مجله پلاسما و نشانگرهای زیستی
شماره پیاپی ۶۶، دوره ۱۷، شماره ۲،بهار ۱۴۰۳، صفحه ۸۰ تا ۹۳
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی میزان و فعالیت سیرتوئین در رتهای دیابتی شده وتحت محدودیت کالری و اثر نیتریک اکساید بر آن

صفر محسنی بندپی[۱]، نازنین نظری[۲]

۱-استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران. نویسنده مسئول : smbmohseni@gmail.com
۲-دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی ، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۰۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۷

چکیده

زمینه و هدف : سیرتوئین‌ها، پروتئین‌های رده ۳ یک خانواده از آنزیم‌های هیستون داستیلاز هستند که هیدرولیز انتهای استیله هیستون را کاتالیز کرده، موجب تغییر شکل کروماتین، ایجاد هتروکروماتین و در نتیجه مهار رونویسی شده و در پیری و سرطان نقش دارد. سیرتوئین فرایندهای مهم سلولی نظیر آپوپتوز، پیری سلول و متابولیسم را تنظیم می‌کند. بنابراین سیرتوئین می‌تواند یک هدف درمانی جدید برای دیابت باشد. همچنین سیرتوئین بعنوان پروتئین تنظیم‌کننده طول عمر شناخته شده است. در مطالعه حاضر اثر نیتریک اکساید بر فعالیت سیرتوئین در رت‌های دیابتی و تحت محدودیت کالری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها : حیوانات مورد استفاده در پژوهش حاضر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ گرم بودند که به ۵ گروه کنترل (C)، تحت محدودیت کالری (CR)، دیابتی شده (D)، ال-آرژنین و گروه L-Name تقسیم شدند و هر گروه شامل ده حیوان بوده است. برای دیابتی کردن به هر حیوان، استرپتوزوسین با دوز ۵۰ mg/kg به روش درون‌صفاقی تزریق گردید. گروه دریافت کننده L-Name (مهارکننده NO)، با دوز ۱۰ mg/kg آنرا بصورت تزریق درون حفره شکمی دریافت کردند. گروه ال-آرژنین (پیش‌ساز نیتریک‌اکساید) نیز، دوز ۵۰ mg/kg از آنرا بصورت تزریق درون حفره صفاقی دریافت کردند. گروه محدودیت کالری به مدت ۴ هفته تحت رژیم کم کالری قرار گرفتند. پس از طی دوره‌ی ۴ هفته‌ای، حیوانات تحت بیهوشی قرارگرفته و خون-گیری بطور مستقیم از قلب آنها بعمل آمد. میزان سیرتوئین بوسیله کیت مربوطه و با دستگاه الایزاریدر سنجیده شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار spss تجزیه و تحلیل شد.

نتایج : میزان سیرتوئین سرم در گروه ال-آرژنین ($P<0.05$) و CR ($P<0.01$) بطور معنی‌داری افزایش یافت در حالیکه در گروه دیابت کاهش معنی‌دار نشان داد ($P<0.001$). همچنین میزان کاهش سیرتوئین در گروه L-Name معنادار نبود.

نتیجه گیری : نتایج نشان داد که ال- آرژنین بعنوان پیش‌ساز نیتریک‌اکساید باعث افزایش میزان سیرتوئین در رت‌های دیابتی و تحت محدودیت کالری می‌گردد.

کلمات کلیدی: نیتریک‌اکساید، دیابت، محدودیت‌کالری، سیرتوئین

مقدمه

نیتریک‌اکساید (Nitric Oxide(NO)) یک مولکول دو اتمی ساده با اثرات بیولوژیکی بسیار وسیع می‌باشد. در بدن انسان و سایر پستانداران سلول‌های زیادی توانایی سنتز NO را دارند. این عمل به وسیله آنزیم‌های نیتریک‌اکساید سنتتاز(Nitric Oxide Synthase (NOS)) از تبدیل ال-آرژنین در حضور اکسیژن و ترکیبی به نام(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate(NADPH))صورت می‌گیرد (۱).

نیتریک‌اکساید به عنوان یک پیامبر داخل‌سلولی و بین-سلولی دارای نقش حیاتی در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک بدن از جمله رشد سلولی، آپوپتوز، تنظیم تونیسیته عروق، مکانیسم دفاعی بدن، قدرت انقباضی و تعداد ضربان قلب، تونوس برونش‌ها و یادگیری و حافظه می‌باشد. NO مولکول رادیکال آزادی است که از آندوتلیوم عروق در پاسخ به تحریک فیزیولوژیکی و مکانیکی رها می‌شود. NO پس از تولید و انتشار بر ماهیچه‌های صاف جدار رگ‌ها تاثیر می-گذارد و موجب شل شدن آنها می‌شود، در سلول‌های ماهیچه صاف جدار رگ‌ها، در حضور اکسیژن به نیترات و نیتریت تبدیل شده و به جریان خون می‌ریزد و به عنوان یک ماده واسطه‌ای مهم در انواع اعمال فیزیولوژیک مانند تنظیم فشار خون و گشادکننده رگ‌ها مورد توجه فراوان قرار گرفته (۲).

NO نقشی محوری در هموستازی عروقی ایفا می‌کند و این عمل را از طریق مهار تکثیر غیرطبیعی سلول‌های عضلات صاف عروق، به دنبال بعضی شرایط بیماری نظیر آترواسکلروزیس انجام می‌دهد. این ماده در تنظیم اعمال گوناگونی نظیر: کنترل هموستازی، تجزیه فیبرین، واکنش گلبول های سفید و پلاکت‌ها با دیواره سرخرگ‌ها، عرضه آنتی‌ژن، تنظیم رشد و تون عروقی و فشار خون دخالت دارد.

از نظر تکنیکی بعضی از عوامل خطر بیماری کرونر قلب نظیر افزایش کلسترول خون، استفاده سیگار، دیابت، افزایش هموسیستئین، که با اختلال عملکرد آندوتلیوم در ارتباط است با کاهش دسترسی زیستی NO همراه است. بطوریکه مشخص شده اختلال در مسیرهای وابسته به NOS یکی از اولین حوادثی است که در آترواسکلروزیس رخ می‌دهد و عواملی که باعث افزایش NO می‌شوند در درمان بیماری-های مربوط به آترواسکلروزیس بسیار مناسب هستند(۳).

مکانیسم‌های فیزیولوژیکی که گردش خون مغزی را تنظیم می‌کند به شکلی آرایش یافتند که علی‌رغم شرایط داخلی و خارجی متغییر باعث ثبات (Cerebral blood flow (CBF)و متابولیسم مغزی (CMRO2) Cerebral metabolic rate of O2)، می‌شود. این عمل ممکن است حتی به هزینه جریان خون ناکافی به اندام‌های دیگر نیز تمام شود(۴).

به طور عمده NOS به عنوان یک سیستم تولیدکننده NO با چرخه گوانیلات‌سیکلاز محلول (sGC) و گوانوزین-مونوفسفات (cGMP) باعث شل شدن عضلات در عروق بزرگ می‌گردد و سیستم تولید سوپراکسید از طریق نسبت H2O2/EDH در عروق کوچک می‌گردد(۳).

عقیده بر این است که گلبول‌های قرمز، *NO مشتق از آندوتلیوم را از طریق واکنش سریع با اکسی هموگلوبین جذب و غیرفعال می‌کند تا مت هموگلوبین و نیترات* شکل داده و به این ترتیب دسترسی به NO را جهت اتساع عروق کاهش دهد(۵)

با توجه به افزایش امید به زندگی و پیر شدن جوامع، تمایل محققین به بررسی فرایند پیری و بیماری‌های وابسته به آن در نیم قرن گذشته و به ویژه دو دهه اخیر افزایش یافته است. این مطالعات عمدتاً بر روی اورگانیسم‌ها از جمله مخمرها، کرم‌ها، پرندگان و موش‌ها انجام شده است و

اطلاعات با ارزشی در رابطه با عوامل موثر بر طول عمر به ما داده است. بطوریکه مشخص شده پروسه پیری می‌تواند به وسیله فاکتورهای مداخله کننده‌ی زیادی از جمله عوامل محیطی، ژنتیکی و دارویی تحت تاثیر قرار گیرد. یکی از عوامل محیطی که بطور خاص مورد توجه قرار گرفته رژیم غذایی می‌باشد. کنترل رژیم غذایی به عنوان یک فاکتور محیطی اصلی اثر عمیقی روی جنبه‌های متعددی از سلامتی ونیز پیری دارد. محدودیت کالری(CR) موثرترین دستکاری محیطی است که می‌تواند در گونه‌های متفاوت باعث افزایش طول عمر شود. در واقع اثر CR روی پیری اولین بار توسط McCay و همکارانش در مدل تجربی حیوانی نشان داده شد. McCay و همکارانش پی بردند که موش‌هایی که یک رژیم غذایی با کالری محدود مصرف می-کنند نسبت به گروه کنترل که رژیم معمول را دریافت می-کنند طول عمر طولانی‌تری دارند. محدودیت کالری یعنی کاهش مصرف ۲۰-۴۰٪ از کالری معمول روزانه در حالیکه دریافت سایر مواد مغذی کافی باشد. نشان داده شده که CR علاوه بر افزایش طول عمر در موش‌ها باعث به تعویق افتادن طیف وسیعی از بیماری‌های مرتبط با سن مانند سرطان، دیابت، آترواسکلروزیس، بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی و بیماری‌های اتوایمیون در پستانداران بالاتر مانند گونه‌های غیرانسانی و انسان‌ها می‌شود. از آنجا که همراه با افزایش سن بروز بیماری‌های مرتبط با آن که سهم اصلی در مرگ و میر را دارد نیز افزایش پیدا می‌کند ، بنابراین ممکن است CR با اثر مطلوب روی تمامی جنبه‌های سلامت انسان و مشکلات مربوط به فرایند پیری اثر بگذارد (۶).

افرادی که در زمینه‌ی اثر محدودیت کالری بر مرگ ومیر و طول عمر در جوندگان کوچک کار کرده‌اند پیشنهاد دادند که، میزانی از CR وجود دارد که به‌وسیله آن، هم میانگین طول عمر و هم حداکثر طول عمر افزایش پیدا می-کند. شروع کار CR در مراحل بالاتر زندگی اثرات قابل توجهی بر طول عمر دارد اما این افزایش طول عمر نسبت به اثر CR در زمانیکه از نوزادی شروع شده باشد کمتر است. و اگر CR خیلی دیر شروع شود، این اثر حتی می‌تواند منفی شود. با افزایش محدودیت کالری طول عمر به طور نامحدود ادامه نمی‌یابد. حداکثر تاثیر با محدودیت‌های ۶۰-۵۵ درصد ایجاد می‌شود (حیوان ۴۵-۴۰ درصد کالری پایه را دریافت می‌کند) اگر بیشتر از این نسبت محدود شوند یک اثر منفی بر طول عمر ایجاد می‌نماید. اینکه چرا یک گذر ناگهانی از مثبت به منفی در اثر کاهش جذب کالری بر طول عمر وجود دارد هنوز مشخص نشده است(۷).

بسیاری از مطالعات گزارش دادند که CR سطوح گردش IGF-1، انسولین (و گلوکز) را کاهش می‌دهد. کاهش IGF-1 و انسولین در مدت ۵ روز از شروع محدودیت کالری به سرعت القا شده وسپس با گذشت زمان بیشتر می‌شود. در رت‌های با محدودیت ۴۰٪ ، کاهش mRNA هورمون IGF-1 در کبد با کاهش وزن بدن مرتبط بود. در رت‌های گروه کنترل با میانگین سنی ۶-۱۲ ماه، IGF-1 پلاسما تا حدود ۲۰٪ کاهش یافت. این کاهش وابسته به سن در رت‌هایی با محدودیت ۴۰٪ حدود ۱۴٪-۲۵٪ پایین‌تر نیز مشاهده شد. پروتئین‌های متصل به IGF-1 نیز با افزایش سن به صورت متناسب با ان کاهش می‌یابد و این کاهش به وسیله CR؛ بیشتر می‌شود. در رت‌های نر ۱۲-۲۰ ماه CR در سطح۴۰٪ اثرات وابسته به سن در رسپتورهای عامل آزادکننده هورمون رشد هیپوفیزی و حساسیت آن را معکوس می‌کند. کاهش سیگنالینگ انسولین و IGF-1 که بوسیله‌ی CR ایجاد می‌شود احتمالاً با افزایش طول عمر توسط CR مرتبط می‌باشد(۸).

سیرتوئین‌ها، پروتئین‌های رده ۳ یک خانواده از آنزیم-های هیستون داستیلاز (HDACs) هستند که هیدرولیز انتهای استیله هیستون را کاتالیز کرده و موجب تغییر شکل

کروماتین، ایجاد هتروکروماتین و در نتیجه مهار رونویسی شده و در پیری و سرطان نقش دارند. ژن‌های خانواده سیرتوئین‌ها به میزان بالایی در طی تکامل حفاظت شده و از ارگانیسم‌های تک‌سلولی تا انسان‌ها وجود دارند. در پستانداران، ۷ نوع پروتئین سیرتوئین(SIRT1-7)، در رده ۳ هیستون داستیلازها وجود دارد که همولوگ sir2 موجود در مخمر بوده و در هسته، سیتوپلاسم و یا میتوکندری توزیع شده‌اند. ژن((sir2) Silent information regulator type 2) ، اولین بار در مخمر شناسایی شد و نام آن، به عملکردش بعنوان یک خاموش‌کننده اپی‌ژنتیکی کروماتین اشاره دارد. در مخمر، حذف sir2 طول عمر را کوتاه می‌کند. بجز سیرتوئین‌ها تمام اعضای دیگر کلاس‌های هیستون داستیلازها به عنصر روی به عنوان کوفاکتور نیاز دارند. حال آنکه SIRT1-7، به NAD وابسته می‌باشند. اگرچه در ابتدا سیرتوئین‌ها بعنوان هیستون داستیلاز شناخته شدند اما با گذشت زمان سوبستراهای غیرهیستونی بیشتر و بیشتری برای آن‌ها شناسایی شده‌اند. در واکنش داستیلاسیون کاتالیز شده توسط این آنزیم‌ها، یک گروه استیل از لیزین استیل برداشته شده و به قسمت ریبوز NAD منتقل می‌شود. بنابراین یک سوبسترای داستیله و O استیل –ADP- ریبوز (OAADPR)، تولید می‌گردد. سومین محصول واکنش یعنی نیکوتین‌آمید، بواسطه فیدبک منفی بعنوان مهارکننده فیزیولوژیکی سیرتوئین‌ها عمل می‌کند. همچنین خود OAADPR هم ممکن است بعنوان پیامبر ثانویه در سیگنالینگ سلولی نقش داشته باشد. علاوه بر این، سیرتوئین‌ها دارای فعالیت ADP- ریبوزیل ترانسفرازی نیز می‌باشند. گفته می‌شود که فعالیت این آنزیم، موجب مهار فعال‌کننده‌های رونویسی یا مهار مهار-کننده‌های رونویسی شده و از این طریق در حوادث سلولی مختلف مانند تنظیم بیان ژن، تنظیم انسولین، پایداری ژنومی میتوز، پاسخ‌های استرس، ترمیم DNA، آپوپتوز، چرخه‌ی سلولی و کنترل طول عمر نقش دارند. سیرتوئین ۱و۶و۷ درون هسته سلول، و بقیه در سیتوپلاسم و میتوکندری فعالیت می‌کند. سیرتوئین‌ها بطور گسترده به عنوان اهداف دارویی مهم مورد بررسی قرار گرفتند. برخی از مولکول‌های کوچک که می‌توانند فعالیت سیرتوئین را تعدیل کنند، پتانسیل درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند چاقی، دیابت، التهاب، سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و دیگر بیماری‌های مرتبط با پیری را دارد(۹).

سیرتوئین‌ها شامل یک هسته کاتالیتیکی با حدود ۲۷۵ آمینواسید می‌باشد که یک بسته کاتالیتیکی را شکل می-دهند و با گروه آسیل بخش لیزین هم‌خوانی دارد. یک شکاف فعال بین ناحیه چین بزرگ Rossman و ناحیه کوچک جفت شونده به Zn می‌تواند به آسانی به پپتید سوبسترا و کمک سوبسترا (co-substrate) به NAD متصل شده و یک شکاف باریکی را ایجاد می‌کند. بررسی ترادف در ساختار کریستالی سیرتوئین ۲و۳و۵ و ۶ نشان داد که بسته کاتالیتیک آنها با چندین بخش هیدروفوبیک محصور شده و به این ترتیب با گروه آسیل هم‌خوانی دارد(۱۰).

مواد و روش ها:

حیوانات آزمایشگاهی

حیوانات مورد استفاده در این پژوهش، موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد Wistar با وزن ۲۵۰ گرم بودند که از پژوهشکده پاستور شهرستان آمل تهیه شدند. موش‌ها با رعایت توصیه‌های پژوهشی در شرایط مناسب و کنترل شده حیوان‌خانه دانشگاه از جمله دوره‌های ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، تهویه‌ی مناسب و درجه حرارت ۲۲-۱۸ درجه سانتیگراد و اقدامات بهداشتی لازم نگهداری شدند. دسترسی حیوان به آب و غذا در مدت پرورش به صورت آزاد بود. دو روز در آزمایشگاه نگهداری شدند تا با محیط جدید سازگاری حاصل کنند. پس از سازگاری به ۵ گروه کنترل

(C)، گروه تحت محدودیت کالری (CR)، گروه دیابتی شده (D)، گروه ال-آرژنین و گروه دریافت‌کننده L-Name تقسیم شدند.

نحوه ایجاد محدودیت کالری(CR)

نحوه ایجاد CR بدین شرح بود که رت‌های این گروه بصورت یک روز در میان به غذا دسترسی داشتند. به این ترتیب که به مدت ۲۴ ساعت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشته و سپس در طی ۲۴ ساعت بعد دسترسی به غذا متوقف می‌گشت ولی آب کماکان در اختیار آنها قرار می-گرفت. این عمل به مدت ۴ هفته ادامه می‌یافت. در همین هنگام و طی این مدت رت‌های گروه کنترل (C) و گروه دیابتی (D)، آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. شرایط چهار گروه یکسان بود جز در مورد غذا. قفس حیوانات هر روز تمیز می‌شد. این عمل در مورد گروه CR اهمیت ویژه-ای داشت زیرا در صورت تمیز نبودن قفس‌ها احتمال باقی ماندن غذا از روز قبل در قفس وجود داشت. پس از طی ۴ هفته، سپس حیوانات برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار می‌گیرند.

چگونگی دیابتی کردن رت‌ها

در این پژوهش از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار، به تعداد ده عدد در هر گروه، استفاده شد. برای دیابتی کردن هر حیوان، استرپتوزوسین با دوز ۵۰ mg/kg بصورت درون صفاقی تزریق گردید. پس از ۴۸ ساعت هیپرگلیسمی شروع شد که پس از یک هفته با اندازه‌گیری قند خون و تایید مقدار آن به میزان بالاتر از ۲۵۰mg/dl در خون حیوانات، دیابتی تلقی شدند. از آنجاکه امکان تلف شدن موش در این گروه وجود دارد تعداد حیوان در این گروه بیشتر از بقیه گروه‌ها بود.

اندازه‌گیری قند خون

روش آنزیمی، کالیمتری (GOD-PAP) برای اندازه-گیری تک نقطه‌ای با روش فتومتری مورد استفاده قرار گرفت. در این روش گلوکز موجود در نمونه، تحت تاثیر گلوکز اکسیداز، تولید گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه می‌کند که در حضور پراکسیداز با ۴- آمینوآنتی پیرین تولید کینونمین قرمز رنگ می‌نماید. شدت رنگ حاصل که که در طول موج ۵۴۶-۵۰۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود، متناسب با مقدار گلوکز است.

در این روش نمونه‌های سرم باید بدون همولیز باشند. محدوده‌ی اندازه گیری در این روش 400-۵ در دسی لیتر است و در موردی که مقدار گلوکز بیش از ۴۰۰ میلی گرم باشد، باید نمونه به ۱ به ۴ با سرم فیزیولوژی رقیق شود و جواب آزمایش در عدد ۵ ضرب شود.

اندازه‌گیری تری‌گلیسرید خون

روش آنزیمی، کالیمتری (GPO) برای اندازه گیری تک نقطه‌ای با روش فتومتری.

اساس روش: در این آزمایش ابتدا تری‌گلیسریدهای سرم تحت ـر ریم لیپوپروتئین لیپاز به گلیسرول و اسیدهای چرب تجزیه می‌شود و سپس طی مراحل زیر اکسیژن آزاد شده از گلیسرول با ۴- آمینوآنتی‌پیرین و فنل در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونمین می‌دهد. میزان کینونیمن تشکیل شده که به صورت فتومتری در طول موج ۵۴۶-۵۰۰ نانومتر قابل اندازه گیری می‌باشد با مقدار تری‌گلیسرید رابطه‌ی مستقیم دارد.

در این روش محدوده‌ی اندازه‌گیری تری‌گلیسرید ۷۰۰-۵ میلی گرم در دسی‌لیتر است و در مواردی که مقدار تری-گلیسرید بیش از ۷۰۰ باشد، نمونه باید با سرم فیزیولوژی به نسبت ۱ به ۴ رقیق شود و جواب آزمایش در عدد ۵ ضرب شود.

خلاصه روش اندازه‌گیری سیرتوئین۱

در این روش براساس دستورالعمل نوشته شده در کیت ابتدا مواد، نمونه‌ها، و استاندارد طبق دستور آماده شدند.

سپس استاندارد و نمونه‌ها به چاهک‌های اختصاصی ریخته شد. و سپس به ترتیب :

- به نمونه‌ها و استاندارد آنتی‌بادی اضافه شد
- در دمای اتاق انکوبه شدند
- بعد از آن تمامی چاهک‌ها شسته شدند
- سوبسترای TMB اضافه شد
- مجدداً انکوبه گردید
- افزودن Stop solution
- پس از آن تغییر رنگ حاصل از افزودن سوبسترای TMB ثبت می‌شود.

روش سنجش سیرتوئین

- 50µL از نمونه‌ها یا استاندارد به چاهک ریخته شد
- 50µL از آنتی بادی کوکتل به هر چاهک اضافه شد که به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد
- هر چاهک با 350µL محلول 1X Wash Buffer PT طی سه مرحله شسته شد. عمل شستن با سرریز کردن محلول چاهک انجام شد.
- 100µL از سوبسترای TMB به هر چاهک اضافه شده به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد
- 100µL از Stop Solution به هر چاهک اضافه شده به مدت یک دقیقه تکان داده شده و جذب محلول در 450nm خوانده شد.

نتایج:

پس از طی دوره ۴ هفته‌ای، حیوانات تحت بیهوشی قرار گرفته، خون‌گیری بطور مستقیم از قلب آنها بعمل آمد و سرم خون جدا شده تا هنگام سنجش در فریزر نگهداری شد.

میزان سیرتوئین

پس از اتمام آزمایش میزان سیرتوئین در نمونه خون تمام موش‌ها اندازه‌گیری شد، و نمودار ستونی مقدار سیرتوئین برحسب Pg/dl برای گروه‌ها ترسیم شد.

با توجه به نمودار میزان سیرتوئین در گروه محدودیت کاری (CR) نسبت به گروه کنترل (C) بطور معناداری افزایش یافته و تفاوت آماری معنی‌دار دارد ($p<0.01$). همچنین تفاوت میزان سیرتوئین در گروه ال-آرژنین (L-Ar) نسبت به گروه کنترل معنادار بود ($p<0.05$). همچنین میزان کاهش سیرتوئین در گروه دیابت (D) نسبت به گروه کنترل معنادار بود ($p<0.001$)(شکل-۱).

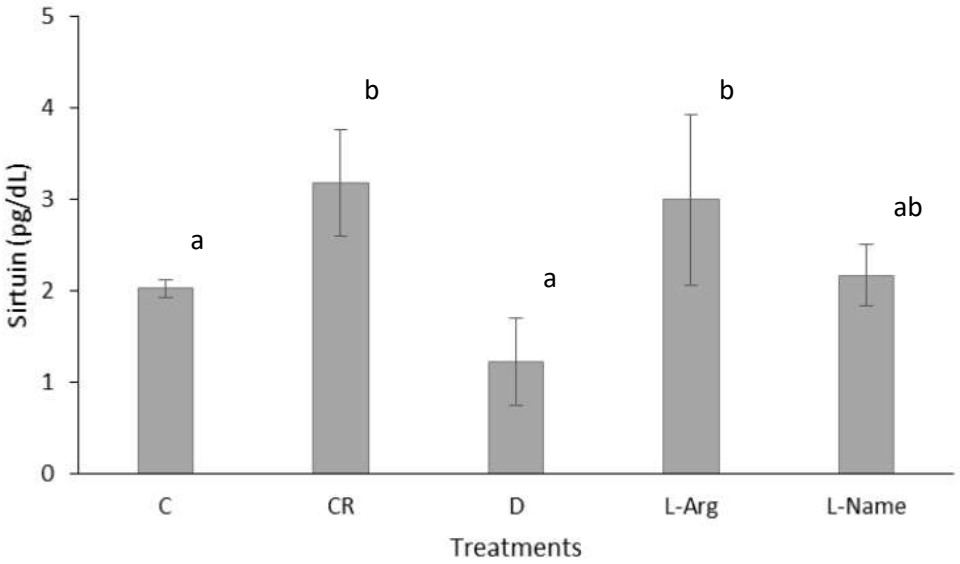
میزان گلوکز

پس از اتمام دوره آزمایش میزان گلوکز در نمونه خون تمام موش‌ها اندازه‌گیری شد، و نمودار ستونی مقدار گلوکز برحسب mg/dl برای گروه‌ها ترسیم شد. با توجه به نمودار میزان گلوکز سرم در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار دارد ($p<0.001$). و در گروه CR کاهش گلوکز نسبت به گروه کنترل معنادار نمی‌باشد. همچنین میزان کاهش گلوکز در گروه ال-آرژنین نسبت به گروه کنترل معنادار نبود(شکل -۲).

میزان تری گلیسرید

پس از اتمام دوره آزمایش میزان تری‌گلیسرید در نمونه خون تمام موش‌ها اندازه‌گیری شد، و میانگین اعداد گروه-های مختلف به صورت نمودار زیر رسم شد.

با توجه به نمودار میزان تری‌گلیسرید در گروه دیابت نسبت به گروه کنترل بطور معناداری افزایش یافته و تفاوت آماری معنادار دارد ($P<0.05$). میزان کاهش تری‌گلیسرید در گروه CR نسبت به کنترل نیز معنی‌دار است ($P<0.05$)(شکل-۳).



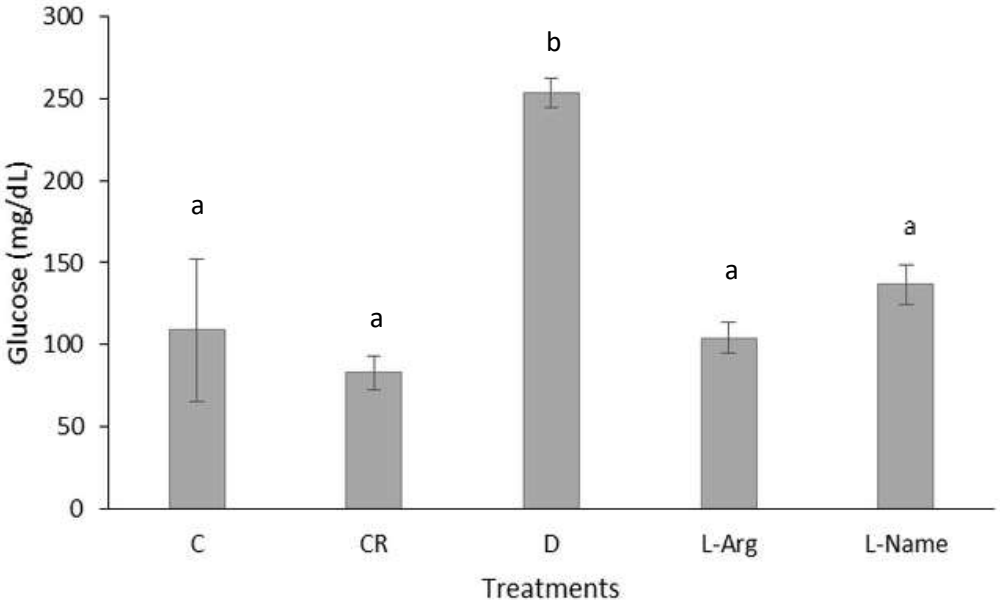
شکل ۱. مقایسه میانگین میزان سیرتوئین در بین گروه ها.

نتایج بصورت Mean±SEM بیان گردیده است.

میزان میانگین سیرتوئین در گروه CR بطور معنی‌داری از گروه L-Name بیشتر بود (p<0.01)

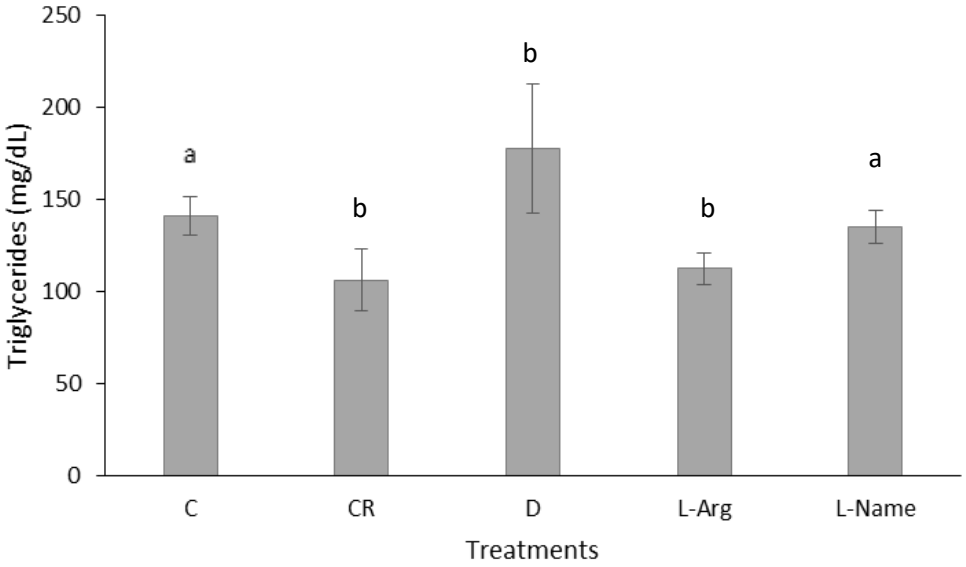
میزان میانگین سیرتوئین در گروه ال- آرژنین بطور معنی‌داری از گروه دیابت بیشتر بود (p<0.01).

میزان میانگین سیرتوئین در گروه L-Name بطور معنی‌داری از گروه دیابت بیشتر بود (p<0.01)



شکل ۲. مقایسه میانگین میزان گلوکز سرم در بین گروه ها.

نتایج به صورت Mean±S.E.M. بیان گردیده است.



شکل۳. میانگین میزان تری گلیسرید سرم در بین گروه ها.

نتایج به صورت Mean±S.E.M. بیان گردیده است.

بحث

میزان گلوکز خون در گروه CR نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت، به‌طور کلی گرسنگی باعث افزایش حساسیت انسولین، کاهش غلظت انسولین و در بعضی موارد کاهش غلظت گلوکز خون می‌گردد. CR در پستانداران دو مرحله دارد. یک دوره سازگاری، که بلافاصله بعد از رژیم اعمال می‌شود، و یک دوره حالت پایدار، که این مرحله می‌تواند طول عمر جانور را زیاد کند. در طول مرحله سازگاری، میزان متابولیسم با کاهش مصرف اکسیژن اندازه‌گیری شد. متابولیسم گلوکز ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس را تنظیم می‌کند. گزارش شده که سلول‌های بتا پانکراس که انسولین را می‌سازند، گلوکز را با تولید ATP حس نمی‌کنند، بلکه توسط تبدیل NAD به NADH حس می‌کنند(۱۱).

بنابراین در طول دوره سازگاری گلوکز خون به شدت پایین میاید ولی در طول وضعیت پایدار پایین‌تر از سطح نرمال می‌باشد. سلول‌های بتا سطوح پایین گلوکز را حس کرده و انسولین کمتری تولید می‌کند. سطح انسولین خون پایین‌تر از جانوران گروه کنترل می‌باشد و حساسیت به انسولین، یعنی اثر انسولین در جذب گلوکز توسط سلول بالاتر است(۱۲).

نتایج حاضر نشان داد تزریق ال-آرژنین باعث کاهش معنی‌داری در سطوح قندخون و تری‌گلیسرید نسبت به گروه کنترل شد. در مطالعه‌ای که روی افراد سالم انجام شده است مکمل ال-آرژنین به مدت ۳ تا ۷ روز باعث بهبود متابولیسم گلوکز شد. به نظر می‌رسد این افزایش بیشتر به دنبال دوزهای حاد ال-آرژنین و با اثر مستقیم نیتریک-اکساید رخ دهد. Natarajan و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند مکمل یاری با اسیدهای آمینه باعث بهبود وضعیت گلیسمیک در بیماران دیابتی می‌شود (۱۳). در یک بررسی Mohammadin و همکاران نشان دادند پیش‌سازهای نیتریک اکساید می‌توانند از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سطح قندخون و هموگلوبین گلیکوزیله را در موش‌های مبتلا به دیابت بهبود بخشند(۱۴).

نتایج مطالعه نشان داد ال-آرژنین به‌عنوان پیش‌ساز نیتریک‌اکساید باعث افزایش معنی‌دار سیرتوئین نسبت به

گروه کنترل شد. Nisoli و همکاران نشان دادند که در موش‌هایی با ۳ تا ۱۲ ماه CR، بیان eNOS و تولید cGMP افزایش می‌یابد. همچنین طی این مدت محدودیت کالری افزایش بیان eNOS با بیوژنزمیتوکندری (تولید میتوکندری جدید)، افزایش مصرف اکسیژن و تولید ATP و حتی افزایش بیان SIRT1 همراه شده است. در حیوانات فاقد eNOS، CR قادر نبود بیوژنز میتوکندری، افزایش متابولیسم اکسیداتیو، تولید ATP و بیان SIRT1 را افزایش دهد به این ترتیب تنظیم افزایشی eNOS می‌تواند مسئول اغلب اثرات مفید CR باشد(۱۵). احتمالاً NO مشابه CR با افزایش نسبت NAD/NADH باعث افزایش نسبت سیرتوئین خون شد.

داده‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که سطح سیرتوئین در گروه CR افزایش معنی‌دار داشته است. مشخص شده که رت‌های ۱۲ ماهه با رژیم CR، از زمان از شیر گرفته شدن در مغز، کبد، کلیه و بافت چربی احشایی نسبت به رت‌های با رژیم غذایی آزاد مشابه همان سن سطح SIRT1 بالاتر دارند. این محققان نتیجه گرفتند که در پستانداران القاء SIRT1 توسط CR یک پاسخ به بقا می باشد که تضعیف عملکردهای فیزیولوژیکی وابسته به سن را بوسیله بالا بردن بقای طولانی مدت سلول متوقف می‌کند(۱۶).

Guarente و همکارانش نشان دادند که CR، و پروتئین‌های آندوژن مختلف ممکن است باعث کاهش نیکوتینامید و افزایش نسبت NAD/NADH شده و در نتیجه محرک فعالیت SIRT1 باشد. با توجه به اینکه NAD به‌عنوان سوبسترای SIRT1 به‌کار می‌رود، از این طریق می‌تواند باعث تحریک فعالیت SIRT1 سلول شود(۱۷).

به نظر می‌رسد اثر محدودیت کالری بر افزایش طول عمر بواسطه‌ی تنظیم سرعت پایه متابولیسم از طریق پروتئین‌های سیرتوئین وابسته به NAD، صورت می‌گیرد(۱۸). فعالیت آنزیمی غیرمعمول SIRT1 که به مقدار زیادی وابسته به نسبت NAD/NADH می‌باشد، نشان می‌دهد که این پروتئین به شدت با وضعیت متابولیک سلول‌ها ارتباط دارد. CR منجربه شکل مطلوب متابولیک و بهبود عملکرد میتوکندریایی در انسان، بوسیله فعال سازی چندین ژن از جمله SIRT1 می‌شود. از این رو CR همراه با افزایش فعالیت بدنی به خصوص در افراد دیابتی چاق توصیه می‌شود. مکانیسم‌های بالقوه‌ای که SIRT1 با تغییرات متابولیکی القاء شده توسط CR تعویق پیری را وساطت می‌کند شامل دو جنبه می‌باشد:

-فعال شدن SIRT1 باعث تنظیم منفی فاکتورهای پروآپوپتیک مانند P53 و Foxo می‌شود.

- SIRT1 باعث یک سری از پاسخ‌های اندوکرین می‌شود که شامل مهار سنتز چربی و ترشح انسولین در سلول‌های بتا جزایر پانکراس به وسیله تنظیم ژن‌های کلیدی مرتبط با متابولیسم مانند PGC-1 α می‌باشد.

SIRT1 همچنین می‌تواند باعث تنظیم بیان ژن‌هایی شود که در مسیرهای متابولیک نقش دارند. PGC-1 α بهترین نمونه از این پروتئین‌ها در مطالعات CR است. PGC-1 α یک تنظیم کننده کلیدی گلوکونئوژنز و اکسیداسیون اسید چرب است که به وسیله SIRT1 به واسطه داستیلاسیون فعال می‌شود.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ال-آرژنین عامل محافظت‌کننده‌ای در برابر آسیب گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است. این امر ممکن است به علت تداخل شیمیایی ال-آرژنین با آنیون سوپر اکسید (O_2) باشد. ال-آرژنین موجب کنترل استرس اکسیداتیو در کبد، کاهش سطوح گلوکز و کلسترول سرم در دیابت می‌شود که به احتمال زیاد به طور مستقیم یا غیرمستقیم (در ارتباط با ظرفیت آنتی اکسیدانی وابسته به NO) عمل می‌کند، به

گونه‌ای که با افزایش غلظت گلوتاتیون (GSH)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و افزایش فعالیت کاتالاز موجب بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی در افراد دیابتی می‌گردد(۱۹).

SIRT1با داستیلاسیون مستقیم چندین فاکتور رونویسی که ژن‌های آنتی‌اکسیدان را تنظیم می‌کند در پاسخ به استرس اکسیداتیو نقش دارد. قابل توجه است که، SIRT1 چندین عضو خانواده FOXO را فعال می‌کند، که از فاکتورهای رونویسی می‌باشد که بیان ژن‌های پاسخ به استرس از جمله SOD2 را بالا می‌برد. همچنین SIRT1 بیوژنز میتوکندریایی را توسط فعال‌سازی PGC-1α بالا می‌برد نیتریک اکساید سنتتاز القایی (iNOS) و تولید نیتروزاکساید را سرکوب می‌کند و بنابراین ممکن است ROS سلولی را کاهش دهد. شواهد نشان می‌دهد که P53 نقش مهمی در تعدیل SIRT1 در طول CR ایفا می‌کند.CR و استرس اکسیداتیو ممکن است نیکوتینامید را کاهش دهد و نسبت NAD/NADH را افزایش دهد که میتواند باعث فعال‌سازی سیرتوئین‌ها شود(۲۰).

داده‌های تحقیق حاضر نشان داد میزان سیرتوئین در گروه دیابت کاهش معنی‌دار داشت، SIRT1 نقش مهمی در کنترل هموستاز گلوکز بازی می‌کند. در واقع، تحت شرایط دیابتی فعالیت و میزان بیان پروتئین سیرتوئین ۱ در بافت‌های مختلف کاهش می‌یابد(۲۱).

Guarente و همکارانش نشان دادند که سیرتوئین-۱ در سلول‌های بتا پانکراس به طور مثبت ترشح انسولین را تنظیم می‌کند و سلول‌هارا از استرس اکسیداتیو و التهاب محافظت می‌نماید و در سیگنالینگ انسولین در سلول‌های چربی و عضله نقش مثبتی دارد و همچنین در کارکرد و سنتز زیستی میتوکندری و بهبود متابولیسم هوازی درگیر است. بنابراین پیشنهاد شده است فعال نمودن سیرتوئین-۱ با بهبود هموستاز گلوکز و کاهش مقاومت به انسولین مرتبط می‌باشد(۲۲).

کاهش فعالیت SIRT1 منجربه افزایش عارضه‌های چاقی مانند مقاومت به انسولین و دیابت می‌باشد(۲۳).

هیپرگلیسمی از طریق مکانیسم‌هایی نظیر افزایش گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها، اتواکسیداسیون گلوکز، فعال‌سازی مسیر پولیول و غیر مزدوج کردن نیتریک‌اکساید آندوتلیالی، منجربه استرس اکسیداتیو می‌شود. استرس اکسیداتیو نیز به نوبه خود نقش مهمی را در مقاومت به انسولین، افزایش متابولیت‌های اکسید نیتریت (NOx) و گسترش پرفشاری خون در افراد نشان داده شده که گلوکز می‌تواند با تولید واسطه‌های اکسیژن فعال (ROS) و کاهش فعالیت NOS و غیرفعال کردن شیمیایی و مستقیم NO، دسترسی به NO را کاهش دهد. در صورتیکه کاهش گلوکز می‌تواند اثر معکوس داشته باشد. دارد (۲۴).

عملکردهای SIRT1 در ارتباط با دیابت نوع ۲ به شرح زیر می‌باشد:۱- می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلفی با مسیر سیگنالینگ انسولین ارتباط داشته باشد. SIRT1 بیان پروتئین تیروزین فسفاتاز B1 (PTPB1) که روی سیگنالینگ انسولین اثر منفی دارد را مهار می‌کند.۲- با داستیله کردن زیر واحد P65 در NF-KB باعث مهار رونویسی و بیان ژن‌های التهابی می‌شود.۳-در بافت چربی سبب افزایش ترشح آدیپونکتین می‌شود.۴- در عضله‌ی اسکلتی سبب افزایش برداشت گلوکز و افزایش بیوژنز میتوکندری می‌شود.۵- در کبد سبب تنظیم متابولیسم لیپید و گلوکز، افزایش گلوکونئوژنز و نیز اکسیداسیون اسید های چرب می‌شود.

سیرتوئین-۱ از طریق مکانیسم‌های فوق در تنظیم ترشح انسولین و بهبودی مقاومت به انسولین نقش خود را ایفا کرده و تاثیرات آنتی‌دیابتیک از خود نشان می‌دهد(۲۳).

داده‌های تجربی نشان می‌دهد که با بیان بیش از حد SIRT1 انسولین سرم و کلسترول همراه با حجم چربی کاهش می‌یابد. و مقاومت به انسولین ناشی از چاقی کم

می‌شود. اخیراً نشان داده شد که SIRT1بافت چربی ممکن است نقش کلیدی در تنظیم هموستاز متابولیک کلی بدن ایفا کرده و کاهش بیان SIRT1 در بافت چربی احشایی ممکن است منجربه اختلالات متابولیکی مرتبط با چاقی احشایی و دیابتی در زنان چاق شود. با توجه به این مطالعات SIRT1 ممکن است یک تنظیم کننده مثبت تا یک مهار کننده انسولین بعد از صرف غذا باشد. بنابراین SIRT1 ممکن است حساسیت به انسولین را در شرایط مقاومت به انسولین توسط کاهش فعالیت PTP1B بهبود بخشد. (۲۵).

نتیجه گیری

سیرتوئین فرایندهای مهم سلولی چون آپوپتوز، پیری سلول و متابولیسم را تنظیم می‌کند. بنابراین سیرتوئین می‌تواند یک هدف درمانی جدید برای بیماری دیابت باشد. محدودیت کالری نیز می‌تواند فرایندهای پیری را کند نماید و آغاز بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سن را، از جمله دیابت، به تاخیر بیاندازد. بنابراین محدودیت کالری می‌تواند نیز می تواند در درمان و پیشگیری از دیابت مورد نظر باشد.

سیرتوئین یک داستیلاز وابسته به **NAD** است که بیان آن توسط محدودیت کالری افزایش می‌یابد و دقیقاً با افزایش طول عمر ناشی از محدودیت کالری در ارتباط است. پیشنهاد شده است که سیرتوئین نیز مانند محدودیت کالری احتمالاً یک هدف درمانی جدید برای پیشگیری و درمان دیابت نوع باشد و فعال نمودن آن با بهبود هموستاز گلوکز و کاهش مقاومت به انسولین مرتبط می‌باشد. به هر حال علی-رغم اهمیت نقش فیزیولوژیک سیرتوئین در افراد دیابتی، پاسخ این پروتئین به ورزش در این بیماران روشن نیست. داشتن اثرات مختلف ورزش به واسطه شباهت به محدودیت کالری، بر پروتئین‌های تنظیمی درگیر در کنترل گلوکز و بیوژنز میتوکندریایی ممکن است به بهبود راهکارهای پیشگیرانه و درمان افراد کم‌تحرک کمک نماید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافع احتمالی در رابطه با تحقیق، تألیف و/یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

فهرست منابع

1. Mondillo C, Pagotto RM, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, Pignataro OP. Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats. Biology of reproduction. 2009 Jan 1;80(1):144-52.

2. Bian K, Doursout MF, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. The journal of clinical hypertension. 2008 Apr;10(4):304-10.

3. Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. Free Radical Biology and Medicine. 2017 Aug 1;109:4-10.

4. Welch KM, editor. Primer on cerebrovascular diseases. Academic press; 1997 Apr 24.

5. Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function?. Redox biology. 2014 Jan 1;2:251-8.

6. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size: one figure. The journal of Nutrition. 1935 Jul 1;10(1):63-79.

7. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. Molecular aspects of medicine.

2011 Jun 1;32(3):159-221.

8. Bédard K, Robinette K, Ferland G, Gaudreau P. Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action. Mechanisms of ageing and development. 2010 Mar 1;131(3):169-78.

9. Aguilera O, Fernández AF, Muñoz A, Fraga MF. Epigenetics and environment: a complex relationship. Journal of applied physiology. 2010 Jul;109(1):243-51.

10. Autiero I, Costantini S, Colonna G. Human sirt-1: molecular modeling and structure-function relationships of an unordered protein. PloS one. 2009 Oct 8;4(10):e7350.

11. McCarter RJ, McGee JR. Transient reduction of metabolic rate by food restriction. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 1989 Aug 1;257(2):E175-9.

12. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work?. Genes & development. 2003 Feb 1;17(3):313-21.

13. Lakshmi S, Punitham R, Arokiasamy T, Sukumar B, Ramakrishnan S. Effect of oral supplementation of free amino acids in type 2 diabetic patients--a pilot clinical trial. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. 2002 Mar 1;8(3):CR131-7.

14. Mohamadin AM, Hammad LN, El-Bab MF, Gawad HS. Can nitric oxide-generating compounds improve the oxidative stress response in experimentally diabetic rats?. Clinical and experimental pharmacology and physiology. 2007 Jul;34(7):586-93.

15. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. Science. 2005 Oct 14;310(5746):314-7.

16. Masoro EJ. Role of sirtuin proteins in life extension by caloric restriction. Mechanisms of ageing and development. 2004 Sep 1;125(9):591-4.

17. Turkmen K, Karagoz A, Kucuk A. Sirtuins as novel players in the pathogenesis of diabetes mellitus. World journal of diabetes. 2014 Dec 12;5(6):894.

18. Wenzel U. Nutrition, sirtuins and aging. Genes & nutrition. 2006 Jun;1:85-93.

19. Fazelian S, Olia AS, Mirfatahi M, Hoseini M, Yganeh HS, Heshmati J, Namazi N. Effect of L-Arginine supplementation on antioxidant enzyme activity, total antioxidant capacity and body composition in patients with pre-diabetes. Arak Medical University Journal. 2013 Jan 1;16(78):25-35.

20. Merksamer PI, Liu Y, He W, Hirschey MD, Chen D, Verdin E. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. Aging (Albany NY). 2013 Mar;5(3):144.

21. H Ruggiero C, Metter EJ, Cherubini A, Maggio M, Sen R, Najjar SS, Windham GB, Ble A, Senin U, Ferrucci L. White blood cell count and mortality in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. Journal of the American College of Cardiology. 2007 May 8;49(18):1841-50.

22. Guarente L. Sirtuins, aging, and medicine. New England Journal of Medicine. 2011 Jun 9;364(23):2235-44.

23. Kitada M, Koya D. SIRT1 in type 2

diabetes: mechanisms and therapeutic potential. Diabetes & metabolism journal. 2013 Oct 1;37(5):315-25.

24. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

25. Imai SI, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature. 2000 Feb 17;403(6771):795-800.

Journal of Plasma & Biomarkers
Volume17 , Issue 2, Number 66, Pages 80-93
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: 9880-1735

Investigating the amount and activity of sirtuin in diabetic rats under caloric restriction and the effect of nitric oxide on it

Safar Mohseni Bandpi[1], Nazanin Nazari[2]

1- Assistant Professor of Biology Department, Golestan University, Gorgan, Iran. Responsible author: smbmohseni@gmail.com
2- Master's student in Animal Physiology, Department of Biology, Golestan University, Gorgan, Iran.

Received:2023.04.16 **Accepted: 2023.07.29**

Abstract

Background & Aim: Sirtuins are category 3 proteins of a family of histone deacetylase enzymes that catalyze the hydrolysis of the acetylated end of histone, causing chromatin shape change, creating heterochromatin, and as a result inhibiting transcription, and plays a role in aging and cancer. Sirtuin regulates important cellular processes such as apoptosis, cell aging and metabolism. Therefore, sirtuin can be a new therapeutic target for diabetes. Also, sirtuin is known as a protein that regulates lifespan. In this study, the effect of nitric oxide on sirtuin activity in diabetic rats under caloric restriction was investigated.

Materials & Methods: The animals used in this study were male Wistar rats weighing 250 grams, which were divided into 5 groups: control (C), calorie restricted (CR), diabetic (D), L-Arginine and L-Name groups. And each group included ten animals. To make each animal diabetic, streptozocin with a dose of 50 mg/kg was injected intraperitoneally. The group receiving L-Name (NO inhibitor) received it at a dose of 10 mg/kg as an intra-abdominal injection. The L-arginine (precursor of nitric oxide) group also received a dose of 50 mg/kg as an intraperitoneal injection.

Results: The calorie restriction group was subjected to a low calorie diet for 4 weeks. After a period of 4 weeks, the animals were anesthetized and blood was taken directly from their hearts. The amount of sirtuin was measured by the relevant kit and with the Elizarider device. The results were analyzed using spss software. The amount of serum sirtuin increased significantly in the L-arginine ($P<0.05$) and CR ($P<0.01$) groups, while it decreased significantly in the diabetes group ($P<0.001$). Also, the reduction of sirtuin in the L-Name group was not significant.

Conclusion: The results showed that L-arginine, as a precursor of nitric oxide, increases the amount of sirtuin in diabetic rats under caloric restriction.

Keywords: Nitric oxide, diabetes, calorie restriction, sirtuin