

ارتباط سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید در موش‌های Balb/C چاق

نیلوفر شعبانی کیا^۱، هاجر سعیدی^۱، المیرا کلانتری^۱، زویا طاهر گورابی^۲، دکتر مجید خزاعی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نیتریک اکساید یکی از عوامل آزادشونده از اندوتلیوم است که اثرات متعددی بر عروق دارد. هدف این مطالعه، تعیین سطح سرمی نیتریک اکساید و ارتباط آن با سطح سرمی لپتین در موش‌های چاق و شاهد بود.

روش‌ها: تعداد ۱۲ موش از نژاد Balb/C به دو گروه تحت تغذیه با رژیم غذایی پر چرب (چربی ۶۰ درصد) و رژیم غذایی طبیعی (گروه شاهد) تقسیم شدند. پس از ۲۰ هفته، نمونه‌ی خونی از حیوانات گرفته و سطح سرمی نیتریک اکساید با استفاده از روش Griess و سطح سرمی لپتین اندازه‌گیری شد و ارتباط این دو عامل بررسی گردید.

یافته‌ها: وزن حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی پر چرب به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه چاق بالاتر از گروه شاهد بود و این تفاوت معنی‌دار بود ($17/62 \pm 2/6$ در مقابل $11/93 \pm 2/4$ میکرومول در لیتر؛ $P < 0/05$). سطح سرمی لپتین نیز در حیوانات چاق به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$) و ارتباط مثبتی بین سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید در گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت ($r = 0/78$).

نتیجه‌گیری: تغذیه‌ی موش‌ها با رژیم غذایی پر چرب سبب افزایش سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید در مقایسه با گروه شاهد می‌شود و ارتباط نزدیک و مثبتی بین سطح سرمی این دو عامل وجود دارد.

واژگان کلیدی: نیتریک اکساید، لپتین، چاقی

ارجاع: شعبانی کیا نیلوفر، سعیدی هاجر، کلانتری المیرا، طاهر گورابی زویا، خزاعی مجید. ارتباط سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید در

موش‌های Balb/C چاق. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۷): ۲۱۴۴-۲۱۴۹

مقدمه

بافت چربی دارای عروق بسیار وسیعی است؛ به طوری که هر سلول بافت چربی توسط یک یا بیشتر مویرگ احاطه می‌شود (۱). رشد سلول‌های چربی نیازمند تغییر شکل (Remodeling) در شبکه‌ی عروقی است. یکی از عواملی که از سلول‌های اندوتلیال

عروقی از جمله سلول‌های اندوتلیال بافت چربی آزاد می‌شود، نیتریک اکساید نام دارد. نیتریک اکساید در ابتدا به عنوان فاکتور شل‌کننده‌ی عروق مشتق از اندوتلیال (Endothelium-derived relaxing factor) شناخته شد، اما بعدها مشخص شد که نیتریک اکساید در بسیاری از فرایندهای هموستاتیک عروقی نقش

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: khazaei@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خزاعی

دارد (۲). نیتریک اکساید از ال-آرژینین و توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز ساخته می‌شود. سه نوع ایزوفرم نیتریک اکساید وجود دارد: ایزوفرم اندوتلیال (eNOS)، القایی (iNOS) و عصبی (nNOS) (۳). نیتریک اکساید سبب بهبود فرایند آترواسکلروز، کاهش پرولیفراسیون سلول‌های عضله‌ی صاف عروق و کاهش تجمع پلاکتی می‌شود (۴-۳)، اما یکی از اثرات مهم دیگر نیتریک اکساید، اثر آن بر پدیده‌ی آنژیوژنز یا رگ‌زایی است (۶-۵).

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که نیتریک اکساید اثر تحریکی بر فرایند آنژیوژنز دارد. بر اساس مطالعات انجام شده، رشد بافت چربی همانند سایر بافت‌ها وابسته به دانسیته‌ی عروقی است که تحت تأثیر تعدادی فاکتور رشد (Growth factor) مثل فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) یا فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF یا Fibroblast growth factors) قرار دارد (۷، ۱). با توجه به اثرات محرک آنژیوژنزی نیتریک اکساید می‌توان انتظار داشت این عامل در رشد بافت چربی یا آدیپوژنز نقش داشته باشد. هدف این مطالعه، بررسی سطح سرمی نیتریک اکساید در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پر چرب و رژیم عادی بود و از آن جا که لپتین یک هورمون مترشح‌ه از بافت چربی است در این مطالعه ارتباط سطح لپتین با میزان نیتریک اکساید سرم نیز بررسی شد.

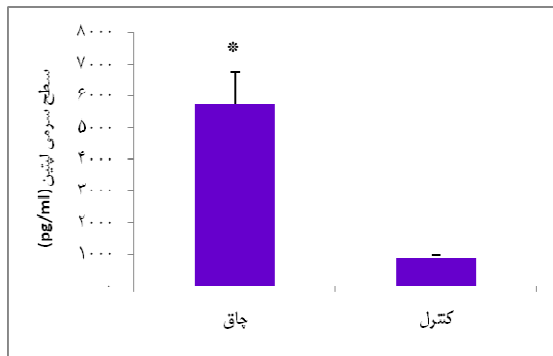
روش‌ها

تعداد ۱۲ موش از نژاد Balb/C از انستیتو پاستور خریداری شدند. موش‌ها در سن ۴ هفته بودند و به لانه‌ی حیوانات گروه فیزیولوژی دانشکده‌ی پزشکی

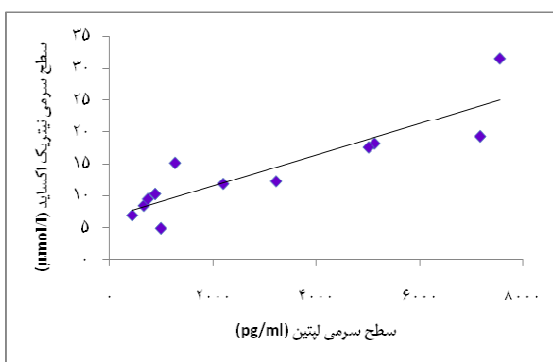
اصفهان منتقل شدند. پس از یک هفته تطابق با لانه‌ی حیوانات، حیوانات به دو گروه تحت تغذیه با رژیم غذایی پر چرب (چربی ۶۰ درصد، کربوهیدرات ۲۰ درصد و پروتئین ۲۰ درصد) و تغذیه شده با رژیم غذایی طبیعی قرار گرفتند (۸). رژیم غذایی پر چرب از شرکت Bioserve تهیه گردید. حیوانات به مدت ۲۰ هفته تحت درمان با رژیم‌های فوق قرار گرفتند. در طول مطالعه، حیوانات در دمای بین ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داشتند و دسترسی کامل به آب و غذا داشتند. کمیته‌ی اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان فرایند اجرایی این مطالعه را تأیید کرد.

وزن حیوانات هر هفته اندازه‌گیری و پس از ۲۰ هفته، نمونه‌ی خونی از آن‌ها گرفته شد. نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سرم‌های به دست آمده در دمای کمتر از ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

سطح سرمی نیتریک اکساید با استفاده از کیت شرکت Promega Corp اندازه‌گیری شد. در این کیت، سطح سرمی نیتریک اکساید با استفاده از روش Griess اندازه‌گیری می‌شود. سطح سرمی نیتریک اکساید نمونه‌ها با استفاده از مقایسه‌ی آن با منحنی استاندارد به دست آمد. سطح سرمی لپتین با استفاده از کیت ELISA اندازه‌گیری گردید (Invitrogen Co, USA). داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد. تفاوت داده‌ها بین دو گروه با استفاده از آزمون Student-t مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی ارتباط بین نیتریک اکساید و لپتین از ضریب Pearson استفاده شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶



شکل ۲. سطح سرمی نیتریک اکساید در حیوانات چاق و شاهد (*: $P < 0/05$ در مقایسه با گروه شاهد)



شکل ۳. ارتباط سطح سرمی نیتریک اکساید و لپتین در موش‌های مورد بررسی ($r = 0/78$)

بحث

هدف این مطالعه، بررسی سطح سرمی نیتریک اکساید و لپتین و نیز ارتباط این دو عامل در موش‌های چاق و شاهد بود. نتایج نشان داد سطح سرمی نیتریک اکساید و لپتین در موش‌های چاق نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. به علاوه، ارتباط خوبی بین این دو عامل در موش‌های مورد مطالعه دیده شد.

نیتریک اکساید یک فاکتور آزادشونده‌ی از اندوتلیوم است که اثرات متعددی بر عروق دارد. یکی از این اثرات، اثر محرک آنژیوژنزی نیتریک اکساید است که می‌تواند بر روی رشد بافت چربی مؤثر باشد (۵). شواهد نشان داده است که سلول‌های اندوتلیال مویرگی از طریق مسیره‌های سیگنالینگ پاراکرین با

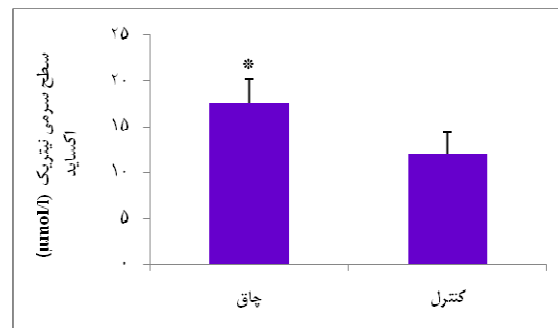
ارتباط سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید در موش‌های چاق (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

وزن موش‌های گروه چاق قبل و پس از مطالعه به ترتیب $15/3 \pm 0/36$ و $29 \pm 2/12$ گرم و در موش‌های شاهد به ترتیب $15/46 \pm 0/47$ و $24 \pm 1/84$ گرم بود ($P < 0/05$). وزن حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی پر چرب بعد از مداخله به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). بررسی سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه‌های آزمایش نشان داد که سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه چاق بالاتر از گروه شاهد بود و این تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (شکل ۱).

شکل ۲ سطح سرمی لپتین را در دو گروه نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود سطح سرمی لپتین در حیوانات چاق به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$) (شکل ۲).

بررسی ارتباط بین سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید نشان داد که ارتباط زیادی بین این دو عامل در کل موش‌های مورد مطالعه وجود داشت (شکل ۳) ($r = 0/78$).



شکل ۱. سطح سرمی نیتریک اکساید در حیوانات چاق و شاهد (*: $P < 0/05$ در مقایسه با گروه شاهد)

افزایش بیان VEGF می‌شود و همانند VEGF موجب افزایش تعداد مویرگ‌های پنجره‌دار به خصوص در بافت چربی می‌شود (۱۶). همچنین لپتین اثرات سینرژیک در ایجاد اثرات آنژیوژنزی VEGF و FGF دارد (۱۷).

نتیجه‌گیری

تغذیه‌ی موش‌ها با رژیم غذایی پر چرب سبب افزایش سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید در مقایسه با گروه شاهد می‌شود و ارتباط قوی و مثبتی بین سطح سرمی این دو عامل وجود دارد. به علاوه نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط زیادی بین سطح سرمی لپتین و نیتریک اکساید وجود دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بابت تأمین هزینه‌های این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

سلول‌های آدیپوسیت در ارتباط هستند و می‌توانند اثرات مستقیمی بر یکدیگر داشته باشند (۹). مطالعات قبلی نشان داده است که آنژیوژنز می‌تواند پدیده‌ی آدیپوژنز و فرایند چاقی را تعدیل نماید (۱۰). در این مطالعه نتایج ما نشان داد که سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه چاق بالاتر از گروه شاهد بود. نتایج مشابه آن در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است (۱۱-۱۳)، اگر چه در برخی از مطالعات نیز تفاوتی در سطح نیتریک اکساید افراد چاق و سالم مشاهده نشده است (۱۴).

لپتین یک هورمون ۱۶ کیلودالتونی است که توسط بافت چربی تولید می‌شود و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را تقویت می‌کند (۱). بنابراین انتظار می‌رود با افزایش توده‌ی چربی، سطح لپتین پلاسما بالا باشد. این موضوع در مطالعات قبلی که بر روی افراد چاق یا مدل‌های چاقی انجام شده است نیز نشان داده شده است (۱۵).

لپتین نه تنها اثرات پروآنژیوژنیک دارد بلکه سبب

References

1. Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res* 2008; 78(2): 286-93.
2. Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2006; 45(5): 268-76.
3. Calver A, Collier J, Vallance P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol* 1993; 78(3): 303-26.
4. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(Pt 3): 593-615.
5. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* 2002; 105(18): 2133-5.
6. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000; 50(1-2): 139-48.
7. Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 318(1-2): 2-9.
8. Masi LN, Martins AR, Rosa Neto JC, do Amaral CL, Crisma AR, Vinolo MA, et al. Sunflower oil supplementation has proinflammatory effects and does not reverse insulin resistance in obesity induced by high-fat diet in C57BL/6 mice. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 945131.
9. Bouloumie A, Lolmede K, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M. Angiogenesis in adipose tissue. *Ann Endocrinol (Paris)* 2002; 63(2 Pt 1): 91-5.
10. Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2362-8.
11. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Zurakowski A. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism* 2004; 53(10): 1268-73.

12. Codoner-Franch P, Tavaréz-Alonso S, Murria-Estal R, Megias-Vericat J, Tortajada-Girbes M, Alonso-Iglesias E. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* 2011; 215(2): 475-80.
13. Hamed EA, Zakary MM, Ahmed NS, Gamal RM. Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94(3): 434-41.
14. Konukoglu D, Serin O, Turhan MS. Plasma leptin and its relationship with lipid peroxidation and nitric oxide in obese female patients with or without hypertension. *Arch Med Res* 2006; 37(5): 602-6.
15. Balwierz A, Polus A, Razny U, Wator L, Dyduch G, Tomaszewska R, et al. Angiogenesis in the New Zealand obese mouse model fed with high fat diet. *Lipids Health Dis* 2009; 8: 13.
16. Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, et al. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 2004; 53(9): 2443-8.
17. Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(11): 6390-5.

Correlations between Serum Leptin and Nitric Oxide Concentrations in Obese and Control BALB/c Mice

Niloofer Shabanikia¹, Hajar Saeidi¹, Elmira Kalantari¹, Zoya Tahergorabi MSc²,
Majid Khazaei MD, PhD³

Original Article

Abstract

Background: Nitric oxide (NO) is an endothelium-derived relaxing factor with several effects on vascular structure. The aim of this study was to investigate the correlation between serum leptin and nitric oxide concentrations in obese and control BALB/c mice.

Methods: Twelve male BALB/C mice were allocated to control and obese groups. Obesity was induced by administration of a high fat diet (60% fat) for 20 weeks. The control group received normal diet during the study. After 20 weeks, blood samples were taken and serum NO and leptin concentrations were measured. Correlations between the measured factors and obesity were evaluated.

Findings: Body weight of obese mice was significantly higher than controls. Serum NO concentration in obese animals was higher than the control group (17.62 ± 2.60 vs. 11.93 ± 2.40 $\mu\text{mol/l}$; $P < 0.05$). Serum leptin was also higher in obese animals compared to the control group. There was also a positive correlation between serum leptin and NO concentrations ($r = 0.78$).

Conclusion: Diet-induced obesity caused significant increases in serum NO and leptin concentrations. Moreover, a positive correlation between serum NO and leptin levels was detected.

Keywords: Nitric oxide, Leptin, Obesity

Citation: Shabanikia N, Saeidi H, Kalantari E, Tahergorabi Z, Khazaei M. **Correlations between Serum Leptin and Nitric Oxide Concentrations in Obese and Control BALB/c Mice.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(217): 2144-9

* This paper is derived from a medical doctorate thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- PhD Student, Department of Physiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Khazaei MD, PhD, Email: khazaei@med.mui.ac.ir