

بررسی ارتباط بین فشار خون سیستولی و فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) در موش صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین

علی محمد شریفی^{۱*}، سید هادی موسوی^۲، باقر لاریجانی^۳

چکیده

مقدمه: بیماری دیابت شیرین یک مشکل بهداشتی در سراسر جهان است که حدود یک تا دو درصد افراد جامعه بدان مبتلا هستند. اختلالات عروقی مانند افزایش فشار خون، نفروپاتی و رتینوپاتی از علل بروز مورتالیتی در این بیماری می باشند. هر چند سازوکار بروز آسیب عروقی در هیپرگلیسمی، هنوز کاملاً روشن نگردیده است؛ ولی می توان به تغییر در سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدسترون (RAAS) و فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) اشاره کرد. جهت بررسی ارتباط تغییرات فشار خون سیستولی (SBP) و فعالیت آنزیم ACE در دیابت نوع یک، این مطالعه در موش های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین، به عنوان مدل حیوانی دیابت نوع یک، انجام گرفت.

روش ها: مطالعه در دو گروه کنترل (C) و دیابتی (D) متشکل از ۸ رت در هر گروه از نژاد Sprague Dawely انجام گرفت. دیابت توسط 60 mg/kg استرپتوزوتوسین داخل صفاقی در گروه (D) القا گردید. فشار خون سیستولی با روش دمی^۴ اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم ACE به روش HPLC اندازه گیری گردید.

یافته ها: ۴ هفته پس از القا دیابت، SBP در گروه D نسبت به کنترل بطور معنی داری افزایش یافت. فعالیت آنزیم ACE در پایان مطالعه در سرم، قلب، ریه و آئورت رت های گروه D افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت که درصد افزایش آن در آئورت و قلب بیشتر بود. فعالیت آنزیم ACE در کلیه کاهش یافت.

نتیجه گیری: می توان نتیجه گرفت که افزایش فعالیت آنزیم ACE و به ویژه ACE قلبی عروقی می تواند در پاتوژنز واسکولوپاتی دیابتی نقش داشته و در ایجاد فشار خون در این مدل دیابتی مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: فشار خون سیستولی، فعالیت ACE، رت دیابتی شده به وسیله STZ

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

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

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

^۴ Tail Cuff

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

۸۰۵۸۶۹۶

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۶/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۳/۹/۲۸

مقدمه

بیماری دیابت 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 [۲۰]. دیابت نوع ۱ یا وابسته به انسولین، حدود ۱۰ درصد از کل موارد دیابت را تشکیل می دهد و به علت اختلال و تخریب کامل سلول‌های بتای پانکراس ایجاد می گردد. اختلالات عروقی مانند افزایش فشار خون، نفروپاتی و رتینوپاتی از علل بروز مورتالیتی در این بیماری هستند [۲۱]. علی رغم تلاش های فراوان انجام شده، سازوکار بروز آسیب عروقی در جریان هیپرگلیسمی کاملاً روشن نگردیده است [۳]، اما تغییر در سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون (RAAS)، نیتریک اکسید و دیگر تنظیم کننده های تون عروقی از عوامل مطرح می باشند [۵ و ۴].

آنزیم مبدل آنژیوتانسین I (ACE) به طور وسیعی در سیستم قلبی-عروقی توزیع شده است که سبب تبدیل آنژیوتانسین I به آنژیوتانسین II می گردد. Ag II یک منقبض 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 عامل رشد مشتق از پلاکت‌ها [۸] و فاکتور رشد β (TGF β) [۹] می گردد که همگی آنها در بروز اختلالات 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]. به خوبی ثابت شده است که RAS در چندین عضو و بافت مانند کلیه، ریه، قلب و سلول‌های عضلات صاف عروق وجود دارد و در آنجا بطور مستقل از سیستم اتوکراین-پاراکراین عمل می نماید [۱۱]. ارتباط بین افزایش فعالیت آنزیم ACE و افزایش فشار خون سیستولی در موارد متعدد گزارش شده است [۱۲]. افزایش فعالیت ACE در بعضی از مدل‌های

حیوانی هیپرتانسیون مانند 2K1C و 1K1C مشاهده گردیده است [۱۳]. نقش ACE بافتی^۱ در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و به نظر می رسد که اهمیت آن نسبت به ACE سرمی بیشتر باشد [۱۳]. افزایش فعالیت این آنزیم به طور موضعی در قلب و آئورت و نه در سرم با هیپرتروفی و اختلالات قلبی عروقی همراه بوده است [۱۴].

ارتباط بین فشار خون سیستولی و فعالیت آنزیم ACE و به ویژه ACE بافتی در دیابت تاکنون به طور کامل بررسی نگردیده است. مدل رت دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین^۲ از مدل‌های شایع بررسی دیابت وابسته به انسولین (Type I) در حیوانات آزمایشگاهی است. استرپتوزوتوسین، داروی سیتوتوکسیک و ضد نئوپلاسم است و سبب تخریب سلول‌های بتای پانکراس و در نتیجه عدم ترشح انسولین می گردد و شرایطی مشابه با دیابت نوع یک (Type I) را ایجاد می نماید.

با توجه به اهمیت آنزیم ACE در ایجاد فشار خون و عوارض قلبی عروقی، فعالیت این آنزیم در سرم، کلیه، ریه، قلب و آئورت در رت‌های دیابتی شده توسط STZ بررسی گردید. تغییرات فشار خون سیستولی در این مدل یکسان نبوده و در مطالعات مختلف، نتایج متفاوتی گزارش شده است؛ لذا SBP رت‌ها نیز اندازه گیری گردید تا ارتباط آن با فعالیت آنزیم ACE بطور دقیق تری بررسی و روشن گردد.

روش‌ها

طراحی مطالعه

۱۶ موش صحرایی نر از نژاد Sprague Dawely با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در این مطالعه استفاده گردید. موش‌ها در قفس متابولیک و در شرایط دسترسی آزاد به آب و غذای کافی نگهداری گردیدند. این حیوانات به دو گروه ۸ تایی کنترل (C) و دیابتی (D) تقسیم گردیدند. دیابت با تزریق ۶۰ میلی گرم STZ به صورت داخل صفاقی در گروه D

¹ Tissue or local ACE

² STZ induced diabetic rat

تحلیل آماری

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده است. برای تحلیل داده ها از آزمون T (T-student test) استفاده شد. $P < 0/05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

گلوکز سرم

در پایان زمان مطالعه، گلوکز سرم در دو گروه اندازه گیری شد. میزان قند سرم در گروه D افزایش چشمگیری (حدود ۵ برابر) نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0/001$) (شکل ۱).

فشار خون سیستولی

۴ هفته پس از ایجاد دیابت، SBP در ۲ گروه اندازه گیری شد. القای دیابت در گروه D سبب افزایش فشار خون سیستولی نسبت به گروه کنترل گردید ($P < 0/05$) (شکل ۲).

فعالیت آنزیم ACE

در گروه D فعالیت آنزیم در سرم، ریه، قلب و آئورت نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد (شکل ۳) که این افزایش در قلب و آئورت از مقدار بیشتری برخوردار بود ($P < 0/01$). درصد افزایش فعالیت آنزیم در آئورت، قلب، ریه و سرم به ترتیب ۴۶، ۳۱، ۲۲ و ۱۱ درصد می باشد. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می گردد، فعالیت ACE در کلیه بر خلاف بافت‌های دیگر به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/05$).

بحث

آنزیم مبدل آنژیوتانسین 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

ایجاد گردید. به گروه کنترل نیز همان مقدار سالیین تزریق شد. گلوکز بیشتر از ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر در ادرار به عنوان نشانگر دیابت در نظر گرفته شد. ۴ هفته پس از ایجاد دیابت، فشار خون سیستولی و قند سرم اندازه گیری شد و پس از بیهوشی، ارگان‌های مورد نیاز جدا گردیدند و در فریزر ۸۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا بموقع مورد استفاده قرار گیرند.

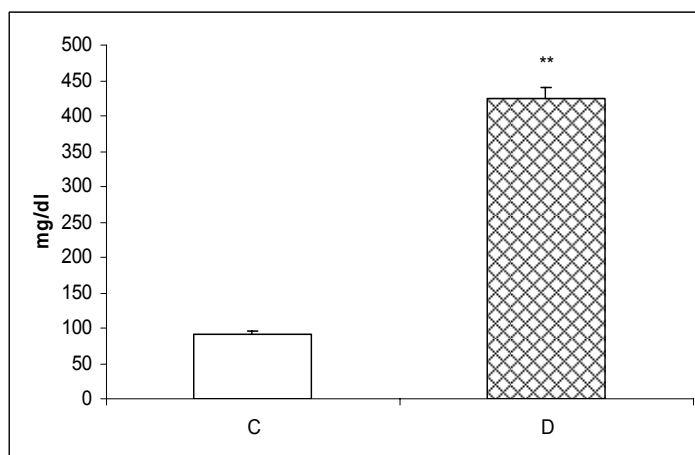
اندازه‌گیری فشار خون سیستولی و گلوکز سرم

در پایان آزمایش، موش‌ها به وسیله اتر به طور سطحی بیهوش شدند. فشار خون سیستولی با روش دمی^۱ اندازه‌گیری شد. گلوکز سرم به روش گلوکز اکسیداز و با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید.

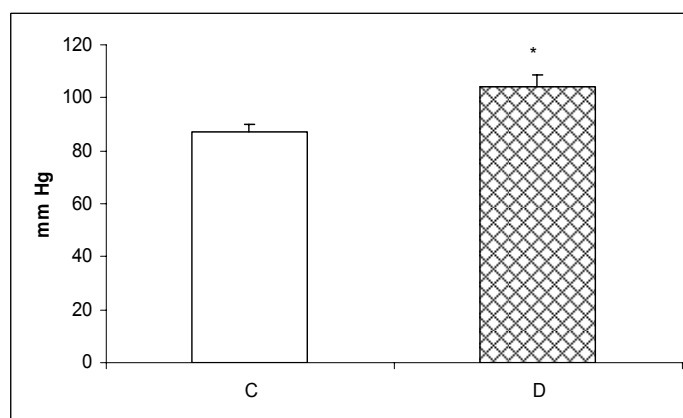
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACE

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 شده است [۱۶]، ۴۰ میکرو لیتر از بافر بورات که حاوی ۳/۵ میکرو مولار بنزوییل گلاسیل لوسین P-benzoyl-L- glycyl-L-leucine (Hip-His-Leu, Sigma) به عنوان سوبسترا بود به ۱۰ میکرو لیتر از نمونه بافتی هموژنیزه شده و یا سرم، اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. واکنش با افزودن ۱۵۰ میکرو لیتر متافسفریک اسید متوقف گردید. پس از سانتریفوژ، ۲۰ میکرو لیتر از محلول فوقانی حاصله، به دستگاه HPLC تزریق شد و میزان هیپوریک اسید تولید شده اندازه گیری گردید. 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.

¹ Tail Cuff



*** اختلاف $P < 0.001$ را نسبت به کنترل نشان می دهد
 شکل ۱- میزان گلوکز سرمی در پایان مطالعه (۴ هفته پس از ایجاد دیابت)



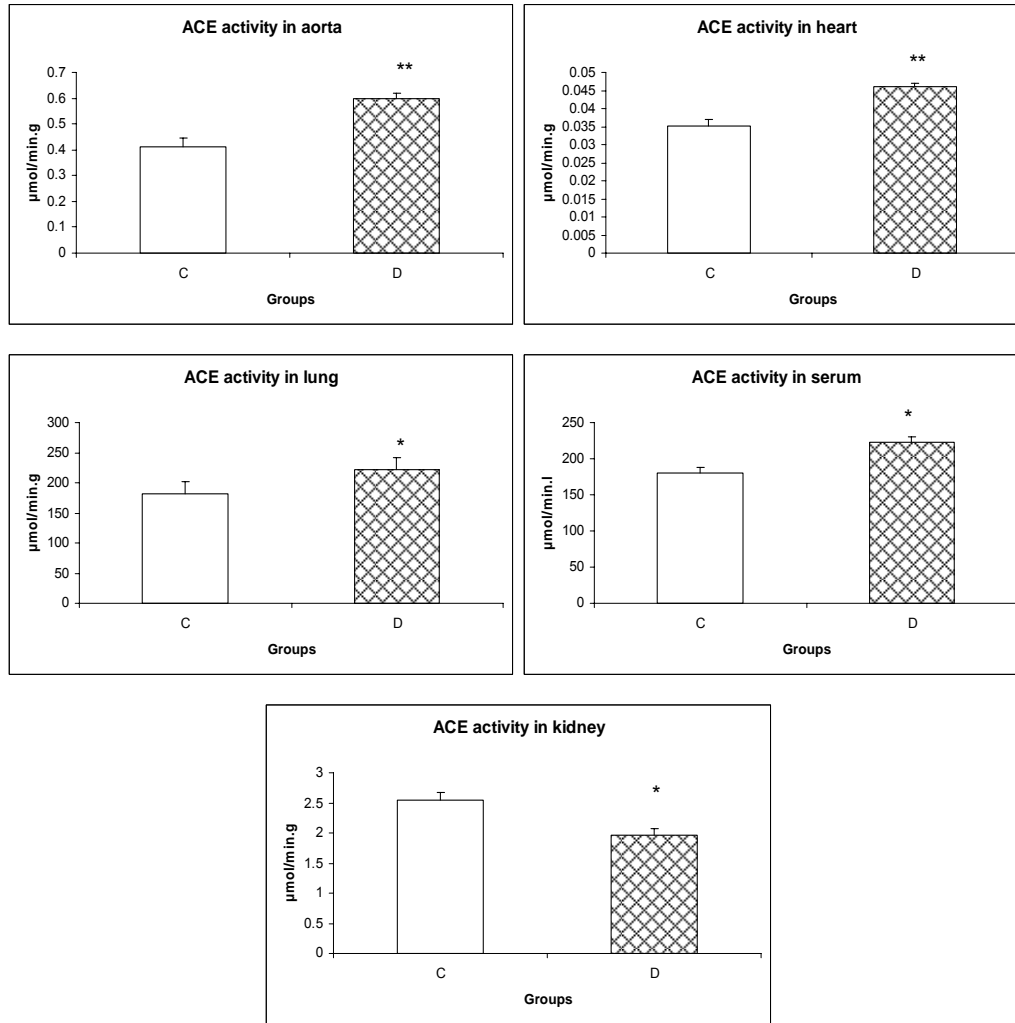
* اختلاف $P < 0.05$ را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد.
 شکل ۲- میزان SBP در پایان مطالعه (۴ هفته پس از ایجاد دیابت)

[۱۳]. این مطالعه با هدف بررسی تغییرات فعالیت این آنزیم در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (STZ) 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 کنترل افزایش یافته است. درصد افزایش در آئورت و قلب بیشتر از سایر بافت‌ها بود. این نکته خود می تواند مؤید اهمیت بیشتر local ACE در ایجاد عوارض قلبی عروقی در

می‌شود و سبب پاسخ عروقی و تنگی آن و پرولیفراسیون سلولی می‌گردد [۱۷ و ۱۸].

افزایش فعالیت این آنزیم سبب افزایش تولید Ag II می‌گردد که از قوی‌ترین منقبض کننده‌های عروقی است. Ag II با سازوکارهای متعددی از جمله تنگی آرتریول‌ها، افزایش تولید رادیکال آزاد و کاهش تولید نیتریک اکسید سبب هیپرتانسیون، هیپرتروفی میوکارد و دیسفونکسیون اندوتلیال عروق می‌گردد. ACE بافتی نسبت به سرم در پاتوژنز اختلالات قلبی عروقی از اهمیت بیشتری برخوردار است



تفاوت، نسبت به کنترل را نشان می دهند $P < 0.01$ ** و $P < 0.05$ *

شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسینوزن در آئورت، قلب، ریه، سرم و کلیه در پایان مطالعه

آنزیم در لوله های نزدیک کاهش می یابد ولی در گلو مریول و بسترهای عروقی که در ایجاد نروپاتی دیابتی از اهمیت بیشتری برخوردار است افزایش نشان می دهد [۲۰]. همچنین می توان به تفاوت ایجاد عوارض در دیابتی ها در ارگان های مختلف اشاره کرد که می تواند بعضاً با تفاوت فعالیت این آنزیم در ارگان های مختلف، بی ارتباط نباشند.

در این مطالعه، فشار خون سیستولی ۴ هفته پس از ایجاد دیابت در رت های دیابتی افزایش یافت. افزایش فشار سیستولی، که خود می تواند به عنوان یک عامل مستقل در

دیابت Type I باشد که موافق با تحقیقات انجام شده قبلی است [۱۹]. فعالیت ACE در کلیه گروه (D) کاهش یافت. این نکته نیز در بعضی از مطالعات قبلی نشان داده شده است [۲۰]. در نگاه اول این نکته متناقض به نظر می رسد و با توجه به ایجاد نروپاتی دیابتی در دیابت نوع یک (Type I) انتظار می رود فعالیت آنزیم ACE افزایش یابد. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که آنزیم ACE در کلیه دیابتی دچار توزیع مجدد^۱ می گردد، به طوری که هر چند فعالیت

^۱ Redistribution

induced diabetic rats کاهش می‌یابد که با درمان با انسولین این کاهش به وضعیت طبیعی باز می‌گردد [۲۲-۲۴] نیتریک اکسید با ایجاد وازودیلاتاسیون در عروق کلیوی سبب افزایش فیلتراسیون گلومرولی می‌شود [۱۱] و هم‌چنین می‌تواند سیستم RAS را سرکوب می‌کند و لذا نقص در تولید آن می‌تواند سبب افزایش فشار خون سیستولی گردد [۳].

می‌توان نتیجه گرفت که افزایش فعالیت آنزیم ACE و به‌ویژه ACE قلبی عروقی می‌تواند در پاتورژن واسکولوپاتی دیابتی نقش داشته و در ایجاد فشار خون در این مدل دیابتی مؤثر باشد و در نهایت این مطالعه می‌تواند به نوعی استفاده از مهارکننده های آنزیم ACE در جهت کاهش فشار خون در بیماران دیابتی و یا حتی در مراحل قبل از آن برای جلوگیری از عوارض دیابت به‌ویژه در بیماران Type I را تأیید نماید.

ایجاد عوارض قلبی-عروقی دیابت نقش داشته باشد، می‌تواند به دلایل مختلفی ایجاد شود. افزایش فعالیت آنزیم مبدل در سرم و بافت‌ها به‌ویژه در قلب و عروق می‌تواند توجیه‌کننده ایجاد فشار خون در این مدل از دیابت باشد. افزایش فعالیت آنزیم ACE می‌تواند سبب افزایش Ag II و در نتیجه افزایش فشار خون گردد. در مطالعات گذشته افزایش فشار خون سیستولی در مدل رت دیابتی ناشی از استریتوزوتوسین با افزایش آنژیوتانسین دو همراه بوده است [۲۱] و افزایش آنژیوتانسین ۲ از علل پیدایش هیپرتانسیون در این مدل از دیابت شناخته شده است [۱۱] که نتایج آنها، با افزایش فعالیت آنزیم ACE بویژه ACE قلبی-عروقی که در این مطالعه نشان داده شد، قابل توضیح و تطبیق می‌باشد. از علل دیگر افزایش فشار خون سیستولی در این مطالعه، می‌توان به کاهش میزان تولید نیتریک اکسید که در این مدل از دیابت مشاهده شده است؛ اشاره نمود. شواهد نشان می‌دهد که میزان نیتریک اکسید NO در STZ

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.
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 hypertension. *Pharmacol Res.* 2003 Mar;47(3):201-9
14. Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. 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-Brands MW, Fitzgerald SM. Blood pressure control early in diabetes: a balance between angiotensin II and nitric oxide. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002 Jan-Feb;29(1-2):127-31.
22. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43(2): 137-47.
23. 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.
24. 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