مجله دیابت و لیپید ایران. بهار و تابستان ۱۳۸۳؛ دوره ۳ (شماره ۲): ۱۹۵-۲۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات انسولین برمیزان فعالیت آنزیم سرمی و بافتی مبدل آنژیوتانسین I (ACE) در رت دیابتی شده

علی محمد شریفی[۱]*، سید هادی موسوی[۲]، باقر لاریجانی[۳]

چکیده

مقدمه: مکانیسم دقیق ایجاد اختلالات عروقی در دیابت نوع I (IDDM) روشن نگردیده است. شواهد زیادی مبنی بر تغییر مکانیسم های تنظیم کننده تونیسیته عروق از جمله تغییر فعالیت آنزیم ACE در بعضی بافتها در رتهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین وجود دارد. جهت بررسی اثرات درمان با انسولین بر این تغییرات مطالعه زیر انجام گرفت.

روشها: مطالعه بر روی سه گروه متشکل از ۸ رت از نژاد Sprauge Dawely انجام گرفت. دیابت توسط ۶۰ mg/kg استرپتوزوتوسین داخل صفاقی در دو گروه دیابتی بدون درمان (D) و درمان شده توسط انسولین (IT) القا گردید. رتهای گروه IT روزانه توسط ۱۰units/kg/day از انسولین NPH به مدت ۴ هفته درمان شدند. گروه کنترل(C) و دیابتی بدون درمان (D) همان مقدار سالین در کل مطالعه دریافت کردند. فعالیت آنزیم ACE به روش HPLC اندازه گیری گردید.

یافته‌ها: ۴ هفته پس از القا، در مطالعه گروه SBP ,D و آنزیم ACE در سرم، ریه، قلب و آئورت افزایش یافت. درمان با انسولین این تغییرات را به حالت طبیعی برگرداند و فعالیت آنزیم در گروه IT نسبت به گروه شاهد تغییری نداشت.

نتیجه‌گیری: می توان نتیجه گرفت که افزایش فعالیت آنزیم ACE و به‌ویژه ACE قلبی عروقی میتواند در پاتوژنز واسکولوپاتی دیابتی نقش داشته باشد و همچنین یکی از مکانیسم های احتمالی انسولین در کاهش عوارض قلبی عروقی می تواند از طریق کاهش فعالیت این آنزیم باشد.

کلیدواژه‌ها: انسولین، فشار خون سیستولی ، فعالیت ACE، رت دیابتی شده به وسیله STZ

۱- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران، بخش فارماکولوژی

۲- دستیار فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، بخش فارماکولوژی

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

* ***نشانی***: تهران صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳؛ تلفن و فاکس: ۸۰۵۸۶۹۶؛ پست الکترونیک: sharifal@yahoo.com و sharam@iums.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

مقدمه

بیماری دیابت شیرین یک مشکل بهداشتی در سراسر جهان است که حدود یک تا دو درصد افراد جامعه بدان مبتلا هستند و سبب از کار افتادگی و مرگ و میر فراوان می گردد. اختلالات عروقی مانند افزایش فشار خون، نفروپاتی و رتینوپاتی از علل بروز مرگ و میر ناشی از این بیماری هستند[۱و۲]. علی رغم تلاش های فراوان انجام شده و موفقیت های چشمگیر در خصوص مکانیسم بروز آسیب عروقی در جریان هیپرگلیسمی، اطلاعات کمی در دسترس است [۳]. تغییر در سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون (RAAS) و نیتریک اکسید و دیگر تنظیم کننده های تون عروقی از کاندید های علت ایجاد اختلالات عروقی در دیابت می باشند [۴، ۵].

آنزیم مبدل آنژیوتانسینوژن (ACE) به فراوانی در سیستم قلبی- عروقی توزیع شده است و سبب تبدیل آنژیوتانسین I به آنژیوتانسین II می گردد. Ag IIیک تنگ کننده قوی شریانی می باشد که سبب افزایش فشار خون می گردد. مشاهدات نشان می دهند که Ag II سبب پرولیفراسیون سلولهای عضلات صاف دیواره های عروق [۶]، هیپرتروفی میوسیت‌ها [۷] و آزاد شدن فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها [۸] و فاکتور رشد β (TGFβ) [۹] می گردد و اینها همه به نوبه خود در بروز اختلات عروقی در دیابت نقش دارند.

سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون (RAAS) نقش مهمی در کنترل هموستاز قلبی عروقی دارد و با تأثیر بر فشار خون و حجم مایعات یکی از مهمترین عوامل اتیولوژیک در ایجاد هیپرتانسیون را شامل می شود [۱۰]. بخوبی ثابت شده است که RAS در چندین عضو و بافت دیگر مانند کلیه، ریه، قلب و سلولهای عضلات صاف عروق وجود دارد و در آنجا بطور مستقل از سیستم اتوکرین-پاراکرین عمل می‌نماید [۱۱]. ارتباط بین افزایش فعالیت آنزیم ACE و فشار خون ثابت گردیده است [۱۲] افزایش فعالیت ACE در بعضی از مدل‌های افزایش فشار خون مانند 2K1C مشاهده گردیده است [۱۳]. نقش ACE بافتی (tissue or local ACE) در دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و اهمیت آن نسبت به ACE سرمی بیشتر می باشد [۱۳]. افزایش فعالیت این آنزیم به طور موضعی در قلب و آئورت و نه در سرم با هیپرتروفی و اختلات قلبی عروقی همراه بوده است [۱۴].

مدل رت دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین STZ induced diabetic rat از مدل های شایع بررسی دیابت وابسته به انسولین (IDDM) در حیوانات آزمایشگاهی است. در مطالعه قبلی نشان داده شد که فعالیت آنزیم ACE در رتهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین پس از ۴ هفته در سرم، ریه، قلب و آئورت افزایش و در کلیه کاهش می یابد. درصد افزایش در دستگاه قلبی عروقی بیشتر می باشد. همچنین این تغییرات با افزایش مختصر در فشار خون سیستولی (SBP) همراه می باشد.

در این مطالعه تلاش گردید تا علاوه بر بررسی مجدد کار گذشته، اثرات درمان با انسولین بر فشار خون سیستولی و فعالیت آنزیم ACE در بافتها و سرم مشخص گردد. درمان با انسولین در IDDM با کاهش مرگ و میر و عوارض قلبی عروقی همراه می باشد لذا بررسی اثر انسولین بر فعالیت این آنزیم و فشار خون نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که در این مطالعه مدنظر بوده است.

روشها

طراحی مطالعه

۲۴ عدد موش صحرایی نر از نژاد Sprauge Dawely با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در این مطالعه استفاده گردید. رتها در قفس متابولیک و در شرایط دسترسی آزاد به آب و غذای کافی نگه‌داری گردیدند. سه گروه ۸ تایی از رتها متشکل از شاهد (C)، دیابتی شده و بدون درمان (D) و دیابتی تحت درمان با انسولین (IT) بررسی گردیدند. با تزریق ۶۰ میلی گرم STZ به صورت داخل صفاقی، دیابت در گروه D و IT ایجاد گردید. به گروه شاهد همان مقدار سالین تزریق گردید. گروه IT روزانه ۱۰ units/kg انسولین NPH به مدت چهار هفته دریافت کردند. گروه C و D به میزان هم حجم آن سالین

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

دریافت کردند. گلوکز ادرار بیشتر از ۲۵۰ میلی گرم در دسی‌لیتر، دیابت در نظر گرفته شد. ۴ هفته پس از ایجاد دیابت فشار خون سیستولی و قند سرم اندازه‌گیری شد و پس از بیهوشی، ارگان‌های مورد نیاز جدا گردید.

اندازه گیری فشار خون سیستولی و گلوکز سرم

در پایان آزمایش، رتها به وسیله اتر به طور سطحی بیهوش شدند. SBP با روش دمی (Tail Cuff) اندازه گیری شد. گلوکز سرم با استفاده از روش گلوکز اکسیداز به روش اسپکتروفوتومتری اندازه گیری گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم ACE

در پایان مطالعه نمونه های خونی برای اندازه گیری فعالیت ACE سرم جمع آوری شد. سپس تحت بیهوشی عمومی سر رتها جدا گردید و بافت های مورد مطالعه جدا و توزین شد. فعالیت آنزیم ACE با استفاده از روش HPLC مورد سنجش قرار گرفت [۱۵]. به طور مختصر، همانگونه که در تحقیقات قبلی گزارش شد [۱۶]، ۴۰ میکرو لیتر از بافر بورات که حاوی ۳/۵ میکرو مولار ببزوییل گلایسیل لوسین-P-benzoyl-L- glycyl-L-leucine (Hip-His-Leu) به عنوان سوبسترا بود به ۱۰ میکرولیتر از نمونه اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. واکنش با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر متافسفریک اسید متوقف گردید. پس از سانتریفوژ، ۲۰ میکرولیتر از سوپرنانت حاصله به ستون دستگاه تزریق شد و میزان هیپوریک اسید تولید شده با HPLC اندازه‌گیری شد. ۱ واحد از فعالیت آنزیم به صورت زیر تعریف شد: فعالیتی از آنزیم که سبب تولید ۱ میکرومولار هیپوریک اسید از HHL در ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه گردد.

تحلیل آماری

نتایج به صورت mean ± SEM ارائه شده است. برای تحلیل داده ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون بن‌فرونی Bonferrroni استفاده شد. $P<0.05$ از نظر اماری معنی دار در نظر گرفته شد

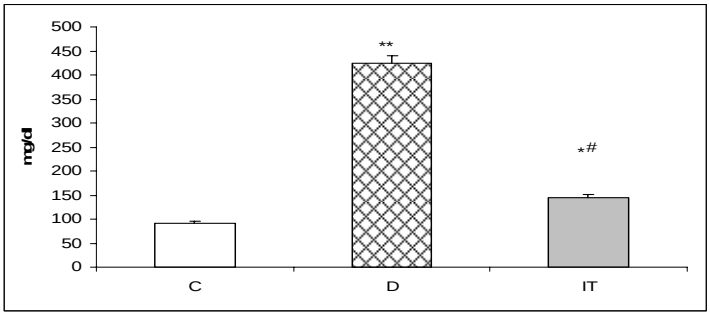
نتایج

گلوکز سرم

در پایان مطالعه گلوکز سرم در سه گروه اندازه گیری شد. میزان قند سرم در گروه D افزایش چشمگیری(حدود ۵ برابر) نسبت به گروه کنترل نشان می داد ($p <0.001$). در گروه IT که تحت درمان با انسولین بودند، گلوکز سرم بطور معنی داری از گروه D کمتر بود ($P < 0.001$) (شکل ۱).

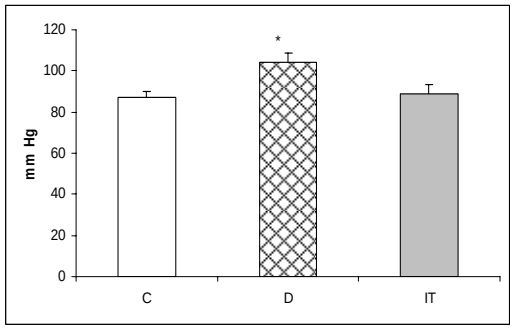
فشار خون سیستولی

در پایان مطالعه SBP در ۳ گروه اندازه گیری شد. القای دیابت در گروه D سبب افزایش فشارخون سیستولی گردید ($p<۰/۰۵$) (شکل ۲). SBP در رتهای دیابتی درمان شده با انسولین تفاوت معنی داری نسبت به گروه شاهد در پایان آزمایش نشان نداد (شکل ۲).

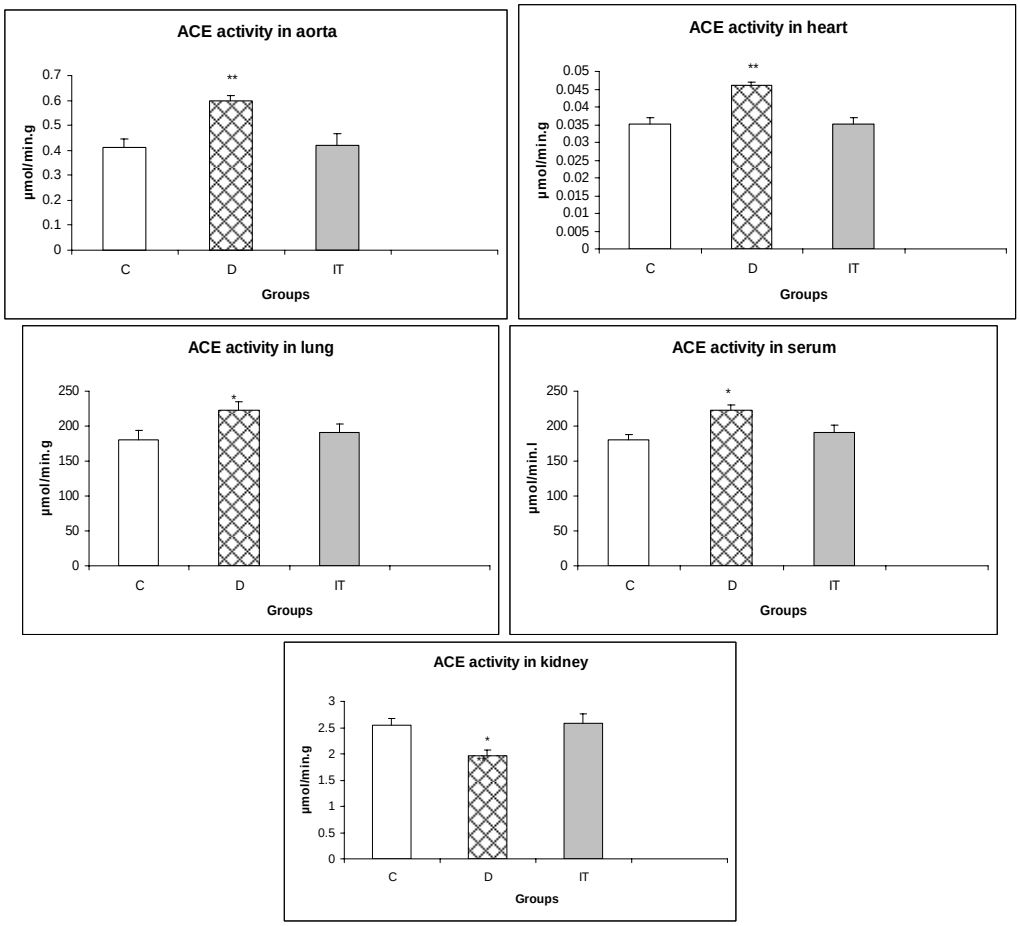


شکل ۱- میزان گلوکز سرم در سه گروه در پایان مطالعه (۴ هفته پس از ایجاد دیابت)
*** P<0.01, ** P<0.001 تفاوت، نسبت به شاهد را نشان می دهند.**

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]



شکل ۲- میزان SBPدر سه گروه در پایان مطالعه * P<0.05 نسبت به گروه شاهد می‌باشد.



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسینوژن در آئورت، قلب، ریه، سرم و کلیه در پایان مطالعه ** P < 0.01 * P < 0.05 تفاوت نسبت به شاهد را نشان می دهند.

فعالیت آنزیم ACE

در گروه D فعالیت آنزیم در سرم، ریه، قلب و آئورت نسبت به شاهد افزایش داشت (شکل ۳). این افزایش در قلب و آئورت بیشتر بود ($P < 0.01$) . درصد افزایش فعالیت آنزیم در آئورت، قلب، ریه و سرم به ترتیب ۴۶، ۳۱، ۲۲ و۱۱ درصد بود. فعالیت ACE در کلیه کاهش یافت (P<۰/۰۵) .در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

گروه IT تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم نسبت به شاهد مشاهده نگردید (شکل ۳).

بحث

آنزیم مبدل آنژیوتانسین (angiotensin converting enzyme) یک پپتیداز دکاپپتیدی است که بطور وسیعی نه تنها در سیستم قلبی عروقی بلکه در دستگاه‌های غیر قلبی نیز بطور وسیعی گسترده شده است. بسترهای عروقی از مکانهایی است که این آنزیم به وفور یافت می شود و سبب پاسخ عروقی وتنگی آن و پرولیفراسیون سلولی می‌گردد [۱۷و۱۸].

افزایش فعالیت این آنزیم سبب افزایش تولید Ag II می‌گردد که از تنگ کننده های قوی عروقی است. Ag II با مکانیسم‌های متعددی از جمله تنگی آرتریول ها، افزایش تولید رادیکال آزاد و کاهش تولید نیتریک اکسید سبب هیپرتانسیون، هیپرتروفی میوکارد و کژکاری اندوتلیال عروق می‌گردد. ACE بافتی نسبت به سرم در پاتوژنز اختلالات قلبی عروقی از اهمیت بیشتری برخوردار است [۱۳]. این مطالعه با هدف بررسی تغییرات فعالیت این آنزیم در رت دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (STZ) که مدل حیوانی برای بررسی IDDM می باشد و ارتباط این تغییرات با میزان فشار خون سیستولی انجام گرفت.

نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم ACE در سرم، ریه، قلب و آئورت رتهای دیابتی بدون درمان D نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. درصد افزایش در آئورت و قلب بیشتر از سایر بافت‌ها می‌باشد. این نکته خود مؤید اهمیت بیشتر local ACE در ایجاد عوارض قلبی عروقی در IDDM میباشد که موافق با تحقیقات انجام شده قبلی می باشد [۱۹].

فعالیت ACE در کلیه گروه D کاهش یافت. این نکته نیز در بعضی از مطالعات قبلی نشان داده شده است [۲۰]. در ظاهر امر این نکته متناقض به نظر می‌رسد و با توجه به ایجاد نفروپاتی دیابتی در IDDM انتظار افزایش فعالیت آنزیم می‌رود. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که آنزیم ACE در کلیه دیابتی دچار توزیع مجدد (redistribution) می‌گردد، به‌طوری‌که هر چند فعالیت آنزیم در لوله های نزدیک کاهش می یابد ولی در گلومرول و بسترهای عروقی که در ایجاد نفروپاتی دیابتی از اهمیت بیشتری برخوردار است، افزایش نشان می دهد [۲۰].

در گروه IT که پس از ایجاد دیابت به مدت ۴ هفته با انسولین درمان گردیده‌اند، این تغییرات مشاهده نگردید و با فعالیت آنزیم در گروه شاهد تفاوت معنی داری نداشت. به عبارت دیگر انسولین مانع از ایجاد تغییر و افزایش فعالیت ACE می‌گردد. مکانیسم این اثر انسولین بر فعالیت ACE مشخص نگردیده است ولی می‌تواند قسمتی از اثرات درمان با انسولین در کاهش اختلالات قلبی عروقی را توجیه نماید. مطالعات بیشتر در این زمینه راه‌گشا خواهد بود. شواهد نشان می دهد که میزان نیتریک اکسید NO در STZ induced diabetic rats کاهش می‌یابد که با درمان با انسولین این کاهش به وضعیت طبیعی تغییر می‌یابد [۲۱، ۲۲، ۲۳]. همچنین در شرایط مهار آنزیم NOS و مهار تولیدNO در رت، فعالیت آنزیم ACE در بعضی بافت‌ها افزایش داشته اشت [۱۰، ۱۴]. با توجه به این شواهد و ارتباط دو سیستم RAS و NO نقش انسولین در رتهای دیابتی در این ارتباط حائز اهمیت بوده و راهنمای مسیرهای آینده تحقیق خواهد بود.

مآخذ:

1. Titus T, Badet L, Gray DW. Islet cell transplantation for insulin-dependant diabetes mellitus: perspectives from the present and prospects for the future. *Expert Rev Mol Med*. 2000; 6;2: 1-28.
2. Traub O, Van Bibber R. Role of nitric oxide in insulin-dependent diabetes mellitus-related vascular complications. *West J Med*. 1995; 162(5): 439-45.
3. Brands MW, Fitzgerald SM. Arterial pressure control at the onset of type I diabetes: the role of nitric oxide and the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*. 2001; 14(6 Pt 2): 126S-131S.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

4. Ustundag B, Cay M, Naziroglu M, Dilsiz N, Crabbe MJ, Ilhan N. The study of renin-angiotensin-aldosterone in experimental diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct*. 1999 ;17(3):193-8.
5. Crespo MJ, Moreta S, Gonzalez J. Cardiovascular deterioration in STZ-diabetic rats: possible role of vascular RAS: *Pharmacology*. 2003; 68(1):1-8.
6. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*. 1993; 91(5): 2268-74.
7. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest*. 1990; 86(6):1913-20.
8. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83(4): 1419-24.
9. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*. 1992; 90(2): 456-61.
10. Usui M, Ichiki T, Katoh M, Egashira K, Takeshita A. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. *Hypertension*. 1998; 32(3): 527-33.
11- Lindpainter K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system: an appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res,*1991;68:905–21.
12- Nakata K, Nishimura K, Takada T, Ikuse T, Yamaguchi H, Iso T.Effects of an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, SA446, on tissue ACE activity in normotensive, spontaneously hypertensive and renal hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;9:305–10.
13.Sharifi AM, Akbarloo N, Heshmatian B, Ziai A. Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C *renovascular hypertensionPharmacol Res*. 2003 Mar;47(3):201-9.
14. Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, et al. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest*. 1997; 99(2):278-87.
15. Horiuchi M., Fujimura K., Terashima T., Iso T. Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. 1982; 233: 123-130.
16. Sharifi A.M., Darabi R., Akbarloo N. Study of antihypertensive mechanism of tribulus terrestris in 2K1C hypertensive rats: role of tissue ACE activity. *Life Sci*. 2003; 24;73(23): 2963-71.
17. Dzau V.J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 1988; 77(suppl 1): 14-113.
18. Sharifi A.M., Li J.S., Endemann D., Schiffrin E. Effects of enalapril and amlodipin on small-artery structure and composition and on endothelial dysfunction in SHR rats. *Journal of Hypertension.*1998; 6: 457-466.
19. Crespo MJ, Moreta S, Gonzalez J. Cardiovascular deterioration in STZ-diabetic rats: possible role of vascular RAS. *Pharmacology*. 2003; 68(1):1-8.
20. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol*. 1993; 265(4 Pt 2): F477-86.
21. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43(2): 137-47.
22. Koo JR, Vaziri ND. Effects of diabetes, insulin and antioxidants on NO synthase abundance and NO interaction with reactive oxygen species. *Kidney Int*. 2003; 63(1): 195-201.
23. Yu WJ, Juang SW, Chin WT, Chi TC, Chang CJ, Cheng JT. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2000; 29;68(6): 625-34.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]