مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز ۱۳۸۵؛ دوره ۶(شماره ۱):۲۶-۱۷

بررسی اثر گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین و فعالیت گلوکوکیناز در جزایر لانگرهانس پانکراس موش‌های صحرایی سالم و دیابتی

محمود خیاطیان[۱]، باقر لاریجانی[۲]*، بیژن فرزامی[۳]، شیرین پورنورمحمدی[٤]، هدی بوشهری[۳]

چکیده

مقدمه: داروهای سولفونیل اوره نظیر گلی‌بن‌کلامید (گلیبوراید) از چندین دهه قبل در درمان دیابت کاربرد داشته اند اما هنوز ساز و کار دقیق عملشان مورد بحث است. از سوی دیگر گلوکوکیناز به عنوان حسگر گلوکز در سلول‌های بتای پانکراس مطرح بوده و در هوموستاز گلوکز و ترشح انسولین نقشی کلیدی را ایفا می‌کند. هدف از تحقیق حاضر،بررسی تاثیر گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین و آنزیم گلوکوکیناز در جزایر لانگرهانس جدا شده از پانکراس موش صحرایی بوده است.

روش‌ها: جزایر لانگرهانس با تکنیک هضم کلاژناز از موش‌های صحرایی سالم و یک مدل تجربی از دیابت نوع ۲ جداسازی شد. فعالیت آنزیمی با اندازه‌گیری سرعت تشکیل گلوکز ٦ فسفات به کمک تغییرات نشر فلوئوروسانس تعیین گردید. ترشح انسولین از جزایر دستچین شده با تکنیک انکوباسیون استاتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان انسولین با روش الایزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از انکوباسیون گلی‌بن‌کلامید با جزایر لانگرهانس نشان داد که این ماده ترشح انسولین پایه (در غلظت ۲/۸ میلی مولار گلوکز) را هم در موش های دیابتی و هم در موش های سالم نسبت به کنترل(بدون دارو) افزایش داده است. در حالی که ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز ۱۶/۷ میلی مولار از افزایش معنی داری برخوردار نبوده است. از سوی دیگر گلی‌بن‌کلامید هیچ گونه اثر تحریکی و یا مهاری بر گلوکوکیناز پانکراس چه در موش‌های سالم و چه دیابتی نداشته است. اما کاهش فعالیت این آنزیم در موش‌های دیابتی، دارای تفاوت معنی دار آماری با موش‌های سالم بوده است .

نتیجه‌گیری: براساس یافته های این پژوهش، می‌توان چنین استنتاج کرد که اثر افزایش دهندگی گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین از طریق سازوکاری بجز تأثیر بر ترشح انسولین تحریک شده با گلوکز می‌باشد و نیز تنظیم فعالیت گلوکوکیناز پانکراس، مستقل از گلی‌بن‌کلامید است.

واژگان کلیدی: گلی‌بن‌کلامید، جزایر پانکراس، جداسازی جزایر، ترشح انسولین،گلوکوکیناز، موش‌های صحرایی دیابتی nSTZ

۱- مرکز تحقیقات زیست پزشکی و گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس
۲- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٤- مرکز تحقیقات فیزیولوژی و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* ***نشانی***: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، کد پستی ١٤١١٤؛ تلفن: ۳-۸۸۰۲۶۹۰۲؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک : emrc@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۲۷
تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۱۰

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

مقدمه

داروهای سولفونیل اوره نظیر گلی‌بن‌کلامید از چندین دهه قبل در درمان دیابت کاربرد داشته اند اما هنوز سازوکار دقیق عملشان در افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس پانکراس و کاهش گلوکز خون مورد بحث است [۱].

از سوی دیگر، رابطهٔ آنزیم گلوکوکیناز(EC 2.7.1.1) با ترشح انسولین از پانکراس توسط محققان مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته و سازوکار مولکولی دخیل در القای ترشح انسولین توسط گلوکز، موضوع تحقیقات بسیاری بوده است. براساس فرضیهٔ سوخت، متابولیسم گلوکز مسؤول ایجاد سیگنال برای ترشح انسولین بوده و گلوکوکیناز به عنوان حسگر گلوکز در سلول‌های بتای پانکراس قلمداد می‌شود [۲]. تصور می‌شود که مرحلهٔ اصلی محدود کنندهٔ سرعتِ متابولیسم گلوکز در سلولهای بتای پانکراس، فسفریلاسیون گلوکز باشد؛ از این رو فسفریلاسیون گلوکز نقشی حیاتی در ترشح (رهایش) انسولین با واسطه گلوکز یا Glucose-Mediated Insulin Release (GMIR) دارد [۳] و کاهش فعالیت گلوکوکیناز در این سلول‌ها به نقص در GMIR می‌انجامد [٤].

گلوکوکیناز (هگزوکیناز IV یا D) دارای وزن مولکولی حدود ۵۰کیلو دالتون و Km ۸-۵ میلی مولار است[۵]. با کشف چند فعال کنندهٔ گلوکوکیناز برای اولین بار در یکی دو سال گذشته [۶، ۷] و باتوجه به خواص درمانی احتمالی این ترکیبات، به نظر می‌آید که کار بر روی عوامل فعال کننده گلوکوکیناز و نحوه ارتباط آنها با ترشح انسولین اهمیت فزونتری یافته است. از طرفی درخصوص سازوکار دقیق اثر داروهای سولفونیل اوره بر ترشح انسولین از سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس پانکراس اطلاعات کاملی وجود نداشت؛ لذا این امر ما را بر آن داشت تا اثر گلی‌بن‌کلامید که امروزه کاربرد بسیار وسیعی در درمان دیابت نوع ۲ دارد، بر روی ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس و نیز بر گلوکوکیناز پانکراس موش‌های صحرایی سالم و یک مدل حیوانی از موش‌های دیابتی نوع ۲ (nSTZ) مورد کنکاش قرار دهیم.

روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

موش‌های صحرایی نر، نژاد ویستار-آلبینو با وزن تقریبی ۳۰۰ گرم تحت رژیم غذایی طبیعی با دسترسی آسان به غذا و آب در مرکز نگهداری حیوانات گروه بیوشیمی پزشکی نگهداری می‌شدند. در روز انجام آزمایش، دو موش صحرایی که از شب قبل به حالت ناشتا نگهداشته شده بودند، پس از تزریق داخل صفاقی ۸۰ mg/kg تیوپنتال، بیهوش و جهت برداشتن پانکراس جراحی شدند.

جداسازی جزایر پانکراس

جداسازی و تخلیص جزایر لانگرهانس پانکراس به روش لیسی و کاستیانوفسکی [۸] با اندکی تغییرات انجام گرفت. پانکراس (لوزالمعده) با کانوله کردن مجرای مشترک صفراوی و تزریق ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر محلول سرد هانکس، پرفیوژ و جدا گردید. پانکراس‌های جدا شده با قیچی به قطعات ریز یک تا دو میلی‌متری خرد گردیده و دو الی ۳ بار با محلول کربس حاوی گلوکز ۲/۸ میلی مولار شستشو داده شدند. سپس جهت هضم بافت پانکراس، کلاژناز به محیط اضافه شد. این آنزیم در درجه حرارت 37^{o} سانتی گراد به مدت ۱۷-۱۵ دقیقه درحالت تکان شدید بر بافت اثر داده می‌شد. جزایر لانگرهانس حاصله پس از چند بار شستشو با محلول کربس سرد محتوی ۰/۵ درصد BSA، در زیر استرئومیکروسکوپ به کمک پیپت پاستور دستچین گردیده و در ویال های انکوباسیون شیشه‌ای سیلیکونیزه قرار داده شدند.

انکوباسیون استاتیک

پس از قرار دادن ۵ جزیره در هر ویال مخصوص انکوباسیون، یک میلی‌لیتر محلول کربس حاوی ۲/۸ میلی‌مول گلوکز به آنها اضافه شد. ویال ها به مدت نیم

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

ساعت در دمای 37^{o} C در حمام شیکردار و جریان مداوم گاز کاربوژن (۹۵ ٪ اکسیژن و ۵ ٪ دی اکسید کربن) پره انکوبه شدند. سپس در زیر استرئومیکروسکوپ به کمک یک پیپت پاستور نوک خمیده، محلول پره انکوباسیون به طور کامل برداشته و مجدداً تعداد جزایر شمارش شد. سپس یک میلی‌لیتر محلول انکوباسیون حاوی ۲/۸ یا ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز بدون دارو و یا همراه با گلی‌بن‌کلامید در غلظت های ۱ و۱۰ میکرو مولار به آن اضافه گردید. ویال ها مجدداً در همان شرایط پیشین به مدت یک ساعت انکوبه شدند. در پایان انکوباسیون، محلول رویی برداشته و در فریزر نگهداری شد. اندازه‌گیری انسولین به طریق الایزا و با کیت مخصوص انسولین موش صحرایی (Rat) از شرکت DRG آلمان براساس دستورات تولید کننده صورت پذیرفت. یادآوری می‌شود که گلی‌بن‌کلامید در DMSO (دی‌متیل سولفوکسید) حل شد به طوری که غلظت نهایی DMSO کمتر از ۰/۱ درصد بود تا تاثیر سویی بر سلول‌های جزایر نداشته باشد.

سنجش فعالیت گلوکوکیناز

فعالیت آنزیمی در سوپرناتانت هوموژنه (عصارهٔ جزایر با استفاده از روش لیانگ و همکاران [۹] با اندکی تغییرات اندازه گیری شد. در این روش از طریق واکنش‌های جفت شده با آنزیم گلوکز ٦ فسفات دهیدروژناز از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* سرعت تشکیل NADH از NAD^{+} اندازه گیری می‌شود. سیصد جزیرهٔ پانکراس دستچین شده در ۳۰۰ میکرولیتر بافر هوموژنیزاسیون در هوموژنایزر قرار داده شد. همگنهٔ حاصل در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا هگزوکیناز متصل به میتوکندری جدا گردد. محلول رویی (سوپرناتانت) جهت سنجش گلوکوکیناز مورد استفاده قرار گرفت. همه مراحل فوق در دمای حدود ٤ درجه سانتی‌گراد انجام گردید.

به منظور رسم منحنی استاندارد، استانداردهای گلوکز-٦-فسفات در غلظت‌های بین ۰/۳ تا ۳ نانومولار تهیه گردید. استانداردها در ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط سنجش (محتوی همهٔ اجزای مورد نیاز واکنش با غلظت مناسب) در ویال‌های اپندورف ریخته شد. پس از انکوباسیون ویال‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، با افزودن بی‌کربنات واکنش متوقف گردید. سپس در طول موج تحریکی ۳٤۰ نانومتر و طول موج نشری ٤٦۰ نانومتر، میزان فلوئورسانس نمونه‌ها در مقابل بلانک معرف اندازه‌گیری شد.

برای سنجش آنزیم، در روش فوق به جای گلوکز ٦ فسفات، عصارهٔ جزایر و نیز گلی‌بن‌کلامید در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرو مولار به مخلوط سنجش افزوده شد. فعالیت گلوکوکیناز با تفریق فعالیت هگزوکیناز از فعالیت تام فسفریلاسیون گلوکز به دست می‌آید.

آماده‌سازی موش‌های دیابتیnSTZ

جهت آماده سازی این نوع مدل حیوانی از دیابت نوع ۲، به موش های صحرایی دو روزه، استرپتوزوتوسین (STZ) به میزان ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از طریق داخل صفاقی تزریق گردید [۱۰]. به منظور ارزیابی دیابتی شدن موش های نوزاد، ۳ روز پس از تزریق STZ، از قلب آنها خونگیری به عمل آمد. اندازه‌گیری گلوکز خون با کیت شرکت زیست شیمی انجام شد. موش‌هایی که دارای قند خون بالاتر از ۲۷۵ میلی‌گرم بر دسی لیتر بودند به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند.

تحلیل آماری

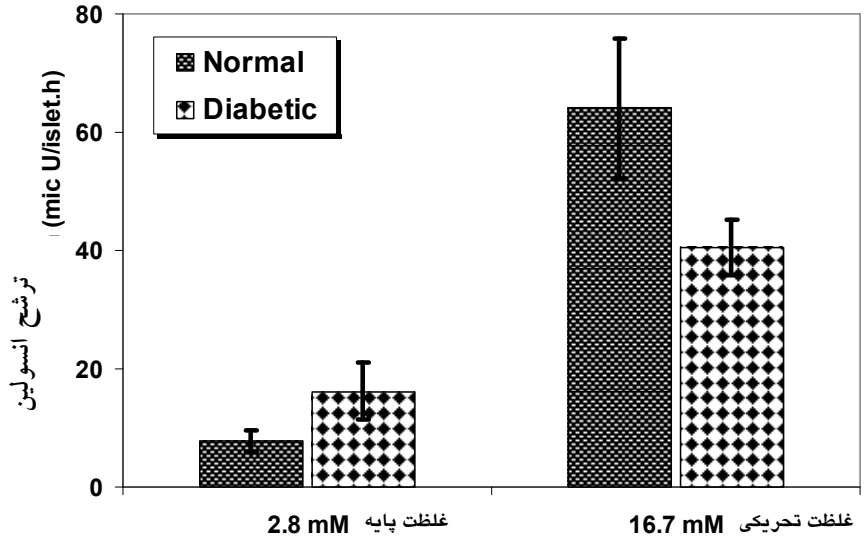
تمامی آزمایش ها به صورت دوتایی انجام گردیده و میانگین این دو به عنوان یک نقطه در نظر گرفته شده است. همهٔ داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان گردیده است. آزمایش ها ۶ الی ۷ بار تکرار شده است. داده ها به کمک نرم افزار SPSS آنالیز گردیده و P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

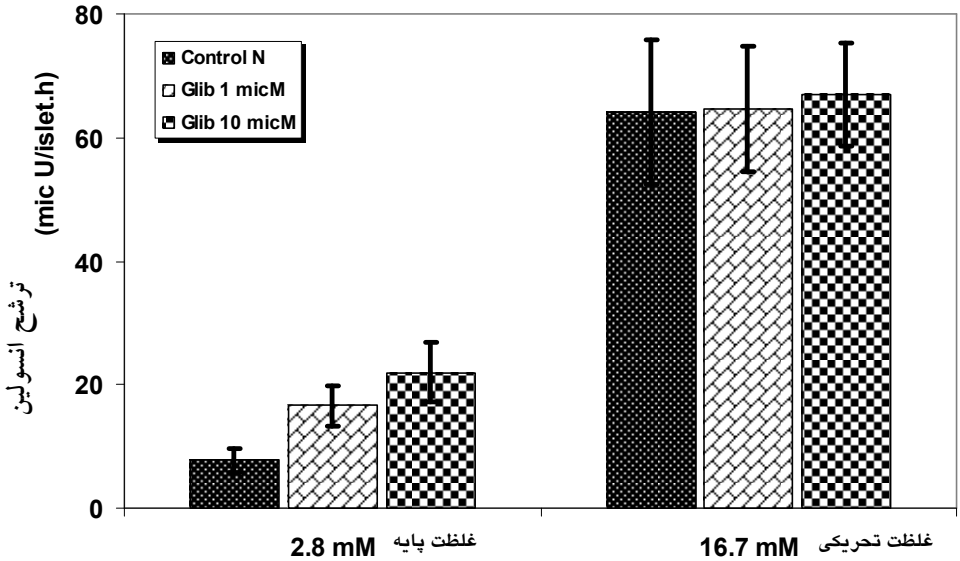
یافته‌ها

در این پژوهش، گلی‌بن‌کلامید (یکی از داروهای گروه سولفونیل اوره) با غلظت های ۱ و ۱۰ میکرو مولار بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس و نیز بر آنزیم گلوکوکیناز پانکراس موش‌های صحرایی سالم و دیابتی اثر داده شد. نتایج به شرح زیر به دست آمد:

نمودار ۱، نتایج حاصل از اثر غلظت های ۲/۸ و ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس را نشان می دهد. مقدار ترشح انسولین در غلظت پایه گلوکز (۲/۸ میلی‌مولار) در موش‌های دیابتی بیشتر از موش‌های سالم است ($P< ۰/۰۱$). مقدار ترشح

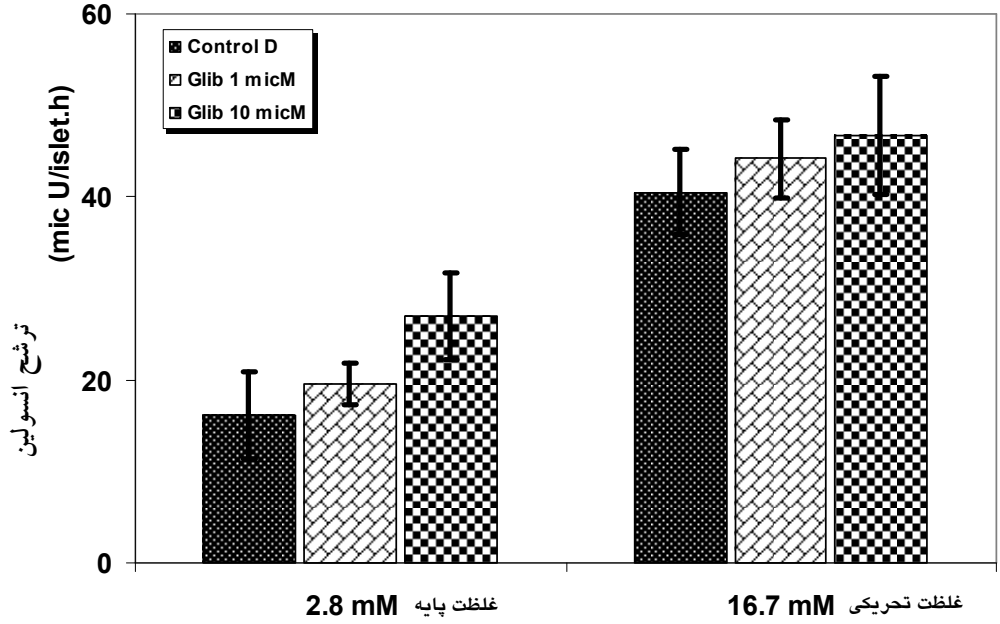


نمودار ۱-اثر غلظت های پایه و تحریکی گلوکز بر ترشح انسولین در موش‌های سالم و دیابتی

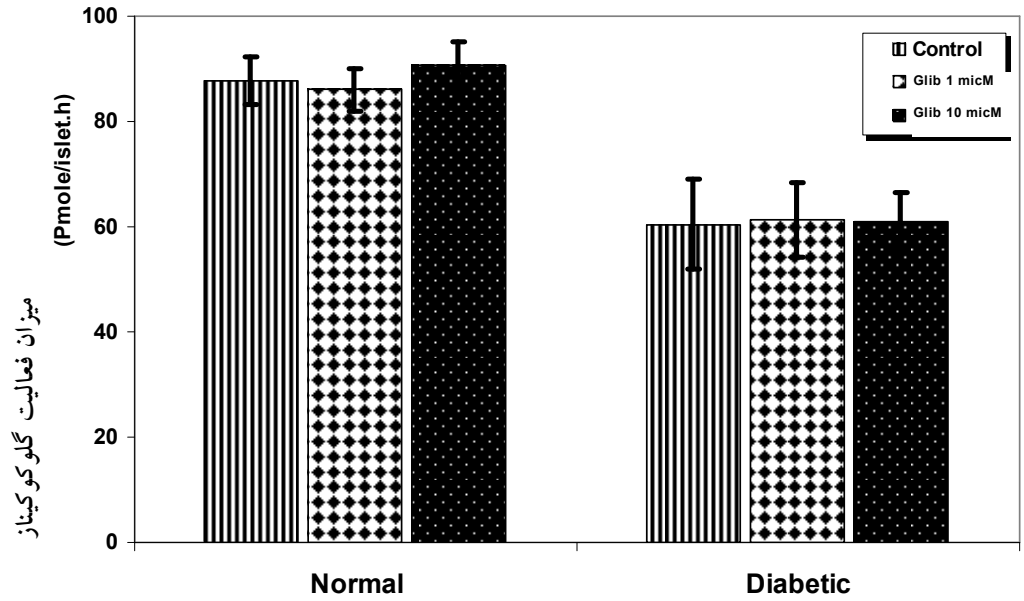


نمودار ۲- اثر گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین در موش های صحرایی سالم

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]



نمودار ۳- اثر گلیبن کلامید بر ترشح انسولین در موش های صحرایی دیابتی



نمودار ۴- اثر گلی‌بن کلامید بر گلوکوکیناز پانکراس در موش های سالم و دیابتی

انسولین با واسطه گلوکز (GMIR) در موش‌های صحرایی دیابتی کمتر از موش‌های سالم است (P<۰/۰۱). از سوی دیگر ترشح انسولین با واسطه گلوکز هم در موش‌های سالم و هم در موش‌های دیابتی بسیار بیشتر از ترشح انسولین پایه می‌باشد (P< ۰/۰۱).

در نمودارهای ۲و ۳ ، اثر گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین به تصویر کشیده شده است. چنان‌که پیداست گلی‌بن‌کلامید در غلظت ۲/۸ میلی مولار گلوکز، ترشح انسولین را هم در موش های دیابتی و هم در موش های سالم نسبت به گروه کنترل (بدون هیچ گونه افکتوری)

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

افزایش داده است (P< ۰/۰۵)، در حالی که در غلظت ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز، تأثیر آن معنی‌دار نبوده است.
در نمودار ٤، اثر گلی‌بن‌کلامید بر گلوکوکیناز پانکراس منعکس شده است. از نمودار فوق برمی‌آید که گلی‌بن‌کلامید هیچ گونه اثر تحریکی و یا مهاری بر گلوکوکیناز چه در موش‌های سالم و چه دیابتی نداشته است. اما فعالیت گلوکوکیناز در موش‌های دیابتی، دارای تفاوت معنی دار آماری با موش‌های سالم بوده است (P< ۰/۰۱).

بحث

نحوه ترشح انسولین با واسطه گلوکز (GMIR) یا GIIS بطور خلاصه چنین است: گلوکز از طریق GLUT-2 وارد سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس گردیده و در آنجا توسط گلوکوکیناز به گلوکز ۶ فسفات تبدیل می‌شود که در نهایت پس از طی راه متابولیسمی گلیکولیز و چرخه کربس منجر به تولید ATP می گردد. افزایش ATP موجب مهار (ویا بسته شدن) کانال‌های پتاسیم حساس به ATP می شود. بسته شدن این کانال‌ها، سبب دپلاریزاسیون غشا می‌گردد. این امر باعث باز شدن کانال‌های کلسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ می‌شود. افزایش کلسیم درون سلولی، آبشاری از فسفریلاسیون‌های پروتیینی را که احتمالاً کینازهای وابسته به Ca^{+2} کالمودولین را شامل می‌شود به وجود می‌آورد که منجر به اگزوسیتوز انسولین می‌شود [۱۱]. گفته شده که گلوکوکیناز پانکراس (آنزیم کاتالیزگر مرحلهٔ محدود کنندهٔ سرعت گلیکولیز) در ترشح انسولین نقشی حیاتی را ایفا می‌کند [۴-۲، ۱۲]. در این پژوهش، ترشح انسولین و فعالیت گلوکوکیناز پانکراس از منظر اثر یک عامل فعال کننده مورد تحقیق قرار گرفت. البته کشف فعال کنندگان اختصاصی گلوکوکیناز بسیار جدید است. اولین بار این ترکیبات در سال ۲۰۰۳ در مجله Science گزارش شدند [۶]. ترکیبات جدیدتری نیز در سال ۲۰۰٤ در مجلهٔ دیابت گزارش شده‌اند [۷]. از آنجا که این طرح تحقیقاتی چند سال پیشتر به تصویب رسیده بود، به ناچار مادهٔ دیگری (گلی‌بن‌کلامید) مورد استفاده قرار گرفت. یکی دیگر از اهداف اصلی نیز این بود که نحوهٔ این ارتباط در موش‌های صحرایی nSTZ (یک مدل حیوانی از دیابت نوع ۲) نیز بررسی گردد. در این نوع دیابت تجربی، سلول‌های پانکراس در حین رشد موش بازسازی می‌شوند [۱۰] و بنابراین یک مدل مناسب برای بررسی عملکرد پانکراس می‌باشند. دلیل عدم استفاده از مدل معمولی دیابت تجربی این بود که تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) موجب تخریب سلول‌های بتای پانکراس در موش‌های بالغ می‌شود.
در گزارش Hinata و همکاران [۱۳]، اظهار شده بود که گلی‌بن‌کلامید موجب افزایش mRNA گلوکوکیناز جزایر لانگرهانس می شود. با توجه به استفادهٔ درمانی داروی گلی‌بن‌کلامید، بر آن شدیم که اثر آن را بر ترشح انسولین پایه و نیز القا شده با گلوکز و همچنین بر فعالیت آنزیم گلوکوکیناز پانکراس مورد بررسی و مطالعه قرار دهیم.
نتایج حاصل از انکوباسیون جزایر با غلظت‌های ۲/۸ و ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز (نمودار۱) نشان داد که در موش‌های صحرایی سالم، ترشح انسولین در غلظت ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز چندین برابر بیشتر از غلظت ۲/۸ میلی مولار گلوکز است (P< ۰/۰۱). البته این امر، گرچه نشانگر سلامت جزایر لانگرهانس و درستی سیستم راه‌اندازی شده جهت جداسازی جزایر و پرفوزیون آنها است (محققان، جهت تعیین ویابیلیتی جزایر پانکراس از همین سویچینگ غلظت گلوکز استفاده می‌کنند) ، اما چندان هم دور از انتظار نبود، چرا که همهٔ گزارش‌ها تأیید کنندهٔ آن است. لیکن ترشح انسولین پایه (یعنی انسولین ترشح شده از جزایر لانگرهانس پانکراس در غلظت ۲/۸ میلی مولار گلوکز) در موش‌های صحرایی دیابتی شده، بیشتر از موش‌های سالم بوده است. این یافته، با نتایج Dachicourt [١٤]، Piston [١٥]،Yoshikawa [١٦]، و Chen [١٧]
همخوانی داشته، اما با برخی گزارش‌ها از جمله مقالهٔ Portha [١٨] در تضاد است.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

علت افزایش ترشح انسولین بازال (پایه) در موش‌های دیابتی در قیاس با موش‌های سالم، هنوز دقیقاً معلوم نشده است. حتی این حالت در موش‌های ۶۰ ٪ پانکراتکتومی شده نیز رخ داده که آن محققان نیز اظهار داشته‌اند دلیلش نامشخص است [۱۹].

اما ترشح انسولین با واسطه گلوکز ۱۶/۷ میلی مولار (GMIR) در موش‌های دیابتی در مقایسه با موش‌های سالم کمتر است (نمودار ۱). این نتیجه با بسیاری از گزارش‌های انتشار یافته همخوانی دارد؛ که احتمالاً به دلیل آن است که موش‌های این نوع مدل حیوانی از دیابت نوع ۲، دچار سوء عملکرد سلول‌های بتا و به تبع آن نقص در GMIR هستند [۱۰، ۱۷، ۲۰، ۲۱] . در برخی دیگر از مدل‌های حیوانی دیابت نوع ۲ نیز وضعیت مشابهی مشاهده شده است [۲۴-۲۲].

نتایج ما نشان داد که گلی‌بن‌کلامید هم در غلظت کم (۱μM) و هم در غلظت زیاد (۱۰ μM)، موجب افزایش ترشح انسولین پایه چه در موش‌های صحرایی سالم و چه در دیابتی می‌شود که البته اثر افزایش دهندگی گلی‌بن‌کلامید در غلظت یک میکرومولار بر ترشح انسولین پایه در موش‌های دیابتی از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است (P> ۰/۰۵). این یافته، با گزارش‌های موجود همخوانی دارد [۲۵، ۲۶]. برخی از مشتقات گلی‌بن‌کلامید نیز چنین تأثیری بروز داده‌اند [۲۷]. درگزارشی متفاوت، Rabuazzo و همکاران [۲۸] جزایر لانگرهانس را به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف گلی‌بن‌کلامید قرار دادند و سپس مشاهده کردند که در این جزایر، ترشح انسولین کاهش می‌یابد.

اما براساس نتایج پژوهش حاضر، گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین با واسطه گلوکز (GMIR) چه در موش‌های سالم و چه در موش‌های دیابتی اثری نداشته است. البته ناگفته نماند که فقط در موش‌های دیابتی در نتیجهٔ اثر گلی‌بن کلامید، افزایش‌های ۱۵-۱۰٪ در GMIR مشاهده می‌شود که این افزایش اندک ترشح انسولین نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری معنی دار نبوده است (P> ۰/۰۵). Purrello و همکاران [۲۵] نیز گزارش کرده‌اند که گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین در غلظت ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز بی‌تاثیر است. نتایجی مشابه یافته‌های ما در یک رده از سلول‌های بتای پانکراس (MIN6) نیز مشاهده شده‌است. در سلول‌های MIN6، گلی‌بن‌کلامید بطور وابسته به دوز ترشح انسولین را در غلظت ۲/۸ میلی مولار گلوکز افزایش داده ولی در غلظت ۱۶/۸ میلی مولار گلوکز، بر ترشح انسولین تأثیری نداشته‌است [۲۹].

عدم تأثیر گلی‌بن‌کلامید بر GMIR از وجوه متفاوتی قابل تجزیه و تحلیل است:

یکی از دلایل این عدم تأثیر شاید این باشد که وجود یک فعال کنندهٔ بسیار قوی (در اینجا گلوکز)، مانع از بروز اثر افزایش دهندگی گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین می‌شود. در موش‌های دیابتی که ترشح انسولین با واسطه گلوکز دچار نقصان می‌شود، این اثر افزایش دهندگی گلی‌بن‌کلامید هویدا می گردد. یکی دیگر از دلایل ممکن است مسمومیت با گلوکز[1] باشد. این حالت در غلظت‌های زیاد گلوکز برای جزایر لانگرهانس پیش می‌آید. توجیه دیگر این است که ای بسا ممکن است اثر گلی‌بن‌کلامید بر افزایش ترشح انسولین از مسیر و سازوکاری بجز اثر بر GMIR باشد. Zhou و Ipp [۳۰] در پژوهشی، در GMIR ایجاد نقص کردند و سپس مشاهده کردند که گلی‌بن‌کلامید نقص در ترشح انسولین با واسطه گلوکز را تصحیح نمی‌کند. می‌توان گفت وقتی گلی‌بن‌کلامید در این تصحیح نقشی نداشته باشد، بدان معنی است که بر GMIR نیز تأثیری ندارد. از سوی دیگر گفته شده که داروهای سولفونیل اوره نظیر گلیبن کلامید، اصولاً با مهار کانال‌های پتاسیم حساس به ATP در غشای پلاسمایی، باعث افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس می‌شوند [۳۱]، البته گلی‌بن‌کلامید از یک جهت با سایر سولفونیل اوره‌ها متمایز است و آن این‌که این دارو، در درون سلولهای بتا نیز تجمع می‌یابد [۳۲]. این بدان معنی است که گلی‌بن‌کلامید اگر هم بر ترشح انسولین تأثیر داشته

[1] Glucose toxicity

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

باشد، بعد از متابولیسم گلوکز و تولید ATP متعاقب آن است.

وانگهی برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ Eliasson و همکاران [۳۳] اظهار داشتند که عمل داروهای سولفونیل اوره کاملاً منحصر به بستن کانال‌های KATP نمی‌شود و این ترکیبات ممکن است اثر مستقیمی بر روی ماشین ترشحی سلول‌های بتا داشته باشند. مشابه این نتایج در آزمایشگاه دیگری نیز به دست آمد[۳۴]. حتی اخیراً گزارش شده که گلی‌بن‌کلامید اگزوسیتوز [ترشح] انسولین را از مسیری که وابسته به پروتیین کیناز C (PKC) است، افزایش می دهد [۳۵]. این بدان معنی است که گلی‌بن‌کلامید در مراحل انتهایی ترشح انسولین و اگزوسیتوز آن که کینازها دخیل هستند، اثر خود را اعمال می‌کند؛ یعنی محلی که در فرایند ترشح انسولین بسیار دور از مکان عمل گلوکوکیناز است.

با توجه به نقش محوری گلوکوکیناز در GMIR، در بخشی دیگر از تحقیق حاضر گلی‌بن‌کلامید در همان غلظت های پیش گفته بر فعالیت گلوکوکیناز عصارهٔ جزایر لانگرهانس نیز اثر داده شد. نتایج نشان داد که گلیبن کلامید بر فعالیت گلوکوکیناز جزایر لانگرهانس اثری ندارد. Lenzen [۳۶] نیز گزارش کرده است که گلی‌بن‌کلامید در غلظت ۱۰ میکرومولار، بر گلوکوکیناز اثری ندارد. همین گروه تحقیقاتی، در جایی دیگر نشان داده‌اند که گلی‌بن کلامید با وجود این‌که mRNA گلوکوکیناز کبد را چهار برابر افزایش می دهد، بر mRNA گلوکوکیناز سلول بتا اثری ندارد [۳۷]. اما Porzio و همکاران [۳۸] گزارش نموده اند که بیان ژن گلوکوکیناز و GLUT2 بطور هماهنگ توسط گلی‌بن‌کلامید تنظیم می‌گردد. البته یک گزارش دیگر نیز در این باره وجود دارد که آن هم گزارش Patane و همکاران [۳۹] است. در تحقیق فوق، گلی‌بن‌کلامید بر گلوکوکیناز سلول‌های بتا اثری نداشته است. اما در مورد هگزوکیناز، محققین فوق، این آنزیم را هم در سیتوزول و هم در فراکشن میتوکندری بعد از تأثیر گلی‌بن‌کلامید مورد سنجش قرار داده‌اند. گلی‌بن‌کلامید بر هگزوکیناز موجود در سیتوزول اثری نداشته اما فعالیت هگزوکیناز متصل به میتوکندری را افزایش داده است. نهایتاً این گروه تحقیقاتی نتیجه گیری کرده اند که گلی‌بن‌کلامید با تأثیر بر هگزوکیناز [و نه گلوکوکیناز]، موجب افزایش حساسیت سلول‌های بتای پانکراس نسبت به گلوکز می‌شود که این اثر ممکن است به فهم سازوکار عمل این دارو در تحریک ترشح انسولین کمک کند. نکته مهم دیگر، کاهش فعالیت گلوکوکیناز در موش‌های دیابتی است که کاهش ترشح انسولین با واسطه گلوکز (GMIR) در این موش‌ها را می‌توان به همین مساله مربوط دانست.

در مجموع باید گفت که شناخت نحوهٔ اثر گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین، مستلزم انجام مطالعات بیشتری چه به صورت *In vitro* و چه به صورت *In vivo* است. براساس یافته های این تحقیق می‌توان چنین استنتاج کرد که اثر افزایش دهندگی گلی‌بن‌کلامید بر ترشح انسولین از راهی بجز GMIR می باشد و از سوی دیگر تنظیم فعالیت گلوکوکیناز و هگزوکیناز پانکراس، مستقل از گلی‌بن‌کلامید است.

سپاسگزاری

از آقای میر سعید یکانی نژاد (جهت انجام آنالیز آماری نتایج این مطالعه) و آقای محمد سوختانلو (برای ترسیم نمودارها) سپاسگزاریم. از پرسنل محترم گروه بیوشیمی پزشکی بالاخص خانم‌ها صفورا ورداسبی، راضیه آبفت و رباب ذاکری نیز به خاطر همکاری های بی شائبه شان در مراحل مختلف این تحقیق تشکر می‌کنیم.

مآخذ

1. LeRoith D, Olefsky JM, and Taylor SI (Eds). *Diabetes Mellitus – A Fundamental and Clinical Text*. Baltimore, MD: Lippincott–Raven, 1996.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

2. Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS. Glucokinase Mutations, insulin Secretion, and diabetes mellitus. *Ann Rev Physiol* 1996; 58: 171 – 186.
3. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39: 647 – 652.
4. Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatie β-cell glucokinase. *Diabetes* 1998; 47: 307 – 315.
5. Pilkis SJ, Weber IT, Harrison RW, Bell GI. Glucokinase: Structrural analysis of a protein involved in susceptibilitiy to diabetes. *J Biol Chem* 1994; 269: 21925 – 21928.
6. Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, Haynes N-E, Bizzarro FT, Coffey JW, et al. Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 2003; 301: 370 – 374.
7. Brocklehurst KJ, Payne VA, Davies RA, Carroll D, Vertigan HL, Wightman HJ, et al. Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase active-tors. *Diabetes* 2004; 53: 535 – 541.
8. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35 – 39.
9. Liang Y, Najafi H, Matschinsky FM. Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets from rat pancreas. *J Biol Chem* 1990; 265: 16863-16866.
10. Bonner–Wier S, Trent DF, Honey RN, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited β-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 1981; 30: 64 – 69.
11. Poitout V, Robertson PR. An Integrated view of β cell dysfunction in type-II diabetes. *Annu Rev Med* 1996; 47: 69-83.
12. Matschinsky FM. Banting Lecture 1995: A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996; 45: 223 – 241.
13. Hinata S, Nishi S, Matsukage T, Funai T, Ichiyama A, Yoshimi T. Regulation of glucokinase gene expression in cultured rat islet cells: the inhibitory effects of T3 and glucagons, and the stimulatory effect of glibenclamide. *Diabets Res* 1994; 26: 13- 23.
14. Dachicourt N, Serradas P, Giroix MH, Gangnerau MN, Portha B. Decreased glucose-induced cAMP and insulin release in islets of diabetic rats: reversal by IBMX, glucagon, GIP. *Am J Physiol* 1996; 271:E725-32.
15. Piston DW, Knobel SM, Postic C, Shelton KD, Magnuson MA. Adenovirus mediated knockout of a conditional glucokinase gene in isolated pancreatic islets reveals an essential role for proximal metabolic coupling events in glucose stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 1999; 274: 1000 – 1004.
16. Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimato T, Umeda F, Nawata H. Glucosamine – induced β-cell dysfunction: a possible involvement of glucokinase or glucose – transporter type 2. *Pancreas* 2002; 24: 228 – 234.
17. Chen C, Thorens B, Bonner – Weir S, Weir GC, Leahy JL. Recovery of glucose – induced insulin secretion in a rat model of NIDDM is not accompanied by return of the β-cell $GLUT_2$ glucose transporter. *Diabetes* 1992; 41: 1320 – 27.
18. Portha B, Giroix M-H, Serradas P, Welsh N, Hellerstrom C, Sener A, Malaisse WJ. Insulin production and glucose metabolism in isolated pancreatic islets of rats with NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 1226 – 33.
19. Liu YI, Nevin PW, Leahy JL. β-cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that presserves normoinsulinemia and normoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E68 – E73.
20. Weir GC, Clorere ET, Zmachinki CJ. Bonner – Weir: Islet Secretion in a new experimental model for non – insulin – dependent diabetes. *Diabetes* 1981; 30: 590 – 595.
21. Dachicourt N, Serradas P, Giroix M-H, Gangnerau M-N, Portha B. Decreased glucose – induced cAMP and insulin release in islets of diabetic rats: reversal by IBMX, glucagons, GIP. *Am J Physiol* 1996; 271: E725 – E732.
22. Kooptiwut, Zraika S, Thorburn AW, Dunlop ME, Darwiche N, Kay TW, Proietto J, Andrikopoulos S. Comparison of insulin secretory function in two mouse models with different susceptibility to β-cell failure. *Endocrinology* 2002; 143: 2085 – 2092.
23. Hosokawa H, Hosokawa YA, Leahy JL. Upregulated hexokinase activity in isolated islets from diabetic 90% pancreatectomized rats. *Diabetes* 1995; 44: 1328 – 1333.
24. Laghmich A, Ladriere L, Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ: Long-term effects of glibenclamide and nateglinide upon pancreatic islet function in normal and diabetic rats. *Pharmacol Res* 1999; 40: 475-82.
25. Purrello F, Vetri M, Gatta C, Gullo D, Vigneri R. Effects of High glucose on insuliln secretion by lsolated rat lslets and purified B-cells and possible Role of glycosylation. *Diabetes* 1989; 38: 1417 –22.
26. Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. Glibenclamide but not other sulphonylureas stimulates release of neuropeptide Y from perifused rat islets and hamster insulinoma cells. *J Endocrinol* 2000; 165: 509-18.
27. Ouedraogo R, Nguyen Q.A, Antoine M.-H, Kane C, Pochet L, Marsereel B, Lebrun P: Insulinotropic Effect of New Glibenclamide Isostres *J Pharmacol Exp Toxicol* 1999; 289: 625–631.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

28. Rabuazzo AM, Buscema M, Vinci C, Caltabiano V, Vetri M, Forte F, Vigneri R, Purrello F. Glyburide and tolbutamide induce desensitization of insulin release in rat pancreatic islets by different mechanisms. *Endocrinology* 1992; 131: 1815-20.
29. Itabashi N, Okada K, Muto S, Fujita N, Ohta T, Miyazaki Ji, Asano Y, Saito T. A novel enhancer of insulinotrophic action by high glucose (JTT-608) stimulates insulin secretion from pancreatic beta-cells via a new cellular mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 953-60.
30. Zhou DB, Ipp E: Sulphonylurea effects on insulin secretion in islets desensitized to glucose. *Pancreas* 1990; 5: 528 – 532.
31. Ashcroft FM, Ashcroft SJH. The sulphonylurea receptor. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1175: 45–59.
32. Hellman B, Sehlin J, Taljedal IB. Glibenclamide is exceptional among hypoglycaemic sulphonylureas in accumu-lating progresssively in beta-cell-rich pancreatic islets. *Acta Endocrinol* 1984; 105: 385-90.
33. Eliasson L, Renstrom E, Ammala C, Berggren PO, Bertorello AM, Bokvist K,et al. PKC-dependent stimulation of exocytosis by sulfonylureas in pancreatic beta cells. *Science* 1996; 271: 813-5.
34. Tian YA, Johnson G, Ashcroft SJ. Sulfonylureas enhance exocytosis from pancreatic beta-cells by a mechanism that does not involve direct activation of protein kinase C. *Diabetes* 1998; 47 :1722-6.
35. Lehtihet M, Welsh N, Berggren PO, Cook GA, Sjoholm A.: Glilbenclamide inhibits islet carnitine palmitoyltrancsferase 1 activity, leading to PKC – dependent insulin exocytosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E438 – E446.
36. Lenzen S, Tiedge M, Panten U. Glucokinase in pancreatic B-Cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinologica* 1987; 115: 21 – 29.
37. Tiedge M, Lenzen S. Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT-2 gene expression in pancreatic B-Cells and liver from rats. *Biochem J* 1995; 308: 139 – 144.
38. Porzio O, Marlier L.N.J.L, Federici M, Hribal M.L, Magnaterra R, Lauro D, Fusco A, Sesti G, Borboni P: GLUT2 and glucokinase expression is coordinately regulated by sulfonylurea. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 153: 155 – 161.
39. Patane G, Piro S, Anello M, Rabuazzo AM, Vigneri R, Purrello F: Exposure to glibenclamide increases rat beta cells sensitivity to glucose. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 887 – 892.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]