

## بررسی اثر اسید آمینه ال- لوسین به عنوان فعال کننده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز و بیتیونول و سولوکتیدیل در نقش مهار کننده‌های این آنزیم، بر روی رت‌های غیر دیابتی و دیابتی شده با آلوکسان

پریچهر یغمایی<sup>۱\*</sup>، آزاده ابراهیم حبیبی<sup>۲</sup>، معصومه نصرالهی<sup>۳</sup>، فرزانه آدینه<sup>۳</sup>

### چکیده:

**مقدمه:** بیماری دیابت یک معضل عمده و تهدید کننده سلامتی انسان می‌باشد که شیوع آن به طور هشدار دهنده‌ای در حال افزایش است. در این بیماری قند خون و به دنبال آن چربی خون افزایش می‌یابد. آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (GDH) موجب افزایش ترشح انسولین می‌شود. لذا مهار کننده‌های این آنزیم شامل بیتیونول (Bithionol)، سولوکتیدیل (Suloctidil)، و همچنین لوسین (L-Leucine) به عنوان فعال کننده آنزیم GDH می‌توانند تاثیراتی بر ترشح انسولین داشته باشند. در مطالعه حاضر تاثیر این عوامل بر میزان ترشح انسولین و مقدار قند و لیپیدهای خون مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش‌ها:** رت‌ها در دو گروه غیردیابتی و دیابتی (تزریق درون صفاقی آلوکسان با دوز ۱۵۰ mg/kg تقسیم شدند. در هر گروه سه دسته برای دریافت ترکیب مورد نظر قرار گرفتند. بیتیونول با دوز ۱۰ mg/kg، سولوکتیدیل و لوسین هر کدام ۲۰ mg/kg به صورت گاوژ به رت‌ها داده شد. این تیمار ۳۰ روز ادامه یافت و در طول تیمار پارامترهای گلوکز خون به صورت هفتگی و میزان مصرف آب و میزان ادرار به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. میزان هورمون انسولین (توسط کیت انسولین رت ALPCO) و فاکتورهای کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL و LDL (توسط کیت پارس آزمون) پس از دوره تیمار ثبت گردید. در پایان جهت بررسی‌های هیستولوژیکی از پانکراس موش‌ها مقاطع بافتی تهیه شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند ترکیب بیتیونول موجب کاهش معناداری ( $P < 0/001$ ) در میزان گلوکز خون و آب و ادرار و میزان تری‌گلیسرید در گروه تجربی دیابتی ۱ نسبت به گروه شم گردید. ترکیبات سولوکتیدیل و لوسین در گروه تجربی دیابتی نسبت به گروه شم موجب کاهش میزان آب و ادرار ( $P < 0/001$ ) و همین‌طور کاهش میزان LDL ( $P < 0/01$ ) شدند. همچنین لوسین باعث افزایش ( $P < 0/05$ ) تری‌گلیسرید در گروه تجربی دیابتی ۳ گردید. نتایج هیستولوژیکی اندکی بهبود را در گروه‌های تجربی دیابتی نسبت به گروه شم دیابتی نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** ترکیبات به کار رفته در این پژوهش، نیازمند تحقیقات بیشتری جهت روشن شدن سازوکار عمل آنها می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** دیابت، پانکراس، آنزیم گلوتامات دهیدروژناز، بیتیونول، سولوکتیدیل، لوسین

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

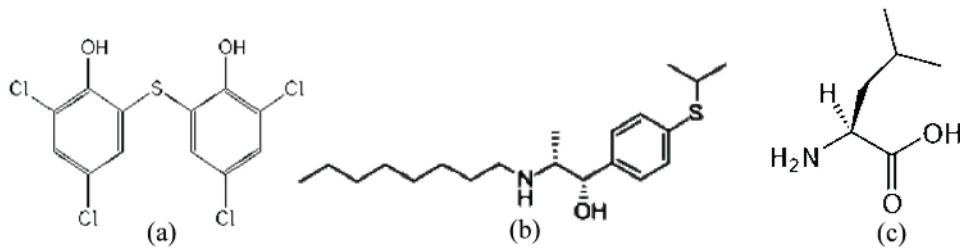
\* **نشانی:** تهران، پونک، حصارک، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، صندوق پستی:

۷۷۵-۱۴۵۱۵، تلفن: ۰۲۱-۴۸۰۴۱۷۰، پست الکترونیک: yaghmaei\_p@yahoo.com

## مقدمه

دیابت بیماری پیش رونده مزمنی است که در اثر افزایش گلوکز خون به دلیل عدم پاسخ فیزیولوژیکی نسبت به گلوکز ایجاد می‌شود. در بیماری دیابت علاوه بر سطح سرمی گلوکز، سطوح سرمی تری‌گلیسرید، کلسترول، LDL، VLDL خون نیز افزایش و سطح HDL که لیپوپروتئین مفید است، کاهش می‌یابد که هر کدام مشکلات خاص خود را به دنبال دارد [۱،۲]. با توجه به افزایش دانش بشری در خصوص این بیماری، نیاز برای یافتن ترکیبات موثر با حداقل عوارض جانبی در درمان دیابت و عوارض ناشی از آن احساس می‌شود [۳]. در حال حاضر درمان اصلی و موثر برای دیابت قندی استفاده از انسولین و عوامل هیپوگلیسمیک است. این ترکیبات دارای عوارض نامطلوب متعددی نظیر افزایش ذخایر چربی، تحلیل رفتن بافت در محل تزریق و بروز شوک هیپوگلیسمیک هستند. همچنین در درازمدت بر روند کاهش ایجاد عوارض دیابت تأثیری ندارند [۴]. واسطه‌های فعال اکسیژن، فرم‌های فعالی از اکسیژن هستند که محصول جانبی تنفس سلولی و فرایندهای متابولیکی سلول می‌باشند و به علت وارد آوردن آسیب‌های اکسیداتیو به سلول ماده سمی محسوب می‌شوند [۵]. آلوکسان با تأثیر مستقیم در تنظیم فعالیت برخی از آنزیم‌های مؤثر در مسیر گلیکولیز به عنوان یکی از داروهای مهم جهت بررسی سازوکارهای تنظیمی متابولیسم گلوکز مطرح می‌باشد [۶]. این دارو با تشدید واکنش‌های استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس غده پانکراس به نکروزه کردن آنها می‌پردازد [۷،۸]. این واکنش‌ها همراه با افزایش غلظت کلسیم در سیتوزول همراه است که باعث تخریب سریع در سلول‌های بتای پانکراس شده و ایجاد دیابت می‌نماید [۹]. در دیابت نوع ۱ و ۲ استرس اکسیداتیو در بدن افزایش یافته است [۱۰]. همچنین استرس اکسیداتیو در ایجاد عوارض میکروواسکولار بیماری نقش دارد [۱۱]. در سندرم‌های hyperammonemia و hyperinsulismemia که یک جهش غالب سبب ایجاد آن می‌شود، بر اهمیت

GDH وقتی توسط GTP، ATP مهار می‌شود، تأکید می‌گردد [۱۲]. اهمیت فعالیت GDH را در موش‌های ترانس ژنیک که دارای هیپوگلیسمی بودند، با توجه به میزان تحریک ترشح انسولین نسبت به موش‌های سالم می‌توان یافت [۱۳]. بنابراین با توجه به نقش مهم GDH در تنظیم انسولین، مهار کننده‌ها و محرک‌های این آنزیم می‌توانند در درمان دیابت تأثیرگذار باشند [۱۴،۱۵]. از جمله مهارکننده‌های آن Bithionol، suloctidil می‌باشند [۱۶،۱۷]. بیتیونول ترکیبی آنتی باکتریال و آنتی پارازیت می‌باشد و دارای حلقه‌های فنول است [۱۸،۱۹]. سولوکتیدیل هم بلوکه کننده کانال کلسیمی است [۲۰،۲۱]. سولوکتیدیل در سطح مهار نقل و انتقالات کلسیم سیتوزولی با بلوکه کردن کانال کلسیمی، اثر مهارکنندگی خود را بر GDH و ترشح انسولین صورت می‌دهد [۲۲]. مشخص شده که لوسین فعالیت گلوتامات دهیدروژناز را در سلول‌های بتا افزایش می‌دهد و این تغییر موجب فعالیت چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک شده و موجب افزایش ATP در داخل سلول بتای پانکراس می‌شود. با افزایش ATP کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP بسته و کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ باز می‌شود و در نتیجه ورود کلسیم به داخل سلول‌های بتا، انسولین از سلول‌های بتا رها می‌شود. محققان این سازوکار را علت اصلی ترشح انسولین در اثر مصرف اسید آمینه‌های شاخه‌دار می‌دانند [۲۳،۲۴] (شکل ۱). دیابت یکی از بیماری‌های پیچیده در انسان می‌باشد که هنوز اتیولوژی آن به خوبی شناخته نشده است. از این رو ایجاد مدل‌های آزمایشگاهی مناسب برای بررسی بیماری فوق حائز اهمیت فراوانی می‌باشد. ترکیبات شیمیایی مختلف جهت ایجاد دیابت در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند که از متداول‌ترین آنها ماده شیمیایی آلوکسان می‌باشد [۲۵،۲۶]. در پژوهش حاضر تلاش شده است تأثیر مصرف ترکیبات نام برده شده شامل بیتیونول، سولوکتیدیل و لوسین در رت‌های نر دیابتی شده توسط آلوکسان، بر میزان ترشح انسولین، مقدار قند خون، لیپیدها و سایر عوامل مرتبط آن بررسی شود.



شکل ۱- ساختار شیمیایی ترکیبات: (a) بیتینول، (b) سولوکتیدیل، (c) لوسین [۱۷،۲۷،۲۸]

## روش‌ها

حالت تنها دم آن بیرون قرار می‌گیرد. سپس با سوزن استریل سرنگ، به دم آن ضربه‌ای زده و بعد از خروج قطره‌های خون توسط دستگاه گلوکومتر میزان گلوکز خون تعیین می‌شود. پس از پایان دوره تیمار، خون‌گیری از قلب رت‌ها صورت گرفت. از این طریق میزان انسولین خون توسط کیت انسولین رت ALPCO و میزان کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و HDL توسط کیت‌های پارس‌آزمون اندازه‌گیری شد. سپس پانکراس آنها خارج شده و پس از شستشو با آب مقطر در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت پانکراس را از فرمالین خارج و وارد مراحل فیکس و تهیه مقطع بافتی می‌گردد. از جمله آبیگری، الکل‌گیری، پارافین دهی و نهایتاً برش‌گیری که برش‌هایی به قطر ۶ میکرون روی لام تهیه شد. رنگ‌آمیزی با روش هماتوکسیلین و ائوزین انجام گردید. از لام‌های آماده شده توسط میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین با بزرگنمایی  $\times 400$  عکس‌برداری شد. تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از واریانس یک طرفه (one-way-ANOVA) و تست Tukey بررسی گردیدند. نتایج به صورت میانگین و خطای معیار ارائه گردیده است. معیار استنتاج آماری  $(P < 0/05)$  در نظر گرفته شده است.

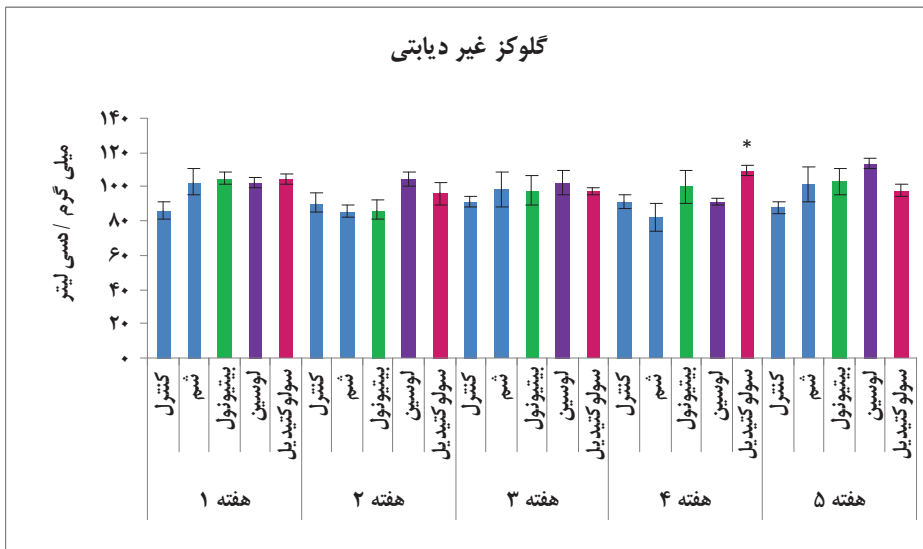
## یافته‌ها

در این بخش در دو گروه غیر دیابتی و دیابتی به شرح نتایج و مشاهدات پرداخته شده است. ابتدا میزان گلوکز آنها مورد بررسی قرار گرفت، سپس تغییرات آب و ادرار و میزان انسولین خون حیوانات بررسی شد. در نهایت تصاویری از مقاطع بافتی پانکراس قابل مشاهده است. در بررسی تغییرات میزان گلوکز سرم خون در گروه‌های تجربی غیر دیابتی ۱ و ۳ در مقایسه با گروه شم، در طی

در این مطالعه رت‌های نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در دمای  $22 \pm 2$  نگهداری شدند. حیوانات به ۶ گروه تقسیم شدند ( $n=6$ ). گروه‌های تجربی دیابتی با تزریق درون صفاقی الوکسان مونوهیدرات (sigma-aldrich) دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دیابتی شدند. گروه کنترل دیابتی که آب و غذای معمولی داشتند، گروه شم دیابتی که علاوه بر آب و غذای معمولی، حلال دارو (روغن هسته انگور) دریافت می‌کردند، گروه تجربی دیابتی ۱ که ترکیب بیتینول (Fluka) را با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۰/۵cc حلال روغن هسته انگور، گروه تجربی دیابتی ۲ که ترکیب سولوکتیدیل (sigma-aldrich) را با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۰/۵cc حلال روغن هسته انگور و گروه تجربی دیابتی ۳ که ترکیب ال-لوسین (sigma-aldrich) را با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۰/۵cc حلال روغن هسته انگور دریافت کردند. تیمار به مدت یک ماه از طریق گاوژ ادامه یافت. گروه‌های غیر دیابتی کنترل، شم و تجربی هم مطابق با گروه‌های دیابتی و با دوزهای یکسان تیمار شدند. نحوه گاوژ کردن به این صورت بود که نیدل مخصوص گاوژ به سرنگ انسولین متصل نموده و محلول مورد نظر به حیوان خورانده می‌شود. برای این کار پوست ناحیه پشت گردن و گوش حیوان گرفته شده و حیوان به طور قائم نگه داشته می‌شود. این امر موجب می‌شود که ترکیب از طریق نیدل مستقیماً به حلق آن وارد شود. در طی دوره تیمار به طور روزانه میزان آب مصرفی و میزان ادرار آنها توسط قفس متابولیک، اندازه‌گیری و ثبت گردید. همچنین به طور هفتگی میزان گلوکز خون آنها اندازه‌گیری شد. برای این امر حیوان را در دستگاه مهارکننده موش (restrainer) قرار دادیم. در این

نشان می‌دهد. گروه تجربی دیابتی ۳ نیز یک تغییر کاهشی معنادار در سطح ( $P < 0/01$ ) را در میزان گلوکز خون، نسبت به گروه شم نشان می‌دهد. این در حالی است که گروه تجربی دیابتی ۲ تغییر معناداری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه شم در میزان گلوکز خون نشان نداده است (نمودار ۲).

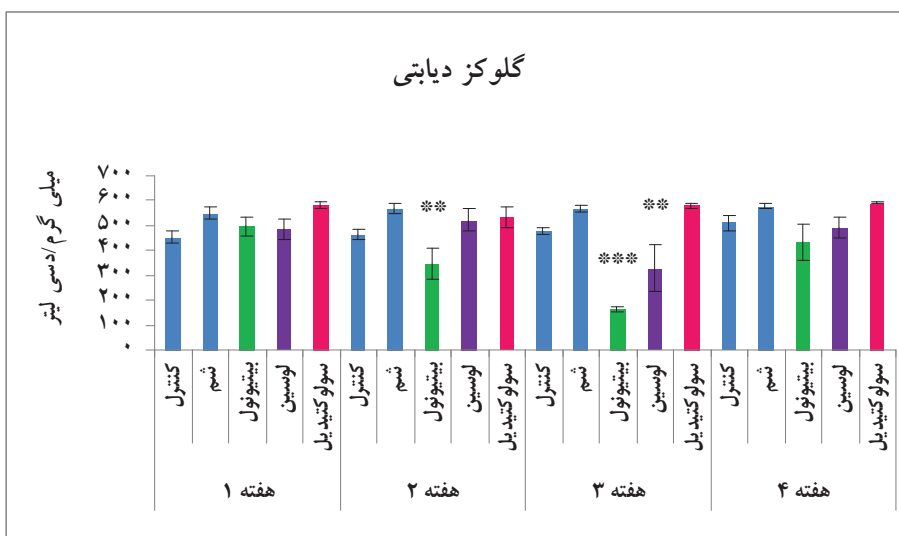
دوره تیمار تغییرات معناداری ( $P < 0/05$ ) را نشان نداده‌اند. اما گروه تجربی غیر دیابتی ۲، افزایش معناداری ( $P < 0/05$ ) نشان داده است (نمودار ۱). در بررسی تغییرات میزان گلوکز خون در گروه تجربی دیابتی ۱ در هفته دوم و سوم تیمار تغییرات کاهشی معناداری در سطوح ( $P < 0/01$ ) و ( $P < 0/01$ ) را در میزان گلوکز خون نسبت به گروه شم



\* سطح معنادار ( $P < 0/05$ )

نمودار ۱- مقایسه میزان گلوکز خون در گروه‌های تجربی غیر دیابتی ۱ و ۲ و ۳ با گروه شم

گروه‌های نامبرده در طی دوره تیمار تغییرات معناداری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه شم، در میزان گلوکز خون نشان نداده‌اند. تنها گروه تجربی غیر دیابتی ۲ (سولوکتیدیل) افزایش معناداری را با سطح ( $P < 0/05$ ) نشان داده است.

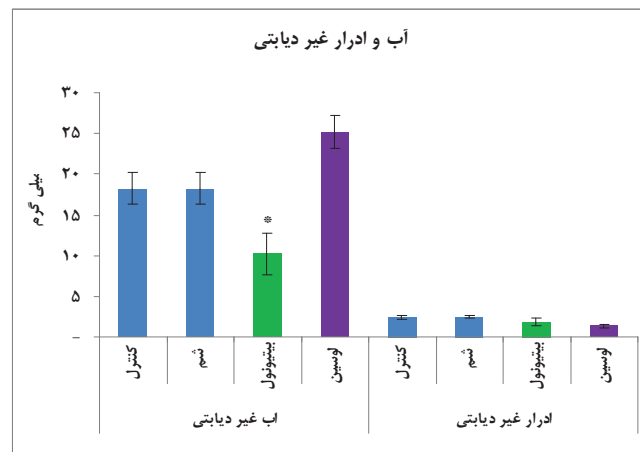


\*\* سطح معنادار ( $P < 0/01$ ), \*\*\* سطح معنادار ( $P < 0/001$ )

نمودار ۲- مقایسه میزان گلوکز خون در گروه‌های تجربی دیابتی ۱ و ۲ و ۳ با گروه شم

در این نمودار گروه دیابتی ۱ (بیتونول) در هفته دوم و سوم تیمار تغییرات کاهشی معناداری در سطوح ( $P < 0/001$ ) را در میزان گلوکز خون نسبت به گروه شم نشان می‌دهد. گروه دیابتی ۳ (لوسین) نیز در هفته سوم تغییر کاهشی معنادار در سطح ( $P < 0/001$ ) را در میزان گلوکز خون، نسبت به گروه شم نشان می‌دهد. اما گروه دیابتی ۲ (سولوکتیدیل) تغییر معناداری را نسبت به گروه شم در میزان گلوکز خون نشان نداده است.

در مقایسه تغییرات آب و ادرار در گروه‌های تجربی غیر دیابتی ۱ و ۳ دیده می‌شود که میزان مصرف آب گروه غیر دیابتی ۱ دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه شم داشته در حالی که میزان مصرف آب گروه غیر دیابتی ۳ و همچنین میزان ادرار آنها تغییرات معناداری ( $P < 0/05$ ) نداشته است (نمودار ۳). بررسی تغییرات آب و ادرار در گروه‌های تجربی دیابتی ۱ و ۲ و ۳ نشان داد که میزان آب مصرفی و ادرار همه گروه‌های دیابتی دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/001$ ) نسبت به گروه شم داشته است (نمودار ۴).

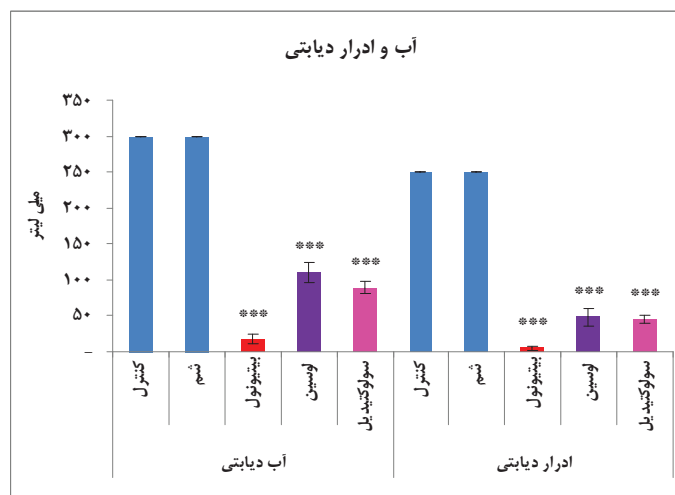


\* سطح معنادار ( $P < 0/05$ )

نمودار ۳- مقایسه تغییرات آب و ادرار در گروه‌های تجربی غیر دیابتی ۱ و ۳ نسبت به گروه شم

تغییرات معناداری را نشان نداده است. همچنین میزان ادرار آنها دارای تغییرات معناداری ( $P < 0/05$ ) نبوده است.

در این نمودار، میزان مصرف آب گروه غیر دیابتی ۱ (بیتونول) دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه شم می‌باشد. میزان مصرف آب گروه غیر دیابتی ۳ (لوسین)

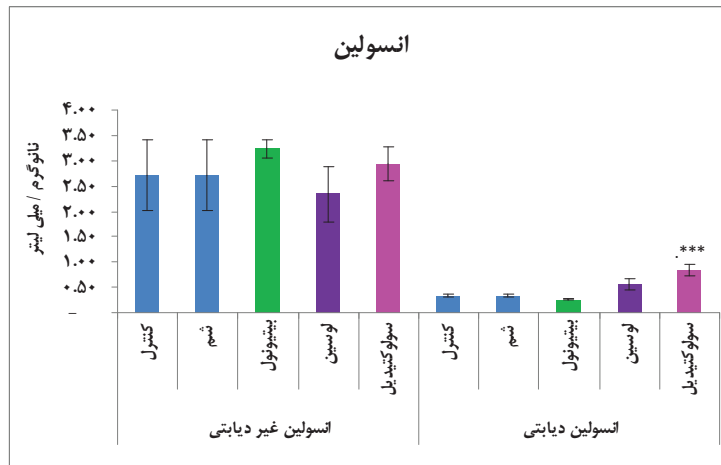


\*\*\* سطح معنادار ( $P < 0/001$ )

نمودار ۴- مقایسه تغییرات آب و ادرار در گروه‌های تجربی دیابتی ۱ و ۲ و ۳ نسبت به گروه شم

همین طور گروه تجربی دیابتی ۱ و ۲ و ۳ در مقایسه گروه شم دیابتی مورد مقایسه قرار گرفت. تنها در گروه تجربی دیابتی ۲ افزایش معناداری نسبت به شم آن در سطح  $(P < 0/001)$  مشاهده شده است و در گروه‌های ۱ و ۳ بدون تغییر بوده است (نمودار ۵).

در این نمودار، میزان مصرف آب و ادرار همه گروه‌های تجربی دیابتی ۱ و ۲ و ۳ دارای کاهش معنی‌داری در سطح  $(P < 0/001)$  نسبت به گروه شم می‌باشد. در ادامه بررسی‌ها میزان انسولین در رت‌های گروه تجربی غیر دیابتی ۱ و ۲ و ۳ نسبت به گروه شم غیر دیابتی و

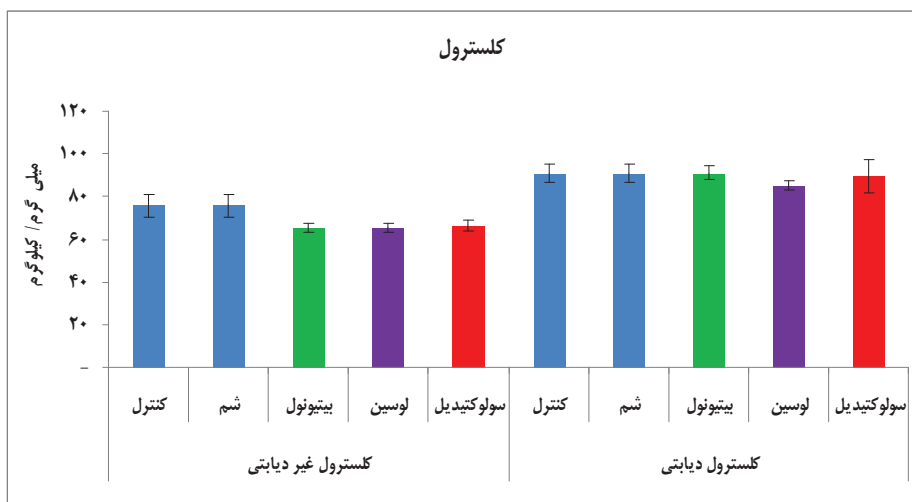


\*\*\* سطح معنا دار  $(P < 0/001)$

نمودار ۵- مقایسه میزان انسولین در رت‌های گروه تجربی غیر دیابتی ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه شم غیر دیابتی، همین طور گروه تجربی دیابتی ۱ و ۲ در مقایسه با گروه شم دیابتی

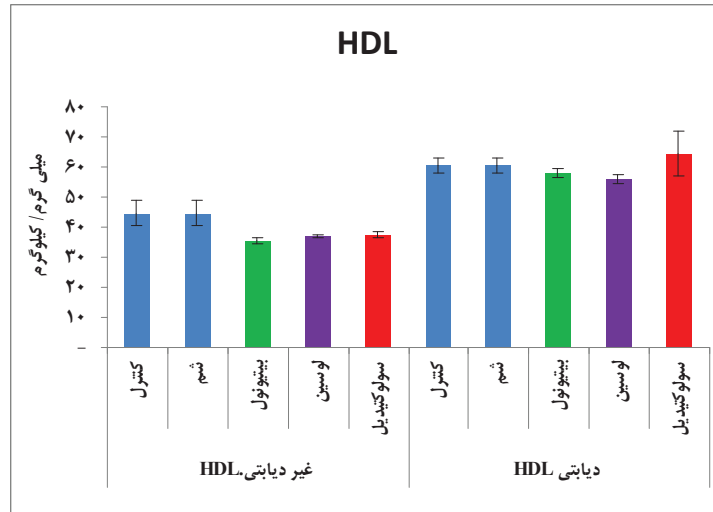
تجربی دیابتی ۱ کاهش تری‌گلیسرید  $(P < 0/001)$  و در گروه دیابتی ۲ کاهش LDL  $(P < 0/01)$  مشاهده شد. گرچه در گروه تجربی دیابتی ۳ کاهش LDL  $(P < 0/01)$  مشاهده می‌شود، اما در میزان تری‌گلیسرید  $(P < 0/05)$  افزایش را نشان می‌دهد (نمودار ۸ و ۹).

تنها در گروه دیابتی سولوکتیدیل افزایش معناداری نسبت به شم آن در سطح  $(P < 0/001)$  مشاهده شده است. در بررسی تغییرات لیپیدها در گروه‌های مورد بررسی نتایج به دست آمده نشان دادند ترکیبات در تغییر میزان کلسترول و HDL بی اثر بوده‌اند (نمودار ۶ و ۷). در حالی که در گروه



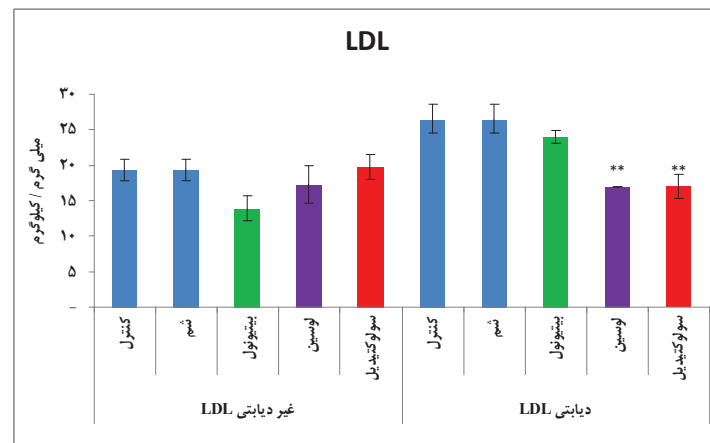
تغییر معناداری  $(P < 0/05)$  مشاهده نمی‌شود

نمودار ۶- مقایسه میزان کلسترول خون در گروه‌های تجربی دیابتی ۱، ۲ و ۳ با گروه شم



تغییر معناداری ( $P < 0.05$ ) مشاهده نمی شود

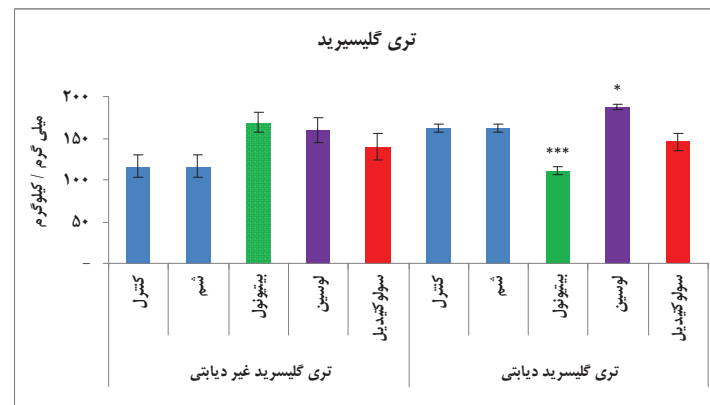
نمودار ۷- مقایسه میزان HDL خون در گروه‌های تجربی دیابتی ۱، ۲ و ۳ با گروه شام



\*\* سطح معنادار ( $P < 0.01$ )

نمودار ۸- مقایسه میزان LDL خون در گروه‌های تجربی دیابتی ۱، ۲ و ۳ با گروه شام

گروه دیابتی ۲ (سولونکتیدیل) و گروه دیابتی ۳ (لوسین) تغییر کاهشی معنادار در سطح ( $P < 0.01$ ) را در میزان LDL خون، نسبت به گروه شام نشان می دهند.

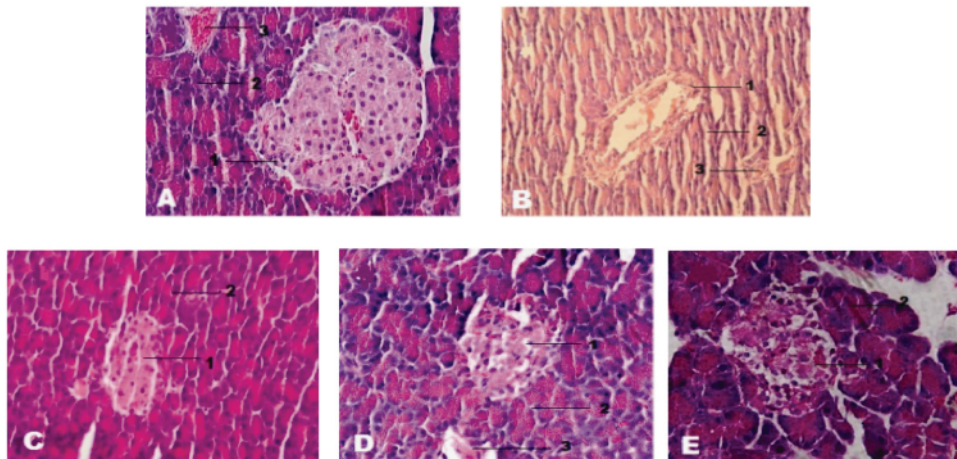


\* سطح معنادار ( $P < 0.05$ )، \*\* سطح معنادار ( $P < 0.01$ )

نمودار ۹- مقایسه میزان تری گلیسرید (TG) خون در گروه‌های تجربی دیابتی ۱، ۲ و ۳ با گروه شام

طبیعی دارد (شکل 1-A)، گروه شم دیابتی با تزریق آلوسان، تخریب و پراکنندگی سلول‌های جزایر بافت پانکراس را نشان می‌دهد (شکل 1-B). در گروه‌های تجربی دیابتی ۱، ۲ و ۳ بازسازی و ترمیم اندکی در جزایر لانگرهانس صورت گرفته است (تصاویر E، D، C).

در این نمودار گروه دیابتی ۱ (بیتونول) تغییرات کاهشی معناداری ( $P < 0/001$ ) را در میزان TG نسبت به گروه شم نشان می‌دهد. گروه دیابتی ۳ (لوسین) نیز در هفته سوم تغییر افزایشی ( $P < 0/05$ ) را در میزان TG، نسبت به گروه شم داشته است. همچنین نتایج مطالعات هیستولوژیکی نشان داد که جزایر لانگرهانس در گروه کنترل ظاهری



۱- جزایر لانگرهانس، ۲- سلول‌های آسینی، ۳- سرخرگ. A: گروه شم غیر دیابتی، B: گروه شم دیابتی، C: گروه دیابتی ۱ تیمار شده با بیتونول (دوز ۱۰ mg/kg)، D: گروه دیابتی ۳ تیمار شده با لوسین (دوز ۲۰ mg/kg)، E: گروه دیابتی ۲ تیمار شده با سولوکتیدیل (دوز ۲۰ mg/kg). شکل ۲- مقطع برش عرضی پانکراس. بزرگنمایی  $\times 400$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین

۲۰۰۸ توسط Stanley، ۲۰۰۴ توسط Corobbi، ۲۰۱۰ توسط Yang و ۲۰۱۱ توسط Fahein بر روی GDH انجام شد و همگی نقش موثر آن را در ترشح انسولین تایید کردند. آنها سازوکار کاملی از نقش این آنزیم را در ترشح انسولین ارائه دادند [۳۰-۳۲]. در سطح انرژی پایه در سلول‌های بتا BCH ( $\beta$ -2-aminobicyclo[2.2.2]-heptan-2-carboxylic acid) موجب تحریک ترشح انسولین می‌شود. انرژی مورد نظر، حاصل از تجزیه گلوتامین (glutaminolysis)، فسفات‌های وابسته به آنزیم گلوتامیناز و GDH است. در این حالت غلظت مهار کننده‌های GDH کاسته می‌شود (ATP/GTP) و فعال کننده‌های فسفات وابسته به گلوتامیناز (فسفات غیر ارگانیک  $\text{pi}$ ) افزایش می‌یابد. BCH موجب می‌شود که GDH گلوتامین را تجزیه کرده و در پی آن سیگنال‌های ضروری ATP برای ترشح انسولین تولید می‌گردد. مهار کننده‌های GDH این پروسه را با مهار GDH بلوکه می‌کنند [۲۷، ۳۳]. در پژوهش حاضر

## بحث

در طی سال‌های گذشته تحقیقات متعددی در خصوص آنزیم گلوتامات دهیدروژناز، سازوکار و نقش آن در ترشح انسولین صورت گرفته است. از جمله آنها در سال ۱۹۹۸، Stanley و همکاران در پژوهشی تاثیر ژن‌های جهش یافته گلوتامات دهیدروژناز را در بیماری‌های hyperinsulism/hyperammonemia بررسی کردند، نتیجه تحقیقات و آزمایش‌های آنها بر این بود که این سندرم‌ها در اثر جهش در ژن سازنده گلوتامات دهیدروژناز بروز می‌کند و به فعالیت آنزیم لطمه می‌زند [۲۹]. در تحقیقی Changhong در سال ۲۰۰۶، اثرات جهش گلوتامات دهیدروژناز حساس به GTP را در ترشح انسولین در موش‌های ترنس ژنیک بررسی کرد. نتایج نشان داد که GDH موجب اکسیداسیون گلوتامات در جزایر لانگرهانس موش شده که نهایتاً باعث افزایش ترشح انسولین می‌گردد. این امر با میزان گلوکز خون مرتبط می‌باشد [۱۳]. تحقیقات مشابهی در سال‌های



بیماری‌های گوناگونی از جمله پارکینسون، آلزایمر مطالعه شده است که اثرات مثبتی در بیماری‌های فوق نداشته است [۴۳-۳۶]. در پژوهش حاضر نیز گروه تجربی دیابتی ۲ (سولوکتیدیل) توانسته است میزان انسولین سرم را نسبت به گروه شم افزایش دهد ( $P < 0/001$ ). از طرفی در گروه‌های غیر دیابتی موجب افزایش گلوکز گردیده است (نمودار ۵) و میزان LDL را کاهش داده است ( $P < 0/01$ ) (نمودار ۸). در مشاهدات هیستولوژیکی جزایر لانگرهانس در گروه تجربی دیابتی ۲ نسبت به گروه شم دیابتی بهبودی اندکی را نشان می‌دهد (شکل ۲). اثر افزایشی سولوکتیدیل بر ترشح انسولین در این پژوهش با اثر مهارکنندگی آن بر GDH در پژوهش‌های Valverd و Ming مغایرت دارد، اما با تاثیر بر افزایش گلوکز، اثر مهارکنندگی خود را می‌تواند تایید کند. بنابراین برای یافتن دلیل تاثیر دوگانه سولوکتیدیل، پژوهش‌های بیشتری در این خصوص مورد نیاز است.

از آنجایی که لوسین به طور نرمال ترشح انسولین را توسط فعال کردن آلوستریکی GDH انجام می‌دهد و از طریق افزایش نسبت ATP/ADP باعث بستن کانال‌های K/ATP و باز کردن کانال‌های وابسته به ولتاژ کلسیمی می‌گردد، افزایش غلظت کلسیم سیتوزولی موجب افزایش ترشح انسولین از گرانول‌های ذخیره می‌شود [۴۴]. همچنین Yung در پژوهشی در سال ۲۰۱۰ نشان داد که درمان بلندمدت با لوسین موجب بهبود اختلالات ترشح انسولین در جزایر دیابتیک انسانی می‌گردد. لوسین این عمل را به وسیله تنظیم ژن‌های کلیدی متابولیکی انجام می‌دهد. به کار بردن لوسین در شرایط *in vivo*، کنترل گلیسیمیک را در انسان و رت‌های دارای دیابت نوع ۲ بهبود می‌بخشد [۳۱]. در تحقیقی دیگر Silva در سال ۲۰۱۰ بیان کرد که رژیم غذایی با فقر پروتئین، ترشح انسولین را دچار اختلال می‌کند و ممکن است ناهنجاری‌های متابولیکی مختلفی را موجب شود که در نهایت منجر به دیابت، چاقی و تصلب شرائین گردد. نهایتاً فعال کننده‌های آلوستریکی GDH (لوسین)، باعث افزایش ترشح انسولین در رت‌های دارای رژیم غذایی غنی شده توسط لوسین می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اضافه کردن لوسین به میزان ۱/۵ درصد از

مهارکننده‌ها و فعال کننده‌های این آنزیم مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله Ming و Yang، ترکیباتی تحت عنوان مهار کننده‌های GDH را مثل Bithionol معرفی نمودند [۱۵،۳۱]. این ترکیب آنتی باکتریال در شکل ساختاری خود دارای دو حلقه فنول می‌باشد (شکل ۱) [۲۷،۳۵]. در تحقیقی در سال ۲۰۰۶ توسط Changhong و همکارانش بر روی اثر پلی فنول‌های چای سبز انجام دادند و اثرات افزایشی آن را در ترشح انسولین مشاهده نمودند. حلقه‌های فنول دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و مانع اکسیداتیو در سلول می‌شوند. پس با ممانعت عمل استرس اکسیداتیو می‌توانند در برابر عوارض آن از جمله دیابت جلوگیری کنند [۱۲]. در پژوهش حاضر این ترکیب به عنوان مهارکننده عمل GDH در رت‌ها (با دوز ۱۰ mg/kg خوراکی) مورد استفاده قرار گرفت تا نتایج تاثیر آن بر میزان گلوکز خون و ترشح انسولین مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این پژوهش نشان دادند که بیتیونول دارای اثرات کاهش معناداری ( $P < 0/05$ ) در میزان قند خون گروه دیابتی در هفته‌های دوم و سوم تیمار بوده است (نمودار ۲). در سطح آب و ادرار کاهش معناداری ( $P < 0/05$ ) مشاهده گردید (نمودار ۳ و ۴). اما در میزان انسولین تغییرات معناداری ( $P < 0/05$ ) مشاهده نگردید (نمودار ۵). میزان تری‌گلیسرید در این گروه دارای کاهش ( $P < 0/001$ ) بود (نمودار ۹). در مشاهدات هیستولوژیکی جزایر لانگرهانس در گروه تجربی دیابتی ۱ نسبت به گروه شم دیابتی بهبودی اندکی را نشان می‌دهد (شکل ۲). بنابراین بیتیونول با وجود این که مهارکننده GDH است، اما اثر وجود حلقه‌های فنول در آن قوی‌تر بوده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن بر مهارکنندگی اش غالب شده و موجب کاهش گلوکز خون گردیده است. اما با توجه به میزان دوز اپتیموم استفاده شده، احتمال می‌رود بیتیونول با افزایش دوز و نیز افزایش دوره تیمار اثرات شفاف‌تری در خصوص اثرات فنولی و آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دهد.

Chung در سال ۱۹۹۸، Valverde در سال ۲۰۰۴ و Ming در سال ۲۰۰۷ در تحقیقاتی پیرامون suloctidil انجام دادند و نقش مهارکنندگی آن را بر GDH عنوان کردند [۱۶،۱۷،۲۲]. این ترکیب در تست‌های مختلفی در

اثر خود را القا نماید. حدس زده می‌شود این دارو در رت‌های دیابتی که دارای سطح قند خون بالایی باشند و در جزایر لانگرهانس آنها تخریب گسترده صورت گرفته باشد، اثری از خود نشان ندهد. ولی در مواردی که میزان قند خون در نمونه‌های دیابتی خیلی بالا نباشد تاثیرگذار است.

در مجموع هر سه ترکیب به کار برده شده در این پژوهش از جمله بیبتونول و لوسین موجب کاهش گلوکز خون، و سولوکتیدیل باعث افزایش ترشح انسولین در روند بهبودی بیماری دیابت شده‌اند. در مشاهدات هیستولوژیکی نیز، این امر قابل مشاهده است. همچنین در تیمار با داروی لوسین کاهش LDL در بهبودی دیابت و علائم قلبی عروقی حاصل از آن قابل توجه است. لذا برای دست یافتن به نتایج دقیق‌تر، نیازمند پژوهش‌های بیشتری هستند.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بوده است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و با همکاری و مساعدت آزمایشگاه علوم پایه این واحد به رشته تحریر درآمده است. از تمامی کسانی که همکاری صمیمانه‌ای با ما داشته‌اند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مقدار آب مصرفی رت در طول روز، در رژیم غذایی قادر به افزایش بیان GDH می‌شود. دلیل آن احتمالاً فعال کردن مسیرهای متابولیکی است که لوسین برای این آنزیم فراهم می‌کند [۴۶]. در پژوهش حاضر لوسین در دوز (۲۰ mg/kg) معادل ۴ mg در رت (۲۰۰ gr) در هفته سوم تیمار در گروه تجربی دیابتی ۳ موجب کاهش ( $P < 0/05$ ) گلوکز گردید (نمودار ۲)، همین طور باعث کاهش میزان آب و ادرار در گروه‌های تجربی دیابتی ( $P < 0/001$ ) گردید (نمودار ۴). پژوهش حاضر تاییدی است بر نتایج Silva و Yung، و احتمالاً با افزایش ترشح انسولین و بهبودی در عملکرد سلول‌های بتا توانسته است گلوکز خون را کاهش دهد. از طرفی نیز با کاهش علائم دیابت موجب کاهش LDL نیز گردیده است. این مورد حائز اهمیت بوده و می‌تواند عاملی بر کاهش میزان بیماری‌های قلبی عروقی گردد [۴۶، ۴۷]. این ترکیب تاثیری معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) در افزایش میزان انسولین ایجاد نکرده است (نمودار ۵). گرچه لوسین موجب کاهش LDL در سطح ( $P < 0/01$ ) شده، اما افزایش تری‌گلیسرید در سطح ( $P < 0/05$ ) موجب شده است (نمودار ۸ و ۹). همین طور در مشاهدات هیستولوژیکی بهبودی اندکی را نشان داده است (شکل ۲). با توجه به اینکه لوسین که یک فعال کننده آلوستریک قوی برای GDH می‌باشد، انتظار می‌رفت در دوز پایین هم با قدرت عمل نماید. احتمالاً این دارو با دوز بیشتر در رژیم روزانه حیوانات تحت تیمار و نیز افزایش طول دوره تیمار بتواند

### مأخذ

1. Abou-Seif MA, Yussef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chem Acta* 2004, 346(2):161-170.
2. Georg P, Ludvic B. Lipids and diabetes. *J clin Basic CXardio* 2000, 3:159-162.
3. Fonseca V, Bakris GL, Benjamin E. Clinical practice recommendations. *Diabetes Care* 2005, 28 (1):3-63.
4. Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatment of diabetes mellitus, an overview. *Cell Mol Biol* 2005, 49: 635-639.
5. Brasnyo P, Gergo A. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *British Journal of Nutrition* 2011, 1-7.
6. Walker D G, Geraldine H. The development of hepatic glucokinase in the neonatal rat. *Biochem J* 1965, 79: 845-854.
7. Elena M, Ottavio G. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabetes care* 2000, 23:1182-1186.
8. Sun Q, Schar N, Goldwaser I, Gershonov E, Fridkin, M., Shechter Y. Vanadate. Restores glucose 6-phosphate in diabetic rats: a mechanism to enhance glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000, 279: 403-410.
9. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B-cells of the rat pancreas. *Physiol. Res* 2004, 50:536-546.
10. Robertson RP. Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2006, 6:615-619.
11. Hamilton CA, Miller WH, Al-Benna S. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin Sci* 2004, 106: 219- 234.

12. Li C, Allen A, Kwagh J, Doliba N, Qin W, Najafi H, Collins H, Matschinsky F, Stanley C, Smith T. Green Tea Polyphenols Modulate Insulin Secretion by Inhibiting Glutamate Dehydrogenase. *Journal of biological chemistry* 2006, 281: 10214-10221.
13. Li C, Matter A, Kelly A, Petty T, Najafi H, MacMullen C, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Kwagh A, Collins H, Hsu B, Yudkoff M, Matschinsky F, Stanley A). Effects of a GTP-insensitive Mutation of Glutamate Dehydrogenase on Insulin Secretion in Transgenic Mice. *Journal of biological chemistry* 2006, 281:15064-15072.
14. Carobbio S, Frigerio F, Rubi B, Vetterli L, Bloksgaard M, Gjinovci A, Pournourmohammadi SH, Herrera P, Reith W, Mandrup S, Maechler P. Deletion of Glutamate Dehydrogenase in  $\beta$ -Cells Abolishes Part of the Insulin Secretory Response Not Required for Glucose Homeostasis. *Journal of biological chemistry* 2008, 284: 921-929.
15. Ming Li, Christopher J. Smith, Matthew T. Walker, and Thomas J. Smith. Novel Inhibitors Complexed with Glutamate Dehydrogenase. *Journal of biological chemistry* 2009; 284, 22988-23000.
16. Li M, Allen A, Smith T. High Throughput Screening Reveals Several New Classes of Glutamate Dehydrogenase Inhibitors. *Biochemistry* 2007, 46(51): 15089-15102.
17. Chung MW, Komorowski RA, Varma RR. Suloctidil-induced hepatotoxicity. *Gastroenterology* 1988, 95(2): 490-491.
18. Martindale .The Extra Pharmacopoeia, 31st ed., Reynolds, J. E. F., ed., *Royal Pharmaceutical Society*, pp. 1996, 106: 108-112.
19. Thong, K. W., Coombs G H, Sanderson B E. L-methionine catabolism intrichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987, 23(3):223-231.
20. Chatelain P, Reckinger N, Roncucci R. Effect of suloctidil on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity and on membrane fluidity in rat brain synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 1979.
21. Piccioni F, Roman BR, Fischbeck KH, Taylor P. A screen for drugs that protect against the cytotoxicity of polyglutamine-expanded androgen receptor. *Oxford Journals Life Sciences & Medicine Human Molecular Genetics* 2004, 13(4): 437-446.
22. Valverde I, Malaisse W. Ionophoretic activity in pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 89(2): 386-395.
23. Seino S. Molecular mechanisms of insulin secretion. *Diabetes* 2002, 51(2) .
24. Senser A, Malaisse WJ. L- Leucine and a non-metabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 1980, 288: 9-187.
25. Canales J, Buitrago F, Faraldo A, Cameselle J. Detection of specific glucose-3- phosphatase activity in rat liver. *FEBS* 1994, 339:55-58.
26. Gupta D, Ahmad F, Suhial M. Effect of Alloxan induced dependent diabetes mellitus on rat erythrocyte cytosolic dehydrogenases. *Indian. J. Exp. Biol* 1996, 34: 262-263.
27. Li C, Buettger C, Kwagh J, Matter A, Daihkin Y, Nissim IB, Collins H.W, Yudkoff M, Stanley CA, Matschinsky FM. Signaling role of glutamine in insulin secretion. *J. Biol.Chem* 2004, 279: 13393-13401.
28. Nelson DL, Cox M. "Lehninger, Principles of Biochemistry" 3rd Ed. *Worth Publishing: New York. ISBN* 2007, 1(57259):153-156.
29. Stanley Ch, YenK M. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *The New England Journal of Medicine* 1998, 338(19):1352-1357.
30. Stanley Ch, YenK M, Lieu B, Burlina A. Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004, 81: 45-51.
31. Yang J, Chi Y, Brant R., Youfei G, Wolf Bryan A. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev* 2010, 68(5): 270-279.
32. Fahien LA, Macdonald MJ. The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion. *Diabetes* 2001, 60(10):2450-4.
33. Li C, Najafi H, Daikhin Y, Nissim I, Collins H, Yudkoff M, Matschinsky F, Stanley C. Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J Biol Chem* 2003, 278: 2853-2858.
34. Martindale. The Extra Pharmacopoeia, 31st ed., Reynolds, J. E. F., ed., *Royal Pharmaceutical Society* 1969, 106: 108, 112.
35. Thong K, Coombs H, Sanderson B. L-methionine catabolism intrichomonads. *Mol Biochem Parasitol* 1987, 23(3): 223-231.
36. Senin U, Parnetti L, Barbagallo-Sangiorgi G, Bartorelli L, Bocola V, Capurso A. Idebeneone in senile dementia of Alzheimer type: a multicentre study. *Archives of gerontology and geriatrics* 1992, 15(3):249-260.
37. Haulică I, Dobrescu G, Frîncu D, Busuioc A, Stratone A, Popa M, Roșca V, Jerca L. Influence of the physical and psychological stress on the cerebro-spinal purinergic fibers in adult rat. *Revista medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași* 1990.
38. Krushkal J, Xiong M, Ferrell R, Sing C, Turner S, Boerwinkle E. Linkage and association of adrenergic and dopamine receptor genes in the distal portion of the long arm of chromosome 5 with systolic blood pressure variation. *Hum. Mol. Genet* 1998.
39. Gidday J, Fitzgibbons J, Shah A, Kraujalis M, Park T. Reduction in cerebral ischemic injury in the newborn rat by potentiation of endogenous adenosine. *Pediatr. Res* 1995.
40. Gentili D, Conter V, Rizzari C, Tschuemperlin B, Zucchetti M, Orlandoni D, D'Incalci M, Maserà G. L-Asparagine depletion in plasma and

- cerebro-spinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia during subsequent exposures to Erwinia L-asparaginase. *Ann. Oncol* 1996.
41. Bielenberg G, Hayn C, Krieglstein J. Effects of cerebro-protective agents on enzyme activities of rat primary glial cultures and rat cerebral cortex. *Biochem Pharmacol* 1986.
  42. Chatelain P, Reckinger N, Roncucci R. Effect of suloctidil on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity and on membrane fluidity in rat brain synaptosomes. *Biochem. Pharmacol.* 1979.
  43. Piccioni F, Roman B, Fischbeck K, Taylor P. A screen for drugs that protect against the cytotoxicity of polyglutamine-expanded androgen receptor. *Oxford Journals Life Sciences & Medicine Human Molecular Genetics* 2004, 13(4): 437-446.
  44. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HK, Kohne R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr* 2006, 136(1 Suppl):269-273.
  45. Silva PM, Zoppi CC, Filiputti E, Silveira LR, Quesada I, Boschero AC, Carneiro EM. Preliminary report: leucine supplementation enhances glutamate dehydrogenase expression and restores glucose-induced insulin secretion in protein-malnourished rats. *Metabolism* 2010, 59(6): 911-913.
  46. Richard W. LDL Cholesterol Lowering in Type 2Diabetes: What Is the Optimum Approach? *Clinical Diabetes* 2008, 26:1, 8-13.
  47. Zhang Y, Guo K, LeBlanc R, Loh D, Schwartz G, Yu Y. Increasing Dietary Leucine Intake Reduces Diet-Induced Obesity and Improves Glucose and Cholesterol Metabolism in Mice via Multimechanisms. *Diabetes* 2007, 56:1647-1654.