مجله دیابت و لیپید ایران. تابستان ۱۳۸۵؛ دوره ۵ (شماره ۴): ۳۱۸-۳۰۹

اثر استرس روانی مزمن بر عملکرد گلی‌بن‌کلامید در ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شدهٔ موش‌های صحرایی در حضور گلوکز

حمیرا زردوز[۱]، صالح زاهدي اصل*[۲]، محمد کاظم غریب ناصري[۱]

چکیده

مقدمه: با توجه به این که استرس مي‌تواند بر کنترل قند خون بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ اثرات معکوس بگذارد، مطالعة حاضر به بررسي عملکرد گلي‌بن‌کلامید در ترشح انسولین از سلول‌هاي بتاي جزایر لانگرهانس موش‌هاي صحرایي، متعاقب اعمال استرس رواني مزمن پرداخته است.

روش‌ها: در این تحقیق، تعداد ۳۰ سر موش صحرایي نر(نژاد Wistar) در گروه‌هاي مساوي شاهد و آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند(هر گروه ۵ سر). چهار نوع استرسور محدود کننده با ترتیب تصادفي روزانه دو بار، هر بار یك ساعت و به مدت ۱۵ و ۳۰ روز اعمال شدند. ۲٤ ساعت پس از آخرین استرس، ترشح انسولین (به روش استاتیك) از جزایر لانگرهانس جدا شدة حیوانات در حضور غلظت‌هاي ٥/٦، ۸/۳ و ١٦/٧ میلي مولار گلوکز بررسي شد. ترشح انسولین از جزایر در حضور غلظت ٥/٦ میلي مولار گلوکز به همراه ۱۰ میکرو مولار گلي‌بن‌کلامید نیز مورد ارزیابي قرار گرفت.

یافته‌ها: ترشح انسولین از جزایر جدا شدة حیوانات استرس دیده در حضور غلظت‌هاي افزایندة گلوکز، فقط در روز سي‌ام نسبت به گروه شاهد بطور معني‌داري افزایش یافت. در گروه آزمایش، میزان ترشح انسولین از جزایر در حضور ٥/٦ میلي مولار گلوکز به تنهایي، در روزهاي پانزدهم و سي‌ام، به طور معني‌داري نسبت به روز اول افزایش یافت. در حالي که این افزایش در گروه شاهد وجود نداشت. بر خلاف حیوانات گروه شاهد، در حیوانات گروه آزمایش ترشح انسولین در حضور ٥/٦ میلي مولار گلوکز به همراه ۱۰ میکرو مولار گلي‌بن‌کلامید، در روزهاي اول، پانزدهم و سي‌ام، تفاوت معني‌داري را با ترشح انسولین در حضور ٥/٦ میلي مولار گلوکز به تنهایي نشان نداد. ترشح انسولین از جزایر جدا شده، در حضور ٥/٦ میلي مولار گلوکز به همراه ۱۰ میکرو مولار گلي‌بن‌کلامید در روزهاي مختلف، بین گروه‌هاي شاهد و آزمایش تفاوت معني‌دار نشان نداد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌هاي فوق، به نظر مي‌رسد که استرس رواني مزمن، پاسخ‌دهي سلول‌هاي بتاي پانکراس به گلي‌بن‌کلامید را کاهش مي‌دهد و در نتیجه مانع از تقویت ترشح انسولین بوسیلة گلي‌بن‌کلامید مي‌شود. توجه به این نکته در کنترل متابولیك بیماران دیابتي که از این دارو استفاده مي‌کنند و تحت استرس قرار مي‌گیرند حائز اهمیت مي‌باشد.

واژگان کلیدی: استرس، انسولین، جزایر لانگرهانس، گلي‌بن کلامید، موش صحرایي

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

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

* ***نشانی***: تهران، اوین، بیمارستان طالقاني، طبقة دوم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکي شهید بهشتي؛ تلفن: ۲۲٤۰۹۳۰۹؛ نمابر: ۲۲٤۰۲٤٦۳؛ پست الکترونیك: zahedi@erc.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۱/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۸

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

مقدمه

استرس، واکنش کلیشه‌اي موجود زنده به تحریکاتي است که تمایل دارند همئوستاز پویاي روندهاي فیزیولوژیك، بیوشیمیایي و یا رواني را مختل کنند [۱]. مواجهه با استرس، منجر به پاسخ‌هاي هماهنگي (پاسخ‌هاي استرسي) مي‌شود که احتمال بقاي موجود را افزایش مي‌دهد [۲] که این کار از طریق تغییراتي در رفتار، عملکرد سیستم اتونوم و ترشح هورمون‌هایي از قبیل آدرنوکورتیکوتروپین، کورتیزول/ کورتیکوسترون، کاتکولامین‌هاي فوق‌کلیوي، اکسي‌توسین، پرولاکتین و رنین مي‌باشند [۳]. به طور کلي استرسورها را مي‌توان به سه گروه بزرك تقسیم‌بندي کرد: ۱) استرسورهاي رواني نظیر مواجهه با محیط غیرقابل کنترل و جدید، محدودیت[1] و چرخش[2]، ۲) استرسورهایي که شامل محرك فیزیکي مي‌باشند و داراي جزء رواني قوي هستند، نظیر درد و شوك الکتریکي[3] و ۳) استرسورهایي که با همئوستاز قلبي عروقي مقابله مي‌کنند، نظیر خونریزي و ورزش[۳، ٤]. در کلینیك استرس‌هاي رواني به ٤ نوع مختلف، که با یکدیگر همپوشاني دارند تقسیم مي‌شوند. این استرس‌ها شامل استرس‌هاي حاد مانند تهاجم و ضرب وشتم، متوالي[4] مانند داغداري و سوگ، مزمن تناوبي[5] مانند کشمکش با همسایگان و اقوام، و مزمن مانند معلول یا ناتوان شدن [۵] مي‌باشند. انواع استرس از جمله استرس رواني نه تنها قادر است متابولیسم کربوهیدرات را در افراد غیر دیابتي تحت تاثیر قرار دهد [۸-٦]، بلکه مي‌تواند در کنترل قند خون بیماران دیابتي نیز ایجاد اختلال نماید [۹، ۱۰].

اثر استرس بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس مورد بررسي قرار گرفته است، به عنوان مثال در مطالعة اثر استرس شوك الکتریکي به عنوان یك استرس فیزیکي، که در طي ۳ روز متوالي اعمال شد، افزایش معني‌داري در میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس در حضور ۵/٦ میلي مولار گلوکز مشاهده شد. در حالي که میزان ترشح انسولین در حضور غلظت‌هاي بالاتر گلوکز (۸/۳ ، ۱۱/۱، ۱٦/۷و ۲۲/۲ میلي مولار) تغییر معني‌داري نداشت [۱۱].

یکي از عوامل محرك ترشح انسولین، گلوکز است که مي‌تواند پس از ورود به داخل سلول‌هاي بتا، متابولیزه شده و با افزایش غلظت ATP در داخل سلول موجب بسته شدن کانال‌هاي پتاسیمي وابسته به ATP و در نهایت دپلاریزاسیون غشاء و باز شدن کانال‌هاي کلسیمي وابسته به ولتاژ شود. با ورود کلسیم به داخل سلول، گرانول‌هاي ترشحي به غشاي پلاسمایي متصل شده و ترشح انسولین صورت مي‌گیرد [۱۲]. بنابراین احتمالاً استرس بر مسیر این حلقة ترشحي اثر گذاشته و موجب اختلال در متابولیسم کربوهیدرات و تنظیم قند خون در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ مي‌شود.

گلي‌بن‌کلامید یکي از رایج‌ترین داروهاي مورد استفاده در درمان دیابت نوع ۲ مي‌باشد [۱۳]. این دارو همچنین توانایي تحریك ترشح انسولین را در شرایط in vitro دارد [۱٤، ۱۵]. تحریك ترشح انسولین بوسیلة گلي‌بن‌کلامید، پس از اتصال این دارو به گیرنده سولفونیل اوره‌ها در غشاي پلاسمایي سلول‌هاي بتا [۱٦]، از طریق دو سازوکار صورت مي‌گیرد. یکي از سازوکارها، مهار کانال پتاسیمي وابسته به ATP است، که خود ترکیبي از کانال پتاسیمي تصحیح کنندة رو به داخل[6] و گیرنده سولفونیل اوره‌ها مي‌باشد [۱۷]. سازوکار دوم، تحریك مستقیم اگزوسیتوز انسولین از گرانول‌هاي ترشحي، به طور مستقل از کانال‌هاي پتاسیمي وابسته به ATP مي‌باشد [۱۸، ۱۹]. نتایج حاصل از یك مطالعه که روي موش‌هاي صحرایي دیابتي انجام شده است نشان داد که موش‌هاي دیابتي استرس دیده، سطح گلوکز خون بالاتري نسبت به موش‌هاي دیابتي گروه شاهد داشتند که با توجه به کاربرد گلي‌بن‌کلامید در هر دو گروه، به نظر مي‌رسد که پاسخ به گلي‌بن‌کلامید در حیوانات دیابتي قویا به‌وسیله استرس تحت تاثیر قرار مي‌گیرد [۲۰]. در مقابل، در مطالعة اثر جنگ به عنوان یك استرسور رواني قوي روي کنترل قند خون بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، تغییر معني‌داري در مقادیر قند خون،

1- Restraint
2- Rotation
3- Foot shock
4- Sequential
5- Chronic

6- Inward-rectifying K^+ channel

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

هموگلوبين گليكوزيله[1] و همچنين دوز مصرفي گليبن-كلاميد مشاهده نشد [۲۱].

بدين ترتيب به نظر مي‌رسد اثر استرس در عملكرد داروهاي پايين آورندة قند خون نظير گليبن‌كلاميد، هنوز كاملاً مشخص نشده است. با توجه به اين نكته و همچنين نظر به اين كه اثرات گليبن‌كلاميد بر بافت‌هاي محيطي [۲۲، ۲۳] در مقايسه با اثر آن بر سلول‌هاي بتاي پانكراس از اهميت كمتري برخوردار است [۲٤]، لذا تحقيق حاضر به بررسي اثر استرس رواني طولاني مدت بر عملكرد گليبن‌كلاميد در ترشح انسولين از جزاير جدا شدة موش-هاي صحرايي نر پرداخته است.

روش‌ها

حيوانات

در اين بررسي، از موش‌هاي صحرايي نر نژاد Wistar (انستيتو پاستور ايران)، به تعداد ۳۰ سر استفاده شد. وزن موش‌ها در شروع آزمايش ۱۷۰ تا ۲۵۰ گرم بود. حيوانات در دماي ۲ ± ۲۲ درجه سانتيگراد در قفس‌ها به صورت دو تايي نگه‌داري شدند. سيكل تاريكي ـ روشنايي ثابت (روشنايي از ۷ صبح تا ۷ عصر) تأمين شد. حيوانات به آب و غذاي كافي(پلت‌هاي استاندارد) جز در زمان آزمايش دسترسي آزاد داشتند. انجام آزمايش‌ها روي حيوانات توسط كميتة اخلاق مركز تحقيقات غدد درون ريز و متابوليسم دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي مورد تاييد قرار گرفته بود.

روش القای استرس

حيوانات به دسته‌هاي مساوي شاهد و آزمايش [كه هر دسته شامل۳ گروه (روزهاي اول، پانزدهم و سي‌ام) و هر گروه شامل۵ سر موش بود] تقسيم شدند. ٤ نوع استرسور محدود كننده (كه توالي استفاده از آنها تصادفي بود)، در دوره‌هاي ۱۵ و ۳۰ روزه به هر يك از حيوانات گروه آزمايش اعمال شد (حيواناتي كه در گروه روز اول قرار داشتند، هيچ گونه استرسي دريافت نكردند). حيوانات گروه آزمايش دو بار در روز هر بار به مدت يك ساعت با استرس مواجه شدند. اولين مواجهه بين ساعت ۹ تا ۱۲ صبح و دومين مواجهه بين ساعت ۱ تا ٤ بعدازظهر صورت گرفت. هدف از بكارگيري ٤ نوع استرسور محدود كنندة مختلف در هر يك از حيوانات گروه‌هاي آزمايش، به حداقل رساندن تطابق حيوانات با استرس بود [۲۵]. استرسورهاي مورد استفاده شامل موارد زير بود: *۱*ـ پيچيدن حيوان در يك حوله و بستن آن با نوار، *۲*ـ محدود كردن حيوان در يك جعبة پلكسي‌گلاس كه داراي دريوش بود، *۳*ـ محدود كردن حيوان در يك لولة پي وي سي كه از هر دو سر بسته بود و *٤* ـ بي‌حركت كردن حيوان روي يك تخته از طريق بستن اندام‌ها بوسيلة نوار به پايه‌هاي فلزي متصل به تخته. ميزان استرس وارد شده به هر يك از حيوانات يكسان و قابل تكرار بود. گروه شاهد در طي دورة آزمايش در محلي كه دور از مكان اعمال استرس روي حيوانات گروه آزمايش بود نگه‌داري شدند. براي به حداقل رساندن القاي استرس در حيوانات گروه شاهد، حيوانات استرس ديده ۱۵ دقيقه بعد به محل نگه‌داري حيوانات منتقل شدند [۲۵].

جداسازی جزایر

جزاير لانگرهانس حيوانات مورد مطالعه با استفاده از تكنيك كلاژناز Lacy و Kostianovsky [۲٦]، با مختصري تغيير، جدا شدند. به اين ترتيب كه ۲٤ ساعت پس از آخرين استرس و به دنبال ۱٦ ساعت ناشتا بودن، پس از بيهوشي ملايم با اتر، سر حيوان با قيچي تيز قطع شد و پس از تخلية خون، ناحية شكم بصورت V شكل باز و محل ورود مجراي صفراوي مشترك به دوازدهه با فورسپس مسدود گرديد. پس از وارد كردن يك كاتتر (شماره ۱۸) از ناحية ناف كبد به درون مجراي صفراوي مشترك، ۱۰ ميلي ليتر از محلول نمكي هنكس[2] سرد، ۷/٤ PH= ، شامل كلرور سديم۱۳٦، كلرور پتاسيم ۵/۳٦، كلرور كلسيم ۱/۲٦، سولفات منيزيوم ($7H_2O$) ۰/۸، فسفات سديم، دي بازيك (H_2O ۲) ۰/۳۳، فسفات پتاسيم، منوبازيك ۰/٤٤، بيكربنات سديم ٤/۱٦ ميلي مولار (شركت

1- HbA_1C

2- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

Merck، آلمان) [۲۷، ۲۸] حاوي ۰/۵ ميلي گرم در ميلي ليتر كلاژنازP (شركت Roche، آلمان)، به داخل پانكراس تزريق شد. با تزريق محلول، پانكراس متسع شده و بلافاصله از بدن حيوان خارج گرديد. پانكراس جدا شده، در لولة آزمايش پلاستيكي، به مدت ۱۷ دقيقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتيگراد قرار داده شد [۲۹]. سپس، محلول هنكس سرد تا حجم ٤٠ ميلي ليتر به لوله اضافه گرديد. پس از يك دقيقه تكان دادن، محتويات آن به داخل كريستاليزوري به حجم ۱۵۰ ميلي ليتر منتقل شده و محلول هنكس سرد تا لبة كريستاليزور اضافه سپس با كمك پيپت پلاستيكي محتويات داخل كريستاليزور به آرامي مخلوط گرديد. پس از گذشت ۲ دقيقه، محلول فوقاني با استفاده از سيستم مكش تخليه شده و عمل شستشوي سوسپانسيون انتهايي ۲ بار ديگر تكرار شد. در مرحلة پاياني، سوسپانسيون انتهايي از صافي گذرانده شد و بار ديگر شستشو صورت گرفت. بخش رسوبي باقي مانده بوسيلة محلول نمكي هنكس سرد رقيق شده و كريستاليزور در سيني محتوي يخ قرار داده شد. با استفاده از استريوميكروسكپ (Kyowa، ژاپن) جزاير دست‌چين شدند (First- picking).

بررسی ترشح انسولین

فعاليت ترشحي جزاير، تحت شرايط استاتيك مورد بررسي قرار گرفت [۲٦، ۳۰]. در اين مرحله به ازاي هر پانكراس و براي هر يك از غلظت‌هاي گلوكز، گروه‌هاي ٤ تايي از جزاير (هر گروه شامل ۸ جزيره) از پتري‌ديش به طور تصادفي برداشت شده و در داخل بشرهاي پلاستيكي كوچك واقع در سيني محتوي يخ قرار داده شد (Second-picking). مرحلة جداسازي جزاير از زمان شروع جراحي تا قرار دادن آنها در بشر به طور متوسط ۱/۵ ساعت طول كشيد. به اين بشرها يك ميلي ليتر محلول كربس[1] با ۷/٤ =PH، شامل كلرور سديم ۱۱۵، كلرور پتاسيم ۵، كلرور منيزيوم (H_2O ٦) ۱، كلرور كلسيم۲/۵، بيكربنات سديم ٢٤ ميلي مولار (شركت Merck، آلمان)، هپس (HEPES) ١٦ ميلي مولار (شركت Sigma، آمريكا)، ۰/۵ گرم در دسي ليتر آلبومين سرم گاوي (BSA) (شركت Fluka، آلمان) [۲۷، ۲۸] كه محتوي غلظت‌هاي ۵/٦، ۸/۳ و ١٦/٧ ميلي مولار گلوكز [۱۱] بود، اضافه شد. همچنين يك ميلي ليتر محلول كربس كه محتوي گلوكز با غلظت ۵/٦ ميلي مولار به همراه ۱۰ ميكرو مولار گلي‌بن‌كلامید (شركت Sigma، آمريكا) بود، به بشرهاي حاوي جزاير اضافه شد. گلي‌بن‌كلامید بهترين پاسخ‌دهي را در محدوة ۸-۵ ميلي مولار گلوكز دارد [۳۱]، بنابراين غلظت ۵/٦ ميلي مولار گلوكز، كه غلظت ناشتاي (پاية) گلوكز پلاسما در موش صحرايي مي‌باشد [۳۲]، در همراهي با گلي‌بن‌كلامید انتخاب شد. غلظت ۱۰ ميكرو مولار گلي‌بن-كلامید نيز حداكثر غلظت مؤثر دارو مي‌باشد كه موجب تحريك ترشح انسولين از جزاير مي‌شود [۳۰، ۳۳] و جهت بررسي هر گونه كاهش درعملكرد گلي‌بن‌كلامید در ترشح انسولين غلظت مناسبي بود. بشرها در ظرف‌هاي شيشه‌اي با درب لاستيكي قرار داده شده و براي مدت ۹۰ دقيقه در حرارت ۳۷ درجه سانتيگراد انكوبه شدند. در ابتداي انكوباسيون، گاز كربوژن (۹۵% اكسيژن و ۵% دي‌اكسيدكربن) به مدت ۵ دقيقه وارد شيشه‌هاي حاوي بشرها شد. پس از اتمام انكوباسيون، محلول فوقاني بشرها جهت ارزيابي ميزان ترشح انسولين، به لوله‌هاي اپندورف منتقل شده و در دماي ۷۰- درجه سانتيگراد نگه‌داري شدند. انسولين با استفاده از كيت RIA انسولين (شركت Diasorin، ايتاليا، شماره كاتالوگ P2796) اندازه‌گيري شد. اين كيت با انسولين موش صحرايي ۱۰۰% Cross-reactivity داشت. ضريب تغييرات درون و برون آزموني انسولين به ترتيب ۱۰/٦% و ۱۰/۸% بود.

تجزیه و تحلیل آماری

نتايج بصورت Mean ± SEM ميزان انسولين ترشح شده از جزاير در ۹۰ دقيقه (ميكرو يونيت از هر جزيره لانگرهانس در ۹۰ دقيقه) بيان شد. به منظور بررسي وجود اختلاف در گروه‌ها در روزهاي مختلف، از آناليز واريانس يك طرفه و به منظور بررسي وجود اختلاف بين گروه‌هاي شاهد و آزمايش در روزهاي مختلف و ارزيابي اختلاف بين ترشح انسولين در محيط محتوي گلوكز (۵/٦ ميلي

1- Krebs-Ringer Solution (KRS)

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

مولار)، به تنهايي و يا به همراه گلي‌بن‌كلاميد در گروه‌ها در روزهاي مختلف از آناليز واريانس دو طرفه به همراه تست Tukey استفاده شد. P<۰/۰۵ مرز معني‌دار بودن اختلافات در نظر گرفته شد.

يافته‌ها

۱ـ ترشح انسولين از جزاير در حضور غلظت‌هاي مختلف گلوكز

در روز اول، در ميزان ترشح انسولين از جزاير در پاسخ به غلظت‌هاي مختلف گلوكز، بين گروه‌هاي شاهد و آزمايش تفاوت معني‌داري مشاهده نشد (نمودار ۱). در روز پانزدهم آزمايش نيز ترشح انسولين از جزاير در حضور غلظت‌هاي مختلف گلوكز تفاوت معني‌داري را بين گروه‌هاي شاهد و آزمايش نشان نداد (نمودار ۲). در حالي كه افزايش معني‌دار ترشح انسولين در گروه آزمايش، در روز سي‌ام در حضور تمامي غلظت‌هاي مورد مطالعة گلوكز (گلوكز ۵/۶ ميلي مولار: ۱/۲۰ ±۱۴/۶۴، گلوكز ۸/۳ ميلي مولار: ۱/۸۵ ± ۳۰/۵۶، گلوكز ۱۶/۷ ميلي مولار: ۱/۹۷ ± ۵۴/۴۲) ، نسبت به گروه شاهد (گلوكز ۵/۶ ميلي مولار: ۰/۶۲ ± ۱۰/۱۱، گلوكز ۸/۳ ميلي مولار: ۱/۰۵± ۲۵/۶۰، گلوكز ۱۶/۷ ميلي مولار: ۲/۵۹± ۴۶/۲۵) مشاهده مي‌شود (P< ۰/۰۰۱) (نمودار ۳).

۲- مقايسهٔ ترشح انسولين از جزاير در حضور غلظت ۵/۶ ميلي‌مولار گلوكز به تنهايي و يا به همراه گلي‌بن‌كلاميد (۱۰ ميكرو مولار) در گروه‌هاي شاهد و آزمايش

در گروه آزمايش، ترشح انسولين از جزاير در حضور ۵/۶ ميلي‌مولار گلوكز به تنهايي، در روزهاي پانزدهم و سي‌ام، نسبت به روز اول، در همان گروه، به طور معني داري افزايش يافت (P< ۰/۰۰۱)، در حالي كه اين افزايش در گروه شاهد وجود نداشت (جدول ۱). آناليز واريانس دو طرفه در گروه آزمايش، در روزهاي اول، پانزدهم و سي‌ام اختلاف معني‌داري را بين ترشح انسولين از جزاير در حضور ۵/۶ ميلي‌مولار گلوكز به همراه۱۰ ميكرومولار گلي‌بن كلاميد و ترشح انسولين در حضور ۵/۶ ميلي‌مولار گلوكز به تنهايي، نشان نداد (جدول ۱). درحالي كه در گروه شاهد ترشح انسولين در حضور۵/۶ ميلي‌مولار گلوكز

جدول ۱- ميزان ترشح انسولين (ميكرو يونيت/جزيره/۹۰ دقيقه) از جزاير گروه‌هاي شاهد و آزمايش، در حضور گلوكز به تنهايي ويا به همراه گلي‌بن‌كلاميد، در روزهاي اول، پانزدهم و سي‌ام

گروه	شاهد			آزمايش		
	روز اول	روز پانزدهم	روز سي‌ام	روز اول	روز پانزدهم	روز سي‌ام
گلوكز (۵/۶ mM)	۸/۳۲± ۰/۸۵ (۸/۳۲± ۱/۸۰)	۹/۶± ۰/۶ (۹/۶±۱/۲۷)	۱۰/۱۱± ۰/۶۲ (۱۰/۱۱± ۱/۳۳)	۸/۳۲± ۰/۸۵ (۸/۳۲± ۱/۸۰)	۱۴/۸۵± ۱/۱۹[b*] (۱۴/۸۵±۲/۵۶) [b*]	۱۴/۶۴± ۱/۲[b*] (۱۴/۶۴± ۲ /۵۴) [b*]
گلوكز (۵/۶ mM)+ گلی بن كلاميد (۱۰µM)	۱۲/۱۴± ۱/ ۵۸[a*] (۱۲/۱۴± ۳ /۳۷) [a*]	۱۳/۳۴± ۰/۸۸[a*] (۱۳/۳۴± ۱/۸۷)[a*]	۱۲/۱۳± ۰/۶۷[a*] (۱۲/۱۳±۱/۴۲) [a*]	۱۲/۱۴± ۱/۵۸ (۱۲/۱۴± ۳/۳۷)	۱۵/۰۸± ۱/۸۲ (۱۵/۰۸± ۳/۹۰)	۱۴/۸۷± ۰/۷۶ (۱۴/۸۷± ۱/۶۰)

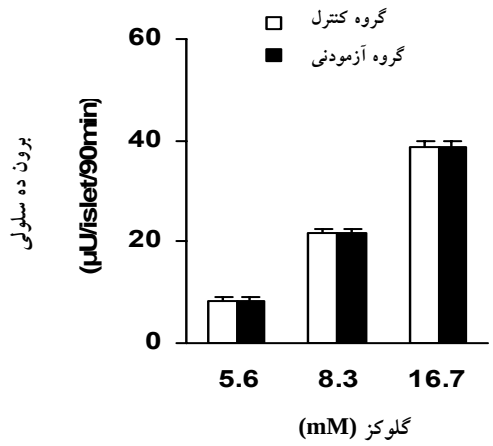
مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد و ميانگين± سطح اطمينان براي ۵ سر حيوان بيان شده‌اند.

a- اختلاف معني‌دار نسبت به حضور گلوكز به تنهايي، در همان گروه

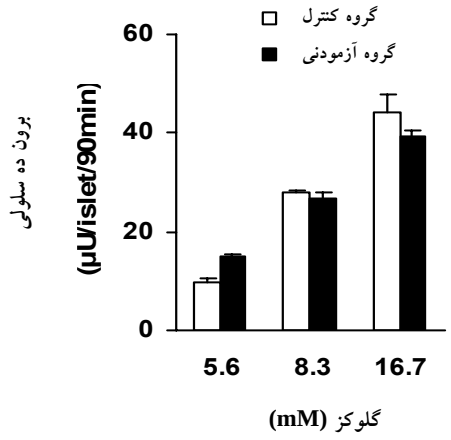
b- اختلاف معني‌دارنسبت به روز اول، در همان گروه

* (P< ۰/۰۰۱)

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]



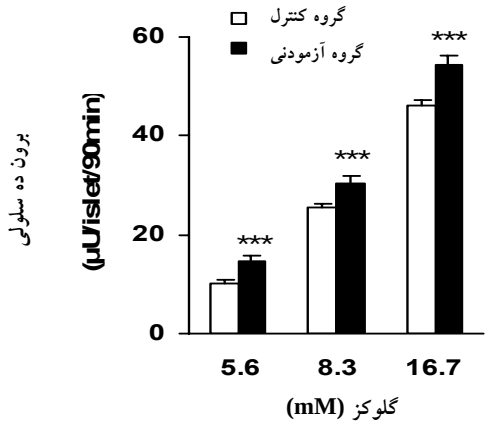
نمودار ۱- میزان ترشح انسولین از جزایر در گروه‌های شاهد و آزمایش در روز اول. هر ستون بیانگر Mean±SEM برای پنج سر حیوان می‌باشد (۴ گروه از جزایر به ازای هر غلظت از گلوکز برای هر حیوان).



نمودار ۲- میزان ترشح انسولین از جزایر در گروه‌های شاهد و آزمایش در روز پانزدهم. هر ستون بیانگر Mean±SEM برای پنج سر حیوان می‌باشد (۴ گروه از جزایر به ازای هر غلظت از گلوکز برای هر حیوان).

به همراه۱۰ میکرومولار گلي‌بن کلامید نسبت به حضور ۵/٦ میلي‌مولار گلوکز به تنهايي، در روزهاي اول، پانزدهم و سي‌ام بطور معني‌داري افزايش يافت (P< ۰/۰۰۱) (جدول ۱). از سوي ديگر در مقايسة ترشح انسولين از جزاير در حضور ۵/٦ ميلي‌مولار گلوکز به همراه۱۰ ميکرومولار گلي‌بن کلاميد، بين گروه‌هاي شاهد و آزمايش، در روزهاي اول، پانزدهم و سي‌ام، اختلاف معني‌داري مشاهده نشد (جدول ۱).

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]



نمودار ۳- میزان ترشح انسولین از جزایر در گروه‌های شاهد و آزمایش در روز سی‌ام. هر نقطه بیانگر Mean±SEM برای پنج سر حیوان می‌باشد (۴ گروه از جزایر به ازای هر غلظت از گلوکز برای هر حیوان).
*** اختلاف بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).**

بحث

نتايج حاصل از تحقيق حاضر نشان مي‌دهند كه استرس رواني طولاني مدت موجب افزايش حساسيت جزاير لانگرهانس به گلوكز مي‌شود. به اين مفهوم كه در هر غلظت معين از گلوكز، پاسخ ترشحي انسولين در حيوانات استرس ديده، در روز سي‌ام آزمايش، نسبت به حيوانات گروه شاهد به طور معني‌داري بيشتر مي‌باشد، در حالي كه در روز پانزدهم، اختلاف معني‌داري ميان گروه‌هاي آزمايش و شاهد وجود ندارد. از سوي ديگر در حيوانات استرس ديده، بر خلاف حيوانات گروه شاهد، در حضور غلظت پاية گلوكز (۵/٦ ميلي مولار) تقويت ترشح انسولين بوسيلة گلي‌بن‌كلاميد مشاهده نمي‌شود.

همان طور كه در نمودار ۳ نشان داده شده است، ترشح انسولين از جزاير گروه آزمايش، در پاسخ به غلظت‌هاي افزاينده گلوكز (۵/٦، ۸/۳ و١٦/٧ ميلي مولار)، كه به ترتيب غلظت‌هاي پايه [۳۲]، پس از صرف غذا [۳٤] و بالا يا پاتوفيزيولوژيك [۳۵] گلوكز، در پلاسماي موش‌هاي صحرايي مي‌باشند، در روز سي‌ام، به طور معني‌داري نسبت به گروه شاهد افزايش يافت، در حالي كه در روزهاي اول و پانزدهم، تفاوت معني‌داري بين دو گروه مشاهده نشد. اين امر موید آن است كه استرس‌هاي اعمال شده در حيوانات در دراز مدت توانسته‌اند پاسخگويي سلول‌هاي جزاير را به گلوكز تحت تاثير قرار دهند. تغيير در حساسيت جزاير به گلوكز در حيوانات استرس ديده، ممكن است ناشي از اثر هورمون‌هاي استرسي به ويژه كورتيكوسترون، افزايش يافته باشد [۳٦، ۳۷]، هر چند سازوكار دقيق اين اثر روشن نيست. با توجه به سازوكار اثر گلوكز در تحريك ترشح انسولين كه مراحل مختلفي از جمله در گيري گيرنده‌هاي ناقل گلوكز در غشاي سلول‌هاي بتا، متابوليزه شدن گلوكز و توليد ATP، بسته شدن كانال‌هاي حساس به ATP در غشاي سلول‌هاي بتا، باز شدن كانال‌هاي كلسيمي وابسته به ولتاژ و در نهايت اگزوسيتوز گرانول‌هاي ترشحي را در بر دارد [۱۲، ۳۸]، شايد استرس يك، چند و يا تمامي عوامل در گير را تحت تاثير قرار مي‌دهد. آزمايش‌هاي گسترده‌تر به ويژه در زمينة سلولي- مولكولي مي‌تواند راهگشاي خوبي براي شناخت اثر احتمالي استرس در افزايش حساسيت جزاير به گلوكز باشد.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

گلي‌بن‌کلامید، دارويي است که به‌طور رايج در درمان بيماري ديابت نوع ۲ مورد استفاده قرار مي‌گيرد. يکي از سازوکارهاي اثر اين دارو، اثر آن بر کانال‌هاي پتاسيمي حساس به ATP مي‌باشد، بنابراين بررسي روند اثر اين ترکيب در حيوانات استرس ديده و مقايسة آن با حيوانات شاهد شايد بتواند علاوه بر مشخص کردن نسبي ميزان اثر اين دارو در شرايط استرس، اثر احتمالي استرس بر کانال‌هاي پتاسيمي حساس به ATP را نيز روشن نمايد. در تحقيق حاضر کاربرد ۵/٦ ميلي‌مولار گلوکز به همراه۱۰ ميکرومولار گلي‌بن کلامید در موش‌هاي استرس ديده نتوانست تغيير محسوسي در ترشح انسولين از جزاير جدا شده ايجاد کند. با توجه به اين که ميزان ترشح انسولين از حيوانات گروه آزمايش در حضور ۵/٦ ميلي مولار گلوکز به تنهايي در روزهاي پانزدهم و سي‌ام حتي تا حدودي بيش از ميزان ترشح انسولين از حيوانات گروه شاهد در حضور توام ۵/٦ ميلي مولار گلوکز و ۱۰ ميکرو مولار گلي‌بن‌کلامید در همان روزها مي‌باشد، شايد يکي از دلايل عدم تغيير در پاسخ ترشحي در حضور توام ۵/٦ ميلي مولار گلوکز و ۱۰ ميکرو مولار گلي‌بن‌کلامید در حيوانات استرس ديده اين است که ميزان ترشح انسولين در اين حيوانات در حضور گلوکز ۵/٦ ميلي مولار به تنهايي حتي بيش از حدي است که براي گلي‌بن‌کلامید امکان تقويت ترشح داشته باشد. بنابر اين به عبارتي اثر تحريکي گلي‌بن‌کلامید پوشيده شده است. اما با توجه به اين که در گروه استرس ديده، حساسيت جزاير به گلوکز افزايش يافته و همچنين پشنهاد شده است که گلي‌بن‌کلامید وابسته به گلوکز عمل مي‌کند [۱٦]، بنابراين انتظار تقويت ترشح انسولين از جزاير بوسيله گلي‌بن‌کلامید وجود دارد، به‌ويژه که جزاير اين حيوانات در حضور غلظت‌هاي بالاتر گلوکز (۸/۳ و ۱٦/۷ ميلي مولار)، همچنان که در نمودار ۳ نشان داده شده است، ظرفيت افزايش ميزان ترشح انسولين را دارند. به اين ترتيب شايد علت احتمالي ديگر در عدم تقويت ترشح انسولين بوسيلة گلي‌بن‌کلامید در حيوانات استرس ديده، تغييراتي باشد که احتمالا استرس در جايگاه‌هاي عمل گلي‌بن‌کلامید ايجاد نموده است.

همانندسازي SUR، نشان داده است اين گيرنده يك كانال نبوده بلكه پروتييني از اعضاي خانوادة بزرگ پروتيين‌هاي ATP-Binding Cassette (ABC) مي‌باشد که هدايت کانال پتاسيمي وابسته به ATP را تنظيم مي‌کند[٤۰،۳۹]، وجود جايگاه اتصال براي ATP و يا ADP در SUR مي‌تواند نشان دهندة وابستگي اثرات سولفونيل اوره‌ها به گلوکز باشد [۱٦]. ساير اعضاي اين خانواده پروتييني علاوه بر تنظيم فعاليت کانال، انتقال وزيکول‌ها را نيز تحت تاثير قرار مي‌دهند [٤۱]. بنابراين احتمالاً SUR نيز در انتقال وزيکولي نقش دارد، به ويژه آن که اين گيرنده به فراواني در گرانول‌هاي ترشحي حاوي انسولين مشاهده شده است [٤۲]. با توجه به اين که گلي‌بن‌کلامید اثراتش را از طريق SUR اعمال مي‌کند، به نظر مي‌رسد که احتمالاً به دليل اثر استرس اعمال شده، اختلالي در حساسيت SUR به ATP و يا کاهشي در تعداد يا تمايل اين گيرنده‌ها بوجود آمده است که منجر به عدم تقويت ترشح انسولين بوسيلة گلي‌بن‌کلامید شده است. با نتايج حاصل از اين مطالعه پي بردن به سازوکار دقيق تغيير ايجاد شده امکان‌پذير نيست، در اين رابطه پيشنهاد مي‌شود که تحقيقات بيشتري به ويژه از نظر سلولي مولکولي و همچنين الکتروفيزيولوژيك، در رابطه با چگونگي فعاليت الکتريکي سلول‌هاي بتا، تحت تاثير استرس و در حضور گلي‌بن‌کلامید، طراحي و انجام شود.

از محدوديت هاي اين مطالعه عدم به کارگيري غلظت هاي مختلف در بررسي عملکرد جزاير لانگرهانس بود. شايد اثر استرس در غلظت هاي مختلف از گلوکز متفاوت‌تر باشد که نياز به مطالعه متعاقب دارد.

يافته‌هاي مطالعة حاضر نشان مي‌دهد که استرس رواني مزمن قادر به تغيير در حساسيت سلول‌هاي بتاي جزاير لانگرهانس و نيز ايجاد اختلال در عملکرد گلي‌بن‌کلامید مي‌باشد، موضوعي که بايستي در مورد بيماران ديابتي مصرف کنندة ترکيبات پايين آورندة قند خون مد نظر قرار گيرد. در اين رابطه احتياج به مطالعات اپيدميولوژيك با تعداد وسيع از بيماران ديابتي نيز مي‌باشد تا ارتباط بين استرس و چگونگي مصرف داروهاي از نوع سولفونيل اوره‌ها را بيشتر مشخص کند.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

سپاسگزاری

این مطالعه در آزمایشگاه علوم پایة اندوکرین مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکي شهید بهشتي صورت گرفته و هزینه‌هاي آن توسط آن مرکز (طرح شماره ۱۰۸) تامین شده است. نویسندگان برخود لازم مي‌دانند از زحمات و راهنمایي‌هاي آقاي دکتر مهدي هدایتي، رییس آزمایشگاه مرکز صمیمانه تقدیر نمایند. همچنین، از همکاري خانم‌ها فرجي، سلیمي و دانشپور و آقایان قاسمي، عظیم‌زاده و بیاباني سپاسگزاري مي‌شود.

مآخذ

1. Wales JK. Does psychological stress cause diabetes? *Diabetic Medicine* 1995; 12: 109-112.
2. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Euro J of Pharmacol* 2003; 463: 235-272.
3. Van de Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 1-48.
4. Carter WR, Herrman J, Stokes K, Cox DJ. Promotion of diabetes onset by stress in the BB rat. *Diabetologia* 1987; 30: 674-675.
5. Wilkinson G. Stress: another chimera. *B M J* 1991; 302: 191-192.
6. Ljungqvist O, Nygren J, Soop M, Thorell A. Metabolic perioperative management. novel concept. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11: 295-299.
7. Strommer L, Permert J, Arnelo U, Koehler C, Isaksson B, Larsson J, et.al. Skeletal muscle insulin resistance after trauma: insulin signaling and glucose transport. *Am J Physiol* 1998; 275: E351-358.
8. Macho L, Koska J, Ksinantova L, Pacak K, Hoff T, Noskov B, et.al. The response of endocrine system to stress loads during space flight in human subject. *Adv Space Res* 2003; 31: 1605-1610.
9. Jaber LA, Lewis NJ, Slaughter RL, Neale AV. The effect of stress on glycemic control in patients with type 2 diabetes during glyburide and glipizide therapy. *J Clin Pharmacol* 1993; 33: 239-245.
10. Moberg E, Kollind M, Lins PE. Acute mental stress impairs insulin sensitivity in IDDM patients. *Diabetologia* 1994; 37: 247-51.
11. Farias-Silva E, Sampaio-Barros MM, Amaral MEC, Carneiro EM, Boschero AC, Grassi-Kassisse DM, et al. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot-shock stress. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 783-789.
12. Tokuyama Y, Fan Z, Furuta H, Makielski JC, Polonsky KS, Bell GI, et al. Rat inwardly rectifying potassium channel Kir6.2: cloning, electrophysiological characterization, and decreased expression in pancreatic islets of male zucker diabetic fatty rats. *Bio and Bioph Res Communic* 1996; 220: 532-538.
13. Lehtihet M, Welsh N, Berggren PO, Cook GA, Sjoholm A. Glibenclamide inhibits islet carnitine palmitoyltransferase 1 activity, leading to PKC-dependent insulin exocytosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E438-E446.
14. Nelson TY, Gaines KL, Rajan AS, Berg M, Boyd AE III. Increased cytosolic calcium: A signal for sulfonylurea-stimulated insulin release from beta cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 2608-2612.
15. Sweet IR, Cook DL, De Julio E, Wallen AR, Khalil G, Callis J, et.al. Regulation of ATP/ADP in pancreatic islets. *Diabetes* 2004; 53: 401-409.
16. Efanov AM, Zaitsev SV, Efanova IB, Zhu S, Ostenson CG, Berggren E, et.al. Signaling and sites of interaction for RX-871024 and sulfonylurea in the stimulation of insulin release. *Am J Physiol* 1998; 274: E751-E757.
17. Nagashima K, Takahashi A, Ikeda H, Hamasaki A, Kuwamura N, Yamada Y, et.al. Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66: S75-S78.
18. Flatt PR, Shibier O, Szecowka J, Berggren PO. New perspectives on the actions of sulphonylurea and hyperglycemic sulphonamides on the pancreatic β-cell. *Diabete & Metab* 1994; 20: 157-162.
19. Eliasson L, Renstrom E, Ammala C, Berggren PO, Bertorello AM, Bokvist K, et al. PKC-dependent stimulation of exocytosis by sulfonylureas in pancreatic β-cells. *Science* 1996; 271: 813-815.
20. Abd Elaziz MA, Al-Dhawailie AA, Tekel A. The effect of stress on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glibenclamide in diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1998; 23: 371-376.
21. Roglic G, Metelko Z. Effect of war on glycemic control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1993; 16: 806-808.
22. Caro JF. Effects of glyburide on carbohydrate metabolism and insulin action in the liver. *Amr J of Med* 1990; 89 (Suppl 2A): 17S-25S.
23. Smith RJ. Effects of the sulfonylureas on muscle glucose homeostasis. *Amr J of Med* 1990; 89 (Suppl 2A): 38S-43S.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

24. Jakson EJ, Bressler R. Clinical pharmacology of sulphonylurea hypoglycemic agents, part 1. *Drugs* 1981; 22: 211-245.
25. Toleikis PM, Godin DV. Alteration of antioxidant status in diabetic rats by chronic exposure to psychological stressors. *Pharmachol Bioch and Behavior* 1995; 52: 355-366.
26. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-39.
27. Shibata A, Ludvigsen CW, Naber SP, McDaniel ML, Lacy PE. Standardization of a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islets. *Diabetes* 1976; 25: 667-672.
28. Roche manual,Collagenase P, version 4,2003; 1-2.
29. Fujioka T, Terasaki PI, Heintz R, Merideth N, Lanza P, Zheng T, et al. Rapid purification of islets using magnetic microspheres coated with anti-acinar cell monoclonal antibodies. *Transplantation* 1990; 49: 404-407.
30. Gullo D, Rabuazzo AM, Vetri M, Gatta C, Vinci C, Buscema M, et.al. Chronic exposure to glibenclamide impairs insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest* 1991; 14: 287-291.
31. Zawalich WS. Glyburide priming of beta cells, possible involvement of phosphoinositide hydrolysis. *Biochemical Pharmacology* 1991; 41: 807-813.
32. Leclercq-Meyer V, Akkan AG, Marchand J, Malaisse WJ. Effect of glimepiride and glibenclamide on insulin and glucagons secretion by the perfused rat pancreas. *Biochemical Pharmacology* 1991; 42: 1634-1637.
33. Hargrove DM, Nardone NA, Persson LM, Andrews KM, Shepherd KL, Stevenson RW, et.al. Comparison of the glucose dependency of glucagon-like peptide-1 (7-37) and glyburide in vitro and in vivo. *Metabolism* 1996; 45: 404-409.
34. Nguyen Q-A, Antoine M-H, Ouedraogo R, Hermann M, Sergooris J, Pirotte B, et.al. In vitro and in vivo effects of new insulin releasing agents. *Biochemical Pharmacology* 2002; 63: 515-521.
35. Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Molecular regulation of the hypothalamo- pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treartment. *Endocrinology* 2001; 142: 4872-4879.
36. Polonsky KS, O'meara NM. Secretion and metabolism of insulin, proinsulin, and c-peptide. In: LJ De Groot (editors). *Endocrinology*, third edition. Philadelphia, Saunders; 1995: 1355-1356.
37. Barbera M, Fierabracci V, Novelli M, Bombara M, Masiello P, Bergamini E, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance and pancreatic adaptive response in aging rats are not modified by oral vanadyl sulfate treatment. *Europ J of Endocrinol* 2001; 145: 799-806.
38. Malaisse WJ. Insulin secretion and beta cell metabolism. In: *Endocrinology*, LJ De Groot (editors). Third ed. Philadelphia, Saunders; 1995: 1329-1333.
39. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, et al. Cloning of the β-cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268: 423-426.
40. Higgins CF. The ABC of channel regulation. *Cell* 1995; 82: 693-696.
41. Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, Kirk KL. Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 1992; 256: 530-532.
42. Ozanne SE, Guest PC, Hutton JC, Hales CN. Intracellular localization and molecular heterogeneity of the sulphonylurea receptor in insulin-secreting cells. *Diabetologia* 1995; 38: 277-282.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]