# بررسي اثر گلوكزآمين بر فعاليت آنزيم‌هاي گلوكوكيناز و هگزوكيناز پانكراس و ارتباط آن با ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي نوع ٢

محمود خياطيان[١]، بيژن فرزامي*[١] ، ابراهيم ميرزا جاني[٢]، باقر لاريجاني[٣]، محمد تقي‌خاني[٤]، سيده زهرا بطحايي[٤]،
صفورا ورداسبي[١]، اسماعيل علمي آخوني[١]

## چكيده

مقدمه: آنزيم گلوكوكيناز به عنوان حسگر گلوكز در سلول‌هاي β جزاير لانگرهانس پانكراس(لوزالمعده) مطرح بوده و در هوموستاز گلوكز و ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز (GSIS) نقشي كليدي را ايفا مي‌كند. در تحقيق حاضر، اثر غلظت هاي مختلف گلوكزآمين (مهار كنندهٔ گلوكوكيناز) بر روي فعاليت آنزيم‌هاي گلوكوكيناز و هگزوكيناز پانكراس و بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس جدا شده از پانكراس موش صحرايي، مورد بررسي قرار گرفت.

روش‌ها: جزاير لانگرهانس با تكنيك هضم كلاژناز از موش‌هاي صحرايي سالم و يك نوع مدل حيواني از ديابت نوع II (موسوم به nSTZ)جدا گرديد. فعاليت آنزيمي با اندازه‌گيري سرعت تشكيل گلوكز–٦- فسفات به كمك تغييرات نشر فلوئورسانس تعيين گرديد. با تكنيك انكوباسيون استاتيك، ترشح انسولين از جزاير دستچين شده مورد ارزيابي قرار گرفت. ميزان انسولين با روش الايزا اندازه‌گيري شد.

يافته‌ها: نتايج ما نشان داد كه گلوكزآمين، فعاليت گلوكوكيناز را در عصاره جزاير به صورت وابسته به دوز كاهش مي‌دهد، اما اثري بر فعاليت هگزوكيناز ندارد. همچنين نتايج حاصل از انكوباسيون گلوكزآمين در غلظت هاي مختلف با جزاير لانگرهانس نشان داد كه ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز مهار مي‌گردد، اما اين ماده بر ترشح انسولين پايه هيچ‌گونه اثر مهاري اعمال نمي‌كند. در موش‌هاي ديابتي فعاليت گلوكوكيناز كاهش يافته بود در حالي كه در اين حيوانات، ترشح انسولين پايه و نيز فعاليت هگزوكيناز بيشتر از موش‌هاي سالم بود.

نتيجه‌گيري: براساس نتايج حاصل از اين تحقيق مي‌توان برآورد نمود كه كاهش فعاليت آنزيمي گلوكوكيناز جزاير پانكراس، احياناً مي‌تواند در كاهش ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز دخالت داشته باشد. افزايش ترشح انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي مي تواند ناشي از افزايش فعاليت هگزوكيناز پانكراس باشد.

واژگان كليدي: گلوكزآمين، جداسازي جزاير، ترشح انسولين، گلوكوكيناز، هگزوكيناز، ديابت نوع ٢

☑ *اين مقاله در كنگرهٔ Diabetes Mellitus and the Control of Cellular Energy Metabolism كه در تاريخ ٢١ لغايت ٢٦ ژانويه ٢٠٠٦ در شهر ونكوور كانادا برگزار گرديد، ارائه شده است.*

١- گروه بيوشيمي پزشكي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي تهران
٢- گروه بيوشيمي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي گيلان
٣- مركز تحقيقات غدد درون‌ريز و متابوليسم، دانشگاه علوم پزشكي تهران
٤- گروه بيوشيمي باليني، دانشكده علوم پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس

* *نشاني*: تهران، خيابان قدس، خيابان پورسينا، دانشكده پزشكي، گروه بيوشيمي، صندوق پستي: ٥٣٩٩-١٤١٥٥
تلفن/ نمابر: ٨٨٩٥٩٧٤٥ ؛ پست الكترونيك: Farzamib@sina.tums.ac.ir

تاريخ دريافت: ٨٤/٣/٢٥
تاريخ پذيرش: ٨٤/١٠/٢٠

## مقدمه

گلوکوکيناز (EC. 2. 7.1.2) تبديل گلوکز سيتوپلاسمي را به گلوکز–٦-فسفات، هم در هپاتوسيت‌ها و هم در سلول‌هاي بتاي پانکراس کاتاليز مي‌کند [ ۱ ]. گلوکوکيناز از جمله آنزيم‌هايي است که تحت عنوان هگزوکيناز نيز ناميده مي‌شوند. وزن مولکولي هگزوکينازهاي I،II و III، ۱۰۰ کيلو دالتون بوده و داراي ميل ترکيبي زيادي براي گلوکز هستند (۳۰μM-۲۰ = Km) و توسط محصول عملشان يعني گلوکز–٦-فسفات بطور پس نورد مهار مي‌شوند؛ درحالي که گلوکوکيناز (هگزوکيناز IV يا D) داراي اندازة کوچکتر (۵۰≃ KDa) و Km بالاتر (۵-۸mM) بوده و توسط گلوکز–٦-فسفات مهار نمي‌شود [ ۲ ].

گلوکوکيناز سه ويژگي منحصر به فرد دارد. يکي اين‌که در غلظت‌هاي پايين گلوکز، از خود خاصيت تعاوني نشان مي‌دهد در حالي که آنزيمي تك واحدي است [۲]. دوم اينکه توسط يك پروتيين فعاليتش تنظيم مي‌شود؛ که اين پروتيين تحت عنوان پروتيين تنظيم کننده گلوکوکيناز (GKRP) شناخته شده و خاصيت مهاري دارد [ ۳ ]. سوم اين‌که اين آنزيم داراي نقل و انتقال[1] بين هسته و سيتوپلاسم مي‌باشد [٤]. اين دو ويژگي اخير در دهة گذشته شناخته شده‌اند.

رابطة آنزيم گلوکوکيناز با ترشح انسولين توسط چندين گروه از پژوهشگران مطالعه شده و سازوکار مولکولي دخيل در القاي ترشح انسولين توسط گلوکز، موضوع پژوهش‌هاي بسياري بوده است. در اين راستا چند نظريه ارائه گرديده است. يکي از اين نظريات، فرضية سوخت[2] نام دارد. براساس اين فرضيه، متابوليسم گلوکز مسؤول ايجاد سيگنال براي ترشح انسولين بوده و گلوکوکيناز، حسگر گلوکز در سلول‌هاي بتاي پانکراس است [۵]. تصور مي‌شود که مرحلة اصلي محدود کنندة سرعتِ متابوليسم گلوکز در سلول‌هاي بتاي پانکراس، فسفريلاسيون گلوکز باشد؛ از اين رو فسفريلاسيون گلوکز نقشي حياتي در ترشح انسولين تحريك شده با گلوکز (GSIS) دارد [۱] و کاهش ميزان فعاليت آنزيم گلوکوکيناز در اين سلول‌ها به نقص در GSIS مي‌انجامد [ ٦ ]. از سوي ديگر، موتاسيون در ژن گلوکوکيناز که تاکنون به تعداد ۱۹۰ مورد گزارش گرديده [ ۷ ]، غالباً منجر به نوعي ديابت نوع II تحت عنوان MODY-2 (ديابت نوع II جوانان) مي‌شود [ ۸ ]. با کشف چند فعال کنندة گلوکوکيناز براي اولين بار در يکي دو سال گذشته [ ۹، ۱۰] و با توجه به کابردهاي درماني احتمالي اين ترکيبات، به نظر مي‌آيد که کار بر روي عوامل مؤثر بر گلوکوکيناز اهميت فزونتري يافته است. اما درمورد مهار کنندگان گلوکوکيناز، بيشتر پژوهش‌ها بر روي گلوکوکيناز کبد متمرکز گرديده است [۱۱] و از آنجا که به نظر مي‌رسد گلوکوکيناز پانکراس به طرزي متفاوت از گلوکوکيناز کبد تنظيم مي شود [۱۲]، مطالعة اثر مهار کنندگان بر روي گلوکوکيناز پانکراس ضروري مي‌نمايد. اخيراً نيز ارتباط راه متابوليسمي هگزوز آمين [ ۱۳] و از همه مهمتر گلوکزآمين [ ١٤] با سوء عملکرد سلول‌هاي بتا[3] پانکراس توسط برخي از محققان گزارش گرديده است. از سوي ديگر، عليرغم توليد موش‌هاي فاقد گلوکوکيناز پانکراس (ناك اوت شده) باتوجه به مرگ آور بودن اين دستکاري ژني در چند روز اول پس از تولد، امکان بررسي‌هاي متابوليك در اين مدل حيواني ديابت نوع II وجود ندارد [۱۵] و از طرفي درخصوص اثر گلوکزآمين بر ترشح انسولين، گزارش‌هاي ضد و نقيضي وجود داشت[ ۱۸-۱٦]، از اين رو بر آن شديم تا اثر گلوکزآمين که امروزه استفاده وسيعي در ترميم غضروف دارد، بر روي گلوکوکيناز و هگزوکيناز پانکراس و نيز بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس جدا شده از موش‌هاي صحرايي سالم و يك نوع مدل حيواني از موش‌هاي ديابتي نوع II (nSTZ) که دچار سوء عملکرد سلول‌هاي بتاي پانکراس هستند بررسي نماييم.

[1] Translocation
[2] Fuel Hypothesis
[3] β-cell dysfunction

# روش‌ها

## حيوانات آزمايشگاهي

موش‌هاي صحرايي نر، نژاد ويستار-آلبينو بـا وزن ٢٠ ± ٣٠٠ گرم تحت رژيم غذايي طبيعي در حيوانخانة گـروه بيوشـيمي پزشـكي نگهـداري مـي‌شـدند. در هـر روز آزمايش، دو موش صحرايي كه از شب قبـل بـه حالـت ناشتا نگهداشته شده بودند پس از تزريق داخل صـفاقي ٨٠ mg/kg تيوپنتال، بيهوش و جهت برداشتن پانكراس جراحي مي‌شدند.

## جداسازي جزاير لانگرهانس

جداسازي و تخليص جزاير لانگرهانس به روش ليـسي و كاستيانوفسكي [ ١٩] با اندكي تغييرات انجام گرفـت. پانكراس (لوزالمعده) با كانوله كـردن مجـراي مـشترك صـفراوي و تزريــق ٢٠-١٥ ميلــي‌ليتــر محلــول ســرد هانكس، پرفيوژ و جدا مي‌گرديـد. پـانكراس‌هـاي جـدا شده با قيچي به قطعات ريز يك تا دو ميلي‌متـري خـرد گرديده و دو الي ٣ بار با محلول كربس حـاوي گلـوكز ٢/٨ ميلي مولار شستشو داده مي شـدند. سپس جهـت هضم بافت پانكراس، كلاژناز به محيط اضـافه مـي‌شـد. اين آنزيم در درجه حرارت ٣٧° سانتي گـراد بـه مـدت ١٧-١٥ دقيقه درحالت تكان شـديد بـر بافـت اثـر داده مي‌شد. جزايـر لانگرهـانس حاصـله پـس از چنـد بـار شستشو بـا محلـول كـربس سـرد محتـوي ٠/٥ درصـد BSA، در زيـر استرئوميكروسـكوپ بـه كمـك پيپـت پاستور دستچين گرديـده و در ويـال‌هـاي انكوباسـيون شيشه‌اي سيليكونيزه قرار داده مي شدند.

## ترشح انسولين

پس از قرار دادن ٥ جزيره در هر ويال انكوباسيون، يك ميلي‌ليتر محلول كربس حاوي ٢/٨ ميلي مـول گلـوكز به آنها اضافه مي‌شد. ويال‌ها بـه مـدت نـيم سـاعت در دماي ٣٧° C در حمام شـيكردار و جريـان مـداوم گـاز كاربوژن (٩٥ ٪ اكـسيژن و ٥ ٪ دي اكـسيد كـربن) پـره انكوبه مي‌شدند. سپس در زير استرئوميكروسـكوپ بـه كمك پيپت پاستور نوك خميده، محلول پره انكوباسيون به طور كامل برداشته و مجـدداً تعـداد جزايـر شـمارش مي‌شد. سپس يك ميلي‌ليتر محلول انكوباسـيون حـاوي ٢/٨ يا ١٦/٧ ميلي‌مولار گلوكز بدون دارو و يا همراه بـا گلــوكزآمين در غلظــت هــاي ٢/٥، ٥، ١٠ و ٢٠ ميلــي مولار به آن اضافه مي‌گرديد. ويال‌هـا مجـدداً در همـان شرايط پيشين به مدت يك ساعت انكوبه مي‌شـدند. در پايان انكوباسيون، محلول رويـي برداشـته و در فريـزر نگهداري مي‌شد. اندازه‌گيري انسولين به طريق ELISA و بـا كيـت مخـصوص انـسولين مـوش صـحرايي[1] از شركت DRG آلمـان براسـاس دسـتورات توليـد كننـده صورت پذيرفت.

## فعاليت گلوكوكيناز و هگزوكيناز

فعاليت آنزيمي در سوپرناتانت هوموژنه (عصارة) جزاير با استفاده از روش ليانـگ و همكـاران [ ٢٠] بـا انـدكي تغييرات تعيين گرديد. در ايـن روش از طريـق واكـنش هــاي جفــت شــونده بــا آنــزيم گلــوكز–٦-فــسفات دهيـدروژناز از بـاكتري *Leuconostoc mesenteroides* سرعت تشكيل NADH از $NAD^+$ اندازه گيري مي‌شود. سيــصد جزيــرة پــانكراس دســتچين شــده در ٣٠٠ ميكروليتر بافر هوموژنيزاسيون در هوموژنـايزر Kontes glass قرار داده مي‌شد. همگنة حاصـل در ١٢٠٠٠g بـه مدت ١٠ دقيقه سانتريفوز مي‌شد تا هگزوكيناز متصل به ميتوكندري جـدا گـردد. محلـول رويـي (سـوپرناتانت) جهت سنجش گلوكوكيناز و هگزوكينـاز مـورد اسـتفاده قرار مي‌گرفت. همة اين مراحل در دماي حدود ٤ درجه سانتي‌گراد انجام گرديد.

جهت رسم منحني استاندارد، استانداردهاي گلـوكز–٦-فسفات در غلظت‌هـاي بـين ٠/٣ تـا ٣ نـانومولار تهيـه گرديد. استانداردها در ١٠٠ ميكروليتر مخلـوط سـنجش (محتـوي همـة اجـزاي مـورد نيـاز واكـنش بـا غلظـت مناسب)، در ويال‌هاي اپندورف ريخته مي‌شـد. پـس از انكوباسيون ويال‌هـا بـه مـدت ٩٠ دقيقـه در دمـاي ٣٠ درجه سانتي‌گراد، با افزودن بيكربنـات واكـنش متوقـف مي‌گرديد. سپس در طول موج تحريكي ٣٤٠ نـانومتر و

[1] Rat

طـول مـوج نـشري ٤٦٠ نـانومتر، ميـزان فلوئورسـانس نمونه‌ها در مقابل بلانك معرف اندازه‌گيري مي‌شد.
جهت سنجش آنزيم، در روش فوق به جاي گلوكز–٦-فسفات، عصارة جزاير و نيز گلوكزآمين به ميزان ۲/۵ تا ۲۰ ميلي مـولار بـه مخلـوط سـنجش افـزوده مـي‌شـد. فعاليـت گلوكوكينـاز بـا تفريـق فعاليـت هگزوكينـاز از فعاليت تـام فـسفريلاسيون گلـوكز بـه دسـت مـي‌آيـد. يادآوري مي‌شود كه در پروتكل سنجش گلوكوكينـاز دو نوع بلانك وجود دارد. يكي بلانك معـرف كـه حـاوي همة اجزاء واكنش منهاي گلوكز–٦-فسفات و يا عصاره است و ديگري بلانك بافت كه حاوي عصارة جزاير بـه اضافة بافر سنجش محتـوي ۰/۵ يـا ۱۰۰ ميلـي‌مـول در ليتر گلوكز در غياب ATP است.

### القاي ديابت نوع ۲

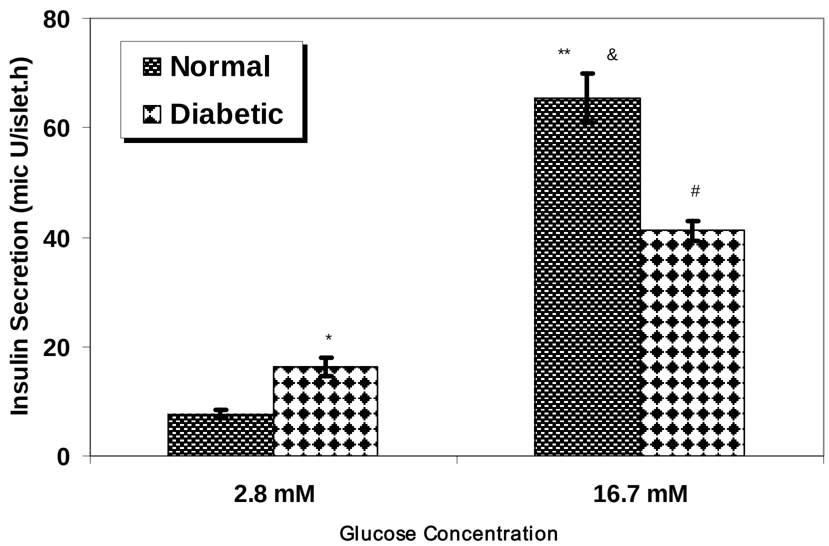
براي اين منظور به موش‌هـاي صـحرايي دو روزه، STZ (استرپتوزوتوسين) به ميزان ۹۰ ميلي‌گـرم بـر كيلـوگرم وزن بدن از طريق داخل صفاقي تزريق گرديد [۲۱]. بـه منظور ارزيابي ديابتي شدن موش‌هاي نوزاد، ۳ روز پس از تزريق STZ، از قلب آنها خـونگيري بـه عمـل آمـد. اندازه‌گيري گلوكز خون با كيت شركت زيـست شـيمي انجام شد. موش‌هايي كه داراي قند خون بـالاتر از ۲۷۵ ميلي‌گرم بر دسي ليتر بودند بـه عنـوان ديـابتي در نظـر گرفته مي‌شدند.

### آناليز آماري

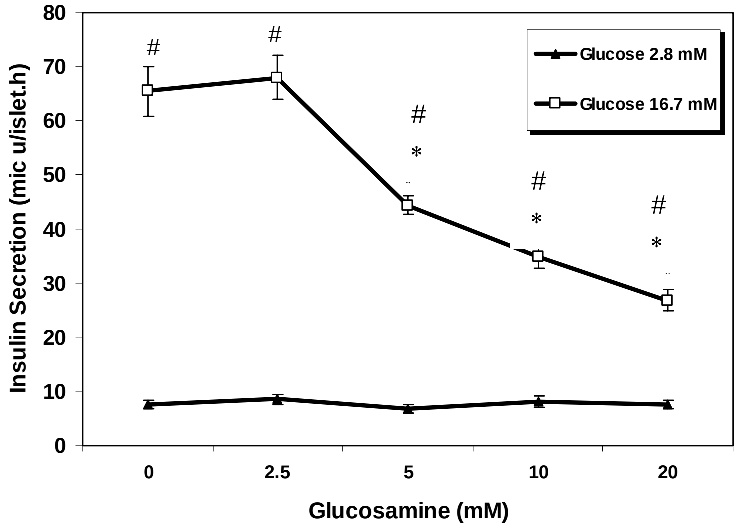
كل آزمـايش‌هـا بـه صـورت دوتـايي انجـام گرديـده و ميانگين اين دو به عنوان يك نقطه درنظـر گرفتـه شـده اسـت. همـة داده‌هـا بـه صـورت ميـانگين ± خطـاي استاندارد (Mean ± SE) بيـان گرديـده اسـت. n تعـداد دفعات تكرار آزمايش است (آزمايش‌هـا ۶ الـي ۷ بـار تكرار شده است). داده ها بـه كمـك نـرم افـزار SPSS آناليز گرديده و P-Value كمتر از ۰/۰۵ به عنوان سـطح معني‌دار آماري در نظر گرفته شده است.

## يافته‌ها

در ايــن پــژوهش، اثــر گلــوكزآمين (مهــار كننــدة گلوكوكيناز) با غلظت هاي ۲/۵ تا ۲۰ ميلـي مـولار بـر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس و نيز بر آنزيم‌هاي

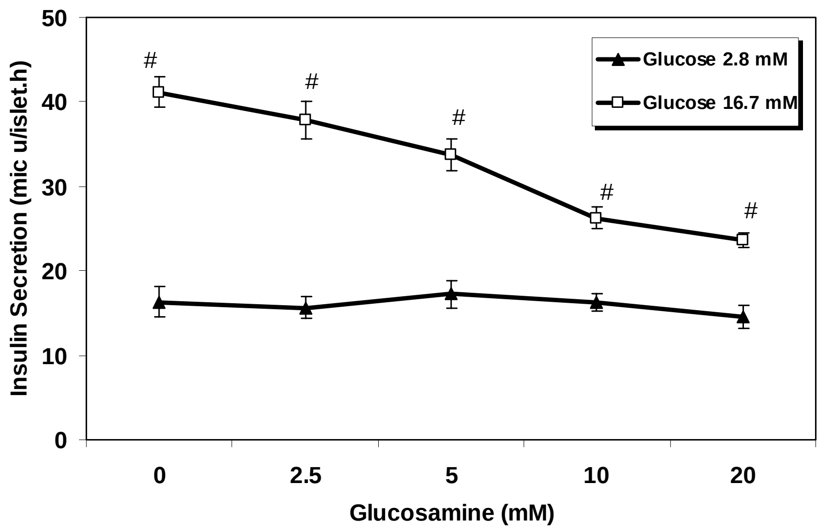



نمودار ۱- اثر غلظت‌هاي پايه و تحريكي گلوكز بر ترشح انسولين از جزاير جدا شدة موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي
ترشح انسولين با شيوه انكوباسيون استاتيك طبق روشي كه در بخش *روش‌ها* آمده، تعيين گرديده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. ۷ = n براي موش‌هاي سالم، ٦ = n براي موش‌هاي ديابتي. * P< ۰/۰۱ در قياس با موش هاي سالم. ** P< ۰/۰۱ در قياس با غلظت ۲/۸ ميلي مولار گلوكز. # P< ۰/۰۱ در قياس با غلظت ۲/۸ ميلي مولار گلوكز.




نمودار ٢- اثر غلظت‌هاي مختلف گلوكز آمين بر ترشح انسولين پايه و تحريك شده با گلوكز (**GSIS**) از جزاير لانگرهانس موش‌هاي صحرايي سالم

ترشح انسولين طبق روش ذكر شده در بخش *روش‌ها* با شيوة انكوباسيون استاتيك بررسي شده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ٧ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. # P< ٠/٠١ نسبت به غلظت ٢/٨ ميلي مولار گلوكز. * نشانگر تفاوت معني دار آماري (P< ٠/٠٥) نسبت به گروه كنترل.



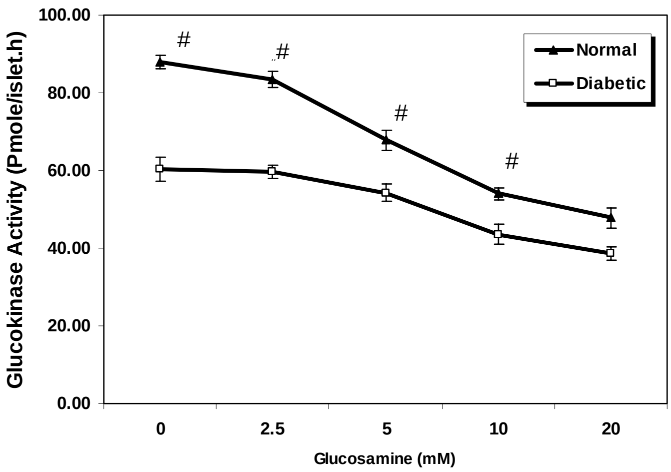

نمودار ٣- اثر غلظت‌هاي مختلف گلوكزآمين بر ترشح انسولين پايه و تحريك شده با گلوكز (**GSIS**) از جزاير لانگرهانس موش‌هاي صحرايي ديابتي.

بررسي ترشح انسولين با تكنيك انكوباسيون استاتيك بر طبق روش ذكر شده در بخش *روش‌ها* انجام گرديده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ٧ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. # P< ٠/٠١ نسبت به غلظت ٢/٨ ميلي مولار گلوكز.

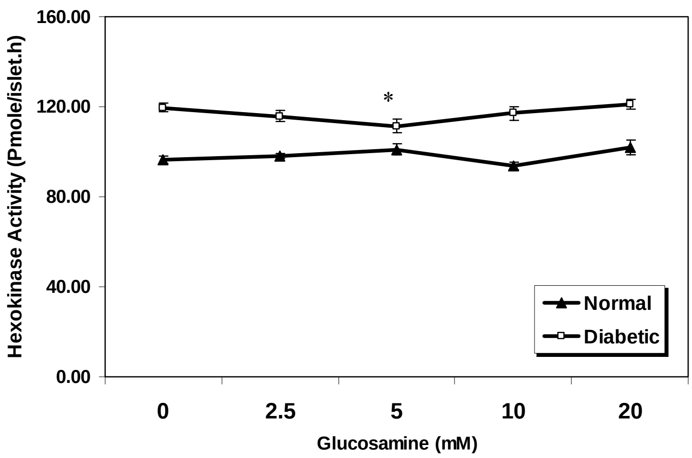
فسفريله‌كنندة گلوكز، گلوكوكيناز و هگزوكيناز پانكراس موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي بررسي گرديد كه نتايجي به شرح زير به دست آمد: نمودار ١، نتايج حاصل از اثر غلظت هاي ٢/٨ و ١٦/٧ ميلي مولار گلوكز بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس را نشان مي دهد. مقدار ترشح انسولين در غلظت پايه گلوكز

(۲/۸ ميلي مولار) در موش‌هاي ديابتي بيشتر از موش‌هاي سالم است (P< ۰/۰۱). مقدار ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز (GSIS) در موش‌هاي صحرايي ديابتي كمتر از موشهاي سالم است (P< ۰/۰۱). از سوي ديگر ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز هم در موش‌هاي سالم و هم در موشهاي ديابتي بسيار بيشتر از ترشح انسولين پايه مي‌باشد (P< ۰/۰۱).

در نمودارهاي ۲و ۳، اثر گلوكز آمين بر ترشح انسولين به تصوير كشيده شده است. همانطور كه از نمودارهاي فوق بر مي‌آيد، گلوكزآمين بر ترشح انسولين پايه اثري ندارد اما ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز ۱٦/۷ ميلي مولار را هم در موش‌هاي صحرايي سالم و هم ديابتي به صورت وابسته به دوز كاهش مي‌دهد (۰/۰۵ >P). يك همبستگي معكوس و معني دار در اين موارد وجود دارد (۰/۸۲۸ - = r براي موش‌هاي سالم و ۰/۸۱۵ - = r براي موش‌هاي ديابتي).




**نمودار۴- اثر غلظت‌هاي مختلف گلوكزآمين بر فعاليت گلوكوكيناز پانكراس در موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي**
فعاليت گلوكوكيناز طبق روشي كه در بخش روش‌ها آمده، اندازه گيري شده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ۷ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. # اختلاف معني دار آماري (P< ۰/۰۵) نسبت به موشهاي ديابتي.




**نمودار ۵- اثر غلظت‌هاي مختلف گلوكز آمين بر فعاليت هگزوكيناز پانكراس در موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي**
فعاليت هگزوكيناز طبق روشي كه در بخش *روش‌ها* آمده، اندازه گيري شده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ۷ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. * فقط در اين غلظت از گلوكزآمين به لحاظ آماري تفاوتي بين هگزوكيناز موش‌هاي سالم و ديابتي وجود ندارد (P> ۰/۰۵) .

نمـودار ٤، نمايـانگر اثـر گلـوكزآمين بـر گلوكوكينـاز پانكراس است. چنان‌كه ملاحظه مي‌شود گلوكزآمين چه در موش‌هاي سالم و چه در موش‌هاي ديـابتي فعاليـت گلوكوكيناز را نسبت به گروه كنترل به صـورت وابـسته به دوز كـاهش مـي دهـد. يـك همبـستگي معنـي‌دار و معكوس در اين مورد وجـود دارد (۰/۸۸۵ - = r بـراي موشهاي سالم و ۰/۸۰ - = r براي موش‌هاي ديابتي). از سوي ديگر فعاليت گلوكوكيناز پانكراس در مـوش‌هـاي ديابتي كمتر از موش‌هاي سالم است (P< ۰/۰۱).

در نمودار ۵، اثر گلـوكزآمين بـر هگزوكينـاز پـانكراس منعكس شده است. پيداست كه گلـوكزآمين هـيچ‌گونـه اثري بر هگزوكيناز چه در موش‌هاي سالم و چه ديـابتي نداشـته اسـت. امـا فعاليـت هگزوكينـاز در مـوش‌هـاي ديـابتي، (بجـز در غلظـت ۵ ميلـي مـولار گلـوكزآمين) داراي اختلاف معني دار آماري با موش‌هاي سالم بـوده است (P< ۰/۰۱).

## بحث

اگرچه تنظيم ترشح انسولين پيچيده بـوده و هنـوز هـم اين فرآينـد بطـور كامـل شـناخته نـشده اسـت [۱۷] و هرچند عليرغم چند دهـه تحقيـق فـراوان، هنـوز هـيچ فرضيه واحـدي كـه GSIS را كـاملا توضـيح بدهـد در دسترس نيـست [۲۲]؛ امـا گفتـه شـده كـه گلوكوكينـاز پانكراس، آنزيم كاتاليزگر مرحلة محدود كننـدة سـرعت گليكوليز، در اين ميان نقش حياتي را ايفا مي‌كند [۱، ۵، ۶، ۲۳]. در اين پژوهش، با استفاده از يـك مهـار كننـدة آنزيم گلوكوكيناز، به بررسـي نقـش گلوكوكينـاز و نيـز هگزوكيناز در ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس جـدا شدة موش صحرايي پرداخته شد. يكـي از اهـداف نيـز اين بوده كه نحوة اين ارتبـاط در مـوش‌هـاي صـحرايي nSTZ (مبتلا به ديابت نوع II) نيز بررسي گردد. در اين نوع ديابت تجربي، سلول‌هاي پـانكراس در حـين رشـد موش بازسازي مـي شـوند [۲۱] و بنـابراين يـك مـدل خوب براي بررسي عملكرد پانكراس مي‌باشند.

نتايج حاصل از انكوباسيون جزايـر بـا دو غلظـت مهـم گلوكز (نمودار۱) نشان داد كه در موش‌هـاي صـحرايي سالم، ترشح انسولين در غلظت ۱٦/۷ ميلي مولار گلوكز چندين برابر بيشتر از غلظـت ۲/۸ ميلـي مـولار گلـوكز است (P< ۰/۰۱). البته اين امر، گرچه نـشانگر سـلامت جزاير لانگرهـانس و درسـتي سـامانه راه انـدازي شـده جهت جداسـازي جزايـر و پريفيـوژن آنهـا اسـت، امـا چندان هم دور از انتظار نبود، چرا كه همـة گـزارش‌هـا تأييد كنندة آن است. ليكن ترشح انـسولين پايـه (يعنـي ترشح انسولين در غلظت ۲/۸ ميلـي مـولار گلـوكز) در موش‌هاي صحرايي ديابتي شـده، بيـشتر از مـوش‌هـاي سالم بـوده اسـت. ايـن نتيجـه بـا نتـايج پيـستون [۲٤]، يوشـيكاوا [١٤] و چـن[۲۵]، همخـواني داشـته، امـا بـا برخي گزارش‌ها از جملـه مقالـة پورتـا [۲٦] در تـضاد است. در گزارش مذكور حتي ترشـح انـسولين پايـه در موش‌هاي ديابتي نصف موش‌هاي سالم بوده است.

علت افزايش ترشح انسولين پايه در موش‌هـاي ديـابتي در قياس با موش‌هاي سالم، هنوز دقيقاً معلـوم نگـشته است. حتي اين حالت در موش‌هاي ٦۰٪ پـانكراتكتومي شده نيز اتفاق افتاده كه آن محققان نيز گفته اند دلـيلش نامشخص است [۲۷]. اما ترشح انسولين تحريـك شـده با گلوكز ۱٦/۷ ميلي مولار (GSIS) در موش‌هاي ديابتي در مقايسه با موش‌هاي سالم كمتـر اسـت (نمـودار ۱). ايـن نتيجـه بـا بـسياري از گـزارش‌هـاي انتـشار يافتـه همخـواني دارد؛ كـه احتمـالاً بـه دليـل آن اسـت كـه موش‌هاي اين نوع مدل حيواني از ديابت نوع II، دچـار سوء عملكرد سلول‌هاي بتا و به تبع آن نقص در GSIS هستند [۲۱، ۲۵، ۲۸، ۲۹] . در اغلب مدل‌هـاي حيـواني ديابت نوع II نيز وضعيت مشابهي مشاهده شده اسـت. گلوكزآمين بر ترشح انـسولين در غلظـت گلـوكز پايـه، اثري نداشته، اما موجب كاهش وابسته بـه دوز آن، هـم در موش‌هاي سالم و هم در موش‌هاي ديابتي در غلظت گلوكز ۱٦/۷ ميلي مولار شده اسـت (نمودارهـاي۲ و۳). اين مسأله يكي از موارد بحث انگيز در موضـوع ترشـح انسولين بـوده اسـت. چـرا كـه گـاه نتـايج دو پـژوهش مختلف حتي از يك محقق نيـز نتـايج متفـاوتي در پـي داشته است. نتايج ما در اين باره با گزارش‌هـاي بالكـان [۱۸] و كنتو [۱۳] مشابهت داشته، امـا متفـاوت و حتـي

متضاد با گزارش‌هاي زوليچ [١٦] و اشکرافت [٣٠] بوده است. از آنجا که تحقيقات اخير مبين اثرات سوء گلوکزآمين بر سلول‌هاي بتا است [١٣، ١٤]، به نظر مي‌آيد که کاهش ترشح انسولين مربوط به اين تأثير باشد. اما، از سوي ديگر، در غلظت ٢/٨ ميلي مولار گلوکز، اثر کاهش دهندگي گلوکزآمين بر ترشح انسولين ديده نمي شود، شايد بتوان گفت که اين بدان دليل است که گلوکزآمين از طريق اثر بر گلوکوکيناز [که در غلظت ١۶/٧ گلوکز ايفاي نقش مي نمايد]، اثر سوء مهاري خود بر سلول‌هاي بتا را اعمال مي‌کند. گلوکزآمين فعاليت آنزيم گلوکوکيناز پانکراس را هم در موش‌هاي سالم و هم در موش‌هاي ديابتي نسبت به کنترل (بدون افزودن هيچگونه واکنش‌گري در محيط آزمايش)، به صورت وابسته به دوز کاهش داد (نمودار ۴). ليانگ و همکاران [٣١] در يك پژوهش پنج نوع متفاوت از موش هاي ديابتي نوع II را مورد مطالعه قرار دادند. در همة موارد، GSIS يا کاهش يافته بوده و يا تأخير داشته است. نکتة جالب توجه تحقيق فوق، اين که در سه نوع اين موش‌هاي ديابتي، فعاليت گلوکوکيناز جزاير بالاتر از موش‌هاي سالم بوده است. پژوهشگران مزبور نتيجه‌گيري کرده‌اند که افزايش گلوکز خون و به تبع آن افزايش گلوکز جزاير، موجب القاي گلوکوکيناز شده است، هرچند در يك نوع از آنها نسبتاً وضعيت نرموگليسميك برقرار بوده است. نتايج ما در اين باره با نتايج اين گروه تحقيقاتي مغايرت دارد. از سوي ديگر مشابه نتايج چن [٣٢] و بالکان [١٨] است. البته هنوز هيچ گزارشي مبني بر افزايش فعاليت گلوکوکيناز تحت تأثير گلوکزآمين وجود ندارد؛ که اين هم بديهي به نظر مي‌رسد. چرا که از گلوکزآمين به عنوان مهار کنندة اختصاصي گلوکوکيناز نام برده مي‌شود. يادآور مي شويم که براساس نتايج پژوهش ما، اثر مهاري گلوکزآمين چه بر ترشح انسولين و چه بر فعاليت گلوکوکيناز به صورت وابسته به دوز[1] بوده است که اين امر در نمودارهاي ٢، ٣، ۴ منعکس گرديده است. از مقايسه نمودارهاي مذکور نکتة ديگري نيز دريافت مي‌شود و آن اين‌که احتمالاً گلوکزآمين از طريق مهار گلوکوکيناز پانکراس، موجب کاهش ترشح انسولين تحريك شده با گلوکز مي شود. سازوکار عمل گلوکزآمين در ايجاد سوء عملکرد سلول‌هاي بتا نيز ممکن است از طريق اثر مهاري اين ترکيب بر روي همين آنزيم کليدي متابوليسم گلوکز در اين سلول‌ها باشد. نکته ديگر کاهش فعاليت گلوکوکيناز در موش‌هاي ديابتي است که کاهش ترشح انسولين تحريك شده با گلوکز (GSIS) در اين موش‌ها را مي توان به همين مساله مربوط دانست. در مورد اثر گلوکزآمين بر هگزوکيناز پانکراس، نتايج ما نشان مي‌دهد که چه در موش‌هاي سالم و چه در موش‌هاي ديابتي اثري مشاهده نمي شود، اما بالکان [١٨] يك افزايش ٤٧ درصدي در هگزوکيناز جزاير تحت تأثير گلوکز آمين گزارش کرده است که با نتايج ما در اين باره مغايرت دارد. البته در گزارش ياشيکاوا [١۴] نيز يك افزايش ٤٠ درصدي در هگزوکيناز جزاير کشت و انکوبه شده با گلوکزآمين ذکر شده است. به نظر نمي‌آيد که افزايش فعاليت هگزوکيناز تحت تأثير گلوکزآمين توجيه منطقي داشته باشد زيرا اين مولکول به عنوان واکنش‌گر هگزوکيناز مطرح نشده است. از سوي ديگر، افزايش فعاليت هگزوکيناز ممکن است ناشي از کاهش گلوکز-٦-فسفات به دليل مهار گلوکوکيناز پانکراس در اثر گلوکزآمين باشد. گلوکز-٦-فسفات که محصول عمل فسفريلاسيون گلوکز است، مهارکننده آلوستريك هگزوکيناز و نه گلوکوکيناز جزاير لانگرهانس است [٣٣]. اما نکته درخور توجه، افزايش فعاليت هگزوکيناز در موش‌هاي ديابتي نسبت به موش‌هاي سالم است. برخي محققان ديگر از جمله کويتيوت [٣٤] و ميلبورن [٣٥] نيز نتايج مشابهي را گزارش کرده‌اند. هرچند نشان داده شده که آنزيم گلوکز-٦-فسفاتاز در موشهاي ديابتي افزايش مي يابد [٣٦، ٣٧] و ممکن است يکي از دلايل افزايش هگزوکيناز در موش‌هاي ديابتي، کاهش گلوکز-٦-فسفات ناشي از افزايش فعاليت گلوکز-٦-فسفاتاز باشد که در نهايت مهار از روي هگزوکيناز برداشته

[1] Dose-dependent

مي‌شود، اما براي يافتن علت اصلي اين افزايش فعاليت آنزيمي، بايد به دنبال توجيهات ديگري نيز بود.
برخي محققان بر اين عقيده اند كه در بيماران ديابتي مبتلا به موتاسيون در گلوكوكيناز (نوعي بيماري ديابت نوع NIDDM=II) كه اختلال شديدي در عملكرد آنزيم فوق ايجاد مي‌شود، سازوكارهاي جبراني باعث افزايش ترشح انسولين مي‌شوند [۳۸]. در اين راستا سازوكارهايي از قبيل Overexpression الل نرمال باقيمانده و نيز كاهش اثر مهاري GKRP پيشنهاد شده است [۳۹]. از سوي ديگر، گفته شده است كه هگزوكيناز هاي با Km پايين، تعيين كننده مقدار انسولين مترشحه در غلظت هاي پايه گلوكز مي‌باشند [٤٠]. شايد يكي ديگر از سازوكارهاي جبراني، همين افزايش هگزوكيناز پانكراس در موش‌هاي ديابتي باشد. و چنان‌چه اين يافته با نتايج مربوط به ترشح انسولين در موش‌هاي ديابتي (نمودار ۳) مقايسه شود شايد بتوان گفت كه همين افزايش هگزوكيناز ممكن است علت افزايش انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي در قياس با موش‌هاي سالم باشد [۴۱]. در اين راستا پيستون و همكاران [٢٤] نيز قبلاً اظهار كرده‌اند كه حسگر گلوكز، چند بخشي است و احتمالاً علاوه بر گلوكوكيناز، هگزوكينازها نيز دخيل‌اند. در مجموع بايد گفت كه شناخت نحوة اثر گلوكوكيناز و يا هگزوكيناز، مستلزم انجام پژوهش‌هاي ژرفتري است. در نتيجه، براساس يافته هاي اين تحقيق مي‌توان برآورد نمود كه كاهش فعاليت گلوكوكيناز جزاير لانگرهانس، احياناً مي‌تواند در كاهش GSIS دخالت داشته باشد. و در نهايت اين‌كه افزايش ترشح انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي شايد ناشي از افزايش فعاليت هگزوكيناز پانكراس باشد.

## سپاسگزاري

اين تحقيق بخشي از يك پروژة تحقيقاتي مصوب معاونت پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي تهران بوده است. از آقاي مير سعيد يكاني نژاد جهت انجام آناليز آماري نتايج اين مطالعه و آقاي محمد سوختانلو براي ترسيم نمودارها سپاسگزاريم. از اساتيد، كاركنان و دانشجويان گروه بيوشيمي پزشكي نيز به خاطر همكاري هاي مؤثرشان در همة مراحل پژوهش تشكر مي‌كنيم.

## مآخذ

1. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39: 647 – 652.
2. 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.
3. Vandercammen A, Van Schaftingen E. Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. *Biochem J* 1993; 294: 551 – 556.
4. Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA. Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 37125-37130.
5. Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS. Glucokinase Mutations, insulin Secretion, and diabetes mellitus. *Ann Rev Physiol* 1996; 58: 171 – 186.
6. Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatie β-cell glucokinase. *Diabetes* 1998; 47: 307 – 315.
7. Gloyn AL et al. Glucokinase (GCK) mutations in hyper and hypoglycemia: maturity – onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat* 2003; 22: 353 – 362.
8. Hattersley AT et al. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 1992; 339: 1307 – 1310.
9. 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.
10. Brocklehurst KJ, Payne VA, Davies RA, Carroll D, Vertigan HL, Wightman HJ, et al. Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes* 2004; 53: 535 – 541.
11. Lenzen S, Tiedge M, Panten U. Glucokinase in pancreatic B-Cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinologica* 1987; 115: 21 – 29.
12. 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.
13. Kaneto H,Xu G, Song K-H, Suzuma K, Bonner – Weir S, Sharma A, Weir GC. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of

pancreatic β-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; 276: 31099 – 31104.
14. 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.
15. Postic C, Shiota M, Magnuson MA. Cell – specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56: 195 – 217.
16. Zawalich WS, Dye ES, Matschinsky FM. Metabolism and insulin – releasing capabilities of glucosamine and N-acetylglucosamine in isolated rat islets. *Biochem J* 1979; 180: 145 – 153.
17. Zawalich WS, Zawalich KC. Glucosamine – induced desensitization of β-cell responses: possible involvement of impaired information flow in the phosphoinositide cycle. *Endocrinology* 1992; 130: 3135 – 3142.
18. Balkan B, Dunning BE. Glucosamine inhibits glucokinase in in vitro and produces a glucose – specific impairment of in vivo insulin seretion in rats. *Diabetes* 1994; 43: 1173 – 1179.
19. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35 – 39.
20. Liang Y, Najafi H, Matschinsky FM. Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets from rat pancreas. *J Biol Chem* 1990; 265: 16863-16866.
21. 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.
22. Poitout V, Robertson PR. An Integrated view of β – Cell dysfunction in type-II diabetes. *Annu Rev Med* 1996; 47: 69-83.
23. Matschinsky FM. Banting Lecture 1995: A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996; 45: 223 – 241.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Liu YI, Nevin PW, Leahy JL. β-cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that preserves normoinsulinemia and normoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E68 – E73.
28. 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.
29. 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.
30. Ashcroft SJH, Crossley JR, Crossley PC. The effect of N-acetyl glucosamine on the biosynthesis and secretion of insulin in the rat. *Biochem J* 1976; 154: 701 – 707.
31. Liang Y, Bonner – Weir S, Wu Y-J, Berdanier CD, Berner DK, Efrat S, Matschinsky FM. In situ glucose uptake and glucokinase activity of pancreatic islets in diabetic and obese rodents. *J Clin Invest* 1994; 93: 2473 – 2481.
32. Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin – resistant spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1994; 94: 399 – 404.
33. Giroix M-H, Sener A, Pipeleers DG, Malaisse WJ. Hexose metabolism in pancreatic islets: inhibition of hexokinase. *Biochem J* 1984; 223: 447 – 453.
34. 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.
35. Milburn JL, Hirose H. Pancreatic β-cells in obesity. *J Biol chem.* 1995; 270: 1295 – 1299.
36. Khan A, Chandramouli V, Ostenson CG, Low H, Landau BR, Efendic S. Glucose cycling in islets from healthy and diabetic rats. *Diabetes* 1990; 39: 456 – 459.
37. Khan A, Efendic S. Evidence that increased glucose cycling in islets of diabetic ob/ob mice is a primary feature of the disease. *Am J Physiol* 1995; 269: E 623 – 626.
38. Sreenan SK, Cockburn BN. Abaptation to hyperglycemia enhances insulin secretion in glucokinase mutant mice. *Diabetes* 1998; 47: 1881 – 1888.
39. Sturis J, Kurland IJ. Compensation in pancreatic beta – cell function in subjects with glucokinase mutations. *Diabetes* 1994; 43: 718 – 723.
40. Becker TC, Noel RJ. Differential effects of over expressed glucokinase and hexokinase I in isolated islets. *J Biol Chem* 1996; 271: 390 – 394.
41. Hosokawa H, Hosokawa YA, Leahy JL. Upregulated hexokinase activity in isolated islets from diabetic 90 % pancreatectomized rats. *Diabetes* 1995; 44: 1328 – 1333.