

## اثر هیپراکسی بر فراهم زیستی نیتریک اکسید در بافت چربی اپیدیدیمال در موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نوع ۲

دکتر اصغر قاسمی<sup>۱</sup>، دکتر سجاد جدی<sup>۱</sup>، دکتر رضا نوروزی‌راد<sup>۲</sup>

مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۲) گروه آموزشی بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران، نشانی مکاتبه با نویسنده مسئول: دزفول، گروه آموزشی بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دکتر رضا نوروزی‌راد؛  
e-mail: norouzirad@gmail.com

### چکیده

**مقدمه:** هیپوکسی و به ویژه هیپوکسی بافت چربی در پاتوفیزیولوژی دیابت نوع ۲ (T2D) نقش دارد و هیپراکسی (تجویز اکسیژن) به عنوان درمانی بالقوه برای T2D مطرح شده است. یکی از عوارض هیپراکسی، کاهش فراهم زیستی نیتریک اکسید (NO) است. هدف این مطالعه تعیین اثر هیپراکسی بر آنزیم‌های تولیدکننده NO (نیتریک اکسید سنتاز یا NOS) یا تخریب‌کننده ال-آرژینین (آرژیناز) در بافت چربی اپیدیدیمال در موش‌های صحرایی مبتلا به T2D است. **مواد و روش‌ها:** دیابت نوع ۲ در ۱۲ سر موش صحرایی نر؛ با استفاده از رژیم غذایی پر چرب و مقادیر اندک استرپتوزوتوسین القاء شد. سپس موش‌ها به دو گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه هیپراکسی (به مدت ۵ هفته اکسیژن ۹۵ درصد دریافت کردند) و گروه شاهد (در معرض اکسیژن هوا، ۲۱ درصد، قرار گرفتند). در پایان ۵ هفته، حیوانات بیهوش شدند، بافت چربی اپیدیدیمال جدا و میزان پروتئین‌های NOS اندوتلیالی (eNOS)، NOS القایی (iNOS) و آرژیناز، همچنین سطح متابولیت‌های NO (NOx) و لاکتات در آن‌ها اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** هیپراکسی سبب کاهش ۲۸ درصدی قند خون و همچنین کاهش غلظت لاکتات، کاهش سطح پروتئین eNOS (۱۱/۱±۵/۲ در مقابل ۸/۴±۱/۳ نانوگرم به ازای میلی‌گرم پروتئین، P=۰/۰۴۱)، کاهش سطح NOx (۱۸/۲±۱/۰ در مقابل ۱۲/۱±۱/۲ نانومول با ازای میلی‌گرم پروتئین، P=۰/۰۲۷) و افزایش پروتئین آرژیناز (۱/۳±۰/۱۴ در مقابل ۲/۲±۰/۳۱ نانوگرم به ازای میلی‌گرم پروتئین، P=۰/۰۲۸) در بافت چربی گردید. نتیجه‌گیری: هیپراکسی گلوکز خون را در موش‌های صحرایی مبتلا به T2D کاهش داد اما فراهم زیستی NO در بافت چربی احشایی را کم کرد که با کاهش سطح پروتئین eNOS و افزایش سطح پروتئین آرژیناز مرتبط است.

**واژگان کلیدی:** دیابت نوع ۲، نیتریک اکسید، چربی احشایی، آرژیناز، هیپراکسی، موش صحرایی

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۲۲ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۲/۰۶/۲۵ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶

### مقدمه

می‌تواند در دستیابی به درمان‌های جدید کمک کند.<sup>۴</sup> علاوه بر مقاومت به انسولین و نقص عملکرد سلول‌های بتا؛ که پاتوفیزیولوژی مرکزی در T2D را تشکیل می‌دهند،<sup>۵</sup> هیپوکسی نیز در ایجاد آن نقش دارد.<sup>۶،۷</sup> هیپوکسی سبب افزایش متابولیسم بی‌هوازی، کاهش تولید ATP و مرگ سلول می‌شود.<sup>۸</sup> شیوع T2D در افرادی که اختلال خواب شبانه دارند بالاتر است<sup>۹</sup> و هیپوکسی شبانه با افزایش خطر T2D همراه است.<sup>۱۰</sup>

دیابت بزرگ‌ترین اپیدمی را در تاریخ بشر شکل داده است.<sup>۱</sup> شیوع جهانی دیابت حدود ۱۰ درصد است<sup>۲</sup> و رشدی فزاینده دارد.<sup>۳</sup> در سال‌های اخیر درک بهتری از پاتوفیزیولوژی دیابت نوع ۲ (T2D) فراهم شده است که

آنزیم‌های تولیدکننده NO (NOS) یا تخریب‌کننده ال-آرژینین (آرژیناز) در بافت چربی اپیدیدیمال در موش‌های صحرایی است.

## مواد و روش‌ها

این گزارش بخشی از یک پروژه بزرگ‌تر است که در آن مقالاتی در زمینه اثر هیپراکسی در بهبود متابولیسم کربوهیدرات از طریق قهوه‌ای کردن بافت چربی سفید در موش‌های مبتلا به T2D<sup>۱۸</sup> و همچنین اثر مفید نیترات در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از هیپراکسی در موش‌های مبتلا به T2D<sup>۲۰</sup> گزارش شده است. طرح توسط کمیته اخلاق پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کدهای اخلاق IR.SBMU.Endocrine.Rec.1396.398 و IR.SBMU.Endocrine.Rec.1396.399 تصویب شده است.

در این مطالعه؛ که از نوع مداخله‌ای تجربی است، از ۱۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار نر با وزن ۱۹۰ تا ۲۱۰ گرم استفاده شد. کار با حیوانات آزمایشگاهی، طبق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در ایران<sup>۳۱</sup> انجام شد. حیوانات در دمای ۲۲±۲ درجه سلسیوس و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته (روشنایی: ۷ صبح تا ۷ شب و تاریکی: ۷ شب تا ۷ صبح) در قفس‌های پلی‌پروپیلنی (۳ سر موش در هر قفس) نگهداری شدند. حیوانات در همه زمان‌ها دسترسی به آب داشتند و به جز در زمان‌هایی که برای انجام آزمایش ناشتا بودند، دسترسی آزادانه به غذا برای آن‌ها فراهم بود. جزئیات بیشتر در مود رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بیشتر توسط نویسندگان چاپ شده است.<sup>۳۲</sup>

پس از القای T2D، با استفاده از تابع تصادفی<sup>ix</sup> نرم‌افزار اکسل،<sup>۳۳،۳۴</sup> حیوانات به طور تصادفی به دو گروه (۶ سر موش در هر گروه) تقسیم شدند: گروه T2D و گروه T2D درمان شده با هیپراکسی (T2D+HOX). برای تقسیم تصادفی حیوانات به دو گروه مراحل زیر انجام شود: (۱) در ستون A نرم‌افزار اکسل اعداد ۱ تا ۱۲ و در ستون B، نام گروه‌ها (T2D و T2D+HOX) نوشته شد. (۲) در ستون C، دستور RAND() اجرا شد که سبب ایجاد اعداد تصادفی بین صفر تا ۱ در این ستون می‌شود. (۳) ستون‌های B و C

هیپوکسی بافت چربی در پاتوفیزیولوژی T2D مرتبط با چاقی نقش دارد.<sup>۱۱</sup> در موش‌های چاق، فشار اکسیژن میان بافتی در چربی اپیدیدیمال<sup>i</sup> ۴۰ تا ۵۰ درصد کمتر از موش‌های لاغر است.<sup>۱۲،۱۳</sup> هیپوکسی در بافت چربی سبب مقاومت به انسولین، افزایش اندازه سلول و کاهش جریان خون می‌شود.<sup>۱۴،۱۵</sup> کاهش جریان خون بافت چربی در چاقی در موش‌های صحرایی،<sup>۱۶،۱۷</sup> مردان<sup>۱۸</sup> و زنان<sup>۱۷</sup> گزارش شده است. هیپوکسی بافت چربی در چاقی ناشی از افزایش اندازه سلول‌های چربی به مقادیری (۱۴۰ تا ۱۸۰ میکرومتر) بزرگ‌تر از مسافت انتشار اکسیژن (۱۰۰ تا ۱۲۰ میکرومتر) و کاهش جریان خون بافت است.<sup>۱۴،۱۵</sup>

طبق این نظریه که دیابت با هیپوکسی توأم است، هیپراکسی به عنوان درمانی بالقوه برای دیابت مطرح شده است.<sup>۱۸</sup> اثرات مفید متابولیک هیپراکسی شامل کاهش گلوکز خون در موش‌های مبتلا به T2D<sup>۱۸،۱۹</sup> و بیماران مبتلا به T2D<sup>۲۰</sup> گزارش شده است. اما درمان با اکسیژن دارای عوارضی است که یکی از آن‌ها کاهش فراهم زیستی<sup>ii</sup> نیتریک اکسید<sup>iii</sup> (NO) است.<sup>۶</sup> غلظت اکسیژن بر متابولیسم NO اثر دارد.<sup>۲۱،۲۲</sup> و افزایش آن سبب کاهش NO می‌شود.<sup>۲۱</sup> NO توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتاز<sup>iv</sup> (NOS) از ال-آرژینین تولید می‌شود و سه ایزوform دارد: اندوتلیالی<sup>v</sup> (eNOS)، نورونی<sup>vi</sup> (nNOS) و القایی<sup>vii</sup> (iNOS).<sup>۲۳</sup> ال-آرژینین علاوه بر NOS، سوپسترای آنزیم آرژیناز نیز هست که آن را به اورنیتین<sup>viii</sup> تبدیل می‌کند.<sup>۲۴</sup> نشان داده شده است که ۳۰ دقیقه مواجهه با هیپراکسی سبب کاهش ۲۰ درصدی نیتريت پلازما در مردان سالم می‌گردد.<sup>۲۵</sup>

در حالی درمان با اکسیژن در T2D فراهم زیستی NO را کم می‌کند که دیابت خود با کاهش فراهم زیستی NO همراه است.<sup>۲۶،۲۷</sup> تاکنون مطالعه‌ای اثر هیپراکسی بر متابولیسم NO در بافت چربی را بررسی نکرده است. در بافت چربی، NO عمدتاً توسط eNOS و iNOS تولید می‌شود و nNOS نقش اندکی دارد.<sup>۲۸</sup> چربی اپیدیدیمال نماینده چربی احشایی در جوندگان است،<sup>۲۹</sup> لذا هدف این مطالعه تعیین اثر هیپراکسی بر

i-Epididymal  
ii-Bioavailability  
iii-Nitric Oxide  
iv-Nitric Oxide Synthase  
v-Endothelial NOS  
vi-Neural NOS  
vii-Inducible NOS  
viii-Ornithine

ix-Random Function

روزهای هفته به جز جمعه‌ها، روزانه به مدت ۲ ساعت در معرض اکسیژن با غلظت ۹۵ درصد (هیپراکسی) قرار داده شدند.

#### اندازه‌گیری غلظت نیتریت و نیترات (NOx) و لاکتات در بافت چربی اپیدیدیمال

برای اندازه‌گیری غلظت NOx<sup>iii</sup> از روش رنگ سنجی گریس<sup>iv</sup> در میکروپلیت استفاده شد.<sup>۳۸</sup> در این روش، ابتدا به منظور پروتئین‌زدایی، سولفات روی (۱۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر) به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند.<sup>۳۹</sup> از محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک میکروپلیت منتقل و به آن ۱۰۰ میکرولیتر وانادیوم III کلرید (۸ میلی‌گرم بر میلی-لیتر در کلریدریک اسید ۱ مولار) اضافه شد تا نیترات به نیتریت احیاء شود. سپس ۵۰ میکرولیتر سولفانامید (۲ درصد در کلریدریک اسید ۵ درصد) و ۵۰ میکرولیتر NEDD<sup>v</sup> (۰/۱ درصد در آب مقطر) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. جذب نوری نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (بیوتک<sup>vi</sup>، آمریکا)، خوانده شد. غلظت NOx در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده از نیترات (۰ تا ۱۰۰ میکرومولار) محاسبه شد. ضریب تغییرات درون آزمونی ۲/۱ درصد و ضریب تغییرات برون آزمونی ۲/۲ درصد بود.

#### اندازه‌گیری پروتئین‌های eNOS، iNOS و آرژیناز در بافت چربی اپیدیدیمال

اندازه‌گیری پروتئین‌های eNOS، iNOS و آرژیناز در بافت چربی اپیدیدیمال با استفاده از کیت‌های الایزا شرکت ZellBio انجام شد. بافت چربی اپیدیدیمال در بافر فسفات سرد (۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۷/۴) حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز با نسبت وزنی-حجمی ۱ به ۲ هوموژن گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول رویی جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. حساسیت کیت‌ها برای eNOS، iNOS و آرژیناز به ترتیب ۰/۲، ۰/۲ و ۰/۷۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. مقادیر پروتئین‌های eNOS، iNOS و آرژیناز در بافت چربی اپیدیدیمال برحسب نانومول به

انتخاب و دستور Sort → Data اجرا شد تا ستون B براساس ستون C مرتب گردد. به این ترتیب، حیوانات در دو گروه قرار گرفتند. گروه T2D+HOX به مدت ۵ هفته اکسیژن ۹۵ درصد دریافت کردند و گروه T2D به همان شکل در معرض اکسیژن هوا (۲۱ درصد) قرار گرفتند. در پایان مطالعه، موش‌ها با پنتوباربیتال سدیم<sup>i</sup> (۴۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) بیهوش شدند و پس از گرفتن نمونه خون برای اندازه‌گیری غلظت گلوکز خون، قفسه سینه باز شد. سرم فیزیولوژی از طریق بطن چپ قلب پرفیوژ (مشروب) شد و درناژ (تخلیه) از دهلیز راست انجام شد و بعد از آن بافت چربی اپیدیدیمال جدا شد. غلظت گلوکز سرم با روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (ایران، تهران) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییرات درون و برون آزمونی به ترتیب ۲/۱ درصد و ۶/۴ درصد بود.

#### القای دیابت نوع ۲

به منظور ایجاد T2D، حیوانات به مدت سه هفته رژیم غذایی پر چرب دریافت کردند و سپس استرپتوزوتوسین<sup>ii</sup> (STZ) با مقدار کم (۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد.<sup>۴۰</sup> در رژیم غذایی پرچرب، ۵۸/۸ درصد کالری دریافتی از چربی، ۲۷ درصد از کربوهیدرات و ۱۴/۲ درصد از پروتئین بود.<sup>۳۶</sup> جزئیات تهیه غذای پر چرب پیشتر گزارش شده است.<sup>۳۷</sup> یک هفته پس از تزریق STZ، نمونه خون از دم حیوانات گرفته شد و حیواناتی که گلوکز سرم ناشتای بالاتر از ۱۵۰ میلی-گرم بر دسی‌لیتر داشتند، مبتلا به دیابت در نظر گرفته شدند. لاکتات با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (ایران، تهران) با روش لاکتات دهیدروژناز اندازه‌گیری شد.

#### تجویز اکسیژن

برای تجویز اکسیژن از محفظه هیپوکسی/هیپراکسی استفاده شد که توسط محققین طراحی و ساخته شده است.<sup>۱۸</sup> (شماره ثبت اختراع: ۸۹۶۷۹، تاریخ ثبت: ۱۳۹۵/۱/۲۴). این محفظه گنجایش ۳ قفس نگه‌داری موش صحرایی (طول قفس=۳۵ سانتی‌متر، عرض=۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع=۱۴ سانتی‌متر) را دارد، به کپسول‌های اکسیژن و نیترژن متصل است و می‌تواند میزان اکسیژن را بین ۱ تا ۹۹ درصد تنظیم کند. حیوانات گروه T2D+HOX به مدت ۵ هفته، در تمام

iii-Nitric Oxide Metabolites

iv-Griess

v-N-ethylenediamine Dihydrochloride

vi-Biotek

i-Pentobarbital Sodium

ii-Streptozotocin

ازای هر میلی‌گرم پروتئین بافت بیان شد. غلظت پروتئین در بافت با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد.<sup>۴۰</sup>

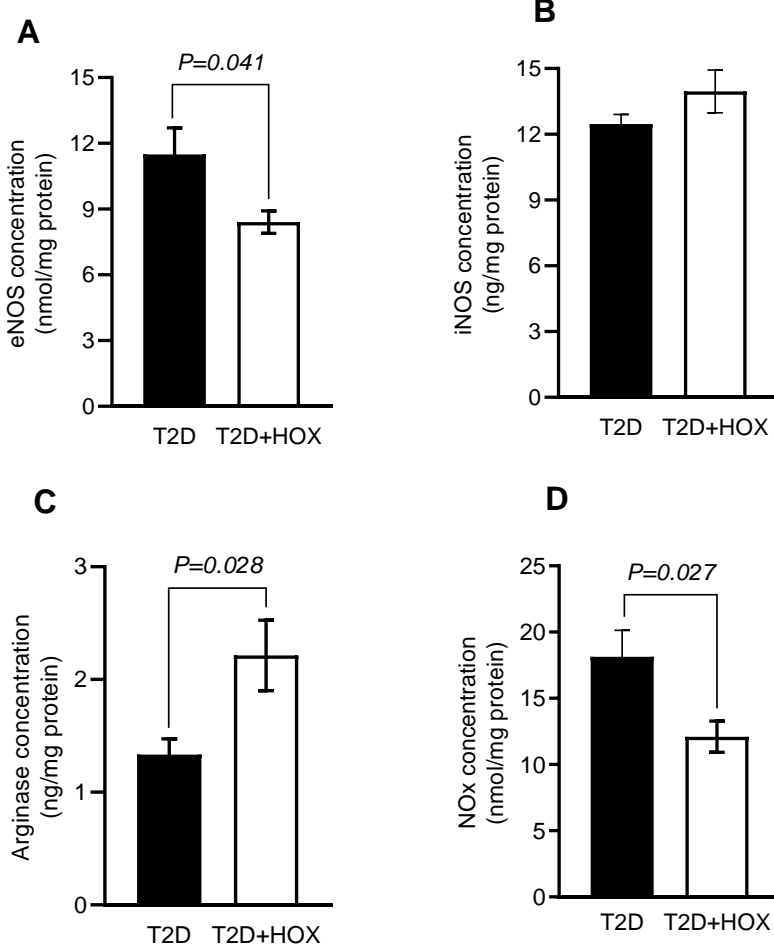
**تجزیه و تحلیل آماری**

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار گراف‌پد پریم نسخه ۸ انجام شد. مقادیر به شکل میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین گزارش شده‌اند. برای مقایسه پروتئین‌های eNOS، iNOS و آرژیناز و همچنین سطح NOx در بافت چربی اپیدیدیمال بین گروه‌های دیابتی و دیابتی درمان شده با اکسیژن، از آزمون تی مستقل استفاده شد و مقادیر P دو دامنه کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

## یافته‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ (A تا D) نشان داده شده است، هیپراکسی سبب کاهش معنی‌دار سطح پروتئین eNOS ( $11.1 \pm 0.2$ ) در مقابل  $18.4 \pm 1.3$  نانوگرم به ازای میلی‌گرم پروتئین و NOx ( $18.2 \pm 1.0$ ) در مقابل  $12.1 \pm 1.2$  نانومول به ازای میلی‌گرم پروتئین) در بافت چربی اپیدیدیمال موش‌های صحرایی درمان شده با اکسیژن گردید. هیپراکسی همچنین سطح پروتئین آرژیناز را به طور معنی‌داری افزایش داد ( $1.3 \pm 0.14$ ) در مقابل  $2.2 \pm 0.31$  نانوگرم به ازای میلی‌گرم پروتئین) اما اثری بر سطح پروتئین iNOS نداشت.

قند خون ناشتا در موش‌های مبتلا به دیابت قبل از مداخله با اکسیژن در گروه دیابتی درمان نشده ( $172.3 \pm 32.2$ ) میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و دیابتی درمان شده با اکسیژن



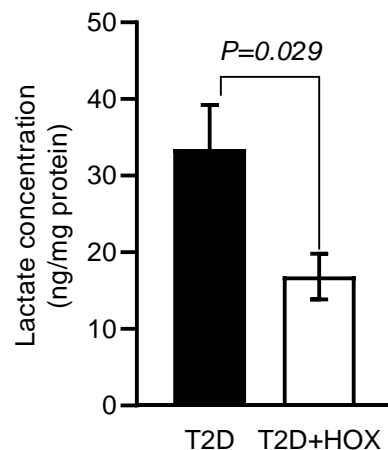
شکل ۱- اثر درمان با اکسیژن ۹۵ درصد (هیپراکسی، HOX) بر سطح پروتئین‌های eNOS (A)، iNOS (B)، آرژیناز (C) و سطح NOx (D) در بافت چربی اپیدیدیمال در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ (T2D).

eNOS, endothelial nitric oxide synthase; HOX, hyperoxia; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NOx, nitric oxide metabolites; T2D, type 2 diabetes.

اکسیژن است و یافته‌ای مورد انتظار است. در همین راستا، نشان داده شده است که ۲۴ ساعت مواجهه با اکسیژن ۹۵ درصد در آدیپوسیت‌های 3T3-L1 منجر به کاهش ۵۰ درصدی رهائش لاکتات شده است.<sup>۴۳</sup> یافته مشابهی در عضلات اسکلتی انسان طی ورزش و استنشاق اکسیژن ۶۰ درصد گزارش شده است.<sup>۴۴</sup> کاهش میزان لاکتات خون به دنبال درمان با هیپراکسی سبب کاهش مقاومت به انسولین می‌شود که در کاهش قند خون نقش دارد.<sup>۱۸</sup>

در این مطالعه، تیمار موش‌های صحرایی مبتلا به T2D با اکسیژن ۹۵ درصد، سبب کاهش سطح پروتئین eNOS در بافت چربی اپیدیدیمال گردید اما اثری بر iNOS نداشت. تاکنون مطالعه‌ای که اثر هیپراکسی بر شاخص‌های مرتبط با متابولیسم NO در بافت چربی را بررسی کند گزارش نشده است. نتایج این مطالعه در مورد عدم تأثیر هیپراکسی بر بیان iNOS هم‌راستا با مطالعات انجام شده در ریه<sup>۴۵،۴۶</sup> و کبد<sup>۴۷</sup> است اما در مورد eNOS نتایج مطالعات متناقض است. به طوری که گزارش شده است؛ هیپراکسی سبب کاهش فعالیت eNOS در بافت ریه،<sup>۴۵</sup> عدم تغییر بیان eNOS در کبد<sup>۴۷</sup> و شبکیه<sup>۴۸</sup> و افزایش بیان پروتئین eNOS<sup>۴۹،۵۰</sup> در ریه می‌گردد. زمانی که موش‌های سوری برای مدت ۵ روز با اکسیژن ۹۵ درصد مواجه شدند، فعالیت eNOS در بافت ریه آن‌ها کاهش یافت اما فعالیت و بیان ژن iNOS تغییری نداشت.<sup>۵۰</sup> از طرف دیگر، مواجهه با اکسیژن ۹۵ درصد به مدت ۹۶ ساعت در موش‌های سوری، اثری بر بیان پروتئین eNOS و iNOS در کبد نداشت.<sup>۴۷</sup> در موش‌های سوری نوزاد که در روزهای ۷ تا ۱۲ بعد از تولد در معرض هیپراکسی (اکسیژن ۷۵ درصد) قرار گرفتند، فعالیت آنزیم NOS در شبکیه کمتر از گروه شاهد بود اما بر خلاف مطالعه ما، سطح پروتئین eNOS تغییری نشان نداد.<sup>۴۸</sup> مواجهه ۸ روزه با اکسیژن ۹۵ درصد در موش‌های صحرایی در روزهای ۲۱ تا ۲۹ بعد از تولد سبب افزایش بیان پروتئین eNOS در بافت ریه به میزان ۲ برابر شد.<sup>۴۹</sup> مواجهه سلول‌های اندوتلیال شریان ریوی در گوسفند، با اکسیژن با فشار ۱۵۰ میلی‌متر جیوه به مدت ۴۸ ساعت، سبب افزایش ۲/۷ برابری در بیان پروتئین eNOS شد.<sup>۵۰</sup> یک سازوکار پیشنهادی برای کاهش پروتئین eNOS در هیپراکسی می‌تواند افزایش استرس اکسیداتیو باشد که در موش‌های مبتلا به T2D<sup>۲۰</sup> و آدیپوسیت‌های 3T3-L1<sup>۴۳</sup> گزارش شده است و می‌تواند سبب تخریب پروتئین‌ها گردد.<sup>۵۱</sup>

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، هیپراکسی همچنین سبب کاهش ۵۰ درصدی سطح لاکتات در بافت چربی اپیدیدیمال در موش‌های مبتلا به دیابت شد (۳۳/۵±۵/۸) در مقابل ۱۶/۹±۳ نانوگرم به ازای میلی‌گرم پروتئین) که نشان دهنده کاهش متابولیسم بی‌هوازی در این بافت است.



شکل ۲- اثر درمان با اکسیژن ۹۵ درصد (هیپراکسی، HOX) بر سطح لاکتات در بافت چربی اپیدیدیمال در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ (T2D).

HOX, hyperoxia; T2D, type 2 diabetes.

## بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که درمان با اکسیژن ۹۵ درصد؛ سبب کاهش میزان پروتئین eNOS، کاهش سطح NOx و افزایش میزان پروتئین آرژیناز در بافت چربی اپیدیدیمال در موش‌های صحرایی مبتلا به T2D گردید که مؤید کاهش فراهم زیستی NO در این بافت می‌باشد. طبق نتایج این مطالعه، ۵ هفته درمان با اکسیژن ۹۵ درصد سبب کاهش ۲۸ درصدی قند خون ناشتا در موش‌های مبتلا به T2D شد که هم‌راستا با نتایج قبلی در مطالعات حیوانی<sup>۱۸،۱۹</sup> و انسانی<sup>۲۰،۴۱،۴۲</sup> است. هیپراکسی از طریق افزایش حساسیت به انسولین، قهوه‌ای کردن بافت چربی و کاهش وزن سبب کاهش قند خون در موش‌های مبتلا به T2D می‌گردد.<sup>۱۸</sup> ما پیشتر گزارش کردیم که ۵ هفته درمان با اکسیژن ۹۵ درصد در موش‌های مبتلا به T2D، سبب کاهش حدود ۲۰ درصدی وزن‌گیری در مقایسه با موش‌های دیابتی درمان نشده می‌گردد.<sup>۱۸</sup> همچنین در مطالعه حاضر، هیپراکسی سبب کاهش ۵۰ درصدی سطح لاکتات در بافت چربی اپیدیدیمال شد که نشان‌دهنده کاهش متابولیسم بی‌هوازی به دنبال تجویز

است که مهار آرژیناز در موش‌های صحرایی مبتلا به T2D سبب افزایش حسایت به انسولین می‌شود<sup>۴۸</sup> و در مبتلایان به T2D عملکرد اندوتلیوم را بهبود می‌بخشد.<sup>۴۹</sup>

از نقاط قوت این مطالعه می‌توان به مدل T2D اشاره کرد که در آن رژیم پر چرب سبب ایجاد مقاومت به انسولین و مقدار اندکی از STZ سبب تخریب نسبی سلول‌های بتای پانکراس می‌گردد و از این نظر شباهت زیادی به پاتوفیزیولوژی T2D در انسان دارد.<sup>۳۷</sup> همچنین مدت اعمال هیپراکسی در این مطالعه (۵ هفته) در مقایسه با دیگر مطالعات در این زمینه (۱ تا ۸ روز<sup>۴۰-۴۲</sup>) طولانی‌تر بود. یکی از نقاط ضعف این مطالعه این است که فقط موش‌های نر بررسی شده‌اند در حالی که توصیه می‌شود در مطالعات حیوانی هر دو جنس مورد بررسی قرار گیرند.<sup>۴۹،۶۰</sup>

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که هیپراکسی اگر چه سبب کاهش گلوکز خون در موش‌های صحرایی مبتلا به T2D می‌گردد اما یکی از عوارض آن در بافت چربی احشایی کاهش فراهم زیستی NO است که با کاهش پروتئین eNOS و افزایش پروتئین آرژیناز مرتبط است. با توجه به این که NO مشتق از eNOS در تنظیم اندازه آدیپوسیت‌ها و متابولیسم انرژی در بافت چربی نقش دارد،<sup>۲۸</sup> کاهش بیان eNOS به دنبال هیپراکسی حائز اهمیت است. ممکن است استفاده توأم از هیپراکسی در کنار نیترات، آن‌طور که پیشتر برای مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از هیپراکسی به کار گرفته شده است،<sup>۳۰</sup> روشی برای پیشگیری از کاهش فراهم زیستی NO به دنبال هیپراکسی باشد.

سپاس‌گزاری: نویسندگان مقاله 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 منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

i-Glycosylated Hemoglobin

در این مطالعه، اکسیژن ۹۵ درصد سبب افزایش میزان پروتئین آرژیناز و کاهش سطح NOx و در بافت چربی اپیدیدیمال موش‌های صحرایی مبتلا به T2D گردید. هم‌راستا با این یافته‌ها، نشان داده شده است که مواجهه با اکسیژن ۹۵ درصد به مدت ۹۶ ساعت در موش‌های سوری سبب افزایش سه برابری بیان پروتئین آرژیناز در کبد، افزایش ۵۰ درصدی غلظت اورنیتین در کبد و کاهش ۴۳ درصدی سطح NOx کبدی گردید.<sup>۴۷</sup> همچنین در مطالعه‌ای که موش‌های صحرایی به مدت ۶۰ ساعت در معرض اکسیژن ۱۰۰ درصد قرار گرفتند، بیان پروتئین آرژیناز افزایش یافت و میزان NOx ریه کاهش حدود ۶۵ درصدی را نشان داد.<sup>۴۶</sup> با توجه به این که eNOS منبع اصلی تولید NO در بافت چربی است،<sup>۲۸</sup> کاهش NOx مشاهده شده در این مطالعه با کاهش میزان پروتئین eNOS در بافت چربی اپیدیدیمال موش‌های صحرایی دیابتی تطابق دارد. از طرف دیگر افزایش استرس اکسیداتیو به دنبال هیپراکسی می‌تواند سبب افزایش تخریب NO و کاهش سطح NOx گردد.<sup>۵۲</sup> همچنین در این مطالعه نشان داده شده که هیپراکسی سبب افزایش ۶۶ درصدی بیان پروتئین آرژیناز (تبدیل‌کننده ال-آرژنین به اوره و ال-اورنیتین) در بافت چربی موش‌های مبتلا به دیابت گردید. ال-آرژنین به عنوان سوستر برای هردو آنزیم NOS و آرژیناز عمل می‌کند؛  $K_m$  آرژیناز برای ال-آرژنین حدود ۱۰۰۰ برابر  $K_m$  آنزیم NOS برای ال-آرژنین است اما  $V_{max}$  آرژیناز بیش از ۱۰۰۰ برابر  $V_{max}$  آنزیم NOS است؛ یعنی افزایش فعالیت آرژیناز می‌تواند در دسترس بودن ال-آرژنین برای NOS را محدود کند.<sup>۳۰-۳۵</sup> بنابراین افزایش میزان آرژیناز نیز می‌تواند در کاهش NOx در بافت چربی مشارکت داشته باشد که مشابه آن پیشتر برای کبد گزارش شده است.<sup>۴۷</sup> افزایش بیان و فعالیت آرژیناز می‌تواند با کاهش تولید NO سبب نقص عملکرد اندوتلیوم گردد.<sup>۵۶</sup> سطح آرژیناز پلاسما در بیماران مبتلا به T2D حدود ۵۰ درصد بالاتر از افراد سالم است؛ فعالیت آرژیناز پلاسما همبستگی مثبت با قند خون ناشتا و هموگلوبین گلیکوزیله دارد.<sup>۵۷</sup> نشان داده شده

## References

1. Zimmet PZ. Diabetes and its drivers: the largest epidemic in human history? *Clinical diabetes and endocrinology* 2017; 3: 1-9.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021. Available from: URL: <http://www.diabetesatlas.org>
3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis

- of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1513-30.
4. Ghasemi A, Kashfi K. Pathophysiology of type 2 diabetes: A general overview of glucose and insulin homeostasis. In: Ghasemi A, Kashfi K, Bahadoran Z, editors. *The role of nitric oxide in type 2 diabetes*. 1 ed: Bentham Science Publisher; 2022. p. 1-22.
  5. Ghasemi A, Norouzirad R. Type 2 Diabetes: An Updated Overview. *Crit Rev Oncog* 2019; 24: 213-22.
  6. Norouzirad R, Gonzalez-Muniesa P, Ghasemi A. Hypoxia in Obesity and Diabetes: Potential Therapeutic Effects of Hyperoxia and Nitrate. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 5350267.
  7. Xi L, Chow CM, Kong X. Role of Tissue and Systemic Hypoxia in Obesity and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 1527852.
  8. Choudhury R. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: a review. *Int J Gen Med* 2018; 11: 431-42.
  9. Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, Young T. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1590-5.
  10. Muraki I, Tanigawa T, Yamagishi K, Sakurai S, Ohira T, Imano H, et al. Nocturnal intermittent hypoxia and the development of type 2 diabetes: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Diabetologia* 2010; 53: 481-8.
  11. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J obes* 2009; 33: 54-66.
  12. Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E333-42.
  13. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 451-63.
  14. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007; 56: 901-11.
  15. West DB, Prinz WA, Francendese AA, Greenwood MR. Adipocyte blood flow is decreased in obese Zucker rats. *The Am J Physiol* 1987; 253: 228-33.
  16. Virtanen KA, Lonroth P, Parkkola R, Peltoniemi P, Asola M, Viljanen T, et al. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3902-10.
  17. Coppack SW, Fisher RM, Humphreys SM, Clark ML, Pointon JJ, Frayn KN. Carbohydrate metabolism in insulin resistance: glucose uptake and lactate production by adipose and forearm tissues in vivo before and after a mixed meal. *Clin Sci (London)* 1996; 90: 409-15.
  18. Norouzirad R, Ghanbari M, Bahadoran Z, Abdollahifar MA, Rasouli N, Ghasemi A. Hyperoxia improves carbohydrate metabolism by browning of white adipocytes in obese type 2 diabetic rats. *Life Sci* 2019; 220: 58-68.
  19. Fujita N, Nagatomo F, Murakami S, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. Effects of hyperbaric oxygen on metabolic capacity of the skeletal muscle in type 2 diabetic rats with obesity. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 637978.
  20. Karadurmus N, Sahin M, Tasci C, Naharci I, Ozturk C, Ilbasimis S, et al. Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycaemic control in patients with diabetic foot. *Endokrynol Pol* 2010; 61: 275-9.
  21. Hickok JR, Vasudevan D, Jablonski K, Thomas DD. Oxygen dependence of nitric oxide-mediated signaling. *Redox Biol* 2013; 1: 203-9.
  22. Thomas DD. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biol* 2015; 5: 225-33.
  23. Ghasemi A. Quantitative aspects of nitric oxide production from nitrate and nitrite. *EXCLI J* 2022; 21: 470-486.
  24. Bahadoran Z, Mirmiran P, Kashfi K, Ghasemi A. Endogenous flux of nitric oxide: Citrulline is preferred to Arginine. *Acta Physiol (Oxf)* 2021; 231: e13572.
  25. Modun D, Krnic M, Vukovic J, Kokic V, Kukoc-Modun L, Tsikas D, et al. Plasma nitrite concentration decreases after hyperoxia-induced oxidative stress in healthy humans. *Clin Physiol Funct Imaging* 2012; 32: 404-8.
  26. Ghasemi A, Jeddi S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. *Nitric oxide* 2017; 70: 9-24.
  27. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2014; 73: 383-99.
  28. Bahadoran Z, Mirmiran P, Ghasemi A. Adipose organ dysfunction and type 2 diabetes: Role of nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 2024; 221: 116043.
  29. Börgeson E, Boucher J, Hagberg CE. Of mice and men: Pinpointing species differences in adipose tissue biology. *Front Cell Dev Biol* 2022; 10: 1003118.
  30. Norouzirad R, Gholami H, Ghanbari M, Hedayati M, Gonzalez-Muniesa P, Jeddi S, et al. Dietary inorganic nitrate attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in obese type 2 diabetic male rats. *Life Sci* 2019; 230: 188-96.
  31. Ahmadi-Noorbakhsh S, Mirabzadeh Ardakani E, Sadighi J, Aldavood SJ, Farajli Abbasi M, Farzad-Mohajeri S, et al. Guideline for the care and use of laboratory animals in Iran. *Lab Anim* 2021; 50: 303-5.
  32. Bagheripour F, Ghasemi A. Ethical Principles for Using Laboratory Rat in Scientific Researches. *Ethics in Science and Technology* 2019; 14: 8-15 [Farsi]
  33. Bagheripour F, Jeddi S, Kashfi K, Ghasemi A. Anti-obesity and anti-diabetic effects of L-citrulline are sex-dependent. *Life Sci* 2024; 339: 122432.
  34. 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.
  35. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: A practical guide. *EXCLI J* 2023; 22: 274-94.
  36. 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.
  37. 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.
  38. Ghasemi A, Hedayati M, Khoshbaten A. Evaluation of a simple and rapid method for serum nitric oxide determination using microplate. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2005; 7: 433-9. [Farsi]
  39. Ghasemi A, Hedayati M, Biabani H. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay. *JMSR* 2007; 2: 43-6.
  40. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

41. Xu Q, Wei YT, Fan SB, Wang L, Zhou XP. Repetitive hyperbaric oxygen treatment increases insulin sensitivity in diabetes patients with acute intracerebral hemorrhage. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2017; 13: 421-6.
42. Al-Waili NS, Butler GJ, Beale J, Abdullah MS, Finkelstein M, Merrow M, et al. Influences of hyperbaric oxygen on blood pressure, heart rate and blood glucose levels in patients with diabetes mellitus and hypertension. *Arch Med Res* 2006; 37: 991-7.
43. Quintero P, González-Muniesa P, García-Díaz DF, Martínez JA. Effects of hyperoxia exposure on metabolic markers and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Physiol Biochem* 2012; 68: 663-9.
44. Stellingwerff T, Leblanc PJ, Hollidge MG, Heigenhauser GJ, Spriet LL. Hyperoxia decreases muscle glycogenolysis, lactate production, and lactate efflux during steady-state exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E1180-90.
45. Arkovitz MS, Szabó C, Garcia VF, Wong HR, Wispé JR. Differential effects of hyperoxia on the inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the lung. *Shock (Augusta, Ga)* 1997; 7: 345-50.
46. Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YC. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol* 1998; 275: L96-102.
47. Malleke DT, Rogers LK, Velluci SM, Young TL, Park MS, Long DW, et al. Hyperoxia increases hepatic arginase expression and ornithine production in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 215: 109-17.
48. Edgar KS, Matesanz N, Gardiner TA, Katusic ZS, McDonald DM. Hyperoxia depletes (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin levels in the neonatal retina: implications for nitric oxide synthase function in retinopathy. *Am J Pathol* 2015; 185: 1769-82.
49. Potter CF, Kuo NT, Farver CF, McMahan JT, Chang CH, Agani FH, et al. Effects of hyperoxia on nitric oxide synthase expression, nitric oxide activity, and lung injury in rat pups. *Pediatr Res* 1999; 45: 8-13.
50. North AJ, Lau KS, Brannon TS, Wu LC, Wells LB, German Z, et al. Oxygen upregulates nitric oxide synthase gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 270: L643-9.
51. Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10: R110.006924.
52. Bohlen HG. Nitric oxide and the cardiovascular system. *Compr Physiol* 2015; 5: 808-23.
53. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33: 829-37, 37a-37d.
54. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336: 1-17.
55. Ghasemi A, Mehrazin F, Zahediasl S. Effect of nitrate and L-arginine therapy on nitric oxide levels in serum, heart, and aorta of fetal hypothyroid rats. *J Physiol Biochem* 2013; 69: 751-9.
56. Shemyakin A, Kövamees O, Rafnsson A, Böhm F, Svanarud P, Settergren M, et al. Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2012; 126: 2943-50.
57. Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2008; 31: 134-9.
58. Peyton KJ, Liu XM, Shebib AR, Johnson FK, Johnson RA, Durante W. Arginase inhibition prevents the development of hypertension and improves insulin resistance in obese rats. *Amino Acids* 2018; 50: 747-54.
59. Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* 2014; 509: 282-3.
60. McCullough LD, de Vries GJ, Miller VM, Becker JB, Sandberg K, McCarthy MM. NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: generative questions to guide policy, implementation, and metrics. *Biol Sex Differ* 2014; 5: 15-24.



Original Article

## Effect of Hyperoxia on Nitric Oxide Bioavailability in Epididymal Adipose Tissue of Male Type 2 Diabetic Rats

Ghasemi A<sup>1</sup> , Jeddi S<sup>1</sup> , Norouzirad R<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>2</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, I.R. Iran.

e-mail: [norouzirad@gmail.com](mailto:norouzirad@gmail.com)

Received: 12/08/2024 Accepted: 16/09/2024

### Abstract

**Introduction:** Hypoxia, particularly in adipose tissue, is involved in the pathophysiology of type 2 diabetes. Hyperoxia, oxygen administration, has been proposed as a potential treatment for this condition. However, one complication associated with hyperoxia is the decreased bioavailability of nitric oxide (NO). This study investigates the effect of hyperoxia on NO-producing enzymes (NO synthase, NOS) and the L-arginine-degrading enzyme (arginase) in epididymal adipose tissue of type 2 diabetic rats. **Material and Methods:** Type 2 diabetes was induced in 12 male rats using a high-fat diet combined with a low dose of streptozotocin. The rats were then divided into two groups: hyperoxia (received 95% oxygen for five weeks) and control group exposed to air containing 21% oxygen). After five weeks, the animals were anesthetized, and epididymal adipose tissue was isolated. Protein levels of endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS), and arginase, as well as concentrations of nitric oxide metabolites (NOx) and lactate, were measured. **Results:** Hyperoxia resulted in a 28% reduction in fasting serum glucose, decreased lactate concentration, decreased eNOS protein levels ( $11.1 \pm 5.2$  vs.  $8.4 \pm 1.3$  ng/mg protein,  $P=0.041$ ), decreased NOx levels ( $18.2 \pm 1.0$  vs.  $12.1 \pm 1.2$  nmol/mg protein,  $P=0.027$ ), and increased arginase protein levels ( $1.3 \pm 0.14$  vs.  $2.2 \pm 0.31$  ng/ mg protein,  $P=0.028$ ) in adipose tissue. **Conclusion:** Hyperoxia reduced fasting serum glucose in type 2 diabetic rats but simultaneously decreased NO bioavailability in visceral adipose tissue, which associated with reduced eNOS protein and increased arginase protein levels.

**Keywords:** Type 2 diabetes, Nitric oxide, Visceral fat, Arginase, Hyperoxia, Rat