبلاست‌های موش‌های صحرایی[۳۷] دیابتی گزارش شده است. این نتایج متفاوت، به دلیل تفاوت در بافت هدف ومدت زمان دیابت است. خلاف دیابت کوتاه‌مدت، به دنبال دیابت طولانی مدت افزایش بیان ژن *Hrd1*[viii] رخ می‌دهد. محصول این ژن به NRF2 متصل شده و آن را به مجموعه پروتئازومی[ix] هدایت می‌کند؛ که موجب کاهش سطح پروتئین NRF2 در بافت می‌شود.[۳۸] اتصال HRD1 به محصول ژن *Redd1*[x]، به عنوان مهارکننده فسفوریلاسیون پروتئین‌های AKT و GSK3β[xi] و تخریب کننده NRF2، در سلول‌های بتا انسان و موش آزمایشگاهی مبتلا به T2D[۳۸] و همچنین در شبکیه موش‌های دیابتی شده با تجویز STZ[۳۹]، مشاهده می‌شود. این مطالعات پیشنهاد داده‌اند که افزایش بیان *Nrf2* با روش‌های دارویی و یا تغذیه‌ای، علاوه بر کاهش عوارض دیابت، منجر به حفظ عملکرد سلول‌های بتا نیز می‌شوند.[۹]

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز نیتریت موجب افزایش ٦١ درصدی بیان *Nrf2* در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با T2D می‌شود. هم راستا با این شواهد گزارش شده است که نیتریت با فعال کردن مسیر *Nrf2*، بیان ژن‌های درگیر در کاهش استرس اکسیداتیو مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پرواکسیداز را در شریان‌های مزانتریک موش‌های مبتلا به پر فشاری خون[۲۲] و در میوکارد موش‌های با نارسایی عملکرد قلب ناشی از ایسکمی را افزایش می‌دهد.[۲۳] درباره اثرات آنتی‌اکسیدانی نیتریت در موش‌های صحرایی با T2D، ما در مطالعه گذشته خود نشان دادیم که تجویز نیتریت منجر به مهار استرس اکسیداتیو ایجاد شده در جزایر در موش‌های صحرایی با T2D می‌شود. بنابراین نیتریت درمانی؛ احتمالاً از طریق افزایش بیان *Nrf2* (جلوگیری از کاهش بیان *Nrf2* در بستر T2D)، منجر به کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از

i-GSIS
ii-Superoxide Dismutase
iii-Catalase
iv-Glutathione Peroxidase
v-Glutathione Reductase
vi-Thioredoxin
vii-Thioredoxin Reductase

viii-HMG-CoA Reductase Degradation 1
ix-Proteasome
x-Stress Response Protein Regulated in Development and DNA Damage 1
xi-Glycogen Synthase Kinase-3 Beta

T2D در جزایر می‌شود. سلول‌های بتا به پروتئین NRF2 برای حفظ توده سلولی، بقا، عملکرد و تکثیر وابسته هستند. تعداد زیادی از ترکیبات دارویی، عمدتاً با منشاء طبیعی، مسیر NRF2 را فعال می‌کنند.[۴۰،۴۱] در واقع، فعال‌سازی *Nrf2* باعث کاهش التهاب، افزایش حساسیت به انسولین، کاهش وزن بدن و حفظ توده سلولی بتا و افزایش ترشح انسولین می‌شود و دستکاری مسیر آنتی‌اکسیدانی NRF2 یک راه درمانی امیدوارکننده در آینده برای درمان هر دو نوع دیابت در نظر گرفته می‌شود.[۹]

در مطالعه حاضر نشان داده شد که افزایش بیان *Nrf2* به دنبال تجویز نیتریت با افزایش بیان ژن *Prdx4* (۹۴ درصد) در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با T2D همراه است. سلول‌های بتا پانکراس ضمن تاشدگی پروانسولین در شبکه آندوپلاسمی مقادیر زیادی H_2O_2 تولید می‌کنند. از آنجا که بیان آنزیم‌های سم زدایی H_2O_2؛ مانند کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیدازها، در جزایر کم است، این سلول‌ها بسیار مستعد آسیب ناشی از اثرات سمی H_2O_2 هستند. پانکراس به طور اساسی دارای مجموعه دفاع آنتی‌اکسیدانی ضعیفی است و ظرفیت محافظتی آنتی‌اکسیدانی سلول‌های بتا پانکراس ممکن است برای مقابله با چالش‌های سبک زندگی امروزی کافی نباشد[۱۰،۴۲،۴۳] و آن‌ها را در معرض خطر بالای اختلال اکسیداتیو قرار دهد. در موش ها حساسیت جزایر به رادیکال‌های پراکسید ۲۵ برابر بیشتر از کبد است.[۱۱] بنابراین می‌توان فرض کرد که NRF2 از طریق افزایش بیان ژن *Prdx4* منجر به کاهش آسیب اکسیداتیو با واسطه H_2O_2 در شبکه آندوپلاسمی و افزایش سنتز و ترشح انسولین از جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با T2D می‌گردد.

از نقاط قوت این مطالعه می‌توان به مدل دیابت نوع ۲ اشاره کرد که در آن رژیم پر چرب سبب ایجاد مقاومت به انسولین و مقادیراندک از STZ سبب تخریب نسبی سلول‌های بتای پانکراس می‌گردد و از این نظر شباهت زیادی به پاتوفیزیولوژی دیابت نوع ۲ در انسان دارد.[۲۶] این مطالعه دارای چند محدودیت نیز هست : (۱) عدم اندازه‌گیری بیان پروتئین ژن‌های مورد مطالعه. با این وجود باید توجه داشت که بر اساس شواهد پیشین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها عمدتاً توسط سطوح mRNA آن‌ها تعیین می‌شود[۴۴] و بیان این ژن‌های در سطح mRNA در جزایر موش صحرایی با T2D به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو سلول بتا در نظر گرفته می‌شود.[۴۵،۴۶] (۲) عدم استفاده از مداخلات دارویی برای ارزیابی سهم *Nrf2* بر کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز نیتریت در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی دیابتی شده. (۳) موش‌های صحرایی ۸ هفته پس از درمان با نیتریت پیگیری شدند و بیان ژن های *Nrf2* و *Prdx4* در جزایر موش صحرایی با T2D فقط در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. دوره‌های پیگیری طولانی‌تر یا کوتاه‌تر ممکن است نتایج متفاوتی به همراه داشته باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی اثر نیتریت بربیان پروتئین ژن‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو در حضور مهارکننده‌های فارماکولوژی *Nrf2* در فواصل زمانی کوتاهتر و بلندتر در جزایر پانکراس انجام شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داده شد که تجویز نیتریت به مدت ۸ هفته موجب افزایش بیان mRNA ژن *Nrf2* به عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی پاسخ‌های سلولی برای مقابله با افزایش استرس اکسیداتیو شد که همراه با افزایش بیان ژن Prdx4 در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی با T2D بود. این داده‌ها برای اولین بار سازوکار جدیدی را برای توضیح اثرات ضد استرس اکسیداتیو نیتریت در T2D ارائه داد. این نتایج تا حدی توجیه کننده اثر مفید نیتریت در کاهش استرس اکسیداتیو،[۲۴] افزایش سطوح mRNA انسولین[۲۱] و محتوای انسولین جزایر[۳۲] و بیان mRNA پروتئین‌های دخیل در برون‌رانی انسولین[۲۱] مشاهده شده در جزایر پانکراس جدا شده از موش‌های صحرایی مبتلا به T2D است.

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.

این طرح با کد قرارداد ۰۳-۴۳۰۱۰۹۷۵ با حمایت مالی پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nat Rev Endocrinol 2018; 14: 88-98.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available from URL: https://www.diabetesatlas.org.
3. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. Lancet 2018; 392: 2052-90.
4. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021. Available from: URL: http://www.diabetesatlas.org
5. Litwak L, Goh S-Y, Hussein Z, Malek R, Prusty V, Khamseh ME. Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational A 1 chieve study. Diabetol Metab Syndr 2013; 5: 1-10.
6. Mendes ABV, Fittipaldi JAS, Neves RCS, Chacra AR, Moreira ED. Prevalence and correlates of inadequate glycaemic control: results from a nationwide survey in 6,671 adults with diabetes in Brazil. Acta Diabetol 2010; 47: 137-45.
7. Agarwal AA, Jadhav PR, Deshmukh YA. Prescribing pattern and efficacy of anti-diabetic drugs in maintaining optimal glycemic levels in diabetic patients. J Basic Clin Pharm 2014; 5: 79-83.
8. Liebl A. Challenges in optimal metabolic control of diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2002; 18: S36-S41.
9. Baumel-Alterzon S, Katz LS, Brill G, Garcia-Ocaña A, Scott DK. Nrf2: The Master and Captain of Beta Cell Fate. Trends Endocrinol Metab 2021; 32: 7-19.
10. Lenzen S. The pancreatic beta cell: an intricate relation between anatomical structure, the signalling mechanism of glucose-induced insulin secretion, the low antioxidative defence, the high vulnerability and sensitivity to diabetic stress. ChemTexts 2021; 7: 1-6.
11. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers DG. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. Proce Natl Acad Scie U S A 1982; 79: 927-30.
12. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes 2007; 56: 1783-91.
13. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. Diabetologia 2009; 52: 2489-98.
14. Jarrin Lopez A, Lau H, Li S, Ichii H. Potential Benefits of /Keap1 Targeting in Pancreatic Islet Cell Transplantation. Antioxidants (Basel, Switzerland) 2020; 9: 321-33.
15. David JA, Rifkin WJ, Rabbani PS, Ceradini DJ. The Nrf2/Keap1/ARE pathway and oxidative stress as a therapeutic target in type II diabetes mellitus. J Diabetes Res 2017; 2017: 4826724-4826739.
16. Kirby J, Halligan E, Baptista MJ, Allen S, Heath PR, Holden H, et al. Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. Brain 2005; 128: 1686-706.
17. Schulte J. Peroxiredoxin 4: a multifunctional biomarker worthy of further exploration. BMC Med 2011; 9: 137.
18. Mehmeti I, Lortz S, Elsner M, Lenzen S. Peroxiredoxin 4 improves insulin biosynthesis and glucose-induced insulin secretion in insulin-secreting INS-1E cells. J Biol Chem 2014; 289: 26904-13.
19. Ghasemi A, Jeddi S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. Nitric oxide : biology and chemistry 2017; 70: 9-24.
20. Nystrom T, Ortsater H, Huang Z, Zhang F, Larsen FJ, Weitzberg E, et al. Inorganic nitrite stimulates pancreatic islet blood flow and insulin secretion. Free Radic Biol Med 2012; 53: 1017-23.
21. Ghasemi A, Afzali H, Jeddi S. Effect of oral nitrite administration on gene expression of SNARE proteins involved in insulin secretion from pancreatic islets of male type 2 diabetic rats. Biomed J 2022; 45: 387-395.
22. Amaral JH, Rizzi ES, Alves-Lopes R, Pinheiro LC, Tostes RC, Tanus-Santos JE. Antioxidant and antihypertensive responses to oral nitrite involves activation of the Nrf2 pathway. Free Radic Biol Med 2019; 141: 261-8.
23. Donnarumma E, Bhushan S, Bradley JM, Otsuka H, Donnelly EL, Lefer DJ, et al. Nitrite Therapy Ameliorates Myocardial Dysfunction via H2S and Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2)-Dependent Signaling in Chronic Heart Failure. Journal of the American Heart Association 2016; 5: e003551.
24. Ghasemi A, Gheibi S, Kashfi K, Jeddi S. Anti-oxidant effect of nitrite in the pancreatic islets of type 2 diabetic male rats. Iran J Basic Med Sci 2023; 26: 420-8.
25. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: A practical guide. EXCLI J 2023; 22: 274-94.
26. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. Biomed Pharmacother 2017; 95: 605-13.
27. Yousefzadeh N, Jeddi S, Zarkesh M, Norouzirad R, Kashfi K, Ghasemi A. Protective effects of long-term nitrate administration against ovariectomy-induced kidney dysfunction in rats. Pharmacol Rep 2023; 75: 979-94.

28. Bryan NS, Ivy JL. Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients. Nutr Res 2015; 35: 643-54.
29. Bakhtiarzadeh F, Siavoshi F, Gheibi S, Kashfi K, Samadi R, Jeddi S, et al. Effects of long-term oral nitrate administration on adiposity in normal adult female rats. Life Sci 2018; 210: 76-85.
30. Jeddi S, Khalifi S, Ghanbari M, Bageripour F, Ghasemi A. Effects of Nitrate Intake on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Diabetic Rats. Arq Bras Cardiol 2016; 107: 339-47.
31. 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.
32. Gheibi S, Bakhtiarzadeh F, Jeddi S, Farrokhfall K, Zardooz H, Ghasemi A. Nitrite increases glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content in obese type 2 diabetic male rats. Nitric Oxide 2017; 64: 39-51.
33. Varzandi T, Abdollahifar MA, Rohani SAH, 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.
34. Jiang T, Huang Z, Lin Y, Zhang Z, Fang D, Zhang DD. The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Diabetes 2010; 59: 850-60.
35. Zhong Q, Mishra M, Kowluru RA. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54: 3941-8.
36. Lee YJ, Kwon SB, An JM, Kim CH, Lee SH, Choi CY, et al. Increased protein oxidation and decreased expression of nuclear factor E2-related factor 2 protein in skin tissue of patients with diabetes. Clin Exp Dermatol 2015; 40: 192-200.
37. Bitar MS, Al-Mulla F. A defect in Nrf2 signaling constitutes a mechanism for cellular stress hypersensitivity in a genetic rat model of type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2011; 301: E1119-29.
38. Wu T, Zhang S, Xu J, Zhang Y, Sun T, Shao Y, et al. HRD1, an Important Player in Pancreatic β-Cell Failure and Therapeutic Target for Type 2 Diabetic Mice. Diabetes 2020; 69: 940-53.
39. Miller WP, Sunilkumar S, Giordano JF, Toro AL, Barber AJ, Dennis MD. The stress response protein REDD1 promotes diabetes-induced oxidative stress in the retina by Keap1-independent Nrf2 degradation. J Biol Chem 2020; 295: 7350-61.
40. Kim MH, Kim EH, Jung HS, Yang D, Park EY, Jun HS. EX4 stabilizes and activates Nrf2 via PKCδ, contributing to the prevention of oxidative stress-induced pancreatic beta cell damage. Toxicol Applied Pharmacol 2017; 315: 60-9.
41. Gao Y, Liu C, Wan G, Wang X, Cheng X, Ou Y. Phycocyanin prevents methylglyoxal-induced mitochondrial-dependent apoptosis in INS-1 cells by Nrf2. Food Funct 2016; 7: 1129-37.
42. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. Biochem Soc Trans 2008; 36: 343-7.
43. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. Free Radic Biol Med 1996; 20: 463-6.
44. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. Diabetes 1997; 46: 1733-42.
45. Dreja T, Jovanovic Z, Rasche A, Kluge R, Herwig R, Tung YC, et al. Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model of the metabolic syndrome. Diabetologia 2010; 53: 309-20.
46. Roma LP, Jonas JC. Nutrient Metabolism, Subcellular Redox State, and Oxidative Stress in Pancreatic Islets and β-Cells. J Mol Biol 2020; 432: 1461-93.

Original Article

Effect of Sodium Nitrite on the Genes Expression of *Nrf2* and *Prdx4* in the Isolated Pancreatic Islets of Type 2 Diabetic Rats

Jeddi S, Ghasemi A

Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

e-mail: Ghasemi@sbmu.ac.ir

Received: 09/07/2024 **Accepted**: 09/09/2024

Abstract

Introduction: Nitrite is a nitric oxide (NO) donor that increases insulin secretion from pancreatic islets in rats with type 2 diabetes (T2D). The underlying mechanism of this effect is the reduction of oxidative stress. This study aims to investigate the effect of nitrite on the expression of two genes involved in the oxidative stress process caused by T2D in the pancreatic islets of rats. Materials and Methods: T2D was induced in male rats by administering a high-fat diet along with a low dose of streptozotocin (25 mg/kg). The rats were divided into three groups (n=6 per group): control, T2D, and T2D+nitrite. The T2D+nitrite group received drinking water containing sodium nitrite (50 mg/L) for eight weeks. At the end of the study, mRNA levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and peroxiredoxin-4 (Prdx4) were measured in the isolated pancreatic islets. Results: In the pancreatic islets isolated from T2D rats, mRNA expression levels of Nrf2 and Prdx4 were significantly lower by 55% (P=0.005) and 77% (P<0.001), respectively, compared to the control group. Nitrite administration in T2D rats resulted in a 61% increase in Nrf2 expression (P=0.050) and a 94% increase in Prdx4 expression (P=0.009) in the isolated pancreatic islets. Conclusion: The beneficial effects of nitrite in reducing oxidative stress induced by T2D in the pancreatic islets of rats are associated with increased mRNA expression of Nrf2 and Prdx4.

Keywords: Nitrite, Nitric oxide, *Nrf2*, Oxidative stress, Pancreatic islets, *Prdx4*, Rat, Type 2 diabetes