Archive of SID

مقایسه بین اثرات انسولینوتروپیک میلرینون و آمرینون، مهارکننده های انتخابی PDE_3، در شرایط برون تنی و درون تنی

*دکترسید محمد رضا پریزاده، **دکتر رضا شفیعی نیک، ***دکتر مهین زهرایی
*گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
***گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

در تحقیق حاضر اثر دو داروی میلرینون و آمرینون، مهار کننده های انتخابی PDE_3، بر ترشح انسولین در شرایط درون تنی(in vitro) با استفاده از روشهای استاتیک (انکوبیشن جزایر لانگرهانس رت و نیز سلولهای مترشحه انسولین کشت داده شده CRI-D2) و دینامیک (پرفزیون جزایر) و نیز در شرایطدرون تنی (in vivo) مورد بررسی قرار گرفت.

در انکوبیشن جزایر، گلوکز با غلظت mM ۱۰ موجب تحریک ترشح انسولین گردید. میلرینون با غلظت M^{-4} ۱۰به طور معنی دار ترشح انسولین القاء شده به وسیله گلوکز را افزایش داد ($p<0/05$). در حالیکه اثر آمرینون، مهار کننده انتخابی PDE_3 دیگر، معنی دار نبود. افزودن غلظت های مختلف میلرینون به محیط حاوی mM ۱۰ گلوکز، موجب افزایش وابسته به دوز ترشح انسولین شد (ED_{50}= ۹μM). در منحنی دوز-پاسخ آمرینون، غلظت های متفاوت این دارو ایجاد اثر معنی دار نکردند.

مقدار ترشح انسولین سلولهای CRI-D2 در حضور گلوکز mM ۱۰ بسیار پائین بود و گلوکز با غلظت mM ۱۰ افزایش معنی دار در ترشح انسولین ایجاد نکرد. ولی افزودن میلرینون با غلظت M^{-4} ۱۰به mM ۱۰گلوکز مقدار ترشح انسولین را افزایش داد.

در شرایط درون تنی میلرینون موجب افزایش وابسته به دوز غلظت انسولین پلاسما شد ($p<0/05$). در حالیکه آمرینون درهمان دوزهای به کار برده شده نه فقط ترشح انسولین را افزایش نداد بلکه آن را ظاهراً کاهش داده است. در مجموع تغییرات ایجاد شده توسط آمرینون معنی دار نبود ($p<0/05$).

با توجه به تفاوت IC_{50} گزارش شده برای میلرینون و آمرینون در مهار PDE_3، در این تحقیق اثر میلرینون می تواند تأئید کننده گزارشات قبلی در مورد اثر انسولینوتروپیک داروهای مهارکننده PDE_3 باشد. متفاوت بودن اثر آمرینون در مقایسه با میلرینون می تواند ناشی از متغییر بودن اثر داروهای مهار کننده PDE در بافتهای مختلف (tissue specificity) یا وجود مکانیسمهای دیگر در تقویت اثر گلوکز توسط داروهای مهارکننده انتخابی PDE_3 باشد.

کلمات کلیدی: آمرینون، انسولینوتروپیک، میلرینون، PDE_3

مقدمه

در سلولهای مترشحه انسولین cAMP یک تقویت‌کننده مهم اثر گلوکز در القاء ترشح انسولین محسوب می‌شود (۱۷). افزایش ترشح هورمونهای (gastrin inhibitory peptide) GIP و GLP-1 (glucagon-like peptide-1) همزمان با افزایش جذب گلوکز از دستگاه گوارش (۱۷) و نیز بی‌کفایتی سلولهای بتای خالص شده در پاسخ به گلوکز وریدی در مقایسه با عملکرد این سلولها در ساختمان جزایر لانگرهانس (وجود ارتباط بین سلولهای بتا و سلولهای آلفای مولد گلوکاگون) منجر به اظهار این نظریه شده است که وجود غلظت‌های بازال cAMP در سلولهای مترشحه انسولین لازمه ترشح فیزیولوژیک این سلولهاست. امروزه تئوری کاهش فعالیت سیستم مبدل سیگنال وابسته به cAMP در سلولهای

www.SID.ir

Archive of SID

مترشحه انسولین به عنوان مکانیسم اصلی در فرایند غیرحساس شدن این سلولها به گلوکز در بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ (NIDDM) مطرح شده است. (۴، ۶، ۱۱).

سیکلیك نوکلئوتید فسفو دی استرازها (PDEs) مجموعه چندین گروه متفاوت آنزیمی هستند که به طور اختصاصی ئیدرولیز cAMP و cGMP را کاتالیز می‌نمایند (۱). این ایزوآنزیم‌ها بر اساس ساختمان و توالی DNA در حال حاضر به ده دسته کاملاً متفاوت تقسیم شده اند و با نام‌های PDE_1، PDE_2 و PDE_{10} مشخص می‌شوند. این آیزوآنزیمها دارای تفاوتهای مهم کاتالیتکی نیز می باشند. به طوریکه PDE_1 با کلسیم-کالمودولین و PDE_2 با cGMPتحریك می شوند در حالیکه PDE_3 با cGMP مهار می گردد. PDE_4 و PDE_5 دارای میل ترکیبی بالا به ترتیب به cAMP و cGMP می باشند (۱). انواع PDE_8 ، PDE_9 و PDE_{10} اخیرا" کشف و اختصاصات آنها بیان شده است (۱۶). تفاوت انتشار این ایزوآنزیم‌ها در بافت‌های گوناگون و تفاوت ساختمان شیمیایی داروهای مهارکننده انتخابی آنها موجب مطرح شدن امکان کاربرد بالینی این داروها شده است. اطلاعات موجود از ایزوآنزیم‌های PDE در سلولهای مترشحه انسولین مبین احتمال وجود PDE_1، PDE_3 و PDE_5 در این سلولها می باشد.

مطالعات قبلی نشان می دهد که با استفاده از داروهای مهارکننده انتخابی PDE_3 می توان ترشح انسولین را افزایش داد (۲، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵) و اثر تحریکی تجویز خوراکی میلرینون بر غلظت انسولین پلاسمایی موش نشان داده شده است (۱۰).

در این تحقیق اثر میلرینون و آمرینون، دو داروی مهارکننده انتخابی PDE_3 ، بر روی ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده رت و سلولهای مترشحه انسولین -CRI D2 و نیز اثر سینرژیسم تجویز خوراکی گلوکز و این داروها بر غلظت گلوکز و انسولین پلاسما موش مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

الف- روش کار در مطالعات برون تنی

تهیه جزایر (Preparation of islets)

موش‌های صحرایی نر، از نوع Sprague-Dawley، با اوزان ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم تحت رژیم غذایی نرمال، تا زمان انجام آزمایش، نگهداری شده اند. در هر آزمایش، دو موش صحرایی پس از تزریق $80 mg.kg^{-1}$، تیوپنتال به داخل حفره شکمی، بیهوش و پانکراس با استفاده از محلول کربس-بیکربنات (حاوی $MgSO_4$ ۰/۹ mM، KH_2PO_4 ۱/۲ mM، $CaCl_2$ ۲/۵mM، $NaHCO_3$ ۲۵ mM، NaCl ۹۴mM، KCl ۴/۷ mM، Glucose ۵/۶ mM)، این محلول قبل از آزمایش توسط مخلوط گازی O_2 ۹۵٪، CO_2 ۵٪ اشباع و pH آن در حد ۷/۳۵ تنظیم گردیده است)، متسع و جدا گردید و سپس جزایر لانگرهانس با استفاده از روش تعدیل شده Lacey & Kostianovsky حاصل گردیدند (۱۵). به این ترتیب که پانکراسهای جدا شده به قطعات ۲mm-۱ خرد، توسط کلاژناز در درجه حرارت $37^{\circ}C$ هضم گردیدند. جزایر لانگرهانس حاصله پس از چند بار شستشو توسط کربس، دست‌چین و به محلول انکوبیشن (محلول کربس حاوی گلوکز ۳mM، فومارات، پیروات و گلوتامات هر یك ۵mM و آلبومین سرم گاوی $3 mg\ ml^{-1}$) منتقل و در طول آزمایش در حرارت $4^{\circ}C$ نگهداری شدند.

اندازه‌گیری ترشح انسولین به روش استاتیک

جزایر لانگرهانس جدا شده در دسته‌جات ۵تایی درون ویالهای شیشه‌ای ته‌گرد سیلیکونایز شده قرار داده شد. یك میلی‌لیتر محلول انکوبیشن حاوی ۳mM گلوکز به هر ویال اضافه گردید. ویالها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $37^{0}C$ و جریان مداوم مخلوط گازی O_2 ۹۵٪ CO_2 ۵٪ انکوبه شدند.. سپس محلول رویی هر ویال را به طور کامل برداشته، ۱ml محلول انکوبیشن حاوی ۳mM یا ۱۰mM گلوکز همراه یا بدون دارو به آن اضافه گردید. ویالها مجدداً در همان شرایط

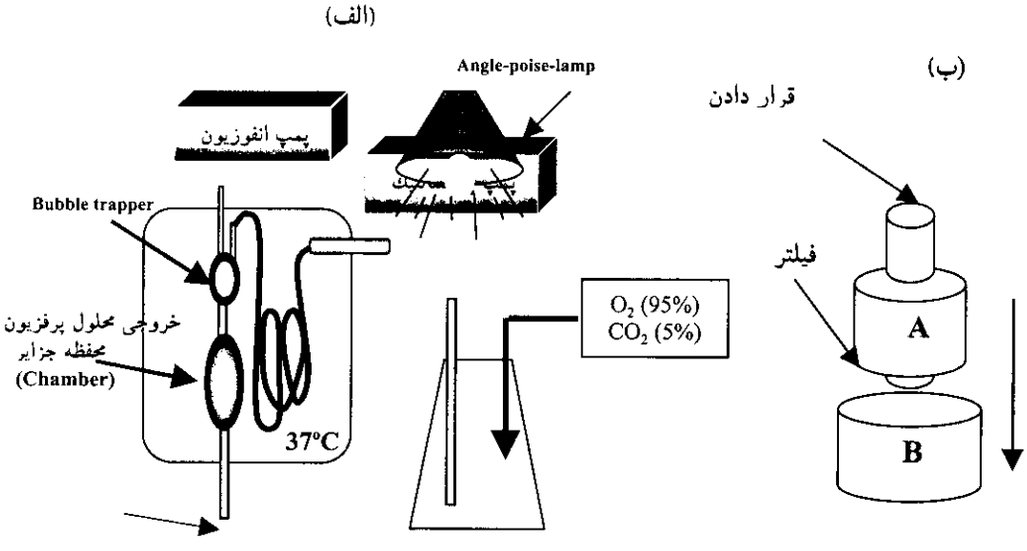
www.SID.ir

Archive of SID

قبلی به مدت یکساعت انکوبه گردیدند. در پایان انکوبیشن، ۵۰µl از محلول انکوبیت برداشته و همراه با بافر فسفات (شامل تیومرسال، BSA، pH=۷/۴) منجمد گردیدند. مقدار انسولین هر نمونه به روش RIA تعیین گردید.. نتایج به صورت µU انسولین ترشح شده توسط هر جزیره در طی یك ساعت گزارش شده است.

اندازه‌گیری ترشح انسولین به روش دینامیک (پرفزیون جزایر)

در این بخش از آزمایشات، ترشح انسولین در یك سیستم پرفزیون دو کاناله بررسی گردید (شکل ۱). ۱۰۰ عدد جزیره روی فیلتر هر چمبر قرار داده شد و سپس چمبر توسط محلول کربس کاملاً پر گردید به نحوی که هیچگونه هوایی در محفظه باقی نماند. سپس چمبرها به سیستم پرفزیون متصل گردیدند. پمپ پریستالتیك، محلول انکوبیشن حاوی ۳ mM گلوکز را با سرعت ثابت ۱ml/min عبور می داد. روشن کردن پمپ انفوزیون موجب افزوده شدن محلول گلوکز هیپرتونیك (تبدیل محلول پرفزیون از ۳ mM به ۱۰ mM گلوکز) همراه یا بدون دارو گردید. دمای محلول پرفزیون قبل از گذشتن از چمبر با استفاده ازگرمای لامپ ۱۰۰ وات (Angle-poise-lamp) و عبور از حمام آب در حد ۳۷°C تنظیم شده است. در خلال آزمایش در فواصل زمانی مناسب از محلول خروجی سیستم نمونه برداری و به روش فوق الذکر منجمد گردید انسولین موجود در نمونه ها به روش RIA تعیین و برحسب مقدار µU انسولین ترشح شده از ۱۰۰ جزیره در مدت یك دقیقه گزارش گردیده است.



شکل ۱:

الف) سیستم پرفزیون جزایر لانگرهانس مورد استفاده دو کاناله بوده که در شکل فوق برای سادگی به صورت یک کاناله نمایش داده شده است. بافر کربس حاوی گلوکز ۳ میلی مولار توسط ۹۵٪ O_2 ۵٪ CO_2اشباع و pH = ۷/٤ تنظیم شد و در مدت پرفزیون تحت جریان ملایم مخلوط گازی مذکور قرار داشت. پمپ پرستالتیک محلول کربس را با سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه از محفظه جزایر عبور داد. روشن کردن پمپ انفوزیون موجب افزودن محلول گلوکز هیپرتونیک همراه یا بدون دارو به مسیر جریان گردید که در نتیجه آن محلول کربس به محلول حاوی گلوکز ۱۰ میلی مولار همراه یا بدون M 10^{-4}دارو تبدیل شد. Bubble trapper موجب حذف حبابهای ایجاد شده گردیده است.

ب) محفظه جزایر (Chamber) مطابق شکل ب از بدنه دو سرنگ قطع شده با گنجایش حجمی ۰/۵میلی لیتر ساخته شد. دهانه بخش A توسط نیلتر نایلونی دارای منافذ با قطر حدود ۱۰ میکرومتر پوشانده و با داخل شدن در بخش Bتوسط چسب PVC فیکس گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

کشت سلول

در هر آزمایش سلولهای مترشحه انسولین CRI-D2 در شرایط استریل در محیط DMEM به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ °C در CO_2 انکوباتور کشت شدند. در این مدت سلولهای مذکور که وابسته به بستر هستند تکثیر یافته توانسته اند سطح فلاسك ۲۵ml را به طور کامل بپوشانند. در این مرحله محیط کشت هر فلاکس تخلیه و سلولها با محلول مورد آزمایش شستشو داده شدند. سپس ۵ میلی لیتر محلول بافر کربس حاوی ۳mM یا ۱۰mM گلوکز همراه یا بدون دارو به هر فلاکس اضافه گردید و سپس به مدت یك ساعت در CO_2 انکوباتور قرار داده شد. در پایان از محلول رویی نمونه برداری و به همراه بافر فسفات منجمد شد و مقدار انسولین موجود به روش RIA مشخص گردید

ب-روش کار در مطالعات درون تنی

این مطالعات بر روی موش‌های سفید کوچك (balb-C)، با وزن متوسط ۲۵g، انجام گردید، موشها تحت رژیم غذایی نرمال نگهداری و ۱۸ ساعت قبل از آزمایش ناشتا شدند..

داروهای مورد استفاده در DMSO حل و به وسیله نرمال سالین تا غلظت مشخص رقیق شدند به گونه ای که غلظت DMSO در محلول نهایی ۱٪ گردید.

در هر آزمایش گلوکز با دوز ۲g/Kg از راه دهان به وسیله Animal feeding به حیوان خورانده شد. پس از نیم ساعت دارو با دوز مورد نظر به صورت I.P. تزریق گردید. ۲۵ دقیقه پس از تزریق دارو، هر موش، داروی بیهوش کننده رامپون (xylazine) را نیز به صورت I.P. دریافت نمود. سه دقیقه بعد (۲۸ دقیقه پس از تزریق دارو) سریعاً قفسه سینه حیوان باز گردید و با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری از قلب حیوان ۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر خونگیری شد. خون گرفته شده، پس از مدتی تأمل و جدا کردن لخته سطحی آن، سانتریفوژ گردید. سرم حاصله به آرامی با پی‌پت پاستور مکیده به یك لوله اپی‌ندورف منتقل شد و سریعاً منجمد گردید.

در پایان میزان انسولین هر نمونه به روش RIA و گلوکز آن با دستگاه RA1000 اندازه گیری شد.

مواد شیمیایی وداروها

داروهای مورد استفاده از طریق واسطه های داخل کشور از آدرسهای ذیل تهیه گردیده است:

Collagenase type IV.C-5138,(Sigma chemical co. poole;dorsel),Bovine Serum Albumin, (BSA RIA-grade A-7888, Sigma), Dimethyl sulfoxide,D-2950(DMSO, Sigma), milrinone (1,6 Dihydro -2-methyl-6 oxo- 3, 4-bipyridine-5-carbonitril), M-4659, (Sigma) Amrinone (5-Amino-[3,4 bipyridin]-6[1H]-0ne) (A-4056, Sigma chemical co. poole;dorsel) ,Trypsin (Sigma), Thiomersal (Ethylmercurithiosalicylate) (Sigma), SIGMAcote (SL-2, Sigma) ,IBMX (3- isobutyl-1-methylxanthine) M-4659 (Fluka) ,Thiopental (Biochemic GmbH), Pyruvic acid (MERCK) ,L-glutamic acid (MERCK) ,Fumaric acid (SERVA),
(DMEM, GIBCO) ,CRI-D2 -cell line (ECACC), Fetal Calf Serum, (FCS, GIBCO), Insulin Kit DLS - 1600 (شرکت کاوشیار، تهران).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین ± متوسط خطای استاندارد (SEM) گزارش گردیده است. مقادیر تعداد مشاهدات (n value) نشان دهنده دفعات تکرار آزمایشات می باشد. برای مشخص نمودن معنی دار بودن تفاوت اعداد، از روش آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شده است.

شایان ذکر است در این تحقیق مقادیری از نظر آماری معنی دار (significant) در نظر گرفته شده اند که حداقل درجه اطمینان ۹۵٪ را داشته اند. به عبارت دیگر میزان عدم اطمینان کمتر از ۵٪ بوده است ($p< ۰/۰۵$).

نتایج

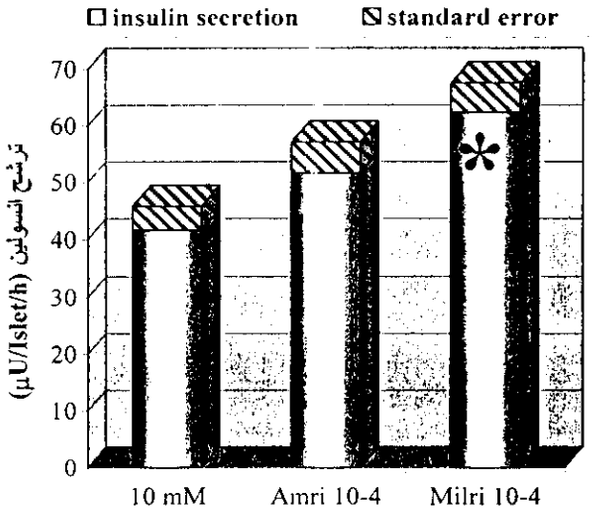
الف) ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده

در انکوبیشن جزایر لانگرهانس در حضور گلوکز ۳ میلی مولار، میلرینون تغییری در ترشح انسولین ایجاد نکرد (جدول ۱). در این شرایط آمرینون در غلظتهای پائین فاقد اثر بود در

www.SID.ir

Archive of SID

حالیکه در غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار ترشح انسولین را به صورت معنی دار افزایش داد ($p< ۰/۰۱$). افزایش گلوکز از ۳ میلی مولار به ۱۰میلی مولار، ترشح انسولین را بیش از سه برابر افزایش داد . میلرینون با غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار موجب تقویت ترشح انسولین القاء شده توسط گلوکز ۱۰میلی مولار شد ($p< ۰/۰۱$). ولی آمرینون $۱۰^{-۴}$ مولار افزایش معنی دار در ترشح انسولین ایجاد نکرد (نمودار ۱). اضافه کردن غلظتهای $۱۰^{-۶}$ ، $۱۰^{-۵}$ ، $۱۰^{-۴}$ مولار میلرینون به محیط حاوی ۱۰ میلی مولار گلوکز موجب افزایش وابسته به دوز ترشح انسولین شد ($EC_{50} = ۹\mu M$). در حالیکه با افزودن دوزهای فوق الذکر از آمرینون حداکثر افزایش ترشح انسولین در غلظت $۱۰^{-۶}$ مولار ایجاد شد و در غلظت های بالاتر منحنی پاسخ به دوز سیر نزولی دارد ($EC_{50} < ۹\mu M$، *نمودار ۲*).



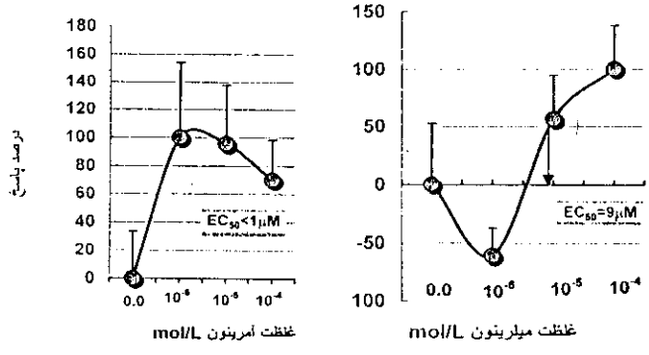
نمودار ۱: مقایسه اثر غلظتهای $۱۰^{-۴}$ مولار میلرینون و آمرینون بر ترشح انسولین از جزایر جدا شده
جزایر در شرایط مشابه نمودار ۲ در حضور گلوکز ۱۰ میلی مولار همراه با غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار میلرینون یا آمرینون و یا بدون دارو انکوبیت شدند.

جدول ۱:اثر آمرینون و میلرینون بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده در حضور ۳ میلی مولار گلوکز

غلظت آمرینون	غلظت گلوکز	تعداد نمونه	*µU/islet/h*
–	۳mM	۶	۶/۰۹±۰/۷۱
$۱۰^{-۶}$M	۳mM	۷	۴/۴۱۷±۰/۶۲
$۱۰^{-۵}$M	۳mM	۶	۵/۶۶±۰/۱۵
$۱۰^{-۴}$M	۳mM	۳	۱۰/۰۸±۰/۱۵

غلظت میلرینون	غلظت گلوکز	تعداد نمونه	*µU/islet/h*
–	۳mM	۶	۱۱/۵۴±۰/۷۲
$۱۰^{-۶}$M	۳mM	۷	۱۲/۲۴±۰/۹۰
$۱۰^{-۵}$M	۳mM	۶	۱۱/۴۴±۰/۴۰
$۱۰^{-۴}$M	۳mM	۴	۱۳/۸±۰/۸۳

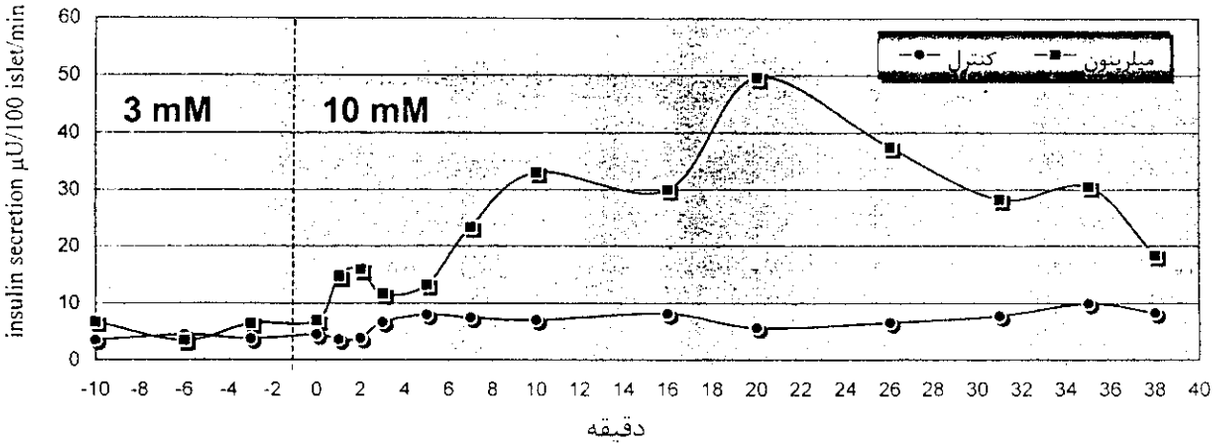
جزایر لانگرهانس در دستجات پنج تایی در درجه حرارت ۳۷ درجه در کربس محتوی ۳ میلی مولار گلوکز ابتدا به مدت نیمساعت پری اینکوبیت وسپس به مدت یک ساعت همراه غلظت های مختلف دارو یا بدون دارو (۳mM) اینکوبیت شدند
تفاوتهای قابل مشاهده بین دو سری آزمایش بدلیل تفاوت در شرایط نگهداری حیوان و اندازه جزایر بوده است.
(* $۱۰^{-۴}$ M آمرینون) اثر آمرینون با غلظت $۱۰^{-۴}$ M معنی دار بود. ANOVA، P<۰/۰۱



نمودار ۲: منحنی های پاسخ به دوز داروهای میلرینون و آمرینون مهار کننده های انتخابی PDE_3
جزایر لانگرهانس در دستجات پنج تایی در درجه حرارت $۳۷\ ^{o}C$ ابتدا به مدت نیمساعت درکربس محتوی ۳ میلی مولار پری اینکوبیت وسپس به مدت یک ساعت درحضور گلوکز ۱۰ میلی مولار همراه دارو (غلظتهای $۱۰^{-۴}$M، $۱۰^{-۵}$M و $۱۰^{-۶}$M)یا بدون دارو (غلظت صفر) اینکوبیت شدند.
هر نقطه نشان دهنده معدل درصد افزایش ترشح انسولین نسبت به کنترل (غلظت صفر دارو، منحنی میلرینون= ۳۰/۵۱، منحنی آمرینون = ۳٤/۹٦، µU/islet/h) و سربارها مشخص کننده مقدار خطای استاندارد هستند.
در منحنی میلرینون P<۰/۰۵ ولی در منحنی آمرینون P>۰/۰۵ است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳: اثرمیلرینون بر ترشح انسولین القاء شده توسط ۱۰ میلی مولار گلوکز در پرفوزیون جزایر لانگرهانی رت

جزایر لانگرهانس دست چین شده در یک پتری دیش محتوی بافر کربس ، ۳ mM گلوکز در ٤ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در هر آزمایش از مجموع این جزایر، دو گروه ۱۰۰ تایی ، بارعایت سالم بودن، یکسان بودن اندازه و عدم چسبندگی به ذرات خارجی، انتخاب و هر دسته به داخل محفظه یک چمبر منتقل گردید. سپس هر چمبر توسط بافر کربس پر شده و به سیستم پرفزیون دو کاناله متصل گردید (شکل ۱). با روشن کردن پمپ پریستالتیک، جریان محلول بافر کربس ، ۳ mM گلوکز با سرعت ۱ ml/min در دمای ۳۷ درجه از روی جزایر عبور نمود. بعد از نیم ساعت در فواصل زمانی مشخص شده در منحنی فوق از محلول خروجی نمونه گیری شد (نمونه های ، ۳ mM). ۲ دقیقه بعد از روشن کردن پمپ انفوزیون (مقدار محاسبه شده time-lag برای سیستم انفوزیون) اولین نمونه (دقیقه صفر) و سپس بقیه نمونه در زمانهای مشخص شده انجام شد (نمونه های ، ۱۰ mM). روشن کردن پمپ انفوزیون موجب تبدیل محلول پرفوزیون از ، ۳ mM گلوکز به ، ۱۰ mM گلوکز همراه یا بدون دارو گردید. درمنحنی فوق هر نقطه حاصل از معدل نتایج حاصل از ۲ آزمایش مجزا می باشند.

در پرفزیون جزایر لانگرهانس، افزایش غلظت گلوکز از ۳ میلی مولار به ۱۰ میلی مولار موجب افزایش سریع ترشح انسولین شد و با تبدیل غلظت گلوکز از ۱۰ میلی مولار به ۳ میلی مولار ترشح انسولین کاهش یافت. افزودن میلرینون موجب تقویت ترشح انسولین القاء شده توسط گلوکز شد (*نمودار ۳*).

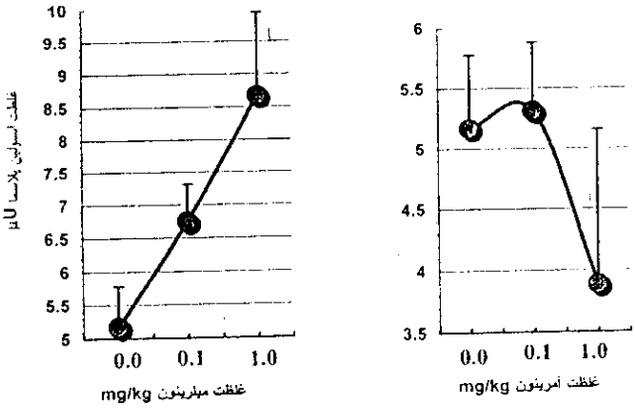
ب) غلظت انسولین و گلوکز در پلاسما

میلرینون موجب افزایش غلظت انسولین پلاسما به صورت وابسته به دوز شد ($p<0/05$). در حالیکه آمرینون نه فقط موجب افزایش ترشح نشد بلکه در غلظت بالا ظاهراً" مقدار انسولین پلاسما را کاهش داده است. ولی تغییرات ایجاد شده توسط آمرینون معنی دار نبود ($p>0/05$، *نمودار ۴*).

میلرینون با دوز ۰/۱ و آمرینون با دوزهای ۱ و ۰/۱ میلی گرم/کیلوگرم تغییری معنی دار در غلظت گلوکز پلاسما ایجاد نکردند.

ج) ترشح انسولین در کشت سلولی

مقدار ترشح انسولین توسط سلولهای CRI-D2 در حضور گلوکز ۳ میلی مولار بسیار پائین بود (۰/۸۱±۰/۱۵µU/ml/h)



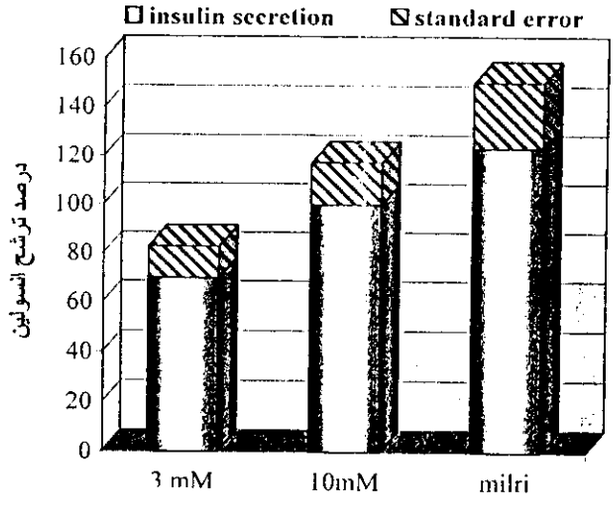
نمودار ٤ : منحنی های تغییرات غلظت انسولین پلاسما به دوز میلرینون و آمرینون، مهار کننده های انتخابی PDE_3، در شرایط درون تنی به موشهای سوری با اوزان متوسط ۲۵ گرم، محلول گلوکز با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم خورانده شد. ۳۰ دقیقه بعدcc ۵ داروی مورد نظر با دوزهای ۰/۱ یا ۱ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت IP به حیوان تزریق شد. ۲۵ دقیقه بعد، Xylazine به صورت IP تزریق گشته و ۲ تا ۳ دقیقه بعد در حالت کاملا بیهوشی از قلب حیوان خون گرفته شد.

در منحنی های فوق هر نقطه مشخص کننده معدل مقدار انسولین پلاسما (µU/ml)، ٦ تا ۱۲ نمونه و سربارها نشان دهنده مقدار خطای استاندارد می باشند.

در منحنی میلرینون $P<0/05$ ولی در منحنی آمرینون $P>0/05$ است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۵: اثر میلرینون بر ترشح انسولین از سلولهای CRI-D2
سلولهای CRI-D2 به مدت ۵ روز در محیط DMEM کشت شدند. پس از پر شدن کامل سطح فلاکس ۲۵ میلی لیتری توسط سلولهای مترشحه انسولین، محیط کشت را خالی نموده، با بافر کربس بی کربنات حاوی ۳ میلی مولار گلوکز یا ۱۰ میلی مولار گلوکز همراه یا بدون میلرینون به فلاکس افزوده شد. بعد از یک ساعت انکوبیشن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد از مایع رویی جهت اندازه گیری انسولین نمونه برداری شد.
هر ستون نشان دهنده معدل درصد ترشح انسولین ۵ فلاکس کشت و خطای استاندارد آن می باشد.

افزایش غلظت گلوکز به ۱۰ میلی مولار تغییری معنی دار در مقدار انسولین محیط ایجاد نکرد (۱/۱۶±۰/۱۹μU/ml/h) و با افزایش 10^{-4} مولار میلرینون به محیط، تغییری معنی دار در ترشح انسولین سلولهای CRI-D2 بوجود نیامد (نمودار ۵).

بحث

نقش تقویتی سیستم مبدل سیگنال وابسته به cAMP در سلولهای مترشحه انسولین در پاسخ دهی این سلولها به گلوکز و نقصان این سیستم به عنوان یك مکانیسم احتمالی ایجاد بیماری دیابت نوع II (NIDDM) اثبات شده است (۵ و ۶). در مطالعات قبلی بر روی بافت مترشحه انسولین احتمال وجود تنوع در آنزیم های فسفودی استراز (PDE) و نیز اهمیت PDE_3 نشان داده شد (۱۵). بعلاوه اثر تحریکی تعدادی از داروهای مهارکننده انتخابی PDE_3 بر ترشح انسولین گزارش شده است (۲، ۹، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). با توجه به اینکه اثر مهاری IGF-1 (insulin-like growth factor 1) (۱۹) و نیز لپتین (۱۸) بر ترشح انسولین از طریق فعال شدن PDE_{3B} ایجاد می شود می توان نتیجه گرفت که داروهای مهار کننده PDE_3 با افزایش غلظت cAMP در سلولهای مترشحه انسولین موجب تحریك ترشح انسولین می شوند.

در این مطالعه افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده توسط میلرینون با غلظت 10^{-4} M و اثر وابسته به دوز این دارو نشان دهنده اثر مستقیم این دارو در تحریك ترشح انسولین است و تأئید کننده گزارشات قبلی در مورد اثر انسولینوتروپیك داروهای مهارکننده PDE_3 است. نزدیك بودن مقدار EC_{50} میلرینون در تحریك ترشح انسولین القاء شده توسط گلوکز (نمودار ۲، ۹μM) با مقادیر IC_{50} گزارش شده (۸) این دارو در مهار PDE قلبی (در حدود ۶ μM) مشابهت دارد. و تأئید دیگری است بر این استدلال که اثر میلرینون در تحریك ترشح انسولین با وابسته مهار PDE ایجاد شده است. در نظر گرفتن مقدار IC_{50} آمرینون در مهار PDE قلبی (۸) در حیوانات مختلف (μM ، سگ=۵۶، خوك=۵۲، راسو=۱۲۶، گربه=۲۰۸، خوکچه=۱۷۹۰) معنی دار نبودن افزایش غلظت انسولین در غلظت 10^{-4} M آمرینون قابل توجیه است. ولی با توجه به اینکه قدرت اثر داروهای مهار کننده PDE در بافتهای مختلف متفاوت است (۸) و مشخص نبودن مقدار IC_{50} میلرینون و آمرینون در بافت مترشحه انسولین تأئید این مسئله نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

اثر کاهنده غلظت پائین میلرینون (۱μM) بر ترشح انسولین (نمودار ۲) و نیز نزدیك بودن این غلظت به مقادیر IC_{50} گزارش شده در مورد این دارو بر روی PDE_3 خالص شده در بافت های دیگر (۷) یعنی مقادیر بین۰/۳ μMتا ۱ μM قابل تأمل است. جالب توجه اینست که این اثر کاهنده در منحنی دوز-پاسخ SKF 94836 یك داروی مهارکننده انتخابی دیگر نیز دیده شده است (۱۵). از طرفی منحنی دوز-پاسخ آمرینون که در آن بالاترین اثر بنظر می رسد در غلظت ۱ μM کاهش سیر منحنی در غلظتهای بالاتر با اثر دیگر داروهای مهار کننده PDE_3 تفاوت دارد. بهر حال می توان از این دو اثر نتیجه

www.SID.ir

Archive of SID

گرفت که این داروها علاوه بر مهار PDE_3 اثرات دیگر نیز بر سلولهای مترشحه انسولین دارند.

مطالعه روی تغییرات ترشح انسولین در سلولهای CRI-D2 بدلیل پائین بودن پاسخ دهی سلولها و میزان آزادسازی انسولین مشکل است. ولی افزایش ترشح انسولین که با افزودن میلرینون با غلظت 10^{-4} M به ۱۰ mM گلوکز ایجاد شد می تواند تأئید کننده اثر مستقیم این دارو در تحریک ترشح انسولین باشد.

داروهای مهار کننده PDE (۱۵) و نیز هورمونهای GLP-1 ، GIP (۱۱، ۱۷) با افزایش غلظت cAMP داخل سلولی موجب تحریک ترشح انسولین القاء توسط گلوکز می شوند. داروهایی که اثر تحریکی آنها بر ترشح انسولین وابسته به افزایش غلظت cAMP داخل سلولی است تغییری در مقدار ترشح بازال انسولین (در حضور غلظت غیر تحریکی گلوکز، ۳ mM) ایجاد نمی کنند (۱۵، ۱۷). دراین تحقیق در مطالعات in vivo استفاده از گلوکز خوراکی برای تحریک آزاد سازی هورمونهای انسولینوتروپیک دستگاه گوارش و ایجاد اثر سینرژیسم با داروهای مهار کننده در تحریک ترشح انسولین استفاده شد. در تجویز میلرینون، افزایش وابسته دوز غلظت انسولین پلاسما را می توان بدلیل ایجاد سینرژیسم بین دارو و هورمونهای مذکور در تحریک ترشح انسولین القاء شده توسط گلوکز دانست. بهرحال آمرینون درهمان دوزهای به کار برده شده نه فقط ترشح انسولین را افزایش نداد بلکه مقدار انسولین را در دوزاژ 10^{-4} M ظاهراً کاهش داده است. این تفاوت اثر را می توان دلیل دیگری بر وجود مکانیسم ثانوی در ایجاد اثر آمرینون دانست. این مسئله در اثر غلظت بالای آمرینون (10^{-4} M) در افزایش ترشح انسولین در حضور گلوکز ۳ میلی مولار (جدول ۱) کاملاً مشخص است.

در پایان می توان نتیجه گرفت که با توجه به تفاوت IC_{50} گزارش شده برای میلرینون و آمرینون در مهار PDE_3، در بافتهای دیگر، تحریک ترشح انسولین توسط میلرینون و عدم ایجاد اثر انسولینوتروپیک توسط آمرینون در این تحقیق قابل تفسیر است. اثر میلرینون می تواند تأئید کننده گزارشات قبلی در مورد اثر انسولینوتروپیک داروهای مهارکننده PDE_3 باشد. عدم افزایش معنی دار ترشح انسولین توسط آمرینون ممکن است ناشی از انتخابی بودن اثر بافتی این داروها (tissue specificity) و یا درگیر بودن مکانیسمهای دیگر را در تقویت اثر گلوکز در تحریک ترشح انسولین توسط داروهای مهارکننده انتخابی PDE_3 دانست. اثرات آمرینون بر ترشح انسولین بازال و نیز اثرات میلرینون در غلظتهای پائین (10^{-4} M) نیاز به بررسی بیشتر دارد.

تشکر و قدردانی

شایان ذکر است این تحقیق بخشی از پروژه تحقیقاتی (بررسی نقش ایزوآنزیمهای فسفودی استراز نوکلئوتیدهای حلقوی در ترشح انسولین) مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بوده که هزینه های آن توسط آن معاونت تأمین شده است. با توجه به اینکه اکثر داروهای مورد استفاده از خارج تهیه گردید کمکهای معاونت محترم پژوهشی جناب آقای دکتر شمسا نقش موثری در انجام این طرح داشته است.

مولفین بر خود فرض می دانند که از مساعدتهای جناب آقایان دکتر توکلی و دکتر پارسایی و دکتر وارسته در مورد کمکهای فکری این عزیزان و نیز از جناب آقای دکتر آریان تشکر نمایند

ضمناً از مساعدتهای جناب آقای دکتر نوری از داشگاه تبریز در تهیه بعضی از اقلام داروی ازخارج کشور و جناب آقای دکتر شکری از دانشگاه تهران در تهیه سلولهای مترشحه انسولین تشکر می شود.

References

1. Beavo J. A., Conti M. & Heaslip R. J., 1994, Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases, Mol. Pharmacol., 40:339.
2. El – Motwally M., Shafiee – Nick R., Pyne N. J. & Furman B. L., 1997, The effect of selective phosphodiesterase inhibitors on plasma insulin concentrations and insulin secretion in-vitro in the rat, (in press)

www.SID.ir

Archive of SID

3. Hagstromtoft E., Boinder J., Eriksson S. & Arner P., 1995, Role of phosphodiesterase III in antilipolytic effect of insulin in-vivo, Diabetes, 44:1170.
4. Hargrove D. M., Nardone N. A. & Parker J. C., 1996, Comparison of the glucose dependency of glucagon-like peptide-1 (7-73) and glyburide in-vitro and in-vivo, Metabolism,45:404.
5. Han P., Werber J., Surana M., Fleischer N., Michaeli T., 1999, The calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE_{1C} down-regulates glucose-induced insulin secretion, J. Biol. Chem., 274:32,22337-44
6. Holz G. G., Habener J. F., 1992, Signal tranduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic beta-cells and glucose competence concept, Trends Biochem. Sci.,17:388-393
7. Manganiello V. C., Degerman E., 1992, Mechanisms for the rat adipocyte particulate cyclic-GMP-inhibited cyclic – GMP – inhibited cyclic AMP phoshodiesterase and its importance in the antilipolytic action of insulin. Advances in Second Messenger Phospho. Res., 25:147-164.
8. Pang D. C., 1992, Tissue and species specificity of cardiac cAMP-Phosphodesterase inhibitors. Advances in Second Messenger Phospho. Res., 25:309-320.
9. Parker J.C., Vanvolkenburg M.A. & Androw K. M., 1995, Cyclic AMP phosphodiesterase of human and rat islets of Langerhans: Contribution of type III and IV to modulation of insulin secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun, 217, 916.
10. Parker J. C., Van Volkenburg M. A., Nardone N. A., Hargrove D. M., Andrews K. M., 1997, Modulation of insulin secretion and glycemia by selective inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase III. Biochem. Biophys. Res. Commun, 236: 3, 665-9
11. Salehi A., Chen D. H., Kanson R., Nordin G., Lundquist I., 1999, Gastrectomy induces impaired insulin and glucagon secretion: evidence for a gastro-insular axis in mice, J. Physiol. (Lond), 514 (Pt 2) 579-91.
12. Shafiee – Nick R., Pyne N. J. & Furman B.L., 1993, Effects of type-specific phosphodiesterase inhibitors on insulin secretion from rat isolated islets, Diabetes Med., 10 (Suppl): S48.
13. Shafiee –Nick. R., El-Metwaly M., Pyne N. J. & Furman B. L., 1994, Effects of isoenzyme-specific Phosphodiesterase inhibitors on insulin secretion in the rat, Br. J. Pharmacol., 112, 369p.
14. Shafiee-Nick R. F.L., London N. J. M., Pyne N. J.& Furman B. L., 1994, Cyclic 3' , 5' AMP Phosphodiesterase in human pancreatic islets, Diabetic Med., 11(Suppl): S31.
15. Shafiee-Nick R., Pyne N. J.& Furman B. L., 1995, Effects of type selective Phospodiesterase inhibitors on glucose-induced insulin secretion and islet phospodiesterase activity, Br. J. Pharmacol., 115, 1486.
16. Soderling S.H., & Beavo J. A., 2000, Regulation of cAMP and cGMP signaling: New phosphodiesterases and new functions. Current Opinion in cell Biology, 12:147-179
17. Zawalich W. S.& Rasmussen H., 1990, Control of insulin secretion: a model involving Ca^{2+}, cAMP and diacylglycerol, Mol. Cell. Endocrinol, 70, 119.
18. Zhao A. Z., Bornfeldt K. E., Beavo J. A., 1998, Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B, J. Clin Invest., 102:5869-73
19. Zhao A. Z., Zhao H., Teague J., Fujimoto W., Beavo J. A., 1997, Attenuation of inulin secretion by insulin-like growth factor 1 is mediated through activation of phosphodiesterase 3B, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 7, 3223-8.

www.SID.ir