

Effect of Glutamine on Oxidative Stress, Inflammatory, and Glycation Markers, and the Activity of Glyoxalase System in Diabetic Rats with Atherosclerosis

Sina Mahdavi¹,
Manochehr Nakhjavani²

¹ Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

² Professor, Endocrinology and Metabolism Research Center, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 26, 2018 ; Accepted September 17, 2018)

Abstract

Background and purpose: Vascular complications of diabetes are the most common causes of mortality in diabetic patients. Hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, glycation products, oxidative stress, and inflammation lead to atherosclerosis and diabetic nephropathy in diabetes. This research aimed at studying the effect of glutamine (Gln) on main causes of vascular complications in diabetic rats with atherosclerosis.

Materials and methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats were divided into four groups, including a control group, diabetic atherosclerosis group, and two similar groups under Gln (0.1% in drinking water) treatment. The following items were measured in all groups: fasting blood sugar, insulin, insulin resistance index, lipid profile, the activity of glyoxalase system (GLO), markers of glycation (glycated albumin, glycated LDL, glyoxal, methylglyoxal, and advanced glycation end products), oxidative stress markers (malondialdehyde and advanced oxidation end products), inflammatory markers (interleukine-6 and tumor necrosis factor- α), serum creatinine, 24-hour urine protein excretion, and kidney weight index.

Results: In diabetic-atherosclerotic group Gln reduced fasting blood sugar, insulin resistance, triglyceride level, total cholesterol, atherogenic index, markers of glycation, oxidative stress, and inflammation. The levels of Cr, 24-hour urine protein excretion, and kidney weight index were lower in treated diabetic-atherosclerotic rats than the untreated group. Gln showed elevating effect on the activity of GLO system in diabetic-atherosclerotic group ($p < 0.001$).

Conclusion: Glutamine improved glucose and lipid metabolism, reduced glycation, oxidative stress, and inflammation and induced the activity of glyoxalase system. Therefore, it could have preventive effect on vascular complications of diabetes.

Keywords: diabetes, atherosclerosis, glutamine, glycated products, oxidative stress, inflammation, glyoxalase system

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (170): 33-42 (Persian).

Corresponding Author: Sina Mahdavi¹- School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. (E-mail: s.mahdavi@arums.ac.ir)

اثر گلوتامین بر شاخص های استرس اکسیداتیو، التهابی گلیک و همچنین فعالیت سیستم گلی اوکسیلاز در موش های صحرایی دیابتی- آترواسکلروزی

سینا مهدوی فرد^۱
منوچهر نخجوانی^۲

چکیده

سابقه و هدف: اختلالات عروقی دیابت علت بیشترین میزان مرگ در افراد دیابتی است. افزایش قند خون، مقاومت انسولین، اختلالات لیپیدی، محصولات گلیک، استرس اکسیداتیو و التهاب، زمینه ساز آترواسکلروز و اختلالات کلیوی در دیابت هستند. این مطالعه با هدف بررسی اثر اسید آمینه گلوتامین بر عوامل زمینه ساز اصلی اختلالات عروقی در موش های صحرایی دیابتی- آترواسکلروزی، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش به چهار گروه شامل گروه شاهد، گروه دیابتی- آترواسکلروزی و دو گروه مشابه تحت تیمار با اسید آمینه گلوتامین (۰/۱ درصد در آب خوری) به مدت سه ماه تقسیم شدند. از موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین تحت رژیم غذایی آتروژنی به عنوان مدل دیابتی- آترواسکلروزی استفاده شد. قندخون ناشتا، انسولین، شاخص مقاومت انسولین، پروفایل لیپیدی، فعالیت سیستم گلی اوکسیلاز و شاخص های گلیک شامل آلبومین و LDL گلیک، گلی اوکسال و متیل گلی اوکسال و محصولات نهایی گلیک پیشرفته، شاخص های استرس اکسیداتیو شامل مالون دی آلدئید و محصولات پیشرفته اکسیداسیون پروتئین ها، شاخص های التهابی شامل فاکتور نکروز موتور-آلفا و اینترلوکین-۶ و همچنین کراتینین سرم، دفع پروتئین ادرار ۲۴ ساعته و شاخص وزن کلیه در همه گروه ها اندازه گیری شد.

یافته ها: گلوتامین میزان قند ناشتای سرم، مقاومت انسولین، تری گلیسرید، کلسترول تام و شاخص آتروژنی، شاخص های گلیک، استرس اکسیداتیو و التهابی را در گروه دیابتی- آترواسکلروزی کاهش داد. مقادیر کراتینین سرم، دفع پروتئینی ادرار ۲۴ ساعته و شاخص وزن کلیه در موش های دیابتی- آترواسکلروزی تحت تیمار پایین تر از موش های دیابتی- آترواسکلروزی بدون تیمار بود. گلوتامین بر فعالیت سیستم گلی اوکسیلاز در گروه دیابتی- آترواسکلروزی اثر افزایش دهنده نشان داد ($p < 0/001$).

استنتاج: گلوتامین با بهبود متابولیسم قند و لیپید، افزایش فعالیت سیستم گلی اوکسیلاز و همچنین کاهش روندهای گلیک، استرس اکسیداتیو و التهابی می تواند اثر پیشگیرنده بر اختلالات عروقی دیابت داشته باشد.

واژه های کلیدی: دیابت، آترواسکلروز، گلوتامین، محصولات گلیک، استرس اکسیداتیو، التهاب، سیستم گلی اوکسیلاز

مقدمه

اختلالات عروقی به ویژه آترواسکلروز و نارسایی کلیوی شایع ترین علت مرگ در بیماران دیابتی است و چرخه گلیک، استرس اکسیداتیو و التهاب زمینه ساز آغاز و پیشرفت اختلالات عروقی دیابت است (۱، ۲).

E-mail: fard635@gmail.com

مؤلف مسئول: سینا مهدوی فرد- اردبیل: دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی

۱. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات بیماری های متابولیک و غدد درون ریز، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۴/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۲۶

نفروباتی در موش‌های صحرایی دیابتی و اثر محافظتی آن بر بافت کلیه در برابر سمیت کلیوی استامنیوفن نشان داده شده است (۱۴،۱۰-۱۲). با توجه به اهمیت استفاده از مواد طبیعی و سازگار با سلامت، در مطالعه قبلی ما اثرات اسیدآمین‌های سیستمین و گلیسین در موش صحرایی دیابتی-آترواسکلروزی مورد بررسی قرار گرفت (۱۵،۲). این مطالعه با هدف بررسی اثر گلوتامین بر ایجاد محصولات گلیک، استرس اکسیداتیو و التهاب و همچنین فعالیت سیستم گلی‌اوکسیلاز در موش‌های صحرایی دیابتی-آترواسکلروزی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، با تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اردبیل با کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1396.97 و با رعایت استانداردهای اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، موش‌های صحرایی نر (۸ هفته) از نژاد ویستار آلبینو با وزن ۲۰۰-۱۸۵ گرم از انستیتو پاستور ایران، کرج، خریداری و تحت شرایط دمایی کنترل شده، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اردبیل نگهداری شدند. بعد از دو هفته سازگاری با شرایط، در نیمی از موش‌ها با تزریق استرپتوزوتوسین به میزان ۴۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن دیابت القا شد و به مابقی فقط سرم فیزیولوژی تزریق گردید. سه روز بعد از تزریق، قند خون در رت‌ها اندازه‌گیری شد و مواردی که قند بالای ۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر داشتند، به عنوان مدل دیابتی پذیرفته شدند. موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی، گروه کنترل و دیابتی و گروه کنترل و دیابتی دریافت کننده گلوتامین به ترتیب (کنترل + گلوتامین) و (دیابتی + گلوتامین) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی کنترل (گروه‌های ۱ و ۲) تا پایان مطالعه با غذای استاندارد تغذیه شدند. به دو گروه دیابتی به منظور ایجاد آترواسکلروز، غذای آتروژن طبق مدل وسترن حاوی

محصولات ابتدایی (آلبومین و LDL گلیک)، میانی (ترکیبات دی-کربونیل مانند گلی اوکسال و متیل گلی اوکسال) و نهایی گلیک با ایجاد و گسترش استرس اکسیداتیو و التهاب در نارسایی سلول‌های بتا-پانکراس، مقاومت انسولین و اختلالات دیابت نقش اساسی دارند (۳). مقاومت انسولین و افزایش تولید محصولات نهایی گلیک پیشرفته، زمینه ساز اختلالات متابولیکی لیپیدها، استرس اکسیداتیو و اختلالات عملکردی سلول‌های اندوتلیال هستند. ترکیبات دی-کربونیل ۲۰۰-۵۰۰۰ برابر گلوکز قابلیت گلیک کردن بیومولکول‌های زیستی را دارند و هم‌چنین این ترکیبات از طریق تولید محصولات نهایی گلیک پیشرفته (AGEs)، افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال در گیرنده‌های فاکتور رشد مشتق از پلاکت در ایجاد پدیده آترواسکلروز نقش مهمی را ایفا می‌نمایند (۴). ترکیبات دی-کربونیل به ویژه متیل گلی اوکسال، منجر به گلیک شدن LDL شده و از این طریق قابلیت اکسید شونده‌گی آن را می‌افزایند. ویژگی پیش آتروژنی LDL اکسیده با گلیک شدن آن افزایش می‌یابد (۵). مهم‌ترین عامل در کاهش میزان ترکیبات دی-کربونیل به ویژه متیل گلی اوکسال و محصولات پیشرفته نهایی گلیک سیستم آنزیمی گلی‌اوکسیلاز است، ولی متاسفانه فعالیت این سیستم در دیابت کاهش می‌یابد (۲،۶،۷).

گلوتامین فراوان‌ترین اسید آمینه مایعات بیولوژیک و ضروری در وضعیت‌های آنابولیک و کاتابولیک است (۹،۸). شواهد نشان می‌دهد اسید آمینه گلوتامین در نگهداری و عملکرد بسیاری از بافت‌ها مانند کبد، کلیه، عصب و روده همچنین سلول‌های ایمنی و بتای پانکراس نقش دارد و احتمالاً کاهش میزان پلاسمایی این اسید آمینه منجر به اختلال در ترشح و عملکرد انسولین می‌گردد (۱۱،۱۰). اثر گلوتامین بر بهبود حساسیت انسولین و تحمل گلوکز در مدل‌های حیوانی، چاقی و بیماران دیابتی نوع یک گزارش شده است و همچنین اثر پیشگیرنده این اسید آمینه بر گسترش اختلالات قلبی و

میزان دفع ادراری پروتئین در ادرار ۲۴ ساعته با روش کدورت سنجی براساس خواندن جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. نحوه سنجش دفع پروتئین در مطالعه قبلی ما بیان شد (۷). شاخص وزن کلیه با تقسیم وزن کلیه راست موش‌های صحرایی بر وزن بدن آن‌ها تعیین گردید.

سنجش محصولات ابتدای، میانی و نهایی گلیک

میزان محصولات اولیه گلیک مانند آلبومین گلیک و LDL گلیک براساس روش نورسنجی اندازه گیری گردید. غلظت آلبومین گلیک براساس احیا ماده نیتروبلو ترازولیوم و خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ سنجیده شد (۱۷). میزان LDL گلیک به وسیله آزمون تیوباریتوریک اسید براساس تشکیل ماده ۵- هیدوکسی متیل فورفورال با خواندن جذب نمونه‌ها در ۴۳۰ نانومتر تعیین گردید (۱۸). روش استخراج آلبومین و LDL از سرم و چگونگی سنجش میزان گلیک آن‌ها در مطالعه قبلی ما بیان شده است (۲). محصولات میانی گلیک مانند گلی اوکسال و متیل گلی اوکسال با روش HPLC فاز معکوس و قرائت جذب در طول موج ۳۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. فاز متحرک، بافر فسفات + استونیتریل + بوتانول (با نسبت ۸:۳۲:۶۰) و روش ایزو گرادینت بود. جهت سنجش از دستگاه HPLC شرکت KNAUER (آلمان) استفاده گردید (۱۹). مقدار محصولات نهایی پیشرفته گلیک (AGEs) براساس جذب فلورومتري، در طول موج تابشی ۴۴۰ نانومتر و طول موج تحریکی ۳۷۰ نانومتر سنجیده شد (۲۰). چگونگی سنجش محصولات نهایی گلیک در تحقیقات قبلی ما ارائه شده است (۲۱،۷).

سنجش شاخص های استرس اکسیداتیو و التهابی

دیان کونزوگه از طریق خواندن جذب نمونه‌ها در ۲۳۴ نانومتر و محصولات فلورسنت حاصل از اکسیداسیون آپو ۱۰۰ B- براساس جذب فلورسنت در طول موج تابشی و طول موج تحریکی به ترتیب ۴۳۰ و ۳۶۰ سنجیده

یک درصد کلسترول و نیم درصد اسید کولیک داده شد. براساس مطالعه قبلی و تجارب به دست آمده از تحقیقات در مطالعه حاضر، گروه‌های تحت تیمار به میزان ۰/۱ درصد گلوتامین در آب خوراکی به مدت سه ماه دریافت کردند (۱۶). براساس مطالعات قبلی ما قرار گرفتن موش‌های صحرایی دیابتی به مدت سه ماه تحت غذای آتروژن برای ایجاد پلاک‌های آترواسکلروزی کافی است (۷،۲).

جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته، خون و بافت

برای جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته یک هفته پیش از پایان مطالعه، موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در قفس متابولیک قرار داده شدند. موش‌های صحرایی پس از ۱۶ ساعت ناشتایی، به وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین (به ترتیب ۹۰ و ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش شدند. نمونه خون از قلب آن‌ها جمع آوری شد و در لوله‌های دارای ضد انعقاد EDTA و بدون ضد انعقاد جمع آوری گردید. نمونه‌های سرم پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۵۰۰۰، نیروی سانتریفیوژی آن‌ها جدا و تا زمان سنجش در فریزر در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. کلیه راست موش‌های صحرایی جدا و وزن شدند.

سنجش قند، پروفایل لیپیدی و شاخص های عملکرد کلیه

قند خون ناشتا، تری گلیسرید، کلسترول و HDL کراتینین به روش آنزیمی با کیت‌های شرکت پارس آزمون سنجش شد. میزان LDL به وسیله معادله فریدوال و شاخص آتروژنی از طریق تقسیم میزان LDL بر HDL محاسبه گردید. انسولین سرم با کیت الیزا (MercoDIA, Uppsala, Sweden) اندازه گیری شد و شاخص مقاومت انسولین، (homeostasis HOMA-IR) (model assessment of insulin resistance) براساس معادله ۱ تعیین گردید.

$$\text{معادله ۱: } \text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glucose (mg/dl)} \times \text{Insulin (uU/ml)}}{405}$$

یافته ها

نتایج قندخون ناشتا، انسولین، شاخص مقاومت انسولین (HOMA)، پروفایل لیپیدی شامل تری گلیسرید، کلسترول تام، HDL، LDL و شاخص آتروژنی همچنین شاخص‌های عملکرد کلیه شامل کراتینین سرم، دفع ادراری پروتئین ۲۴ ساعته و شاخص وزن کلیه در جدول شماره ۱ بیان شده است. میزان این متغیرها به جز انسولین و HDL در گروه دیابتی-آترواسکلروزی بالاتر از گروه کنترل بود و در گروه دیابتی-آترواسکلروزی تحت تیمار با گلوتامین نسبت به گروه دیابتی بدون تیمار، میزان همه متغیرها به جز انسولین و HDL پائین تر بوده است ($p < 0/001$).

مقایسه غلظت محصولات گلیکته (آلبومین گلیکته، LDL گلیکته، گلی اوکسال، متیل گلی اوکسال و AGEs) شاخص‌های استرس اکسیداتیو (محصولات ابتدایی و نهایی اکسیداسیون LDL، محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین‌ها و مالون دی آلدئید) فاکتورهای التهابی ($TNF-\alpha$ و IL-6) در گروه‌های کنترل و دیابتی در اثر تیمار با گلوتامین در جدول شماره ۲ بیان شده است. مقادیر گلی اوکسال، متیل گلی اوکسال، AGEs و همچنین $TNF-\alpha$ و IL-6 در گروه‌های کنترل و دیابتی-آترواسکلروزی کم‌تر از گروه‌های بدون تیمار بوده است. گلوتامین بر سایر متغیرها تنها در گروه دیابتی-آترواسکلروزی تحت تیمار اثر کاهنده نشان داد ($p < 0/001$).

شد. دیان کونژوگه و محصولات فلورسنت به ترتیب نشانگر اکسیداسیون ابتدایی و نهایی LDL هستند (۲۲). سنجش محصولات پیشرفته پروتئین اکسیده یا AOPP بر اساس روش اسپکتوفتومتری در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد (۲۳). غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از تیوباریتوریک اسید و خواندن جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید. چگونگی سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در مقالات قبلی ما بیان شده است (۲۴، ۲۵). فاکتورهای التهابی اینترلوکین-۶ (IL-6) و فاکتور نکروز تومور-آلفا ($TNF-\alpha$) با کیت‌های الیزا (Immunotech, France) اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم‌های سیستم گلی اوکسیلاز (گلی اوکسیلاز ۱ و ۲) فعالیت آنزیم‌های گلی اوکسیلاز ۱ و ۲ گلبول‌های قرمز بر اساس تشکیل و تجزیه لاکتوئیل گلوکوتائون و خواندن میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۵). نحوه سنجش آنزیم‌های گلی اوکسیلاز در مطالعه قبلی ما تشریح شده است (۷).

تمامی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($mean \pm SD$) ارائه شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس چندگانه یا چند متغیری (MANOVA-Tukey) که یک روش یک طرفه درون گروهی برای مقایسه چند متغیر است، در نرم‌افزار SPSS 16 استفاده گردید و $p < 0/05$ برای تمام سنجش‌ها معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: اثر گلوتامین بر میزان قند خون ناشتا، انسولین، شاخص مقاومت انسولین، پروفایل لیپیدی و شاخص‌های عملکرد کلیه در گروه‌های کنترل و دیابتی - آترواسکلروزی

پارامتر	کنترل	کنترل (گلوتامین)	دیابتی - آترواسکلروزی	دیابتی - آترواسکلروزی (گلوتامین)
گلوکز ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸۹/۶۷ \pm ۶/۰۱	۷۳/۲۹ \pm ۵/۸۳	۲۶۳/۱۰ \pm ۱۵/۹۴*	۱۶۷/۴۸ \pm ۸/۱۳**
انسولین (میکرو واحد بر میلی لیتر)	۱۹/۲۲ \pm ۱/۳۶	۲۰/۱۵ \pm ۱/۵۴	۹/۳۵ \pm ۰/۳۸*	۱۲/۴۷ \pm ۰/۵۹**
شاخص مقاومت انسولین	۴/۳۶ \pm ۰/۳۷	۳/۷۹ \pm ۰/۲۹	۶/۰۷ \pm ۰/۵۲*	۵/۲۵ \pm ۰/۴۳**
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۹۰/۸۶ \pm ۵/۹۴	۷۸/۸۰ \pm ۴/۰۹	۳۷۸/۱۰ \pm ۱۳/۰۴*	۱۳۹/۵۱ \pm ۷/۰۲**
کلسترول تام (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۰۱/۳۵ \pm ۶/۸۴	۸۷/۹۱ \pm ۵/۰۲	۲۶۸/۲۵ \pm ۲۴/۸۷*	۱۶۴/۵۱ \pm ۱۱/۰۹**
HDL (میلی گرم بر دسی لیتر)	۵۶/۳۷ \pm ۲/۶۷	۵۹/۷۱ \pm ۳/۰۹	۳۳/۲۵ \pm ۲/۰۷*	۴۱/۵۱ \pm ۲/۸۵**
LDL (میلی گرم بر دسی لیتر)	۲۳/۶۱ \pm ۱/۹۵	۲۰/۸۱ \pm ۲/۰۳	۱۷۹/۴۲ \pm ۸/۳۲*	۹۹/۰۱ \pm ۵/۰۷**
شاخص آتروژنی	۰/۴۲ \pm ۰/۰۳	۰/۳۴ \pm ۰/۰۳	۰/۳۹ \pm ۰/۰۳*	۰/۳۸ \pm ۰/۰۲**
کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر)	۰/۶۷ \pm ۰/۰۵	۰/۷۱ \pm ۰/۰۵	۱/۲۵ \pm ۰/۰۷*	۱/۵۱ \pm ۰/۰۹**
میزان دفع پروتئین در ادرار ۲۴ ساعته (میلی گرم بر دسی لیتر در ۲۴ ساعت)	۱۴/۴۵ \pm ۰/۷۸	۱۳/۰۵ \pm ۰/۹۴	۲۹۸/۶۷ \pm ۱۶/۱۲*	۸۶/۵۹ \pm ۴/۹۱**
شاخص وزن کلیه (گرم بر ۱۰۰ گرم وزن بدن)	۰/۷۷ \pm ۰/۰۶	۰/۸۳ \pm ۰/۰۵	۱/۲۳ \pm ۰/۱۲*	۰/۹۹ \pm ۰/۰۹**

*: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($P < 0/001$).

#: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی-آترواسکلروزی ($p < 0/001$) می‌باشد. روش آماری MANOVA و آزمون Tukey (تعداد در هر گروه ۱۰ سر موش صحرایی).

جدول شماره ۲: مقایسه غلظت محصولات گلیک شایع استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی در تمام گروه‌های کنترل و دیابتی - آترواسکلروزی بعد از سه ماه دریافت گلوتامین،

گروه				پارامتر
دیابتی - آترواسکلروزی	دیابتی - آترواسکلروزی (گلوتامین)	کنترل (گلوتامین)	کنترل	
۲۲۳/۲۶ ± ۸۱/۳۸ [#]	۳۹۸/۲۵ ± ۱۷۱/۰۶*	۸۸/۲۹ ± ۴/۸۳	۹۵/۱۳ ± ۶/۴۳	آلبومین گلیک (میکرومول بر لیتر)
۱۰۲/۹۲ ± ۶۱/۰۵ [#]	۱۶۷/۳۳ ± ۹/۳۸*	۴۳/۳۳ ± ۹/۵۴	۴۹/۴۳ ± ۴/۰۶	LDL گلیک (میکرومول بر لیتر)
۵۶/۴۴ ± ۵/۴۱ [#]	۱۱۵/۰۴ ± ۷/۰۹*	۹/۹۳ ± ۰/۶۹*	۱۴/۹۵ ± ۰/۷۷	گلی اوکسال (میکرومول بر لیتر)
۳۸/۹۲ ± ۲/۶۵ [#]	۱۰۴/۱۸ ± ۶/۳۱*	۱۱/۵۶ ± ۰/۷۶*	۱۷/۸۱ ± ۰/۸۰	متیل گلی اوکسال (میکرومول بر لیتر)
۹۸/۹۱ ± ۵/۶۵ [#]	۳۲۱/۱۸ ± ۱۶/۳۱*	۴۴/۵۶ ± ۲/۸۶*	۵۵/۱۹ ± ۳/۰۱	محصولات نهایی گلیک پیشرفته (واحد قراردادی)
۳۵/۶۴ ± ۲/۶۵ [#]	۹۱/۴۵ ± ۴/۳۱*	۱۳/۵۳ ± ۰/۹۱*	۱۵/۱۹ ± ۱/۰۳	محصولات ابتدایی LDL اکسیده
۳۳۸/۵۱ ± ۱۲/۷۵ [#]	۶۸۸/۲۵ ± ۲۹/۳۱*	۱۹۶/۰۱ ± ۸/۰۹	۲۰/۵۱ ± ۸/۰۶	(میکرومول بر لیتر)
۳۷/۲۴ ± ۱/۰۷ [#]	۶۹/۴۵ ± ۳/۳۳*	۲۰/۰۱ ± ۱/۶۰	۳۳/۶۱ ± ۱/۷۵	محصولات نهایی LDL اکسیده (واحد قراردادی)
۸۹/۸۴ ± ۴/۶۷ [#]	۱۶۶/۲۰ ± ۹/۷۴*	۱۰/۰۱ ± ۰/۵۳	۱۲/۴۰ ± ۰/۶۶	محصولات اکسیداسیون پیشرفته پروتئین‌ها (میکرومول بر لیتر)
۱۸۹/۸۴ ± ۹/۸۵ [#]	۲۶۶/۹۱ ± ۲۴/۷۴*	۸۷/۰۱ ± ۴/۱۴	۱۰/۲۳ ± ۵/۷۳	مالون دی آلدئید (میکرومول بر لیتر)
۱۵۵/۹۶ ± ۷/۶۳ [#]	۲۹۴/۲۰ ± ۲۳/۵۰*	۱۰/۷۷۱ ± ۶/۵۹	۱۳۲/۱۱ ± ۷/۳۲	ایترلوکین-۶ (میکرومول بر لیتر)

*: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($P < 0/001$),

#: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی - آترواسکلروزی ($p < 0/001$) می‌باشد. روش آماری MANOVA و آزمون Tukey (تعداد در هر گروه ۱۰ سر موش صحرایی).

بحث

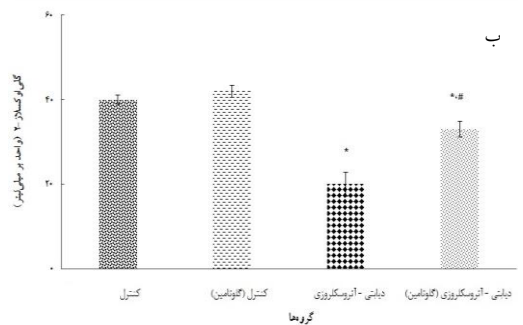
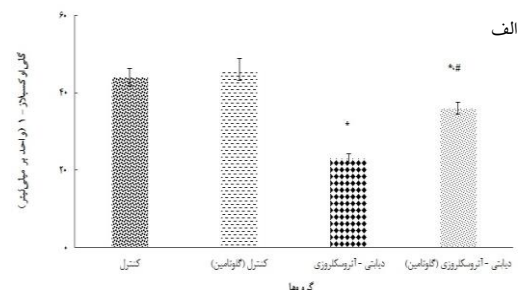
در این مطالعه، برای اولین بار اثر گلوتامین بر محصولات مختلف گلیک، استرس اکسیداتیو، التهاب و فعالیت سیستم گلی اوکسیلاز در موش‌های صحرایی مدل دیابتی - آترواسکلروزی مورد بررسی قرار گرفت. گلوتامین منجر به کاهش محصولات ابتدایی، میانی و نهایی گلیک، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و التهاب گردید. این اسید آمینه متابولیسم قند و لیپید، کارکرد کلیه و فعالیت سیستم گلی اوکسیلاز را در موش‌های صحرایی دیابتی - آترواسکلروزی بهبود بخشید.

در موش‌های صحرایی دیابتی - آترواسکلروزی تحت درمان با گلوتامین نسبت به گروه بدون تیمار کاهش گلوکز ناشتا و مقاومت انسولین با افزایش ترشح انسولین همراه بوده است (جدول شماره ۱) ($p < 0/001$). به نظر می‌رسد گلوتامین با کاهش گلوکونئوز، افزایش گلیکوژن، تامین آلانین برای سلول‌های بتا - پانکراس و کاهش اسیدهای چرب آزاد پلاسما منجر به کاهش قند خون، بهبود عملکرد سلول‌های بتا و کاهش مقاومت انسولین می‌گردد (۲۶، ۱۶). کاهش میزان قند خون افراد دیابتی نوع دو و موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک در اثر تیمار با گلوتامین قبلاً گزارش شده است (۲۸، ۲۷).

محصولات ابتدایی تا نهایی گلیک با زمینه‌سازی و تشدید استرس اکسیداتیو و التهاب در نارسایی سلول‌های

اثر گلوتامین بر فعالیت آنزیم‌های گلی اوکسیلاز ۱

و ۲ در همه گروه‌ها در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم‌های گلی اوکسیلاز در گروه دیابتی - آترواسکلروزی نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود ولی گلوتامین بر فعالیت این آنزیم‌ها در گروه‌های دیابتی - آترواسکلروزی اثر افزایش‌دهنده داشت ($p < 0/001$).



نمودار شماره ۱: فعالیت آنزیم‌های گلی اوکسیلاز-۱ و گلی اوکسیلاز-۲ در گروه‌های کنترل و دیابتی - آترواسکلروزی، الف: گلی اوکسیلاز-۱، ب: گلی اوکسیلاز-۲، *: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0/001$), #: نمایانگر تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی - آترواسکلروزی ($p < 0/001$), روش آماری MANOVA و آزمون Tukey (تعداد در هر گروه ۱۰ سر موش صحرایی).

کاهش AOPP در رت‌های دیابتی-آترواسکلروزی توسط اسید آمینه‌های سیستئین، N-استیل سیستئین و گلایسین قبلاً توسط گروه تحقیقاتی ما گزارش شده است (۷،۲). اثر ضد التهابی گلوتامین در موش‌های صحرایی دیابتی-آترواسکلروزی با کاهش میزان TNF- α و IL-6 همراه بوده است (جدول شماره ۲) ($p < 0/001$). گلوتامین با کاستن بیان ژن NF-kB، ساخت و ترشح فاکتورهای التهابی را می‌کاهد (۳۴). اثر کاهنده گلوتامین بر استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از افزایش قندخون در محیط کشت سلول‌های اندوتلیال، و اثر ضد التهابی آن در موش‌های صحرایی تحت ورزش استقامتی و مدل سمیت کلیوی استامنیوفن نشان داده شده است (۳۶،۳۵،۱۴). اختلالات لیپیدی یا افزایش شاخص آتروژنی (نسبت LDL به HDL) و تری‌گلیسرید منجر به بروز آترواسکلروز در بیماران دیابتی می‌گردد. تیمار با گلوتامین وضعیت پروفایل لیپیدی در رت دیابتی-آترواسکلروزی را نیز بهبود بخشید. سطح تری‌گلیسرید، کلسترول، LDL و شاخص آتروژنی در موش‌های صحرایی تحت تیمار به‌طور معنی‌داری کمتر از رت‌های دیابتی-آترواسکلروزی بدون تیمار بوده است (جدول شماره ۱) ($p < 0/001$). براساس جستجو در مقالات و وبگاه‌ها، اثرات مفید این اسید آمینه بر پروفایل لیپیدی تاکنون در هیچ مطالعه‌ای ذکر نشده است و برای اولین بار در این مطالعه گزارش گردید. تغییراتی مانند گلیکیمیشن و اکسیداسیون LDL در بیماران دیابتی به علت افزایش مجموعه عوامل خطری مانند افزایش قند خون، اختلالات لیپیدی و استرس اکسیداتیو، نسبت به افراد غیر دیابتی بیش‌تر رخ می‌دهد. در این مطالعه برای اولین بار اثر کاهنده گلوتامین بر روند گلیکیمیشن و اکسید شدن LDL ارائه شده است (جدول شماره ۲). گلوتامین بر محصولات ابتدایی و نهایی اکسیداسیون در موش‌های صحرایی دیابتی-آترواسکلروزی اثر کاهنده داشته است ($p < 0/001$). براساس مطالعات قبلی ما تیمارهایی که قادر باشند محصولات ابتدایی و نهایی اکسیداسیون LDL را

بتا-پانکراس، ایجاد مقاومت انسولین و اختلالات عروقی دیابت نقش دارند (۲۹). براساس مطالعات قبلی ما تیمارهایی که بتوانند مقادیر محصولات مختلف گلیکیمیشن، استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش دهند، کارایی بالایی جهت افزایش حساسیت انسولین و پیشگیری از اختلالات دیابت دارند (۷،۲). با توجه به جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱، گلوتامین ویژگی ضد گلیکیمیشن خود را با کاستن مقادیر محصولات ابتدایی تا نهایی گلیکیمیشن افزایش فعالیت آنزیم‌های گلیکسیلاز در موش‌های صحرایی دیابتی-آترواسکلروزی نشان داد ($p < 0/001$). این اسید آمینه احتمالاً با ویژگی آنتی‌اکسیداتیو، جمع‌آوری ترکیبات دی‌کربونیل و فعالسازی سیستم گلیکسیلاز، توان مهار تشکیل محصولات گلیکیمیشن را دارد. در دیابت فعالیت سیستم گلیکسیلاز احتمالاً در پی کاهش گلوکاتایون افت می‌کند. از طرفی، گلوتامین پیش‌ساز گلوکاتایون نیز هست، و در دیابت میزان گلوکاتایون و گلوکاتایون هر دو کاهش می‌یابد (۳۰). براساس مطالعات ما، تاکنون اثر این اسید آمینه از بین محصولات مختلف گلیکیمیشن تنها بر میزان هموگلوبین گلیکیمیشن در افراد دیابتی نوع دو نشان داده شده است (۲۷).

در این مطالعه محصولات پیشرفته پروتئین اکسید شده و مالون دی‌آلدئید به ترتیب به عنوان شاخص‌های مناسب نشانگر اکسیداسیون پروتئین‌ها و لیپیدها استفاده گردید (۲۴). مقدار این شاخص‌ها در موش‌های صحرایی دیابتی-آترواسکلروزی تحت تیمار نسبت به گروه بدون تیمار کاهش یافت (جدول شماره ۲) ($p < 0/001$). اثر کاهنده این اسید آمینه بر میزان مالون دی‌آلدئید در موش‌های صحرایی مدل کبد چرب نشان داده شده است، ولی در این مطالعه برای نخستین بار اثر کاهنده گلوتامین بر شاخص اکسیداسیون پروتئین‌ها گزارش گردید (۳۱). گلوتامین با داشتن ویژگی آنتی‌اکسیداتیو، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مانند سوپرکسید دیسموتاز، شرکت در ساخت گلوکاتایون و جلوگیری از کاهش آن منجر به کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۲،۳۳).

کلیوی حاصل از استامنیوفن در موش گزارش شده است (۱۴،۱۳). البته گلوتامین با وجود اثر حفاظتی در برابر سمیت کبدی دلتامترین، بر سمیت کلیوی آن در موش‌های صحرایی اثری نداشته است (۳۷). به نظر می‌رسد تشخیص مکانیسم سمیت کلیوی دلتامترین می‌تواند راهگشای عدم اثر گلوتامین در این آسیب کلیوی باشد. محدودیت‌های این مطالعه شامل، عدم مطالعه میکروسکوپی آئورت و کلیه موش‌های صحرایی جهت بررسی اثر گلوتامین بر ضایعات بافتی حاصل از القا دیابت و آترواسکلروز می‌باشد. گلوتامین با داشتن ویژگی‌های ضد گلیکه، آنتی‌اکسیداتیو و ضد التهابی همچنین اثر مفید بر متابولیسم قند و لیپید، به نظر می‌رسد داروی سودمندی جهت کاهش خطر ابتلا به آترواسکلروز و اختلالات کلیوی باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جهت تامین مالی و خانم دکتر سیده زهرا بطحایی جهت همکاری در اجرای این مطالعه سپاسگزاریم.

References

1. Kawanami D, Matoba K, Utsunomiya K. Signaling pathways in diabetic nephropathy. *Histol Histopathol* 2016; 31(10): 1059-1067.
2. Mahdavi S, Bathaie SZ, Nakhjavani M, et al. The synergistic effect of antiglycating agents (MB-92) on inhibition of protein glycation, misfolding and diabetic complications in diabetic-atherosclerotic rat. *Eur J Med Chem* 2016; 121: 892-902.
3. Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res* 2010; 59(2): 147-156.
4. Cantero AV, Portero-Otín M, Ayala V, et al. Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor- β : implications for diabetic atherosclerosis. *FASEB J* 2007; 21(12): 3096-3106.
5. Shamsaldeen YA, Mackenzie LS, Lione LA, Benham CD. Methylglyoxal, A Metabolite Increased in Diabetes is Associated with Insulin Resistance, Vascular Dysfunction and Neuropathies. *Curr Drug Metab* 2016; 17(4): 359-367.
6. Nigro C, Leone A, Raciti GA, Longo M, Mirra P, Formisano P, et al. Methylglyoxal-Glyoxalase 1 Balance: The Root of Vascular Damage. *Int J Mol Sci* 2017; 18(1): 188-202.
7. Mahdavi S, Bathaie S, Nakhjavani M, Heidarzadeha H. L-cysteine is a potent inhibitor of protein glycation on both albumin and LDL, and prevents the diabetic

- complications in diabetic-atherosclerotic rat. Food Res Int 2014; 62: 909-916.
8. Weiner ID VJ. Ammonia Transporters and Their Role in Acid-Base Balance. *Physiol Rev* 2017; 97(2): 465-494.
 9. Stangl R SA, Ónody P, et al. Reduction of liver ischemia reperfusion injury via glutamine pretreatment. *J Surg Res* 2011; 166(1): 95-103.
 10. Badole SL, Jangam GB, Chaudhari SM, Ghule AE, Zanwar AA. L-glutamine supplementation prevents the development of experimental diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *PLoS One* 2014; 9(3): e92697.
 11. Roshanravan B, Zelnick LR, Djucovic D, et al. Chronic kidney disease attenuates the plasma metabolome response to insulin. *JCI Insight* 2018; 3(16): e122219.
 12. Torres-Santiago L MN, Hossain J et al. Does oral glutamine improve insulin sensitivity in adolescents with type 1 diabetes? *Nutrition* 2017; 34: 1-6.
 13. Sadar S, Kaspate D, Vyawahare N. Protective effect of L-glutamine against diabetes-induced nephropathy in experimental animal: Role of KIM-1, NGAL, TGF-beta1, and collagen-1. *Ren Fail* 2016; 38(9): 1483-1495.
 14. Brovedan MA, Molinas SM, Pisani GB, et al. Glutamine protection in an experimental model of acetaminophen nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2018; 96(4): 366-371.
 15. Mahdavi-fard S, Bathaie Z, Nakhjavani M, Etemadi Kia B. EFFECT of one month cysteine treatment on the glycemic control, lipid profile, glycated and oxidized LDL, in the rat model of diabetes-atherosclerosis. *IJDLD* 2014; 13(4): 279-286 (Persian).
 16. Comar JF, de Oliveira DS, Bracht L, Kimmelmeier FS, Peralta RM, Bracht A. The Metabolic Responses to L-Glutamine of Livers from Rats with Diabetes Types 1 and 2. *PLoS One* 2016; 11(8): e0160067.
 17. Xu YJ, Wu XQ, Liu W, et al. A convenient assay of glycoserum by nitroblue tetrazolium with iodoacetamide. *Clin Chim Acta* 2002; 325(1-2): 127-131.
 18. Cohen MP, Shea EA, Wu V-Y. Inhibiting LDL glycation ameliorates increased cholesteryl ester synthesis in macrophages and hypercholesterolemia and aortic lipid peroxidation in streptozotocin diabetic rats. *Metabolism* 2010; 59(5): 658-653.
 19. Nakayama K NM, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, Kohno M, Ito S. Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol* 2008; 28(6): 871-878.
 20. Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51(6): 597-604.
 21. Mahdavi-fard S, Bathaie Z, Nakhjavani M, Etemadi kia B. Effect of one month cysteine treatment on the glycemic on the glycemic control, the glycemic control, lipid profilr, glycated and oxidized LDL, in the rat model of diabetes-atherosclerosis. *IJDLD* 2014; 13(4): 279-286 (Persian).
 22. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 2010; 411(23-24): 1875-1882.
 23. Taylor EL, Armstrong KR, Perrett D, Hattersley AT, Winyard PG. Optimisation of an Advanced Oxidation Protein Products Assay: Its Application to Studies of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 496271.
 24. Shahsavari G, Firouzi M, Mahdavi-fard S, Joudaki A, Birjandi M. Phototherapy motivates protein and lipid oxidation in jaundiced term

- and late term neonates. *CJP* 2017; 3(2): 248-252.
25. Mustafiz A, Singh AK, Pareek A, et al. Genome-wide analysis of rice and Arabidopsis identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses. *Funct Integr Genomics* 2011; 11(2): 293-305.
 26. Wang C, Deng Y, Yue Y, Chen W, Zhang Y, Shi G, et al. Glutamine Enhances the Hypoglycemic Effect of Insulin in L6 Cells via Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Protein Kinase B (AKT)/Glucose Transporter 4 (GLUT4) Signaling Pathway. *Med Sci Monit* 2018; 24: 1241-1250.
 27. Mansour A, Mohajeri-Tehrani MR, Qorbani M, Heshmat R, Larijani B, Hosseini S. Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Nutrition* 2015; 31(1): 119-126.
 28. Newsholme P, Lima M, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(2): 153-163.
 29. Schalkwijk CG, Miyata T. Early-and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids* 2012; 42(4): 1193-1204.
 30. Krupek T, Silva MARCP, Batista MR, Shimauti EL, Nakanishi AB, Comar JF, et al. Glutamine dipeptide supplementation improves clinical responses in patients with diabetic foot syndrome. *Braz J Pharm Sci* 2016; 52(3): 567-574.
 31. Angulo P, Adams LA. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J* 2006; 82(967): 315-322.
 32. Marques C, Licks F, Zattoni I, de Souza LE, Marroni CA, Marroni NP. Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(28): 4464-4474.
 33. Kim HJ, Park DJ, Kim JH, et al. Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation. *J Pharmacol Sci* 2015; 127(1): 117-126.
 34. Singleton KD, Wischmeyer PE. Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292(5): 1839-1845.
 35. Muniandy S, Qvist R, Yan GO, Bee CJ, Chu YK, Rayappan TA. The oxidative stress of hyperglycemia and the inflammatory process in endothelial cells. *J Med Invest* 2009; 56(1,2): 6-10.
 36. Raizel R, Leite JS, Hypolito TM, Coqueiro AY, Newsholme P, Cruzat VF, et al. Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of l-glutamine and l-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance exercise. *Br J Nutr* 2016; 116(3): 470-479.
 37. Gunduz E, Ulger BV, Ibiloglu I, Ekinici A, Dursun R, Zengin Y, et al. Glutamine provides effective protection against deltamethrin-induced acute hepatotoxicity in rats but not against nephrotoxicity. *Med Sci Monit* 2015; 21: 1107-1114.