

اثر تجویز طولانی مدت نیترات سدیم با دوز کم بر سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده

دکتر نصیبه یوسفزاده ^{id}، مجید شکری ^{id}، دکتر سجاد جدی ^{id}، دکتر اصغر قاسمی ^{id}

مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران،
نشانی مکاتبه‌ی نویسنده مسئول: تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان اعرابی، پلاک ۲۴، مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز،
پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دکتر اصغر قاسمی؛ e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: شیوع اختلالات کبدی در زنان بعد از یائسگی بالا است. هدف این مطالعه بررسی اثر تجویز طولانی مدت نیترات با دوز کم بر سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی؛ شامل آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP)، در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده است. مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار به ۳ گروه تقسیم شدند (۱۰ سر در هر گروه). شاهد، اوارکتومی شده و اوارکتومی شده+نیترات. مدل اوارکتومی (برداشت تخمدان) در موش‌های صحرایی ماده ۶ ماهه، با استفاده از ایجاد دو برش پوستی پشتی-طرفی، ایجاد شد. حیوانات در گروه شاهد و اوارکتومی شده؛ آب آشامیدنی و در گروه اوارکتومی شده+نیترات؛ نیترات سدیم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آب آشامیدنی) را به مدت ۹ ماه دریافت کردند. وزن بدن، میزان غذای مصرفی و آب مصرفی در ابتدای مطالعه (ماه صفر)، شروع تجویز نیترات سدیم) و انتهای مطالعه (ماه ۹، انتهای تجویز نیترات سدیم) در همه گروه‌ها اندازه‌گیری شد. سطوح سرمی ALT، AST و ALP به صورت ماهانه اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: تجویز نیترات منجر به کاهش وزن در گروه اوارکتومی شده در انتهای مطالعه (۶/۹ درصد، $P=0/004$) گردید ولی اثری بر میزان آب و غذای مصرفی نداشت. در انتهای مطالعه، موش‌های اوارکتومی شده دارای سطح سرمی افزایش یافته ALT (۲۱/۱ درصد، $P<0/001$)، ALP (۲۲/۸ درصد، $P=0/004$) و ALT (۳۱/۳ درصد، $P<0/001$) بودند. تجویز نیترات منجر به کاهش سطح ALT به میزان ۶/۷ درصد ($P=0/012$)، ALP به میزان ۱۳/۱ درصد ($P=0/001$) و ALT به میزان ۹/۴ درصد ($P=0/029$) در طول مطالعه گردید. نتیجه‌گیری: تجویز طولانی مدت نیترات با دوز کم باعث بهبود عملکرد کبدی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده گردید.

واژگان کلیدی: اوارکتومی، نیترات سدیم، آنزیم‌های کبدی، موش‌های صحرایی ماده، یائسگی

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۵ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۰/۱۲/۲ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۷

مقدمه

می‌یابد.^۱ کاهش استروژن ناشی از یائسگی منجر به اختلال عملکرد میتوکندری، افزایش فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو در کبد می‌گردد؛ که می‌تواند منجر به افزایش بیماری‌های کبدی شود.^۲ تجویز استروژن برای درمان بیماری کبدی در زنان یائسه، به علت ایجاد عوارض جانبی نامطلوب (مثل ایجاد کلستاز^۳)، دارای محدودیت‌هایی می‌باشد.

یائسگی حدود ۱۰ درصد از جمعیت بزرگسال جهان را تحت تأثیر قرار داده و هر سال ۲۵ میلیون زن در جهان یائسگی را تجربه می‌کنند.^۱ در حال حاضر حدود یک میلیارد زن در جهان در دوران یائسگی هستند و تخمین زده می‌شود که این تعداد تا سال ۲۰۵۰ به ۱/۶ میلیارد نفر برسد.^۲ شیوع اختلالات کبدی در زنان بعد از یائسگی افزایش می‌یابد و از حدود ۳۰ درصد قبل از یائسگی به حدود ۵۰ درصد افزایش

هستند و^{۲۳} بنابراین می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی به تجویز نیترات داشته باشند. همچنین، تعداد زیادی از مطالعات حیوانی و انسانی که اثرات مفید نیتريت و نیترات را بر سیستم‌های مختلف بدن گزارش کرده‌اند، در کوتاه مدت انجام شده است و نگرانی در مورد اثرات نامطلوب احتمالی قرار گرفتن در معرض نیترات به صورت طولانی مدت همچنان وجود دارد.^{۲۴} بنابراین هدف مطالعه حاضر؛ تعیین اثر تجویز نیترات سدیم خوراکی با دوز کم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۹ ماه، بر شاخص‌های عملکرد کبدی در موش صحرایی اوارکتومی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مراحل انجام مطالعه

این مطالعه مطابق با قوانین نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی ایران،^{۲۵} با کد اخلاق کار با حیوانات به شماره IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1400.121 و IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1398.111 انجام گرفته است. موش‌های صحرایی ماده در حیوانخانه پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با رطوبت 50 ± 6 درصد، دمای 22 ± 2 درجه سلسیوس و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگه‌داری شدند. مراحل انجام مطالعه حاضر در نمودار ۱ نشان داده شده است. تعداد ۳۰ سر موش صحرایی ماده از نژاد ویستار (۶ ماهه با وزن ۲۰۰-۲۲۰ گرم) به صورت تصادفی به سه گروه (۱۰ سر در هر گروه) تقسیم شدند: گروه شاهد، گروه اوارکتومی شده، گروه اوارکتومی شده+نیترات. گروه شاهد و اوارکتومی شده به طور منظم آب آشامیدنی و گروه اوارکتومی شده+نیترات، آب آشامیدنی حاوی نیترات سدیم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) را به مدت ۹ ماه دریافت کردند. دوز مصرفی نیترات سدیم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و طول مدت مداخله (۹ ماه)، با توجه به اثرات حفاظتی نیترات سدیم بر شاخص‌های چاقی^{۲۶} و عملکرد کلیه^{۲۷} در موش‌های صحرایی ماده، از مطالعات قبلی انتخاب شدند. وزن بدن (گرم)، مصرف آب (میلی‌لیتر در روز) و مصرف غذا (گرم در روز) در ابتدای مطالعه (زمان انجام اوارکتومی، ماه منفی ۲)، ۲ ماه بعد از اوارکتومی (شروع تجویز نیترات، ماه صفر) و انتهای مطالعه (۹ ماه بعد از تجویز نیترات، ماه ۹) ثبت شدند. برای اندازه‌گیری مصرف آب، بطری‌های آب مخصوص موش صحرایی هر ۳ روز یکبار (به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر) پر گردید و در انتهای روز سوم قبل از تعویض

بنابراین، تحقیقات بیشتر برای ارائه درمان‌های مؤثرتر ضروری به نظر می‌رسد.^۵

اکسید نیتريكⁱ (NO) یک مولکول کوچک با عملکردهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک متعدد در کبد می‌باشد.^{۶،۷} کاهش فراهم زیستیⁱⁱⁱ NO یک عامل خطر برای ایجاد بیماری کبدی است^{۸،۹} که در موش‌های صحرایی^{۱۰} و موش‌های سوری فاقد تخمدان^{۱۱} و همچنین در زنان یائسه^{۱۲} گزارش شده است. کاهش NO در کبد موش‌های سوری می‌تواند منجر به افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی شامل؛ آسپاراتات آمینو ترانسفرازⁱⁱⁱ (AST)، آلکالین فسفاتاز^{iv} (ALP) و آلانین آمینو ترانسفراز^v (ALT) گردد.^{۸،۹} همچنین افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده گزارش شده است.^{۱۳،۱۴} افزایش سطح ALT، AST و ALP در سرم به عنوان شاخص اختلال در عملکرد کبد در نظر گرفته می‌شود.^{۱۵}

تجویز نیتريت و نیترات معدنی (به عنوان دهنده‌های NO) و همچنین رژیم غذایی غنی از نیتريت و نیترات؛ منجر به جبران سطوح کاهش یافته‌ی NO در بیماری‌های مختلف، مثل چاقی و دیابت نوع ۲، می‌گردد.^{۱۶} بنابراین نیتريت و نیترات با تبدیل شدن به NO می‌توانند اثرات حفاظتی در بستر بیماری‌هایی که با کاهش فراهم زیستی NO (مثل یائسگی)^{۱۲} همراه هستند، اعمال کنند.^{۱۷} تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر تجویز نیتريت و نیترات بر آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده، گزارش نشده است. لیکن، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تجویز نیتريت در موش‌های صحرایی با دیابت نوع ۲^{۱۸} و همچنین موش‌های سوری فاقد آنزیم NO سنتاز اندوتلیالی،^{۱۹} منجر به کاهش سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST می‌گردد. همچنین تجویز نیترات باعث بهبود عملکرد کبد و کاهش آسیب کبدی در بیماران با پیوند کبد می‌گردد.^{۲۰} مطالعات گزارش شده در مورد اثرات مفید نیترات بر عملکرد کبد عمدتاً در موش‌های صحرایی نر با بیماری‌های مختلف و در کوتاه مدت انجام شده است. جنس ماده در مقایسه با جنس نر دارای توانایی تولید و فعالیت بالاتر NO در کل بدن،^{۲۱} ظرفیت بالاتر احیای نیترات به نیتريت در دهان،^{۲۲} و همچنین سطوح سرمی بالاتر نیتريت

i - Nitric oxide

ii - Bioavailability

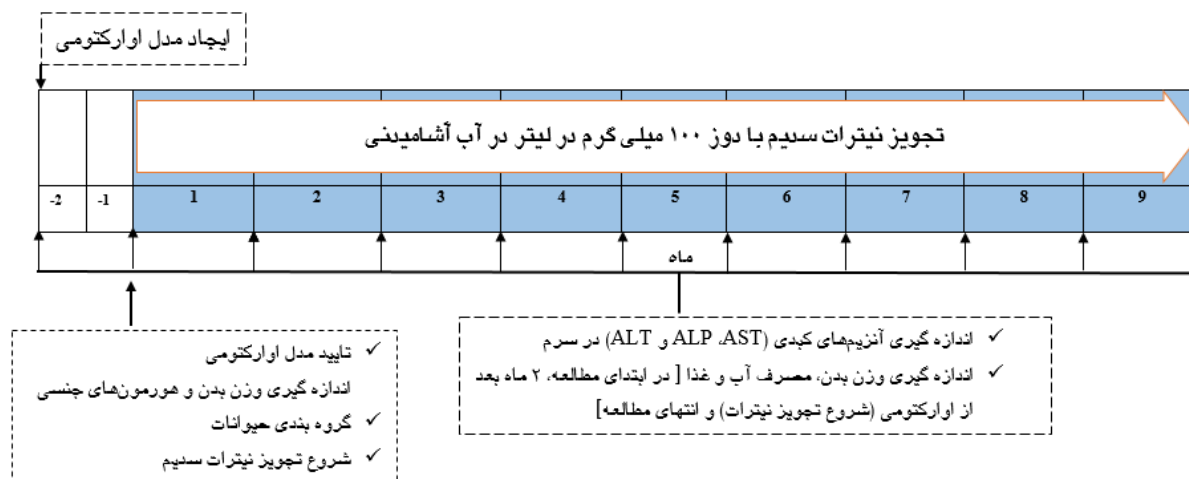
iii - Aspartate amino transferase

iv - Alkaline phosphatase

v - Alanine amino transferase

نحوه ایجاد مدل اوارکتومی و تأیید آن پیشتر گزارش شده است.^{۲۸} به طور خلاصه موش‌های صحرایی ماده ۶ ماهه با سدیم پنتوباریتالⁱ (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند و تخمدان با روش دو برش پوستی پشتی-طرفیⁱⁱ خارج شد. دو ماه بعد از ایجاد مدل اوارکتومی، شاخص‌های تأیید اوارکتومی شامل افزایش وزن بدن، کاهش وزن رحم و تغییرات هورمون‌های جنسی (استروژن و پروژسترون) در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده اندازه‌گیری شدند.^{۲۸} جهت کاهش اثرات مخدوش کننده رشد و پیری که به ترتیب در موش‌های صحرایی با سن کمتر از ۶ ماه و بیشتر از ۹ ماه مشاهده می‌شود و همچنین طولانی بودن مداخله در مطالعه حاضر (تجویز ۹ ماه نیترا سدیم)، موش‌های صحرایی ۶ ماهه برای ایجاد مدل اوارکتومی انتخاب شدند.^{۲۸}

آب، میزان آب مصرفی با توجه به میزان آب باقیمانده در بطری اندازه‌گیری و با واحد میلی‌لیتر در هر روز برای هر موش صحرایی محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری غذای مصرفی، هم‌زمان با تعویض آب، مقدار مشخصی غذا (۳۰۰ گرم) در قفس افزوده شد و در انتهای روز سوم با توجه به غذای باقیمانده، میزان غذای مصرفی هر موش صحرایی با واحد گرم در هر روز برای هر موش صحرایی محاسبه شد. سطح سرمی آنزیم‌های ALT، ALP، AST و قبل از ایجاد مدل اوارکتومی (ماه منفی ۲)، در زمان تأیید اوارکتومی (شروع تجویز نیترا، ماه صفر) و بعد از تجویز نیترا، به صورت ماهانه در هر ۳ گروه اندازه‌گیری شد. در مطالعه حاضر برای پایش صحت اندازه‌گیری‌ها از سرم‌های شاهد تجاری TruLab P و TruLab N در دو محدوده غلظتی طبیعی و غیرطبیعی بالا، تولید شرکت پارس آزمون استفاده شد.



نمودار ۱- مراحل انجام مطالعه

درون آزمونی و برون آزمونی برای همه‌ی اندازه‌گیری‌ها زیر ۳ درصد بود.

اندازه‌گیری سطح سرمی هورمون‌های جنسی

برای اندازه‌گیری سطح سرمی استروژن و پروژسترون از کیت الایزایⁱⁱⁱ DBC (ساخت کشور کانادا با حساسیت ۱۰ پیکو گرم بر میلی‌لیتر برای استروژن و ۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای پروژسترون) استفاده شد. ضریب تغییرات درون آزمونی برای سطح سرمی استروژن ۵/۳ و برای پروژسترون ۴/۸ درصد بود.

آنالیز آماری

تحلیل آماری یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد. یافته‌های کمی به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. از آزمون آنالیز

i-Pentobarbital

ii -Two-dorsolateral Skin Incision Method

iii- Diagnostics Biochem Canada Inc., Ontario, Canada

اندازه‌گیری سطح سرمی آنزیم‌های کبدی

پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، نمونه‌های خون از دم موش‌های صحرایی جمع‌آوری شد و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ و سرم جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی جدا گردید. سرم‌ها تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. آنزیم‌های کبدی در ابتدای مطالعه (زمان ایجاد مدل اوارکتومی، ماه منفی ۲)، دو ماه بعد از ایجاد اوارکتومی (شروع تجویز نیترا، ماه صفر) و سپس تا انتهای مطالعه (۹ ماه بعد از تجویز نیترا سدیم)، بصورت ماهانه، اندازه‌گیری شدند. آنزیم‌های ALT، ALP، AST و ALT با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر سلکترا E (ساخت کشور هلند) و کیت‌های شرکت پارس آزمون (ساخت کشور ایران با حساسیت ۲، ۳ و ۴ واحد بین‌المللی در لیتر به ترتیب برای ALT، ALP، AST) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییرات

در موش‌های اوارکتومی شده به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود (۰/۲۸ گرم در مقابل ۱/۲۴ گرم؛ $P < 0.001$).
اثر تجویز نیترا ت سدیم بر وزن بدن، غذای مصرفی، و آب مصرفی در موش‌های صحرایی ماده

در ابتدای مطالعه (زمان ایجاد مدل اوارکتومی، ماه منفی ۲)، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه از نظر وزن بدن (۲۰۷/۶±۲/۴ گرم در گروه شاهد در مقابل ۲۰۹/۲±۲/۷ گرم در گروه اوارکتومی شده)، غذای مصرفی (۱۴/۹±۰/۲ گرم در روز در گروه شاهد در مقابل ۱۵/۱±۰/۴ گرم در روز در گروه اوارکتومی شده) و آب مصرفی (۲۲/۷±۱/۱ میلی‌لیتر در روز در گروه شاهد در مقابل ۲۴/۶±۱/۶ میلی‌لیتر در روز در گروه اوارکتومی شده) وجود نداشت. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اوارکتومی منجر به افزایش معنی‌دار (۱۴/۳ درصد، $P < 0.001$) وزن بدن در ماه صفر (دو ماه بعد از اوارکتومی و شروع تجویز نیترا ت) گردید و این افزایش وزن تا انتهای مطالعه (۹ ماه بعد از تجویز نیترا ت) ماندگار بود (۱۲/۱ درصد، $P < 0.001$). تجویز نیترا ت سدیم منجر به کاهش وزن در گروه اوارکتومی شده در ماه نهم (۶/۹ درصد، $P = 0.004$) گردید. تجویز نیترا ت سدیم در گروه اوارکتومی-شده اثری بر میزان آب و غذای مصرفی نداشت.

جدول ۱- اثر تجویز نیترا ت بر وزن بدن، غذای مصرفی و آب مصرفی در موش‌های صحرایی ماده

پارامتر	شاهد		اوارکتومی شده		اوارکتومی شده+نیترا ت	
	ماه صفر	ماه ۹	ماه صفر	ماه ۹	ماه صفر	ماه ۹
وزن بدن (گرم)	۲۱۹/۰±۴/۴	۲۴۵/۴±۳/۶	۲۵۰/۳±۳/۹*	۲۷۵/۲±۴/۱*	۲۵۳/۲±۵/۸*	۲۵۶/۰±۵/۸†
غذای مصرفی (گرم)	۱۶/۱±۰/۵	۱۶/۳±۰/۵	۱۶/۷±۰/۳	۱۵/۱±۰/۲	۱۷/۵±۰/۳	۱۴/۸±۰/۳
آب مصرفی (میلی‌لیتر)	۲۳/۲±۱/۱	۲۸/۴±۰/۷	۲۴/۶±۰/۳	۲۹/۲±۰/۹	۲۷/۲±۱/۵	۳۰/۱±۱/۶

یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار استفاده شده است. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۱۰ سر می‌باشد. تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد در زمان متناظر و تفاوت معنی‌دار با گروه اوارکتومی در زمان متناظر را نشان می‌دهند. ماه صفر: زمان شروع تجویز نیترا ت و تأیید مدل اوارکتومی، ماه ۹: ۹ ماه بعد از تجویز نیترا ت سدیم و انتهای مطالعه

سطح آنزیم AST سرم در گروه اوارکتومی شده در ماه هفتم (۱۲۷/۳±۳/۰/۸) واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی-شده+نیترا ت در مقابل ۱۴۹/۶±۲۶/۴ واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی، ($P = 0.021$) شد که این کاهش در انتهای مطالعه نیز مشاهده گردید ($P = 0.006$). مقایسه سطح زیر منحنی نشان داد که سطح سرمی آنزیم AST در گروه اوارکتومی شده نسبت به گروه شاهد (۲۱/۱ درصد، $P < 0.001$)، در طول مطالعه بالاتر بود. تجویز نیترا ت منجر به کاهش سطح سرمی آنزیم AST به میزان ۷/۷ درصد ($P = 0.012$) در طول مطالعه گردید.

واریانس دوطرفه مخلوطⁱ برای تحلیل داده‌های وزن، غذای مصرفی، آب مصرفی و آنزیم‌های AST، ALP، و ALT در زمان‌های مختلف استفاده گردید. نتایج مربوط به سطح سرمی هورمون‌های جنسی و سطح زیر منحنی به ترتیب با استفاده از آزمون تی-مستقل و آنالیز واریانس یک‌طرفهⁱⁱ آنالیز شد. جهت تعیین اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های مختلف به دنبال آنالیز واریانس یک‌طرفه از آزمون تعقیبی توکیⁱⁱⁱ استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأیید مدل اوارکتومی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو ماه بعد از ایجاد مدل اوارکتومی، موش‌های صحرایی ماده دارای سطح سرمی پایین‌تر استروژن (۷/۵±۰/۹ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بعد از اوارکتومی در مقابل ۱۰/۲±۹۵/۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر قبل از اوارکتومی، $P < 0.001$) و پروژسترون (۱۴/۷±۱/۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر بعد از اوارکتومی در مقابل ۵۷/۵±۵/۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر قبل از اوارکتومی، $P < 0.001$) نسبت به ابتدای مطالعه بودند. همچنین در انتهای مطالعه، وزن لوله‌های رحم

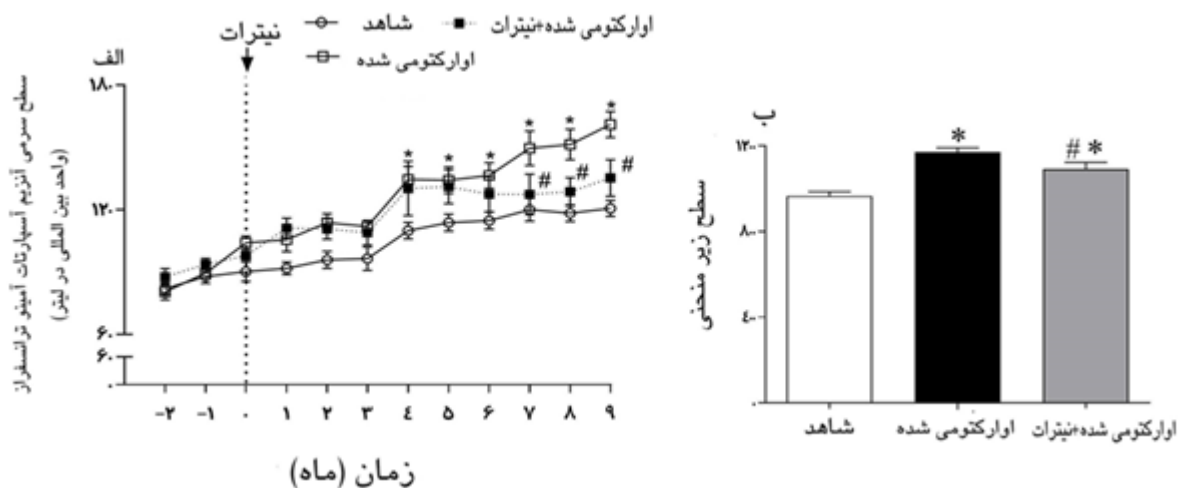
اثر تجویز نیترا ت سدیم بر سطح آنزیم AST

همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، قبل از انجام اوارکتومی (ماه منفی ۲)، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه از نظر سطح سرمی آنزیم AST وجود نداشت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گروه اوارکتومی شده سطح آنزیم AST سرم در پایان ماه چهارم (۱۳۴/۵±۱۹/۹) واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی در مقابل ۱۰۹/۹±۱۲/۷ واحد بین‌المللی در لیتر در گروه شاهد، ($P = 0.009$) و بعد از آن تا انتهای ماه نهم ($P < 0.001$)، بالاتر از گروه شاهد بود. تجویز نیترا ت سدیم منجر به کاهش

i-Mixed two-way ANOVA

ii-One-way ANOVA

iii-Tukey



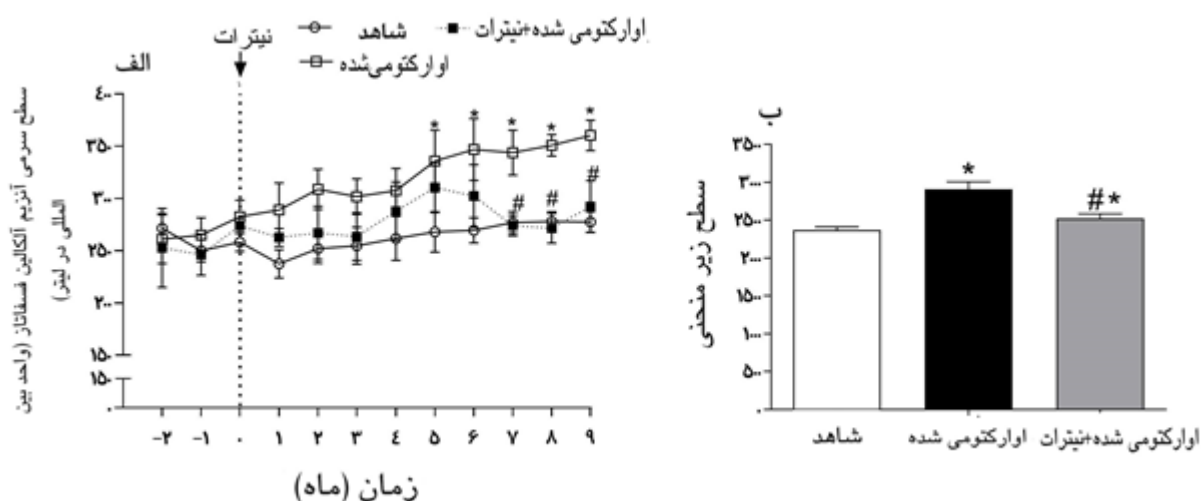
نمودار ۲- اثر تجویز نیترا سدیم بر سطح سرمی آنزیم AST (الف) و سطح زیر منحنی مربوط به آن (ب) در موش‌های صحرایی ماده. یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف از معیار بیان شده‌اند.

* تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و # تفاوت معنی‌دار با گروه اوارکتومی‌شده را نشان می‌دهند. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۱۰ سر است.

ماه هفتم (۲۷۴/۱±۳۱/۱) واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی‌شده+نیترا در مقابل ۳۴۳/۷±۶۸/۵ واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی، (P=۰/۰۳۵) شد؛ که این کاهش تا انتهای مطالعه حفظ گردید (P=۰/۰۰۹). نمودار سطح زیر منحنی نشان داد که سطح سرمی آنزیم ALP در گروه اوارکتومی‌شده نسبت به گروه شاهد (۲۲/۸ درصد، P=۰/۰۰۴) در طول مطالعه بالاتر بود. تجویز نیترا منجر به کاهش سطح سرمی آنزیم ALP (۱۳/۱ درصد، P=۰/۰۰۱) در طول مطالعه گردید.

اثر تجویز نیترا سدیم بر سطح آنزیم ALP

قبل از انجام اوارکتومی (ماه منفی ۲) تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه از نظر سطح سرمی آنزیم ALP وجود نداشت (نمودار ۳). نتایج مطالعه نشان داد که در گروه اوارکتومی‌شده سطح آنزیم ALP سرم در پایان ماه پنجم (۳۳۵/۷±۹۴/۱۹) واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی در مقابل ۲۶۷/۹±۶۱/۳ واحد بین‌المللی در لیتر در گروه شاهد، (P=۰/۰۴۲) و بعد از آن تا انتهای ماه نهم (P=۰/۰۲۶) بالاتر از گروه شاهد بود. تجویز نیترا سدیم منجر به کاهش سطح آنزیم ALP سرم در گروه اوارکتومی‌شده در

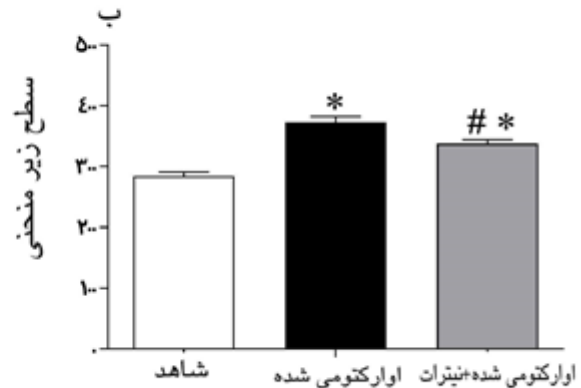
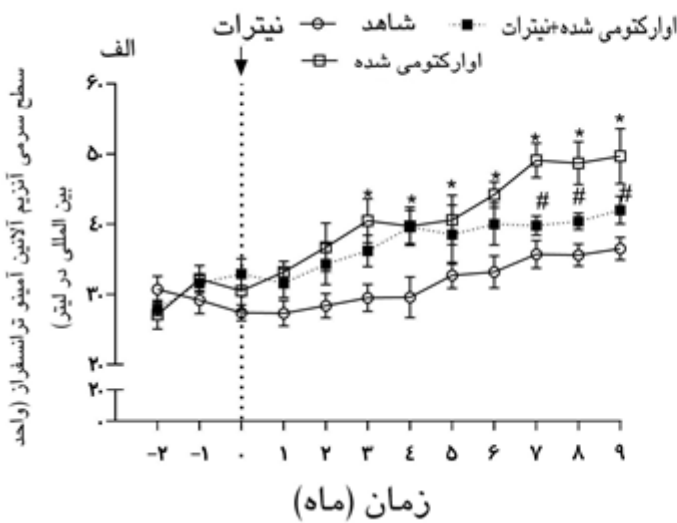


نمودار ۳- اثر تجویز نیترا سدیم بر سطح سرمی آنزیم ALP (الف) و سطح زیر منحنی مربوط به آن (ب) در موش‌های صحرایی ماده. یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف از معیار بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و # تفاوت معنی‌دار با گروه اوارکتومی‌شده را نشان می‌دهند. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۱۰ سر است.

سرم در گروه اوارکتومی‌شده در ماه هفتم ($39/8 \pm 4/3$) واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی‌شده+نیترات در مقابل $49/1 \pm 7/8$ واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی، ($P=0/016$)، هشتم ($P=0/037$) و نهم ($P=0/057$) شد. نمودار سطح زیر منحنی نشان داد که در طول مطالعه سطح سرمی آنزیم ALT در گروه اوارکتومی‌شده نسبت به گروه شاهد $31/3$ درصد ($P<0/001$) بالاتر بود و تجویز نیترات منجر به کاهش آن به میزان $9/4$ درصد ($P=0/029$) در طول مطالعه گردید.

اثر تجویز نیترات سدیم بر سطح آنزیم ALT

قبل از انجام اوارکتومی (ماه منفی ۲)، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه از نظر سطح سرمی آنزیم ALT وجود نداشت (نمودار ۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گروه اوارکتومی‌شده سطح آنزیم ALT سرم در پایان ماه سوم ($40/5 \pm 9/9$) واحد بین‌المللی در لیتر در گروه اوارکتومی در مقابل $29/5 \pm 6/2$ واحد بین‌المللی در لیتر در گروه شاهد، ($P<0/001$) و تا ماه نهم ($P<0/001$) بالاتر از گروه شاهد بود. تجویز نیترات سدیم منجر به کاهش سطح آنزیم ALT



نمودار ۴- اثر تجویز نیترات سدیم بر سطح سرمی آنزیم ALT (الف) و سطح زیر منحنی مربوط به آن (ب) در موش‌های صحرایی ماده. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و # تفاوت معنی‌دار با گروه اوارکتومی‌شده را نشان می‌دهند. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۱۰ سر است.

وزن بدن و کاهش 83 درصدی وزن رحم نسبت به گروه شاهد بودیم.^{۳۶} مجموع این نتایج نشان‌دهنده موفقیت ایجاد مدل اوارکتومی در موش‌های صحرایی ماده بود. این داده‌ها با گزارش‌های قبلی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده مطابقت دارند، به این صورت که کاهش 50 تا 90 درصدی سطح سرمی استروژن و پروژسترون در مطالعات قبلی گزارش شده است.^{۲۸-۳۰} به علاوه افزایش 5 الی 17 درصدی وزن بدن و کاهش 70 الی 85 درصدی وزن رحم نیز در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده گزارش شده است.^{۳۱،۳۲}

بر اساس نتایج این مطالعه، موش‌های اوارکتومی‌شده دارای وزن بالاتر نسبت به گروه شاهد بودند و تجویز نیترات سدیم منجر به کاهش $8/2$ درصدی وزن بدن آن‌ها گردید. مشابه با مطالعه حاضر، کاهش وزن بدن به دنبال

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که اوارکتومی منجر به افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌گردد. تجویز نیترات سدیم خوارکی به مدت 9 ماه با دوز پایین منجر به کاهش سطح سرمی این آنزیم‌ها در موش‌های صحرایی اوارکتومی-شده در طول مطالعه گردید؛ که نشان‌دهنده بهبود عملکرد کبدی می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو ماه بعد از ایجاد مدل اوارکتومی، موش‌های صحرایی ماده دارای سطح سرمی پایین‌تر استروژن و پروژسترون (به ترتیب 93 و 78 درصد) نسبت به ابتدای مطالعه بودند. علاوه بر این در موش‌های اوارکتومی شده، در پایان مطالعه، شاهد افزایش 14 درصدی

چربی بدن و تجمع چربی احشایی می‌شود؛ که می‌تواند منجر به بیماری‌های کبدی و دیابت در این بیماران گردد.^{۴۷} این اثر در مدل حیوانی اوارکتومی شده نیز مشاهده شده است.^{۴۸} گزارش شده است که ایجاد کبد چرب و اختلالات عملکردی کبد به دنبال آن، یک رویداد وابسته به زمان است؛ به طوری که خطر ۱ ساله، ۲ ساله و ۵ ساله برای بیماری کبد چرب پس از عمل جراحی و برداشت تخمدان و کاهش استروژن به ترتیب ۱۴، ۲۰ و ۳۸ درصد است.^{۴۷} این گزارشات تا حدی توجیه‌کننده فاصله زمانی بین ایجاد اوارکتومی و مشاهده اختلالات کبدی در مطالعه حاضر می‌باشند.

مطالعه حاضر نشان داد که تجویز نیترات در گروه اوارکتومی شده منجر به کاهش آنزیم‌های کبدی گردید. اگرچه تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر تجویز نیترات بر آنزیم‌های کبدی در بستر اوارکتومی گزارش نشده است، ولی در مطالعات مختلف اثرات مفید تجویز نیترات بر بهبود عملکرد کبدی و کاهش آسیب کبدی (کاهش آنزیم‌های کبدی) در موش‌های سوری پیر،^۹ موش‌های سوری تغذیه شده با غذای پرچرب^{۴۹} و موش‌های صحرایی با دیابت نوع ۲^{۱۸} گزارش شده است. اثرات مفید نیترات بر عملکرد کبد می‌تواند از طریق مسیرهای مختلف صورت پذیرد. به این صورت که نیترات با تبدیل شدن به نیتريت و NO می‌تواند بر کاهش فراهم زیستی NO که در یائسگی مشاهده می‌گردد، غلبه کند.^{۱۰،۵۰} همچنین نیتريت مشتق شده از نیترات می‌تواند به طور مستقیم به گیرنده آلفای استروژن که گیرنده اصلی استروژن در بافت کبد است، متصل گشته و بدین‌وسیله تا حدودی جایگزین استروژن کاهش یافته در شرایط اوارکتومی باشد.^{۵۱} به علاوه نیتريت مشتق شده از نیترات می‌تواند منجر به افزایش فعالیت زنجیره تنفسی در میتوکندری، از طریق نیتروزیلایون کمپلکس I یا اتصال به سیتوکروم C گشته، و منجر به فعال شدن کیناز فعال‌شونده توسط آدنوزین مونوفسفات^۱ (AMPK) شود. فعال‌سازی AMPK منجر به مدولاسیون تعدادی از مسیرهای پیام رسان پایین دستی برای کاهش سنتز اسیدهای چرب و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و برداشت گلوکز در کبد می‌شود.^{۵۲} همچنین نیتريت و نیترات در کبد دارای اثرات ضد استرس اکسیداتیو هستند که می‌تواند منجر به کاهش آسیب کبدی گردند. این اثر مفید نیترات تا حدی با کاهش

تجویز نیتريت به مدت ۱۸ هفته در موش‌های سوری اوارکتومی شده، گزارش شده است.^{۱۱} در مطالعه حاضر نیترات بدون اثر بر میزان غذای مصرفی منجر به کاهش وزن بدن گردید که مطابق با جمع‌بندی انجام شده در یک مطالعه مروری در موش‌های صحرایی است.^{۱۱} نیتريت و نیترات اثرات ضد چاقی خود را با کاهش وزن بدن و بهبود متابولیسم کربوهیدرات (کاهش سطح سرمی گلوکز، کاهش مقاومت به انسولین و افزایش ترشح انسولین) اعمال می‌کنند.^{۳۳-۳۵} همچنین یکی از مسیرهای مهم اعمال اثرات ضد چاقی نیتريت و نیترات، قهوه‌ای شدن چربی سفید می‌باشد؛ تجویز نیتريت و نیترات منجر به کاهش مقدار چربی احشایی،^{۳۶} افزایش نسبت بافت چربی قهوه‌ای به چربی سفید در موش‌های صحرایی ماده سالم^{۳۷} و نیز افزایش تبدیل چربی سفید به قهوه‌ای در موش‌های صحرایی نر با دیابت نوع ۲^{۳۸،۳۹} می‌گردد. نتایج پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که تجویز نیترات در موش‌های صحرایی با دیابت نوع ۲، منجر به افزایش بیان ژن‌های درگیر در روند قهوه‌ای شدن، در بافت چربی اپیدیدیمال می‌گردد.^{۴۰} نیتريت و نیترات با تبدیل شدن به NO باعث افزایش گوانوزین مونو فسفات حلوقی شده که یکی از فاکتورهای تحریک کننده قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید^{۳۸،۳۹} و بیوژنز میتوکندری می‌باشد؛^{۴۱} که هر دو منجر به کاهش وزن می‌گردند. گزارش شده است که تجویز نیترات منجر به قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید به دنبال تجویز نیترات در موش‌های صحرایی^{۳۶} و موش‌های سوری^{۱۱} اوارکتومی شده می‌گردد.

در مطالعه حاضر افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های AST، ALP و ALT، در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده، مشاهده شد. هم‌جهت با این نتایج؛ افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده، در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است.^{۱۳،۴۲} افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌تواند به علت افزایش سطح سرمی تری‌گلیسرید،^{۴۳} افزایش چربی در کبد، مقاومت به انسولین،^{۴۴} افزایش وزن بدن^{۴۵} و افزایش نشست آنزیم‌های کبدی به سرم،^{۴۵} در بیماران کبدی باشد. همه این تغییرات در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده نیز دیده شده است.^{۳۶،۳۸} گزارش شده است که استروژن از طریق سرکوب لیپوژنز و گلوکونئوژنز و تقویت لیپولیز و ذخیره گلیکوژن در کبد، مانع تجمع چربی در کبد و در نتیجه بیماری کبدی و دیابت می‌گردد.^{۴۶} کمبود استروژن به دنبال یائسگی باعث توزیع مجدد

i- 5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase

از مدل جراحی برای ایجاد یائسگی استفاده شد. نتایج یک مطالعه ۱۲ ساله کوهورت مبتنی بر جمعیت نشان می‌دهد که اختلالات متابولیک ناشی از یائسگی جراحی نسبت به یائسگی طبیعی سریع‌تر و شدیدتر می‌باشد.^۹ اگرچه گزارش شده است که این تفاوت در اختلالات متابولیک ناشی از یائسگی جراحی در ۵ سال اول بعد از جراحی دیده شده و بعد از آن و در طولانی مدت مشاهده نمی‌گردد.^{۱۰} محدودیت دیگر مطالعه حاضر عدم بررسی سازوکارهای مولکولی درگیر در ایجاد اثرات مفید نیترات بر عملکرد کبدی است.

نتیجه‌گیری

تجویز طولانی مدت نیترات با دوز کم می‌تواند منجر به بهبود عملکرد کبدی در بستر یائسگی گردد؛ که با کاهش سطح AST، ALP، و ALT در سرم نشان داده شده است. سپاسگزاری: مطالعه حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد پژوهان ۲۰۸۲۲ است. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز، کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن،^{۳،۵} حذف لیپیدهای پراکسید^۵ و تغییر بیان آنزیم‌های تولیدکننده NO^۳ در کبد، نشان داده شده است. از نقاط قوت این مطالعه می‌توان به مدل اوارکتومی استفاده شده و همچنین دوز نیترات مصرف شده در موش-های صحرایی ماده اشاره کرد. موش‌های صحرایی اغلب پیش از سن ۱۸ تا ۲۴ ماهگی یائسه نمی‌شوند^۶ و مدل اوارکتومی روشی مناسب برای القای یائسگی در موش‌های صحرایی ماده می‌باشد.^{۲۸} مدل اوارکتومی در مطالعه حاضر، بیشتر ویژگی‌های مشاهده شده در زنان یائسه را نشان می‌دهد و مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات مداخلات دارویی است.^{۲۸} دوز نیترات استفاده شده در مطالعه حاضر (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در آب آشامیدنی، معادل ۱۰/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز در هر موش صحرایی) معادل دوز ۱/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم در انسان بوده^۷ و می‌تواند از طریق غذای مصرفی (میانگین دریافت نیترات در انسان از ۱/۲۸ تا ۲/۱۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز در کشورهای مختلف^۸) حاصل شود. یکی از محدودیت‌های این مطالعه این است که

References

- Hill K. The demography of menopause. *Maturitas* 1996; 23: 113-27.
- Zhang GQ, Chen JL, Luo Y, Mathur MB. Menopausal hormone therapy and women's health: An umbrella review. *PLoS Med* 2021; 18: e1003731.
- Setroame AM, Kormla Affrim P, Abaka-Yawson A, Kwadzokpui PK, Eyram Adrah F, Bless H, et al. Prevalence of Metabolic Syndrome and Nonalcoholic Fatty Liver Disease among Premenopausal and Postmenopausal Women in Ho Municipality: A Cross-Sectional Study. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 2168381.
- Brady CW. Liver disease in menopause. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 7613-20.
- O'Donohue J, Williams R. Hormone replacement therapy in women with liver disease. *Br J Obstet : An Gynaecol* 1997; 104: 1-3.
- Carnovale CE, Ronco MT. Role of nitric oxide in liver regeneration. *Ann Hepatol* 2012; 11: 636-47.
- Wiley JW. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 541-4.
- Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetes* 2000; 43: 1498-506.
- 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.
- Hernández I, Delgado JL, DÁ-az J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, et al. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R1599-605.
- Ohtake K, Ehara N, Chiba H, Nakano G, Sonoda K, Ito J, et al. Dietary nitrite reverses features of postmenopausal metabolic syndrome induced by high-fat diet and ovariectomy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017; 312: E300-E8.
- Rosselli M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK, Dubey RK. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)* 1995; 25: 848-53.
- Pósa A, Szabó R, Kupai K, Csonka A, Szalai Z, Veszélka M, et al. Exercise Training and Calorie Restriction Influence the Metabolic Parameters in Ovariectomized Female Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 787063.
- Park JY, Yun H, Jo J, Baek JY, Lee SC, Choi YJ, et al. Beneficial effects of *Cirsium japonicum* var. *maackii* on menopausal symptoms in ovariectomized rats. *Food Funct* 2018; 9: 2480-9.
- 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.
- Ghasemi A, Jeddi S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. *Nitric oxide* 2017; 70: 9-24.
- Roberts LD. Does inorganic nitrate say NO to obesity by browning white adipose tissue? *Adipocyte* 2015; 4: 311-4.
- Jeddi S, Gheibi S, Carlström M, Kashfi K, Ghasemi A. Long-term co-administration of sodium nitrite and sodium hydrosulfide inhibits hepatic gluconeogenesis in

- male type 2 diabetic rats: Role of PI3K-Akt-eNOS pathway. *Life Sci* 2021; 265: 118770.
19. 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.
 20. 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.
 21. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N, et al. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)* 1998; 32: 730-4.
 22. Kapil V, Rathod KS, Khambata RS, Bahra M, Velmurugan S, Purba A, et al. Sex differences in the nitrate-nitrite-NO(*) pathway: Role of oral nitrate-reducing bacteria. *Free Radic Biol Med* 2018; 126: 113-21.
 23. Kapil V, Milsom AB, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F, et al. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*. 2010; 56: 274-81.
 24. Hezel MP, Liu M, Schiffer TA, Larsen FJ, Checa A, Wheelock CE, et al. Effects of long-term dietary nitrate supplementation in mice. *Redox Biol* 2015; 5: 234-42.
 25. Ahmadi-Noorbakhsh S, Mirabzadeh Ardakani E, Sadighi J, Aldavood SJ, Farajli Abbasi M, Farzad-Mohajeri S. Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals in Iran. *Lab Anim (NY)* 2021; 50: 303-5.
 26. Yousefzadeh N, Jeddi S, Shokri M, Afzali H, Norouzirad R, Kashfi K, et al. Long Term Sodium Nitrate Administration Positively Impacts Metabolic and Obesity Indices in Ovariectomized Rats. *Arch Med Res* 2021.
 27. Jeddi S, Yousefzadeh N, Ghasemi A. Effect of Long-term Nitrate Administration on Kidney Function in Female Rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2021; 23: 37-44.
 28. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J* 2020; 19: 89-107.
 29. Wise PM, Ratner A. Effect of ovariectomy on plasma LH, FSH, estradiol, and progesterone and medial basal hypothalamic LHRH concentrations old and young rats. *Neuroendocrinology* 1980; 30: 15-9.
 30. Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas* 2016; 87: 5-17.
 31. Conley MN, Roberts C, Sharpton TJ, Iwaniec UT, Hord NG. Increasing dietary nitrate has no effect on cancellous bone loss or fecal microbiome in ovariectomized rats. *Mol Nutr Food Res* 2017; 61: 1600372.
 32. Devareddy L, Hooshmand S, Collins JK, Lucas EA, Chai SC, Arjmandi BH. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 694-9.
 33. Kapil V MA, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F, Arghandawi S, Pearl V, Benjamin N, Loukogeorgakis S, Raymond MacAllister, Adrian J. Hobbs, Andrew J. Webb, Amrita Ahluwalia. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension* 2010; 56: 274-81.
 34. 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* 2021; S2319-4170(21)00037-8.
 35. Shokri M, Jeddi S, Faridnouri H, Khorasani V, Kashfi K, Ghasemi A. Effect of nitrate on gene and protein expression of nitric oxide synthase enzymes in insulin-sensitive tissues of type 2 diabetic male rats. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2021; 21: 2220-30.
 36. 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.
 37. 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.
 38. 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.
 39. 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.
 40. Jeddi S, Yousefzadeh N, Afzali H, Ghasemi A. Long-term nitrate administration increases expression of browning genes in epididymal adipose tissue of male type 2 diabetic rats. *Gene* 2021; 766: 145155.
 41. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Sci* 2003; 299: 896-9.
 42. Al-Rejaie SS. Thymoquinone treatment alleviate ovariectomy-induced hepatic oxidative damage in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2013; 3: 126-222.
 43. 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 (Baltimore, Md)* 2002; 35: 373-9.
 44. 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.
 45. Koubaa-Ghorbel F, Chaâbane M, Jdidi H, Turki M, Makni-Ayadi F, El Feki A. *Salvia officinalis* mitigates uterus and liver damages induced by an estrogen deficiency in ovariectomized rats. *J Food Biochem* 2021; 45: e13542.
 46. Shen M, Shi H. Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis. *Int J Endocrinol* 2015; 2015: 294278.
 47. Matsuo K, Gualtieri MR, Cahoon SS, Jung CE, Paulson RJ, Shoupe D, et al. Surgical menopause and increased risk of nonalcoholic fatty liver disease in endometrial cancer. *Menopause* 2016; 23: 189-96.
 48. Corriveau P, Paquette A, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM. Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. *Maturitas* 2008; 59: 259-67.
 49. 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.
 50. Zhao S, Lu Z-H, Cui J-J, Li D, Zhu Y-L, Gan J-H. Nitroglycerin ameliorates liver injury and regulates

- adaptive immunity in mice. *Drug Dev Res* 2020; 81: 557-63.
51. Veselik DJ, Divekar S, Dakshanamurthy S, Storch GB, Turner JM, Graham KL, et al. Activation of estrogen receptor-alpha by the anion nitrite. *Cancer Res* 2008; 68: 3950-8.
52. Lundberg JO, Carlstrom M, Weitzberg E. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. *Cell Metab* 2018; 28: 9-22.
53. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658: 44-9.
54. 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.
55. 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.
56. Brooks HL, Pollow DP, Hoyer PB. The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology* 2016; 31: 250-7.
57. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22: 659-61.
58. Babateen AM, Fornelli G, Donini LM, Mathers JC, Siero M. Assessment of dietary nitrate intake in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2018; 108: 878-88.
59. Farahmand M, Ramezani Tehrani F, Bahri Khomami M, Noroozadeh M, Azizi F. Surgical menopause versus natural menopause and cardio-metabolic disturbances: A 12-year population-based cohort study. *J Endocrinol Invest* 2015; 38: 761-7.
60. Ozdemir S, Celik C, Görkemli H, Kiyici A, Kaya B. Compared effects of surgical and natural menopause on climacteric symptoms, osteoporosis, and metabolic syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 106: 57-61.

Original Article

Effect of Long-term, Low-dose Sodium Nitrate Administration on Serum Liver Enzymes Levels in Ovariectomized Rats

Yousefzadeh N , Shokri M , 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@endocrine.ac.ir

Received: 06/11/2021 Accepted: 26/02/2022

Abstract

Introduction: High prevalence of liver disorders has been observed in postmenopausal women. This study aims at determining the effects of long-term, low-dose nitrate administration on serum levels of liver enzymes, including aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and alanine aminotransferase (ALT) in ovariectomized rats. **Materials and Methods:** Female Wistar rats were divided into three groups (n=10/group): control, ovariectomized, and ovariectomized+nitrate. The ovariectomized model (ovariectomy) was induced in 6-month-old female rats using the two-dorsolateral skin incision method. The control and ovariectomized rats received drinking water, and the ovariectomized+nitrate rats received sodium nitrate (100 mg/L in drinking water) for nine months. Body weight, food intake, and water consumption were measured in all the groups at the start (month 0, the beginning of sodium nitrate administration) and end of the study (month 9, the end of sodium nitrate administration). Serum levels of AST, ALP, and ALT were measured every month. **Results:** Nitrate administration decreased body weight in the ovariectomized group at the end of the study (6.9%, P = 0.004) but did not affect water consumption and food intake. At the end of the study, the ovariectomized rats had increased serum levels of AST (21.1%, P<0.001), ALP (22.8%, P=0.004), and ALT (31.3%, P<0.001). Nitrate administration decreased serum levels of ALT (9.4%, P=0.029), AST (6.7%, P=0.012), and ALP (13.1%, P=0.001) over the period of the study. **Conclusion:** Long-term, low-dose nitrate administration improved liver function in the ovariectomized rats.

Keywords: Ovariectomy, Sodium nitrate, Liver enzymes, Female rats, Menopause