

## بررسی تعداد و میل ترکیبی گیرنده های انسولینی در گلبول های قرمز افراد مبتلا به

### دیابت نوع دو

حسین سالاری<sup>۱</sup>، بیژن فرزانی\*<sup>۲</sup>، پروین پاسالار<sup>۱</sup>، باقر لاریجانی<sup>۲</sup>

#### چکیده

**مقدمه:** شناسایی گیرنده انسولین بر سطح گلبول های قرمز می تواند روش مناسبی برای مطالعه تغییرات این گیرنده در بیماری دیابت و عوارض حاصل از آن باشد. روش های معمول جهت این شناسایی، بیوپسی بافت چربی یا عضلات و کشت سلول و یا تهیه تعداد مناسبی از مونوسیت ها می باشد که انجام آن با اشکالاتی همراه است. در مطالعه حاضر از گلبول های قرمز استفاده شد.

**روش ها:** تعداد ثابتی گلبول قرمز در معرض مقادیر ثابت انسولین نشانه دار و مقادیر متفاوتی انسولین غیرنشانه دار قرار گرفت و اثر رقابتی در مقابل گیرنده انسولین با سنجش رادیواکتیویته باقیمانده بر روی گیرنده مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه در سه گروه سالم، دیابتی کنترل نشده (poor control) و دیابتی کنترل شده (good control) مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان میل ترکیبی پذیرنده انسولین با انسولین بین افراد سالم و دیابتی کنترل نشده وجود دارد ( $P < 0/008$ ) هم چنین تفاوتی بین میزان میل ترکیبی افراد سالم و دیابتی کنترل شده وجود داشت که از نظر آماری نیز معنی دار بود ( $P < 0/017$ ). به علاوه بین میزان اتصال انسولین به گیرنده اش در افراد دیابتی کنترل شده و کنترل نشده وجود داشت ( $P < 0/009$ ). این تغییرات با مقدار هموگلوبین گلیکوزیله رابطه معکوس داشت. با استفاده از منحنی اسکاچارد تعداد گیرنده های انسولین نیز بر سطح هر گلبول قرمز در سه گروه مقایسه گردید. در این ارزیابی تعداد پذیرنده های گلبولی در افراد سالم، دیابتی و دیابتی کنترل شده به ترتیب  $1820 \pm 72/8$  و  $1026 \pm 40/4$  و  $1230 \pm 49/2$  محاسبه گردید که تفاوت معنی داری را نشان داد.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده، بنظر می رسد که بکارگیری گلبول های قرمز برای شناسایی تغییرات در گیرنده انسولین می تواند برای مطالعه گیرنده انسولین، در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک بکار رود.

**واژگان کلیدی:** دیابت نوع دو، گیرنده انسولین، گلبول قرمز، انسولین نشانه دار

۱- دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

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

\* **نشانی:** تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، پست الکترونیک: bfarzami@neda.net

## مقدمه

انسولین، هورمون مترشحه از سلول‌های بتای غده پانکراس ورود گلوکز را به داخل سلول‌های بدن به ویژه سلول‌های ماهیچه‌ای و سلول‌های بافت چربی، تسهیل می‌کند. گلوکز در سلول‌های کبد به صورت گلیکوژن ذخیره می‌شود تا در موقع نیاز به گلوکز تبدیل شود و نیاز سلول‌ها به گلوکز تأمین گردد. در افراد مبتلا به دیابت نوع دو پاسخ به انسولین در سلول‌ها کاهش می‌یابد. در مواردی کاهش ترشح انسولین نیز مشاهده می‌شود که منجر به افزایش مقدار گلوکز خون می‌شود که می‌تواند عوارض جبران ناپذیری را بوجود آورد عوامل محیطی و ژنتیکی در ایجاد این نوع دیابت دخالت دارد. که با مقاومت به انسولین و کمبود انسولین ممکن است همراه باشد. ژن‌های ویژه ای که در ایجاد دیابت نوع دو دخالت دارند شناسایی نشده‌اند. اما تحقیقات زیادی در این زمینه وجود دارد. عوامل غیر ژنتیکی در ایجاد دیابت نوع دو را می‌توان افزایش سن، کالری دریافتی بالا، افزایش وزن، کم تحرکی و کم وزنی در هنگام تولد دانست. دیابت نوع دو، حدود ۹۰ درصد کل انواع دیابت را شامل می‌شود. انسولین به طور مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش انتقال گلوکز به سلول‌ها می‌شود گلوکز از طریق انتشار تسهیل شده و به کمک ناقل های گلوکز به درون سلول‌ها راه می‌یابد. انسولین در بسیاری از سلول‌ها باعث تقویت این فرایند می‌شود. در واقع انسولین با انتقال ناقل‌هایی که درون سلول و در غشای وزیکول‌ها جای دارند به سطح سلول و غشای پلاسمایی می‌رسد و باعث افزایش انتقال گلوکز بداخل سلول می‌شود [۱] تاکنون ۵ نوع ناقل گلوکز شناسایی شده است که به اختصار<sup>۱</sup> GLUT یک تا پنج نامیده می‌شوند. GLUT<sub>1</sub> در غشای سلول‌ها از جمله غشای گلبول‌های قرمز یافت می‌شود. این ناقل دارای دو نوع آرایش است در یک آرایش جایگاه اتصال به گلوکز به سمت خارج وجود دارد و در آرایش دیگر این جایگاه به طرف داخل سلول قرار گرفته است. ناقل به تغییر آرایش بین این دو حالت

<sup>1</sup>Glucose transporter

باعث انتقال گلوکز به درون سلول می‌شود. GIUT<sub>1</sub> به انسولین حساس نیست یعنی انسولین باعث افزایش این ناقل در سطح سلول نمی‌گردد [۲ و ۳]. GIUT<sub>4</sub> که در سلول‌های بافت چربی و عضلانی یافت می‌شود، ناقل حساس به انسولین است. نقص در عملکرد ناقل‌های گلوکز می‌تواند به اختلال در سوخت و ساز گلوکز منجر شود. بیشترین مطالعه در این زمینه بر روی GIUT<sub>4</sub> صورت گرفته است. کاهش در فعالیت ناقل می‌تواند بعلت کمبود انسولین، مقاومت به انسولین، کاهش تعداد ناقل، نقص در جابجایی ناقل به سطح غشاء یا نقص ذاتی ناقل باشد. هر چند علت اصلی کاهش فعالیت GIUT<sub>4</sub> در برخی افراد مبتلا به مقاومت به انسولین نقص در عملکرد هورمون انسولین است [۲، ۳]، انسولین اثر خود را از طریق گیرنده‌های غشایی اعمال می‌کند. گیرنده انسولین از نوع گیرنده های تیروزین کینازی است. بهمین جهت همگام با ارزیابی میزان اتصال انسولین به گیرنده اش در سطح گلبول‌های قرمز فعالیت تیروزین کینازی گیرنده‌های سلولی نیز مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. که می‌توان از این طریق نشان داد که مقاومت به انسولین مربوط به کاهش گیرنده های انسولینی و یا کاهش فعالیت تیروزین کینازی آنهاست [۴]. در سال ۱۹۹۷ گمبیر و همکارانش وجود گیرنده‌های انسولین را از طریق روشی براساس رادیواکتیویتی انسولین پیوندشده به غشای گلبول قرمز شناسایی نمودند [۵]. بر سطح هر گلبول قرمز حدود ۲۰۰۰ گیرنده انسولین وجود دارد که با افزایش سن گلبول‌های قرمز این تعداد کاهش می‌یابد؛ همچنین در برخی بیماری‌های انسانی نظیر دیابت تعداد گیرنده‌ها ممکن است کاهش یابد [۶]. با این همه، درباره رابطه پیشرفت بیماری و درجه کاهش گیرنده‌ها گزارشی ارائه نشده است. همچنین نقش گیرنده انسولین در گلبول‌های قرمز مشخص نیست. یکی از نقش‌هایی که برای این گیرنده پیشنهاد شده است اثر غیرمستقیم آن بر سوخت و ساز گلوکز در گلبول‌های قرمز است گیرنده انسولین در این سلول‌ها از طریق فعالیت تیروزین کینازی خود باعث فسفوریله شدن پروتئین‌های اختصاصی و در نتیجه آزاد شدن آنزیم‌های گلیکولیزی به سیتوزول

نگردیده بود و قند خون آن‌ها از حدود ۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر بالا تر بود ( $15 \pm 215$ ) (poor control). از افراد سالم و بیمار ۱۰ میلی لیتر خون هپارینه تهیه گردید و قند خون به روش گلوکز اکسیداز (کیت شرکت زیست شیمی) اندازه گیری شد. روش مطالعه بررسی اتصال انسولین به گیرنده اش در گلوبول های قرمز طبق روش مندرج در رفرانس [۹] بود. برای بدست آوردن درصد اتصال ویژه انسولین، درصد اتصال انسولین نشاندار در غلظت  $10^6$  نانوگرام در میلی لیتر از درصد اتصال انسولین غیرنشاندار کم می گردد تا اتصال اختصاصی انسولین به گیرنده اش بدست آید. منظور از اتصال غیر اختصاصی، اتصال سست و جدا از گیرنده در سطح غشای گلوبول قرمز است [۹ و ۱۰]. از رابطه تعادلی ترکیب گیرنده با انسولین می توان به معادله زیر رسید.

$$\frac{1}{K} = \frac{[I^*L][I]}{[I^*L_t][I^*]} - \frac{[I^*L][I]}{[I^*][I^*L]}$$

$$\frac{[I^*L]}{[I^*L_t]} = \frac{1}{k} \frac{[I^*]}{[I]} + 1$$

که در آن  $I^*$ : انسولین نشاندار

و  $I$ : انسولین غیر نشاندار

$I^*L$ : کمپلکس انسولین نشاندار با گیرنده

$IL$ : کمپلکس انسولین غیرنشاندار با گیرنده

رسم نمودار  $\frac{[I^*L]}{[I^*L_t]}$  در مقابل  $\frac{[I^*]}{[I]}$  شیب خطی

مساوی  $\frac{1}{K}$  را بدست خواهد داد که از آن ثابت تعادل ترکیب انسولین با گیرنده غشایی گلوبول قرمز بدست می آید.

تعداد جایگاه‌های اتصال در هر گلوبول قرمز را می توان از طریق زیر محاسبه نمود [۹]:

$$\frac{\text{تعداد انسولین اتصال یافته در هر لیتر}}{\text{تعداد سلول در هر لیتر}} \times 6/02 \times 10^{23}$$

## یافته‌ها

از رسم نمودار نسبت مقادیر انسولین پیوند شده

می‌شود. آنزیم های گلیکولیزی در این فرایند فعالیت بیشتری از خود نشان می دهند و باعث افزایش بیشتر سوخت و ساز گلوکز می گردند [۷] در این تحقیق اثر پیشرفت دیابت نوع دو در کاهش گیرنده‌های انسولینی گلوبول قرمز و همچنین اثر درمان در گروه دیابتی کنترل شده مورد بررسی قرار گرفت و میزان تغییرات کمی گیرنده با افراد دیابتی کنترل نشده و گروه سالم مقایسه گردید.

## روش‌ها

بودر خالص انسولین، سفادکس  $G_{50}$  و با فرتریس از شرکت سیگما و مواد مصرفی دیگر از شرکت مرک آلمان خریداری شد. یدید سدیم رادیواکتیو ( $Na^{125}I$ ) از شرکت آمرشام (Amersham) تهیه گردید. تمامی ترکیبات دارای درجه خلوص آنالیتیکال بالا بودند. برای بررسی میزان اتصال انسولین به گیرنده اش در گلوبول‌های قرمز از دستگاه گاماکانتور مدل (M1209brother, Konton Instrument) استفاده گردید. برای تعیین مقدار انسولین بدست آمده از روش لوری (Lowry) استفاده شد [۸]. هموگلوبین A1c تمامی نمونه ها در مرکز تحقیقات غدد بیمارستان شریعتی و با روش  $HPLC^1$  مدل (Drew) انجام گرفت.

**انتخاب نمونه:** در این مطالعه سه گروه انتخاب شدند.

**الف:** افراد سالم ۱۵ نفر از کارکنان دفتر انتشارات کمک آموزشی وزارت آموزش و پرورش که میانگین قند خون آنها  $93 \pm 8/2$

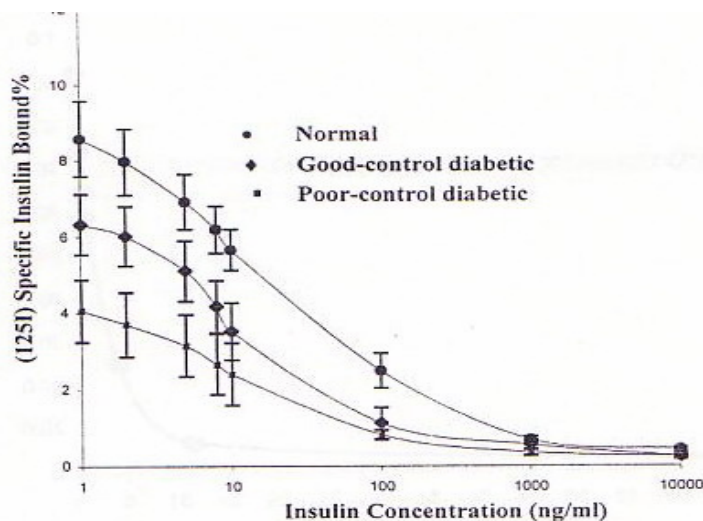
ب: افراد مبتلا به دیابت نوع دو که نظارت مناسبی بر بیماری خود داشتند. ۱۵ نفر از بیمارانی که به درمانگاه بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند و مقدار قند خون آن‌ها در حدود ۲۰۰-۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر کنترل شده بود.  $115 \pm 15$  (Good control)

ج: افراد مبتلا به دیابت نوع دو که نظارت مناسبی بر بیماری خود نداشتند. ۱۵ نفر از بیمارانی که به درمانگاه بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند ولی درمانی درباره آن‌ها اعمال

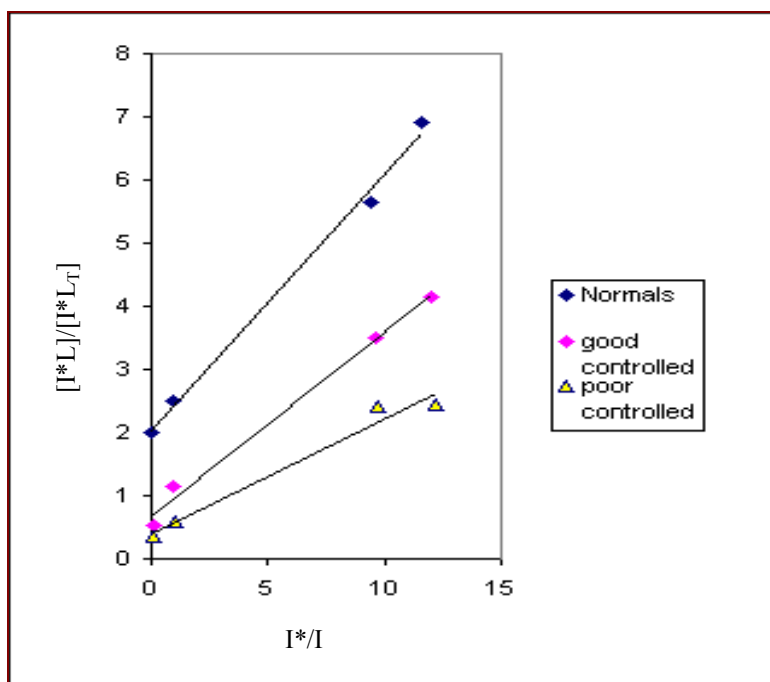
<sup>1</sup> High Performance Liquid Chromatography

مقدار اندازه گیری شده HbA1C در سه گروه فوق به ترتیب مساوی  $11/6 \pm 3/8$  و  $5/6 \pm 0/9$  و  $4/2 \pm 0/6$  تعیین گردید (جدول ۱).

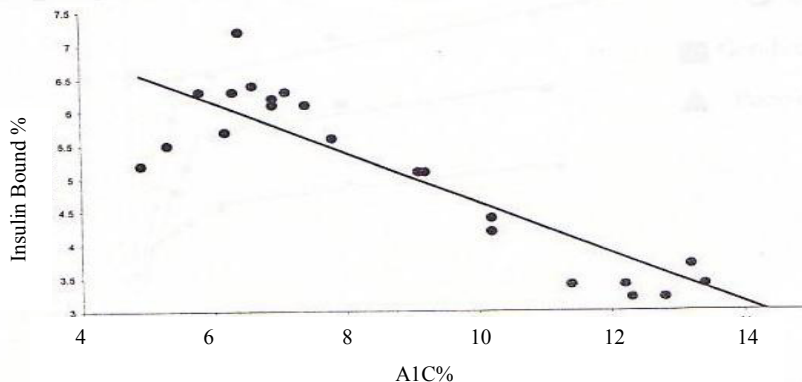
اختصاصی به گلبول قرمز بر حسب غلظت های انسولین غیرنشانه دار (شکل ۱)، ماکزیمم درصد اتصال در هر سه گروه دیابتی کنترل نشده، کنترل شده و سالم به ترتیب مساوی با  $4/06 \pm 0/8$  و  $6/03 \pm 0/79$  و  $8/4 \pm 0/9$  بدست آمد.



شکل ۱- نمودار مقایسه درصد اتصال انسولین در افراد سالم، دیابتی Poor control و Good control



شکل ۲- نمودار اتصال انسولین به گیرنده اش در تعیین ثابت پیوندی آن در افراد سالم- دیابتی و دیابتی کنترل شده



شکل ۳- نموداری که ارتباط معکوس میزان اتصال و مقدار هموگلوبین گلیکوزیله را نشان می‌دهد

جدول ۱- ماکزیمم درصد اتصال و HbA1C در هر سه گروه دیابتی کنترل نشده، کنترل شده و سالم

میزان قند خون (mg/dL)	ثابت پیوندی K(mmol/L)	P value	میزان درصد اتصال	تعداد جایگاه اتصال	
HbA <sub>1C</sub>					
۹۳ ± ۸/۲	۴/۲ ± ۰/۶	-	۸/۴۱ ± ۰/۹۸	۱۸۲۰ ± ۷۲/۸	سالم
۲۱۵ ± ۴۵	۱۱/۸ ± ۳/۸	۰/۰۰۸	۴/۰۶ ± ۰/۸۱	۱۰۲۶ ± ۴۰/۴	دیابتی کنترل نشده
۱۱۵ ± ۱۵	۵/۶ ± ۰/۹	۰/۰۱۷	۶/۳۳ ± ۰/۷۹	۱۲۳۰ ± ۴۹/۲	دیابتی کنترل شده

مقادیر HbA<sub>1C</sub> هر یک از نمونه‌ها (شکل ۳) ارتباط معکوس بین میزان اتصال انسولین و مقدار هموگلوبین گلیکوزیله را نشان داد. محاسبه ثابت پیوندی K مطابق فرمول بدست آمده در بخش روش‌ها بین سه گروه دیابتی، دیابتی کنترل شده و سالم به ترتیب مساوی ۰/۴۸۵ میلی مول در لیتر ۱/۸۱ میلی مول در لیتر و ۳/۳۳ میلی مول در لیتر تعیین گردید. جدول زیر تعداد و درصد جایگاه‌ها و ثابت اتصال را در سه گروه سالم دیابتی کنترل نشده و دیابتی کنترل شده همراه با مقادیر HbA<sub>1C</sub> و قند خون هر یک از گروه‌ها نشان می‌دهد.

### بحث

در این مطالعه با استفاده از روش گمبیر (Gambhir)، گیرنده‌های گلوبول قرمز در افراد دیابتی و دیابتی کنترل شده

مقادیر p در بین دو گروه دیابتی و دیابتی کنترل شده مساوی ۰/۰۰۹ < P و بین دو گروه سالم و دیابتی کنترل نشده مساوی ۰/۰۸ < P بدست آمد. نمودار اسکاجارد جهت تعیین درصد انسولین پیوند شده و در نهایت تعداد سایت‌های انسولین پیوند شده در هر سلول گلوبول قرمز مورد استفاده قرار گرفت. محور عمودی نسبت انسولین اتصال یافته به انسولین آزاد و بر روی محور افقی انسولین پیوند شده بر حسب مول در لیتر آمده است (این کمیت با در نظر گرفتن وزن مولکولی انسولین مساوی ۵۷۳۳ دالتون محاسبه شده است). تعداد انسولین اتصال یافته در لیتر از محل تقاطع خط نمودار در غلظت‌های اولیه با محور عمودی برای سه گروه دیابتی، دیابتی کنترل شده و سالم به ترتیب مساوی ۱۰۲۶ ± ۴۰/۳ و ۱۲۳۰ ± ۴۹/۲ و ۱۸۲۰ ± ۷۲/۸ بدست آمد. رسم نمودار درصد انسولین پیوند شده در مقابل

افزایش ترشح انسولین شوند. اما در مطالعاتی که با استفاده از گلوبول‌های قرمز و مونوسیت‌ها انجام گرفته است، مشخص گردیده که این ترکیبات می‌توانند باعث افزایش اتصال انسولین به گیرنده اش نیز بشوند [۱۳-۱۵]

مواردی که در مطالعه حاضر برای نخستین بار گزارش گردیده یکی ارتباط معکوسی است که بین  $HbA_{1C}$  و تعداد گیرنده های انسولینی هر یک از افراد مورد مطالعه در سه گروه شناسایی شده است و نشان می‌دهد در بیماری دیابت نوع دو هر قدر بیماری پیشرفته‌تر باشد تعداد گیرنده‌های انسولینی کاهش بیشتری را نشان می‌دهند.

همچنین بررسی ثابت پیوندی K در ترکیب انسولین با گیرنده اش نیز نشان داد که علاوه بر کاهش تعداد گیرنده های انسولین، میل ترکیبی آنها نیز با انسولین کاهش می‌یابد که این نتیجه نیز از آن جهت در خور اهمیت است که نشان می‌دهد در فرایند تغییرات ساختمانی مولکول‌های پروتئینی گیرنده‌های انسولینی نیز ممکن است دستخوش این تغییرات شوند و در نتیجه فعالیت آنها کاهش یابد. با توجه به همبستگی زیادی که بین درجه پیشرفت بیماری دیابت و تعداد و همچنین میل ترکیبی گیرنده های انسولینی وجود دارد به نظر می‌رسد که می‌توان با استفاده از گلوبول‌های قرمز طیف وسیعی از فراورده‌های دارویی را شناسایی کرد که از طریق افزایش میزان اتصال انسولین به گیرنده اش باعث افزایش بهبود سلامت بیماران می‌شوند. تحقیق بیشتر در این زمینه می‌تواند راه را برای ساخت و شناسایی داروهای کارآمد که بتوانند تأثیر بیشتری در افزایش گیرنده‌های سلولی داشته باشند هموار نماید.

و افراد سالم بررسی شد. برای تفکیک دو گروه دیابتی از هم وضعیت سلامتی بیمار هنگام مراجعه به درمانگاه و مقدار هموگلوبین گلیکوزیله تعیین گردید. مقدار  $HbA_{1C}$  در گروه دیابتی کنترل نشده  $11/8 \pm 3/8$  و در گروه دیابتی کنترل شده  $5/6 \pm 0/9$  تعیین گردید. مطالعه ما نشان داد که بین میزان اتصال انسولین به گیرنده اش در گلوبول‌های قرمز افراد سالم و دو گروه دیابتی تفاوت معنی داری وجود دارد (شکل ۱ و ۲). در افراد سالم و دیابتی کنترل نشده  $P < 0/008$  و در افراد سالم و دیابتی کنترل شده  $P < 0/017$  بدست آمد، همچنین بین دو گروه دیابتی کنترل شده و کنترل نشده تفاوت معنی داری مشاهده گردید ( $P < 0/008$ ). میزان اتصال با وضعیت نظارت بیمار بر میزان قند خون و  $HbA_{1C}$  همخوانی داشت به نحوی که ارتباط معکوس بین میزان  $HbA_{1C}$  و میزان اتصال مشاهده گردید (شکل ۳). در مطالعات محققان دیگر، نتایج مشابهی حاصل شد. در گزارشی بعد از یک دوره نظارتی یکساله به کمک دارو و رژیم غذایی میزان اتصال انسولین به گیرنده اش در گلوبول‌های قرمز مورد بررسی قرار گرفت [۱۱].

استفاده از منحنی اسکاچارد در تعیین تعداد گیرنده‌ها بر سطح گلوبول قرمز روشی مناسب جهت مقایسه وضع بیمار است که می‌تواند در مطالعه اثر داروها، مواد غذایی و سایر عوامل تأثیرگذار بر روند پیشرفت یا درمان بیماری دیابت مورد استفاده قرار گیرد [۱۱-۱۳].

در بررسی اثر داروها بر روند بهبودی بیماری دیابت، امکان تأثیر دارو از طریق اثر بر افزایش گیرنده‌های سلولی نیز ممکن است مورد توجه قرار گیرد بطور مثال ترکیبات سولفونیل‌اوره قادرند با تحریک سلول‌های بتا باعث

## مآخذ

- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, and Rodwell VW, Harper's Biochemistry Mc Graw-Hill, 2003.
- Leroith D, Taylor SI and Oltesky I M, Diabetes Mellitus. Lipincott Williams and wilkins, 2003.
- Zancan P. Sola Penna M. Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin, Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function *Mol Genet Metab* 2005; 86: 401-11.
- Santos RF, Palmieri MG Wajchenberg BL and Azhars. Insulin- receptor tyrosine kinase activity decreased in erythrocytes from non obese patients with NIDDM, *Horm. Metab Res.* 1994; 26: 283-7.
- Gambhir KK Archer JA, and Carter L, Insulin radioreceptor assay for human erythrocytes, *Clinical Chem* 1977; 23: 1590-1595.
- Robinson TJ Archer JA, Gambhir KK Hollis VW, Erythrocyte: a new cell type for the evaluation of insulin receptor defects in diabetic human. *Science* 1979; 205: 200-202.
- Marques F. Crespo ME, Silva ZI and Bicho M., Insulin and high glucose modulation of

- phosphatase and reductase enzyme in the human erythrocytes; a comparative analysis in normal and diabetic states, *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 47: 191-8.
9. Gambhir KK, Archer JA, and Bradfey CY, Characteristics of human erythrocyte insulin receptor, *Diabetes* 1978; 27: 701-708.
  10. Gambhir KK, Archer J. and Caster L, Insulin radioreceptor assay for human erythrocytes, *Clinic Chem* 1977; 23:1590-1592.
  11. Doms FR Ryan I , Gorden P, and wachslicht Rodbard H., Erythrocytes and monocytes insulin binding in man, *Diabetes* 1981; 30; 896-902.
  12. Santos RF, Nomizo R, Oliveira E Ursich M.Wajchenberg B. R GM. Azhar S. Erythrocyte insulin receptor tyrosine kinase activity is increased in glyburide-treated patients with type 2 diabetes in good glycemic control, *Diabetes Obes Metab* 2000; 2: 237-41.
  13. Canivet B., and Freychet P, Glipizide treatment does not change erythrocyte insulin receptors in non insulin- dependent diabetes mellitos, *Therapie* 1985; 40: 93-97.
  14. Hribal ML, D'Alfonso R, Giovannone B, Lauro D, Liu YY, Borboni P, Federici M, Lauro R, Sesti G. The sulfonylurea glimepiride regulates intracellular routing of the insulin-receptor complexes through their interaction with specific protein kinase C isoforms, *Mol Pharmacol*, 2001; 59: 322-30.