

بررسی اثرات محدودیت کالری و نقش نیتریک اکسید در وضعیت همودینامیک موش‌های صحرائی نرمال و دیابتی شده توسط استرپتوزوسین

علی محمد شریفی^{۱*}، صفر محسنی^۲، سپیده نکوپرور^۱، باقر لاریجانی^۳، حسین فخرزاده^۳، شهربانو عریان^۲

چکیده

مقدمه: اضافه وزن یکی از عوامل تهدید کننده سلامتی در جوامع امروز به ویژه جوامع صنعتی و پیشرفته است. افراد چاق نسبت به بیماری‌های متعددی از جمله دیابت و بیماری‌های قلبی-عروقی در معرض خطر بیشتری هستند. مشخص گردیده که تغییر در شیوه زندگی به ویژه کاهش وزن و محدودیت کالری به عنوان عوامل غیر دارویی، تاثیر زیادی در کاهش این مشکلات دارند. در بررسی حاضر اثرات احتمالی محدودیت کالری بر تولید نیتریک اکسید (NO) و میزان فشار خون در موش‌های نرمال و دیابتی شده مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها: تعداد ۴۰ موش صحرائی در چهار گروه کنترل (C)، محدودیت کالری (CR)، دیابتیک (D) و دیابتیک تحت تاثیر محدودیت کالری (CRD) مورد بررسی قرار گرفتند. دو گروه کنترل (C) و دیابتیک (D) آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند در حالی که گروه‌های CR و CRD به مدت چهار هفته و به صورت یک روز در میان به غذا دسترسی داشتند. دو گروه اخیر نیز آزادانه به آب دسترسی داشتند.

یافته‌ها: پس از طی ۴ هفته میزان فشار خون و نیتریک اکسید سرم مورد سنجش قرار گرفتند که نتایج حاصل نشانگر این است که میزان فشار خون در گروه‌های CR و CRD به ترتیب نسبت به گروه‌های C و D کاهش معنی داری داشته است، در حالی که مقدار نیتریک اکسید سرم در گروه‌های CR و CRD به ترتیب نسبت به گروه‌های C و D افزایش معنی داری را نشان می‌دهد.

نتیجه گیری: از بررسی انجام شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که محدودیت کالری می‌تواند موجب افزایش تولید نیتریک اکسید و همچنین کاهش فشار خون در موش‌های نرمال و دیابتیک گردد که احتمالاً این کاهش فشار خون ناشی از افزایش میزان نیتریک اکسید می‌باشد.

واژگان کلیدی: محدودیت کالری، نیتریک اکسید، دیابت، فشار خون

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران

۳- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳؛ تلفن: ۸۸۰۵۸۶۹۶؛ پست الکترونیک: sharam@iums.ac.ir

مقدمه

افزایش وزن یکی از مهمترین عواملی است که سلامتی انسان‌ها را در جوامع امروزی و به ویژه در جوامع صنعتی و پیشرفته تهدید می‌نماید. افراد چاق نسبت به بیماری‌های مختلفی مانند دیابت و به ویژه بیماری‌های قلبی-عروقی نظیر فشار خون، آترواسکلروز و افزایش چربی و کلسترول در معرض خطر بیشتری هستند [۱]. در میان روش‌های مختلف درمان و پیشگیری، اتخاذ روش‌های غیر دارویی مانند ورزش و کنترل تغذیه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند [۲].

مشخص گردیده که محدودیت در دریافت کالری^۱ می‌تواند منجر به افزایش طول عمر و نیز کاهش وقوع بسیاری از بیماری‌های وابسته به دوران پیری، سرطان، دیابت و اختلالات نورولوژیک گردد [۳]. در بیماران چاق و مبتلا به افزایش فشار خون، کاهش وزن به عنوان یک عامل درمانی غیر دارویی موثر جهت کاهش فشار خون توصیه می‌گردد [۲]. در عین حال سازوکار دقیق کاهش فشار خون در اثر کاهش وزن مشخص نشده است [۴].

یکی از عوامل مهم مرگ و میر در جهان بیماری دیابت است. نارسایی‌های قلبی - عروقی ناشی از آن، نظیر آترواسکلروز، میکروآنژیوپاتی و افزایش فشار خون نیز از علل مهم و اصلی این مرگ و میر محسوب می‌گردند [۶،۵]. شدت و وسعت بیشتر ضایعات آترواسکلروز در افراد دیابتی نسبت به افراد غیر دیابتی گزارش گردیده است [۷]. در مبحث پاتوفیزیولوژی دیابت، اکثر نگاه‌ها به اندوتلیوم عروق معطوف گردیده است که نقش مهمی در هومئوستاز سیستم قلب و عروق را دارا هستند [۹،۸]. از جمله عوامل تعیین کننده در این راستا تولید مولکول نیتریک اکسید (NO) است چرا که این ملکول ارزشمند و سیگنالی، نقش تعیین کننده‌ای در اعمال مختلف بیولوژیک دارد که از جمله این اعمال می‌توان به تعدیل تون عروقی، ممانعت از تکثیر سلول‌های ماهیچه صاف، محافظت دیواره عروق در برابر آسیب پلاکت‌ها و سلول‌های خونی اشاره کرد [۱۰]. وجود نارسایی در سیستم تولید NO با انواع

مختلفی از بیماری‌های قلبی-عروقی نظیر افزایش فشار خون، آترواسکلروز و دیابت همراه است [۱۱،۱۲]. مطالعات متعددی در جهت بررسی بهبود عملکرد اندوتلیوم از طریق تحریک تولید NO و یا محافظت از NO در برابر واکنش‌های اکسیداتیو و جلوگیری از تبدیل آن به مولکول سمی پراکسی نیترات صورت گرفته است [۱۳،۱۴]. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیرات احتمالی محدودیت کالری بر تولید نیتریک اکسید و همچنین بر میزان فشار خون در موش‌های دیابتیک و غیر دیابتیک می‌باشد.

روش‌ها

طرح تحقیق

چهل موش صحرایی نر نژاد ویستار خریداری شده از انستیتو پاستور در محدوده وزنی ۱۵۰-۱۳۰ گرم به ۴ گروه (n=۱۰) تقسیم گردیده و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. تمامی گروه‌ها آزادانه به آب دسترسی داشتند. در طول این مدت دو گروه کنترل (C) و دیابتی (D) آزادانه به غذا دسترسی داشتند درحالی که دو گروه دیگر یعنی گروه محدودیت کالری (CR) و گروه دیابتیک به مدت چهار هفته تحت تاثیر محدودیت کالری (CRD) به صورت دسترسی یک روز در میان به غذا بودند. موش‌های صحرایی دو گروه D و CRD با تزریق ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم استرپتوزوسین (STZ) به صورت درون صفاقی (IP) دیابتی شدند. حیواناتی که گلوکز ادرار آنها بیش از ۲۵۰ mg/dl بود، دیابتیک در نظر گرفته شدند. پس از ۴ هفته، وزن بدن، قلب، آئورت و میزان فشار خون تمامی گروه‌ها اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری فشار خون سیستولی و میزان گلوکز

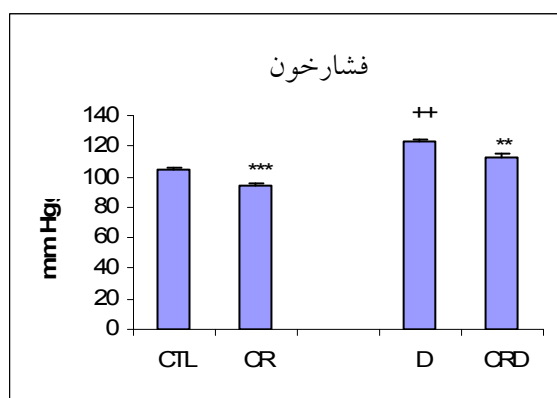
سرم

در پایان ۴ هفته موش‌های صحرایی به طور سطحی بوسیله اتر بیهوش شده و فشار خون سیستولی (SBP) آنها به روش کاف دمی^۲ اندازه‌گیری شد. میزان گلوکز سرم نیز به

² Tail-cuff

¹ caloric restriction

گردید. میزان SBP در گروه CR ($93/7 \pm 2$) نسبت به گروه C ($104/2 \pm 2$) (نمودار ۲)، ($P < 0/001$) و در گروه CRD ($112/5 \pm 2/8$) نسبت به گروه D ($122/4 \pm 1/8$) ($P < 0/01$) (نمودار ۲) کاهش معنی داری را نشان دادند. همچنین میزان SBP در گروه D نسبت به گروه C افزایش چشمگیری داشت (نمودار ۲، $P < 0/01$).



نمودار ۲- میزان فشار خون سیستولیک (mmHg) در دو گروه کنترل (C) و محدودیت کالری (CR)، کنترل دیابتی (D) و دیابتی تحت محدودیت کالری (CRD) در پایان ۴ هفته، $P < 0/001$ ***، $P < 0/01$ **، $P < 0/01$ **، $P < 0/01$ ** مقایسه CTL و D.

سرم NO_x

NO_x سرم (NO_2^- , NO_3^-) متابولیت نهایی NO بوده و اغلب جهت اندازه‌گیری میزان NO در سرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان NO_x (μM) سرم در گروه CR ($15/5 \pm 0/5$) نسبت به گروه C ($12/5 \pm 1/1$) ($P < 0/01$) (نمودار ۳) و در گروه CRD ($12/01 \pm 0/45$) نسبت به گروه D ($9/5 \pm 0/6$) ($P < 0/01$) (نمودار ۳) افزایش معنی داری داشت. از طرفی میزان NO_x سرم در گروه D ($9/5 \pm 0/6$) نسبت به گروه C ($12/5 \pm 1/1$) ($P < 0/01$) کاهش چشمگیری نشان داد (نمودار ۳). معیارهای وزنی گروههای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

وسیله کیت و به روش اسپکتروفوتومتری گلوکز اکسیداز سنجیده شد.

اندازه‌گیری میزان NO_x سرم

غلظت‌های نیترات و نیتريت (NO_x) سرم با استفاده از کیت و به روش کالریمتیک غیر آنزیمی^۱ همان گونه که قبلاً بوسیله Walker و همکاران [۱۵] شرح داده شده است، مورد سنجش قرار گرفت [۱۶].

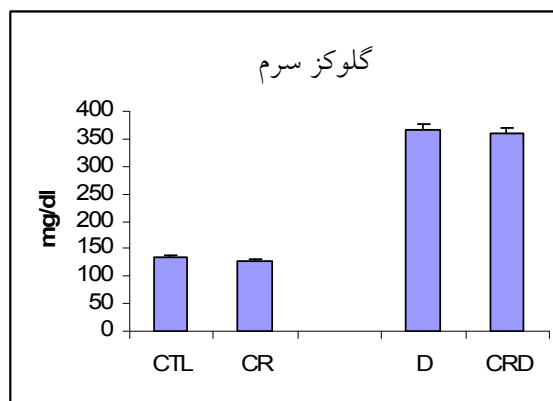
تحلیل آماری

نتایج به صورت $Mean \pm SEM$ ارائه گردید. جهت تحلیل داده‌ها از آزمون t-student استفاده شده است. $P < 0/05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

گلوکز خون

میزان گلوکز سرم در پایان چهار هفته اندازه‌گیری گردید و تغییر معنی‌داری بین دو گروه C ($135/3 \pm 1/9$) و CR ($128 \pm 2/8$) (نمودار ۱) و همچنین D ($368 \pm 9/1$) و CRD ($359 \pm 10/3$) (نمودار ۱) مشاهده نگردید.

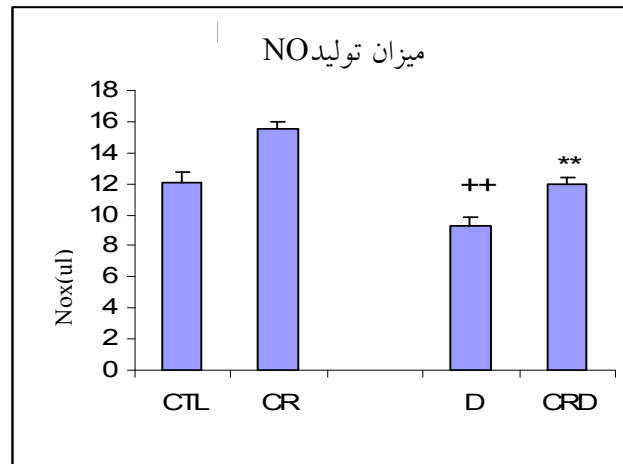


نمودار ۱- میزان گلوکز سرم (mg/dl) کنترل (C) و محدودیت کالری (CR)، کنترل دیابتی (D) و دیابتی تحت محدودیت کالری (CRD) در پایان ۴ هفته

فشار خون سیستولیک SBP

در پایان ۴ هفته، فشار خون سیستولیک گروه‌ها اندازه‌گیری

¹ Oxford Biomedical Research



نمودار ۳- میزان NO_x (μM) در دو گروه کنترل (C) و دیابتی تحت محدودیت کالری (CR) پس از ۴ هفته. کنترل دیابتی (D) و دیابتی تحت محدودیت کالری (CRD) در پایان ۴ هفته، $P < 0.01^{**}$ ، $P < 0.01^{++}$ ، مقایسه CTL و D

جدول ۱- معیارهای وزنی گروه‌های مختلف

گروه	میانگین وزن بدن (mg)	میانگین وزن قلب (mg)	میانگین وزن آئورت (mg)**	نسبت وزن قلب به آئورت به بدن	نسبت وزن بدن
C	۸۰۷	۲۵۰/۵	۵۰	۳/۲۲	۰/۱۹
CR	۶۵۶	۱۷۳	۳۰	۳/۷۹	۰/۱۷
D	۸۰۷	۲۳۰	۳۰	۳/۴۱	۰/۱۲
CRD	۶۵۴	۱۸۱	۳۵	۳/۶۱	۰/۱۹

* کنترل = C، محدودیت کالری = CR، دیابت = D، دیابتی تحت محدودیت کالری = CRD

** میانگین وزن آئورت به ازای ۱ سانتیمتر

بحث

در پیدایش اثرات CR به درستی شناخته نشده اند. اخیراً سازوکارهایی درمورد چگونگی تاثیر CR روی به تاخیر انداختن پیری مطرح شده اند که برخی از آنها به این شرح هستند: ۱- کاهش در میزان استرس اکسیداتیو [۲۰]، ۲- کاهش در روند گلیکوکاواسیداسیون [۲۱]، ۳- ایجاد هیپوترمی و کاهش در سطح هورمون‌های تیرویدی [۲۲] و ۴- تغییر در بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها [۲۳، ۲۴].

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ایجاد محدودیت کالری (CR) منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان فشار خون و وزن بدن گردیده است (نمودار ۲ و

محدودیت کالری (CR) کاهش قابل ملاحظه در میزان دریافت کالری است، به شرط آن که این کاهش دریافت باعث سوء تغذیه نگردد [۱۷]. مطالعات نشانگر آن است که CR باعث افزایش طول عمر موجودات مختلف از قبیل ماهی‌ها، عنکبوت‌ها، جوندگان و موجودات غیر پستاندار دیگر می‌گردد [۱۸].

علاوه بر این نشان داده شده که CR منجر به کاهش وقوع اختلالات مرتبط با سن، دیابت، سرطان و مشکلات قلبی-عروقی در پستانداران می‌گردد [۱۹]. سازوکارهای مسؤول

می‌توان با عنایت به مطالعه دیگری از نویسنده که نشان دهنده تداخل بین عمل نیتریک اکسید و آنزیم ACE می‌باشد را مورد توجه قرار داد به طوری که به نظر می‌رسد افزایش NO موجب کاهش ACE و به تبع آن آنژیوتانسین ۲ به عنوان یک تنگ کننده قوی عروقی و در نتیجه کاهش فشار خون خواهد گردید [۱۶]. علاوه بر موارد مذکور، گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر محدودیت کالری در کاهش فشار خون در موش‌های فشار خونی مدل خودبخودی یا SHR موجود می‌باشد که عمده این تاثیر را ناشی از مداخله در سیستم عصبی سمپاتیک دانسته‌اند [۲۷]. مطالعات مشابه در انسان نیز حاکی از آن است که CR و کاهش وزن، منجر به کاهش فعالیت سمپاتیک و در نتیجه کاهش کاتکول‌آمین پلازما گردیده‌اند [۲۸]. معتقدین این نظریه مطرح نموده‌اند که تنها بخشی (حدود ۵۰ درصد) از کاهش فشار خون توسط CR به کاهش تون سمپاتیک مربوط است و سازوکار باقیمانده این کاهش نامشخص می‌باشد [۲۵] که شاید نتایج مطالعه اخیر بتواند توجه گر و بیانگر سازوکار بخش باقیمانده این کاهش بوده و بتوان آن را به افزایش NO ناشی از محدودیت کالری نسبت داد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به نداشتن امکان اندازه گیری دقیق میزان دریافتی انرژی در گروه‌های مختلف آزمایشی اشاره کرد.

در نهایت، با توجه به مطالب ذکر شده، احتمالاً بتوان ایجاد محدودیت کالری (CR) را پس از بررسی دقیق‌تر در مطالعات انسانی به عنوان یک راهکار غیر دارویی قلمداد نموده که در کنار دیگر شیوه‌های درمانی بتوان از آن در پیشگیری و کاهش برخی از اختلالات نظیر دیابت و مشکلات قلبی - عروقی متعاقب آن بهره برد. بررسی بیشتر جهت تعیین سازوکار دقیق‌تر تاثیر CR بر عوامل ذکر شده می‌تواند تصویر کامل‌تری از این راهکار را ترسیم نماید. لذا پیشنهاد می‌گردد رژیم محدودیت کالری که در آن میزان دقیق کالری غذایی مشخص و ارتباط آن با میزان میانجی‌های مختلف معین باشد و همچنین تاثیر درصد کاهش مواد معینی از مواد (چربی، قند، پروتئین) در رژیم غذایی مشخص مورد مطالعه قرار گیرد.

جدول ۱). بدین ترتیب با استفاده از این نتایج می‌توان به رابطه بین توازن انرژی و تنظیم فشار خون اشاره کرد. این یافته‌ها با نتایج مطالعات قبلی مبنی بر تاثیر رژیم کم کالری در کاهش فشار خون از طریق کاهش وزن در بیماران چاق مبتلا به فشار خون، مطابقت دارند [۲۵]. این نتایج همچنین با گزارش‌های قبلی مبنی بر کاهش فشار خون توسط ایجاد CR طولانی مدت در انواع مدل‌های فشار خون نیز مطابقت دارد [۲۶].

سازوکارهای مختلفی در تنظیم فشار خون نقش دارند که در این میان می‌توان به نقش مولکول NO به عنوان یک متسع کننده عروق از یک طرف و نیز سیستم رنین- آنژیوتانسین و به دنبال آن آنژیوتانسین ۲ در انقباض عروقی از طرف دیگر به عنوان مولکول‌های تعیین کننده در تنظیم تون عروقی و متعاقباً تنظیم فشار خون اشاره نمود. در این بررسی نشان داده شده که میزان تولید NO در موش‌های گروه محدودیت کالری اعم از غیر دیابتی و دیابتی به میزان قابل توجهی نسبت به موش‌های گروه کنترل هر دو گروه افزایش یافته است (نمودار ۳). همچنین در همین راستا میزان فشار خون در دو گروه CR و CRD نسبت به دو گروه C و D کاهش چشمگیری داشته است (نمودار ۲). نتایج بدست آمده می‌تواند ناشی از عمل مولکول NO در کاهش فشار خون که احتمالاً از طریق ایجاد محدودیت کالری ایجاد گردیده است باشد.

از طرف دیگر نشان داده شده که CR باعث کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد [۲۰]. با توجه به این موضوع که میزان تولید NO در دو گروه تحت تاثیر محدودیت کالری (CR و CRD) نسبت به دو گروه کنترل و دیابتیک افزایش داشته است، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً CR از طریق بهبود عملکرد اندوتلیوم و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد باعث افزایش تولید مولکول NO و یا کاهش تبدیل آن به مولکول سمی پرواکسی نیتریت گردیده و در نتیجه باعث کاهش فشار خون در موش‌های تحت رژیم محدودیت کالری گردیده است.

توضیح دیگر در ارتباط با افزایش تولید نیتریک اکسید متعاقب تاثیر محدودیت کالری و کاهش فشار خون را

مآخذ

1. Bray GA. Obesity. In: (editors) Ziegler EE, Filer LJ Jr. *Present knowledge in nutrition*. Washington, DC: ILSI Press; 1996: 19-32.
2. Gregory C, Doelle. The clinical picture of metabolic syndrome. *Postgrade Med* 2004; 116: 30-8.
3. Wu A, Sun X, Liu Y. Effect of caloric restriction on cognition and behavior in developing mice. *Neuroscience letters* 2003; 339: 166-168.
4. Sasaki S, Higashi Y, Nakagada K, Kimura MA. A low calorie diet improves endothelium-dependent vasodilation in obese patients with essential hypertension. *AJH* 2002; 15: 302-309.
5. Standl E, Balletshofer B, Dahl B. Predictors of 10-year macrovascular and overall mortality in patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 1540-1545.
6. Stern MP. Diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes* 1995; 44: 369-347.
7. Calles-Escandon J, Mirza SA, Garcia-Rubi E. Type 2 diabetes: One disease, multiple cardiovascular risk factors. *Coron Artery Dis* 1999; 10: 23-30.
8. Hogikyan RV, Galecki AT, Pitt B. Specific impairment of endothelium-dependent vasodilation in subjects with type 2 diabetes independent of obesity. *Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1946-1952.
9. Vallance P, Calver A, Collier J. The vascular endothelium in diabetes and hypertension. *J Hypertension Suppl* 1992; 10: 825-829.
10. Alexander RW, Dzau VJ. Vascular biology: the past 50 years. *Circulation* 2000; 102(20 Suppl 4): IV112-6.
11. Pieper GM, Dondlinger L. Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 238: 684-691.
12. Hambrecht R, Hilbrich L, Erbs S. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure. *J AM Coll Cardiol* 2000; 35: 706-713.
13. Henry HT, Farris KT, Kimberly SB, Shelly JC, Ganz P and Mark A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin invest* 1996; 97: 22-28.
14. Fuchsjäger-Mayrl G, Pleiner J, Wiesinger GF, Sieder AE. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1795-1801.
15. Walker LM, Shah SV, Mayeux PR. Lack of a role for inducible nitric oxide synthase in an experimental model of nephritic syndrome. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 137-43.
16. Sharifi A.M, Mousavi SH, Larijani B. Study of interaction between nitric oxide and ACE activity in STZ-induced diabetic rats: role of insulin. *Pharmacological Research* 2004; 50: 261-266.
17. Tavernavakis N, Driscoll M. Caloric restriction and life span: a role for protein turnover. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 215-229.
18. Weindruch R. Caloric restriction: Life span extension and retardation of brain aging. *Clin Neuro Res* 2003; 279-284.
19. Williams KV, Bertoldo A, Kinahan P, Cobelli C, and Kelley DE. Weight Loss-Induced Plasticity of Glucose Transport and Phosphorylation in the Insulin Resistance of Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 1619-1626.
20. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
21. Kristal BA, Yu BP. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and millard reactions. *J Gerontol Bio Sci* 1992; 47: B107-B114.
22. Walford RL, Spindler SR. The response to caloric restriction in mammals shows features also common to hibernation – a cross-adaptation hypothesis. *J Gerontol Biol Sci* 1997; 52: B179-B183.
23. Van Remmen H, Ward WF, Sabia RV, Richardson A. Gene expression and protein degradation. In: *Masoro E, ed. Handbook of Physiology:aging*. Oxford: Oxford University Press; 1995: 171-234.
24. Karelus K, Bergman. Neuroendocrine involvement in aging; evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 837-843.
25. Jones MA, Van Ness JM. Influence of food deprivation on sympathetic support of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Nutrition Research* 1998; 18: 1581-1594.
26. Notargiacomo AV, Freis ED. Effect of weight reduction diet on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1981; 176: 612-5.
27. Young JB, Mullen D. Caloric restriction lowers blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 1978; 27: 1711-1714.
28. Tuck ML, Sowers JR. Reductions in plasma catecholamines and blood pressure during weight loss in obese subjects. *Acta Endocrinologica* 1983; 102: 252-257.