



Scan online to view this article

study of comparative effects of harmine and ghrelin agonist on insulin and c-peptide secretion

Alieh Safamanesh¹, Shahrbanoo Oryan², Ramesh Ahmadi^{*3}, Kazem Parivar¹

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

3- Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Abstract

Aim and Background: The ability to secrete insulin from the islets of Langerhans on the one hand and suppress the factors that increase serum glucose concentrations on the other; It is very important in patients with metabolic disorders such as diabetes. The aim of this study was to compare the effects of harmine with ghrelin agonist (as a suppressor of insulin secretion) on insulin secretion and c-peptide in PANC-1 cell line and intracellular glucose concentration in HT1080 cell line.

Materials and Methods: To do this, cell lines were purchased from the Iranian Genetic Resources Center and after cell passage and preparation, were treated with doses of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 µg /ml harmin and ghrelin agonists with doses of 0.05, 0.5, 5, 50 and 500 µg / ml. While performing MTT test, insulin secretion and c-peptide were measured by ELISA.

Results: The results showed that harmine dose-dependently increased insulin and c-peptide secretion as well as increased intracellular glucose and had the opposite effect of ghrelin agonist.

Conclusion: Harmine analogues could be a unique therapeutic promise for human diabetes and possibly serve as inhibitors of ghrelin agonists.

Key words: Harmine, insulin, c-peptide, ghrelin agonist, PANC-1 cell line, HT1080 cell line

Corresponding author:

Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Email: ramahmd@yahoo.com





برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی مقایسه‌ای اثر هارمین و آگونیسست گرلین بر

ترشح انسولین و C - پپتید

عالیه صفامنش^۱، شهربانو عریان^{۲،۱}، رامش احمدی^{۳*}، کاظم پریور^۱

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

۲- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

چکیده

سابقه و هدف: توانایی ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس از یک سو و سرکوب فاکتورهای افزایش دهنده غلظت‌های سرمی گلوکز از سوی دیگر؛ در بیماران مبتلا به اختلال‌های متابولیسمی از جمله دیابت اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه مقایسه اثرهای هارمین با آگونیسست گرلین (به‌عنوان سرکوبگر ترشح انسولین) بر ترشح انسولین و C - پپتید در رده سلولی PANC-1 و غلظت گلوکز داخل سلولی در رده سلولی HT1080 بوده است.

مواد و روش‌ها: جهت انجام این کار رده‌های سلولی از مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری و پس از پاساژ سلولی و آماده‌سازی، تحت تیمار با دوزهای هارمین ۰/۱، ۰/۰۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آگونیسست گرلین با دوزهای ۰/۵، ۰/۰۵، ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند و ضمن انجام تست MTT، میزان ترشح انسولین و C - پپتید به روش الیزا سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که هارمین به‌طور وابسته به دوز منجر به افزایش ترشح انسولین و C - پپتید و نیز افزایش غلظت گلوکز داخل سلولی شده است و اثرهای آن برعکس آگونیسست گرلین بوده است.

نتیجه‌گیری: آنالوگ⁻های هارمین می‌توانند نویدبخش درمانی منحصر به فرد برای دیابت انسانی بوده و به‌احتمال به‌عنوان مهارکنندگان آگونیسست گرلین مطرح باشند.

واژه‌های کلیدی: هارمین، انسولین، C - پپتید، آگونیسست گرلین، رده سلولی PANC-1، رده سلولی HT1080

مقدمه

جزایر لانگرهانس پانکراس با تنظیم ترشح انسولین و

گلوکاگن نقش حیاتی در تنظیم سوخت هومئوستازی برعهده دارند و چنانچه ترشح این دو هورمون دچار اختلال شود منجر به ایجاد دو شکل بزرگ دیابت نوع یک و دیابت نوع دو می‌شود (۱). سیگنالینگ انسولین در سلول‌های بتا، بسیاری از اثرهایی هم‌چون بیان ژن افزایش یافته انسولین، ترشح آن و بیوسنتز پروانسولین و پیشرفت چرخه سلولی را که توسط گلوکز آغاز می‌گردند؛ تنظیم می‌کند (۲). از سوی دیگر، C - پپتید نقش مهمی در سنتز انسولین و ارتباط آن با زنجیره‌های A و B دارد به‌طوری‌که باعث تاخوردگی

نویسنده مسئول:

گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

قم، قم، ایران

پست الکترونیکی: ramahmd@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

آنچه از مجموع این مطالعه‌ها برمی‌آید عملکرد معکوس گرلین و انسولین در تنظیم هومئوستازی قند خون است با توجه به اختلال ترشح انسولین در بیمارهای متابولیکی و یا اختلال در عملکرد انسولین جهت سرکوب سطوح گرلین و مناطق مرکزی در گیر در اشتها پس از اخذ غذا، هر دارویی که بتواند به طور مستقیم سلول‌های بتا را متأثر ساخته و ترشح انسولین را القاء کند حائز اهمیت است. هارمین بتاکاربولینی است که از گیاه اسپند از خانواده زیگوفیلایه استخراج می‌شود. بتاکاربولین‌ها به راحتی از سد خونی مغزی عبور کرده و غلظت نوروترانسمیترها را تغییر می‌دهند؛ هم چنین طیفی از اثرهای نوروفیزیولوژیکی و سمی از جمله اثر بر دمای بدن، تشنج، فعالیت‌های ضد افسردگی، اتساع عروقی، اثرهای ضد تجمعی پلاکت‌ها^۲ و اثر بر ترک دارو و اشتها را اعمال می‌کنند (۲۱-۱۹).

در این مطالعه هدف بررسی اثرهای هارمین بر ترشح انسولین و C - پپتید (به عنوان گزارشگر ترشح انسولین) در رده سلولی PANC-1 و بازجذب گلوکز در رده سلولی HT1080 در مقایسه با آگونیست گرلین بوده است زیرا فرض ما در این مطالعه بر این بوده است که هارمین در محور انسولین - گلوکز - گرلین بر ترشح انسولین و C - پپتید به صورت وابسته به دوز اثر تحریکی داشته و برعکس آگونیست گرلین عمل می‌کند و به احتمال می‌تواند به عنوان یک مهار کننده ترشح گرلین مطرح باشد.

مواد و روش‌ها

پودر هارمین و آگونیست گرلین (C24H26CIN7OS) با برند سیگما-آلدریج (آمریکا)، کیت‌های سنجش انسولین با برند (Monobind Inc، آمریکا)، C - پپتید با برند (Mercodia، سوئد)، کیت سنجش گلوکز با برند (MAK263 سیگما آلدریج آمریکا) و محیط کشت DMEM با برند سیگما آلدریج خریداری شدند. رده‌های سلولی PANC-1 و HT1080 از مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران - تهران، تهیه گردیدند.

صحيح و تشكيل پيوند دی‌سولفیدی زنجیره داخلی می‌شود. هنگامی که C - پپتید توسط روندهای پروتئولایتیک از پروانسولین جدا می‌شود (۳) در نهایت به میزان مساوی با مقدار انسولین وارد جریان گردش خون می‌شود (۴)، بنابراین سنجش میزان C - پپتید معادل با سنجش مقدار انسولین و روش مطمئن تری است زیرا نیمه عمر آن (۳۰-۲۰ دقیقه) بیش تر از انسولین (۵-۳ دقیقه) (۵) بوده و هم چنین کلیرنس کبدی ناچیزی در مقابل انسولین دارد و این دلایل باعث شده تا C - پپتید در پچه‌ای برای انجام آزمایش‌های پایدار در پاسخ به نوسان‌های سلول‌های بتا باشد (۶). فاکتور دیگری که در تنظیم هومئوستازی قند خون در سال‌های اخیر مطرح شده است پپتید گرلین است به طوری که، ارتباط معکوس بین سطوح گرلین خون و سطوح انسولین، نشان دهنده یک فیدبک مهاري بین انسولین و گرلین است (۷). پژوهش‌های انجام شده در سال‌های گذشته نشان داده است که بسته به شرایط تجربی، گرلین ترشح انسولین را هم تحریک (۸) و هم مهار (۹) می‌کند. در واقع، ممکن است گرلین در غلظت‌های پایین اثرهای مهاري و در غلظت‌های بالا اثرهای تحریکی بر ترشح انسولین داشته باشد (۱۰). مکانیسم‌های مرکزی که به موجب آن‌ها گرلین می‌تواند کاهش غلظت گلوکز را حس کند (۱۱) باعث افزایش سطوح گرلین (۱۲) و بیان هیپوتالاموسی^۱ GHSR می‌شود (۱۳). نورون‌های پاسخگوی گلوکز که در هسته شکمی هیپوتالاموس، منطقه هیپوتالاموس جانبی، منطقه پاروسلولار در هسته‌های پاراونتریکولار واقع شده‌اند نیز اهداف مهمی برای اشتها و اثرهای گرلین روی هومئوستازی انرژی (۱۴) و نورون‌های حسگر گلوکز در پاسخ به گرلین هستند (۱۵). GHSR نیز در مجاورت این نواحی هیپوتالاموسی بیان می‌شود (۱۶). فعال سازی نورون‌ها از هسته‌های مسیر سالیتری توسط انسولین (القا کننده هیپوگلیسمی) باعث پاسخ گرسنگی از نورون‌های حاوی گرلین (۱۷) و در نهایت تحریک مسیرهای گلوکوژنولیز و نئوگلوکوژنولیز کبدی شده و تولید گلوکز که توسط انسولین مهار شده بود؛ فعال می‌گردد (۱۸). بنابراین

² platelet antiaggregation

¹ Growth Hormone Secretagogue Receptor

انتخاب غلظت‌های هارمین و آگونیست گرلین

انتخاب دوز به‌روش لگاریتمی صورت گرفت. دوزهای هارمین ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آگونیست گرلین ۵۰، ۵۰۰، ۵، ۵۰، ۰/۵، ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتخاب گردیدند. شروع محدوده‌های دوز با توجه به مطالعه‌های قبلی صورت گرفته است (۲۲، ۲۳).

آماده‌سازی محیط کشت رده PANC-1

رده PANC-1 لاین سلولی شبه - اپیتلیالی کارسینومای پانکراس انسانی است. محیط کشت این رده سلولی شامل DMEM ۹۰٪ به اضافه ۴ mM L-Glutamine هم‌چنین ۴/۵ gr/L گلوکز به اضافه ۱ Mm سدیم - پیرووات و FBS غیر فعال گرم ۱۰٪ بوده است که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود.

مرحله پاساژ سلولی رده PANC-1

طی پاساژ اول ۲ میلی‌لیتر محلول تریپسین ۰/۲۵٪ - EDTA ۰/۰۲٪ (Gibco, German) به فلاسک اضافه شد. و به انکوباتور CO₂ دار برای دو دقیقه منتقل گردید و پس از آن خارج و در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. سلول‌ها در این مرحله در سوسپانسیون موجود در فلاسک شناور بودند و از کف ظروف کشت کنده شده بودند. فلاسک به‌سرعت به زیر هود استریل منتقل و ۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل دارای تریپسین غیرفعال به آن اضافه شد. سوسپانسیون با چندین مرتبه پیپتاژ هموژنایز گردید و سپس به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. این فالکون در دستگاه سانتریفیوژ به‌مدت ۵ دقیقه و ۲۰۰ دور سل پلت گردید. در زیر هود استریل، سوپرناتانت آسپیره گردید. دوباره سلول‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت به آرامی پیپتاژ شدند تا توده سلولی شکسته شود. مقادیر بسیار کمی از سوسپانسیون سلولی به‌داخل یک میکروتیوب ریخته شد و تعداد سلول‌ها و درصد بقا شمارش شد. سلول‌ها به‌نسبت ۱:۲ تا ۱:۴ در فلاسک‌های جدید تقسیم شدند. سپس محیط کشت جدید به آن‌ها اضافه شد به‌طوری‌که ۸ میلی‌لیتر محیط کشت به فلاسک T-25 اضافه گردید. فلاسک‌های جدید به انکوباتور CO₂ دار با ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل

شدند محیط کشت سلول‌ها هر ۳-۲ روز یک‌بار به‌مدت حدود دو هفته تعویض شد تا سلول‌ها در هر گروه به تراکم مناسب ($10^4 \times 2-4$ cells/cm²) رسیدند. این سلول‌ها پس از پر کردن کف ظرف کشت، در پاساژ موردنظر منجمد شدند تا در مرحله بعدی تحقیق استفاده شوند. برای انجماد از (DMSO (Dimethyl Sulfoxide: Sigma, USA) ۱۰٪ و ۹۰٪ FBS برای تراکم سلولی 2×10^6 cells /vial استفاده شد.

آماده‌سازی محیط کشت رده HT1080

رده سلولی HT1080، لاین سلولی فیبروسارکومای انسانی است. محیط کشت این لاین سلولی شامل محیط کشت کامل DMEM (به اضافه ۲ mM L-Glutamine هم‌چنین ۴/۵ gr/L گلوکز به اضافه ۱۱۰ mg/L سدیم - پیرووات) همراه با FBS (v/v) ۱۰٪ گرم غیرفعال و L-Glutamine ۲ mM بوده است.

پاساژ رده سلولی HT1080

برای این کار ابتدا محیط رشد کامل DMEM و محلول tryPsin-EDTA که قبل در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده بود، آماده شدند. سپس محیط رشد به وسیله آسپیراسیون حذف گردید. سلول‌ها یک مرتبه با ۱۰ میلی‌لیتر PBS شستشو داده شدند. سپس تریپسینایز شدن سلول‌ها برای ۳-۱ دقیقه در ۵ میلی‌لیتر محلول tryPsin-EDTA صورت گرفت. این ویال برای ۲-۱ دقیقه به انکوباتور منتقل گردید تا رهاسازی سلول‌های چسبنده از فلاسک صورت بگیرد. سپس سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. برای جلوگیری از آسیب به سلول‌های در معرض تریپسین، سلول‌ها با ۵ میلی‌لیتر محیط رشد حاوی تریپسین غیرفعال رقیق شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون سلولی برداشته و ۲۸ میلی‌لیتر محیط رشد تازه اضافه شد. این ۳۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون در ۵ فلاسک T-۱۷۵ تقسیم گردید. سپس سلول‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵٪ منتقل گردید. سلول‌ها روزانه بررسی شدند تا به کانفلوئنس ۸۰-۷۰٪ برسند.

سنجش MTT

۵۰٪ سلول‌ها در غلظت مورد نظر زنده مانده باشند.

روش سنجش انسولین و c - پپتید

جهت انجام این کار، سلول‌ها با دوزهای مذکور هارمین و آگونیست گرلین؛ تیمار شدند و پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت جهت سنجش انسولین و c - پپتید به روش الایزا (PLATE READER by DAS, Italy) طبق دستورالعمل کیت خریداری شده آماده شدند.

تست سنجش گلوکز در رده سلولی ماهیچه

جهت انجام این کار، سلول‌ها با دوزهای مذکور هر چهار دارو؛ تیمار شدند و پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت جهت سنجش گلوکز درون سلولی با استفاده از روش گلوکز اکسیداز آماده شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های یک طرفه ANOVA و Tukey Post hoc و نرم‌افزار SPSS ۲۰ استفاده شد. سطح معنی‌داری در تمام موارد ($P \geq 0.05$) منظور گردید.

نتایج

تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر روی میزان

بقاء سلول‌ها در لاین سلولی PANC-1

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان بقاء در سلول‌های این لاین سلولی تحت تیمار با دوز $500 \mu\text{g/ml}$ آگونیست گرلین به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر دوزها کاهش یافته است ($P \geq 0.01$). در دوز $50 \mu\text{g/ml}$ نیز اگرچه نسبت به دوز $500 \mu\text{g/ml}$ بقاء بیش‌تر بود اما با این حال نسبت به دوزهای پایین‌تر درصد بقاء کم‌تر بود ($P \geq 0.01$). هم‌چنین اختلاف معنی‌داری در بقاء سلولی بین دوزهای $0.5 \mu\text{g/ml}$ و $0.05 \mu\text{g/ml}$ آگونیست گرلین، مشاهده شد ($P \geq 0.05$) و سلول‌ها در دوز $0.05 \mu\text{g/ml}$ بالاترین میزان بقاء را داشتند. در غلظت $5 \mu\text{g/ml}$ بقاء سلول‌ها ۵۰٪ به بالا بود و این غلظت IC_{50} مناسبی برای آگونیست گرلین در این لاین سلولی بود. در کل نتایج حاکی از این بود که آگونیست گرلین به صورت وابسته دوز میزان بقاء سلولی را متأثر ساخته و در

پودر MTT با غلظت 5 mg/ml در PBS تهیه شد. این محلول در دمای 37°C و در تاریکی به‌مدت یک ماه قابل نگه‌داری است. سلول‌ها به تعداد $10^3 \times 30 \text{ cell/well}$ در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. سپس به‌منظور چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، آن را به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و سپس محیط رویی خارج گردید و محیط کامل جدید به هر خانه اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، پلیت‌ها برای تست MTT آماده شدند. برای انجام این تست، پس از ۲۴ ساعت، 100 میکرولیتر محلول MTT به هر خانه اضافه شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. بعد از اضافه کردن این محلول رنگ محیط به‌علت تولید فورمازان^۳ به رنگ آبی در می‌آید. پس از گذشت این مدت زمان، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و محلول رویی سلول‌ها خارج گردید. سپس به هر خانه 1 میلی‌لیتر DMSO اضافه گردید تا کریستال‌های تولید شده حل شوند. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور انکوبه شدند. بعد از گذشت این مدت‌زمان تمام خانه‌های پلیت پیمپتاژ شده و میزان جذب در طول موج 570 nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تحلیل داده‌های اسپکتروفتومتری و تعیین بقای سلول

پلیت‌ها پس از اضافه شدن DMSO شروع به تغییر رنگ کردند؛ نمونه‌های کنترل که تیماری روی آن‌ها صورت نگرفت؛ به‌طور تمام ارغوانی رنگ شدند و این مسئله گویای زنده بودن سلول‌ها است؛ اما هر چه رقت دارو بیش‌تر شد بر میزان مرگ سلول‌ها اضافه گردید و رنگ چاهک‌ها سفیدتر شد. در نهایت جذب نوری محلول به‌دست‌آمده در طول موج 570 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و درصد بقای سلول‌ها از با فرمول زیر محاسبه گردید.

$100 \times \text{جذب نمونه کنترل} / \text{جذب نمونه تیماری} = \text{درصد بقای هر نمونه تیماری}$

غلظت‌هایی که توان حیاتی ۵۰٪ به بالا دارند، IC_{50} مناسبی برای سلول موردنظر هستند. برای ادامه پژوهش به دوزهای نیاز است که از IC_{50} بالاتر باشند، یعنی بیش از

³ Furmazan

دوزهای بالاتر بقاء سلول‌ها را کاهش می‌دهد (شکل ۱، نمودار a).

تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر روی میزان بقاء سلول‌ها در لاین سلولی PANC-1

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان بقاء در سلول‌های این لاین سلولی تحت تیمار با دوز $100 \mu\text{g/ml}$ هارمین به طور معنی‌داری نسبت به سایر دوزها کاهش یافته است ($P \geq 0.001$). در دوز $10 \mu\text{g/ml}$ نیز اگرچه نسبت به دوز $100 \mu\text{g/ml}$ بقاء بیش‌تر بود اما با این حال نسبت به دوزهای پایین‌تر درصد بقاء کم‌تر بود ($P \geq 0.01$). اختلاف معنی‌داری در بقاء سلولی بین دوزهای 0.1 و $0.01 \mu\text{g/ml}$ هارمین، مشاهده نشد و سلول‌ها در این دو دوز بالاترین میزان بقاء را داشتند. هم‌چنین IC_{50} هارمین در محدوده غلظتی بین $1 \mu\text{g/ml}$ و $10 \mu\text{g/ml}$ بود. در کل نتایج حاکی از این بود که هارمین به‌صورت وابسته دوز میزان بقاء سلولی را متأثر ساخته و در دوزهای بالاتر اثرهای کشندگی بالایی دارد (شکل ۱، نمودار b).

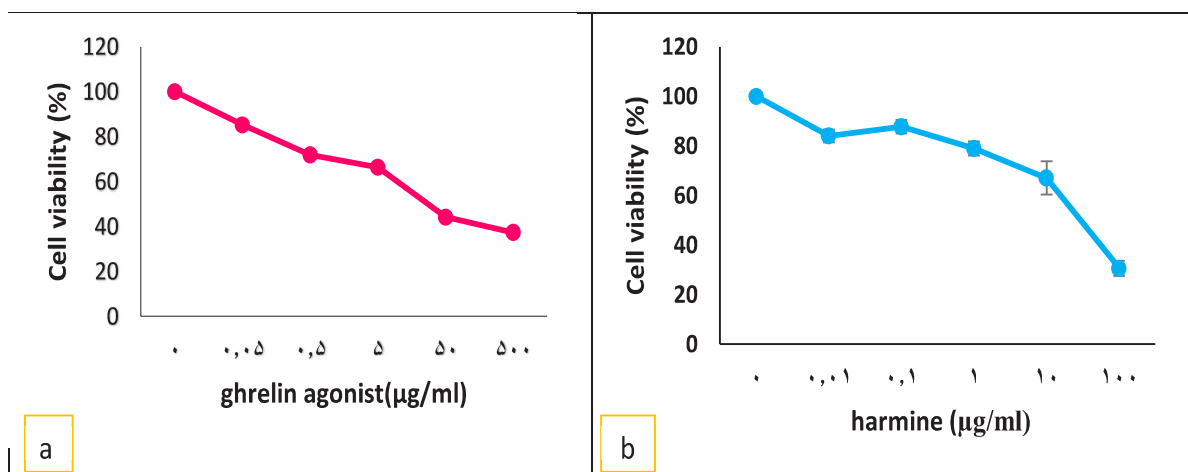
تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر روی میزان بقاء سلول‌ها در لاین سلولی HT1080

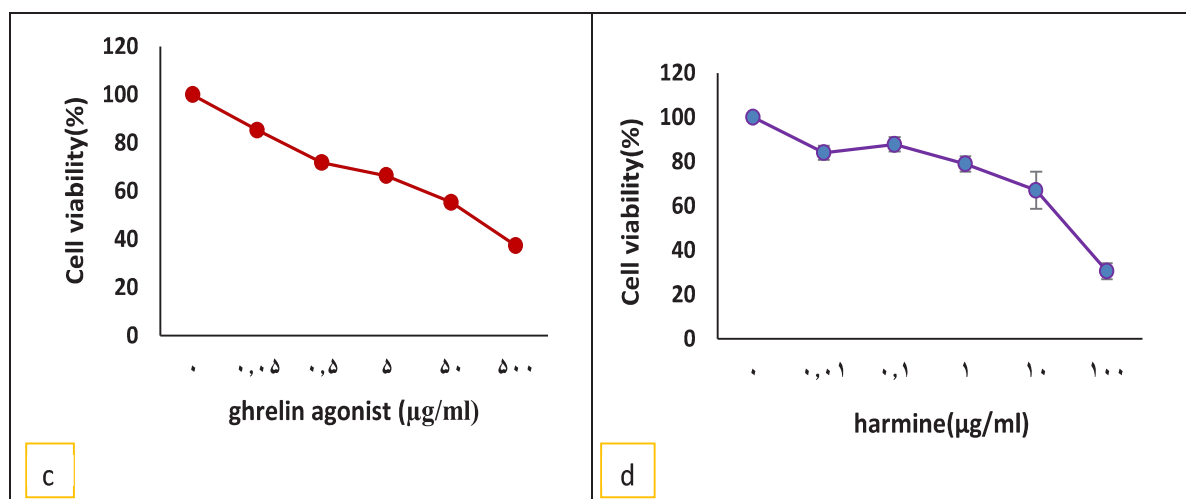
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان بقاء در سلول‌های این لاین سلولی تحت تیمار با دوز $500 \mu\text{g/ml}$ آگونیست گرلین به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر دوزها بسیار کاهش

یافته است ($P \geq 0.001$). درصد بقاء سلولی در دوز $500 \mu\text{g/ml}$ اگرچه نسبت به دوز $500 \mu\text{g/ml}$ بیش‌تر بود اما با این حال نسبت به دوزهای پایین‌تر کم‌تر بود ($P \geq 0.001$). سلول‌ها در دوز $0.5 \mu\text{g/ml}$ بالاترین میزان بقاء را داشتند. IC_{50} آگونیست گرلین در این لاین سلولی مشابه با لاین PANC-1 بود. در کل نتایج حاکی از این بود که آگونیست گرلین با افزایش دوز، میزان بقاء سلولی را متأثر ساخته و اثرهای کشندگی بالایی دارد (شکل ۱، نمودار c).

تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر روی میزان بقاء سلول‌ها در لاین سلولی HT1080

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان بقاء در سلول‌های این لاین سلولی تحت تیمار با دوز $100 \mu\text{g/ml}$ هارمین به طور معنی‌داری نسبت به سایر دوزها کاهش یافته است ($P \geq 0.001$). بقاء سلولی در دوزهای $10 \mu\text{g/ml}$ و 1 تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P \geq 0.05$) و اگرچه نسبت به دوز 100 بالاتر بود ولی نسبت به دوزهای پایین‌تر، بقاء کم‌تر بود ($P \geq 0.001$). سلول‌ها در دوز $0.1 \mu\text{g/ml}$ و $0.01 \mu\text{g/ml}$ بالاترین میزان بقاء را داشتند و این دو دوز تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند. IC_{50} هارمین نیز در این لاین سلولی مشابه با لاین سلولی PANC-1 بود. در کل نتایج حاکی از این بود که هارمین با افزایش دوز، میزان بقاء سلولی را متأثر ساخته و اثرهای کشندگی بالایی دارد (شکل ۱، نمودار d).





شکل ۱- (a) نتایج تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر میزان بقای سلول‌های لاین سلولی پانکراس (PANC-1). در این نمودار میزان بقای سلول‌های لاین PANC-1 با دوزهای (μg/ml) ۰/۰۵، ۰/۵، ۵، ۵۰ و ۵۰۰ آگونیست گرلین نشان داده شده است. (b) نتایج تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر میزان بقای سلول‌های لاین سلولی پانکراس (PANC-1). در این نمودار میزان بقای سلول‌های لاین PANC-1 با دوزهای (μg/ml) ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ هارمین نشان داده شده است. (c) نتایج تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر میزان بقای سلول‌های لاین سلولی HT1080. در این نمودار میزان بقای سلول‌های لاین HT1080 با دوزهای (μg/ml) ۰/۰۵، ۰/۵، ۵، ۵۰ و ۵۰۰ آگونیست گرلین نشان داده شده است. (d) نتایج تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر میزان بقای سلول‌های لاین سلولی HT1080. در این نمودار میزان بقای سلول‌های لاین HT1080 با دوزهای (μg/ml) ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ هارمین نشان داده شده است. در همه نمودارها؛ سطح معنی‌داری ($P \leq 0.05$) و داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده است و تیمار با هر دوز با سه تکرار صورت گرفته است.

ها بالاترین میزان بقا را داشتند کم‌ترین میزان ترشح انسولین مشاهده گردید (شکل ۲، نمودار b).

تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر میزان ترشح انسولین در لاین سلولی PANC-1

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاهش معنی‌داری در میزان ترشح C - پپتید توسط سلول‌ها، در دوز (۵۰ μg/ml) و ۵) نسبت به دوزهای پایین‌تر وجود دارد ($P \geq 0.001$) و هم-چنین بین این دو دوز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ترشح C - پپتید در دوزهای ۰/۵ و ۰/۰۵ μg/ml در بالاترین میزان بود و بین این دو دوز نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طوری‌که نتایج نشان داد افزایش ترشح C - پپتید به طور وابسته به دوز کاهش یافته است (شکل ۲، نمودار c).

تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر میزان ترشح انسولین در لاین سلولی PANC-1

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان C - پپتید ترشح شده توسط سلول‌ها، در دوز (۱۰ μg/ml) نسبت به دوزهای دیگر وجود دارد

تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر میزان ترشح انسولین در لاین سلولی PANC-1

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان ترشح انسولین توسط سلول‌ها، با افزایش دوز یک روند نزولی طی می‌کند. این کاهش ترشح انسولین در دوزهای ۵۰ و ۵۰ μg/ml تفاوت معنی‌داری با هم نشان نداد اما در مقایسه با دوزهای پایین‌تر، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P \geq 0.05$). هم-چنین تفاوت معنی‌داری در ترشح انسولین بین دوزهای (۰/۵ و ۰/۰۵ μg/ml) مشاهده نگردید (شکل ۲، نمودار a).

تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر میزان ترشح انسولین در لاین سلولی PANC-1

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان ترشح انسولین توسط سلول‌ها، با افزایش دوز یک روند صعودی طی می‌کند. اگرچه این افزایش ترشح انسولین در دوزهای ۱۰ و ۱ μg/ml تفاوت معنی‌داری با هم نشان نداد اما در مقایسه با دوزهای پایین‌تر، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P \geq 0.01$). به‌طوری‌که نتایج نشان داد در دوز ۰/۰۱ μg/ml که سلول-

($P \geq 0.001$). ترشح c - پپتید در دوز $1 \mu\text{g/ml}$ نیز تفاوت معنی داری با دوزهای پایین تر نشان داد ($P \geq 0.05$). به -طوری که نتایج نشان داد افزایش ترشح c - پپتید به طور وابسته به دوز افزایش یافته است اگرچه که تحریک سلول ها با دوزهای کم هارمین تأثیری در افزایش ترشح c - پپتید نشان نداد (شکل ۲، نمودار d).

تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر غلظت گلوکز درون سلولی در لاین سلولی HT1080

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در دوز ($50 \mu\text{g/ml}$) میزان غلظت داخل سلولی گلوکز کاهش یافته است و اختلاف معنی داری نسبت به دوز ($5 \mu\text{g/ml}$) وجود دارد ($P \geq 0.01$). غلظت گلوکز درون سلولی در دوز ($5 \mu\text{g/ml}$) نسبت به دوز ($0.5 \mu\text{g/ml}$) ($P \geq 0.001$) و نیز در دوز ($0.5 \mu\text{g/ml}$) نسبت به دوز ($0.05 \mu\text{g/ml}$) ($P \geq 0.05$) کم تر بود که نشان دهنده این است که با افزایش دوز آگونیست گرلین، غلظت گلوکز درون سلولی کاهش می یابد (شکل ۲، نمودار e).

تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر غلظت گلوکز درون سلولی در لاین سلولی HT1080

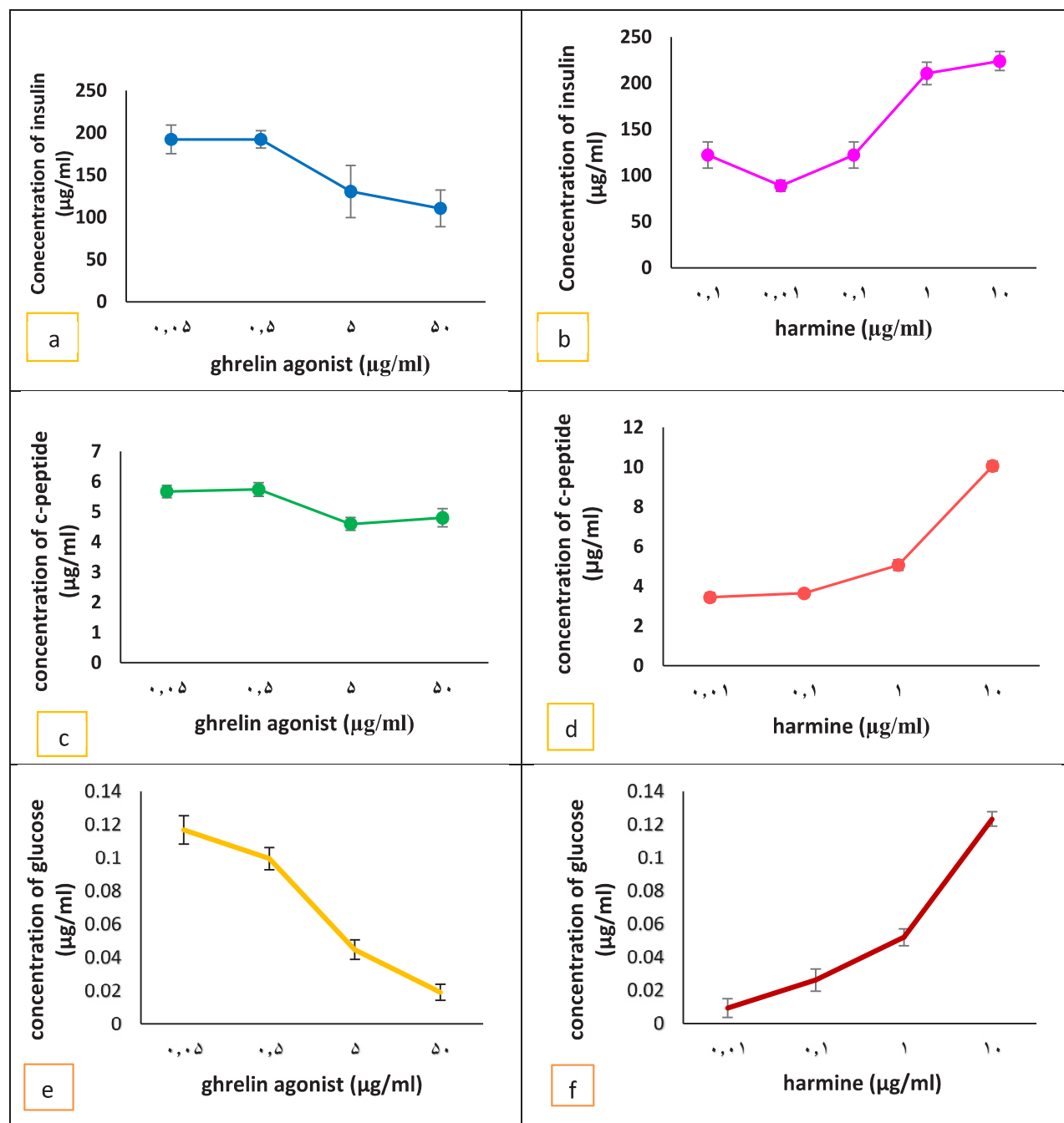
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اختلاف معنی داری در غلظت گلوکز درون سلولی، در دوز ($10 \mu\text{g/ml}$) نسبت به دوزهای پایین تر وجود دارد ($P \geq 0.001$). این اختلاف معنی دار در غلظت گلوکز درون سلولی در دوز ($1 \mu\text{g/ml}$) نسبت به دوز ($0.1 \mu\text{g/ml}$) ($P \geq 0.01$) و در دوز ($0.1 \mu\text{g/ml}$) نسبت به دوز ($0.01 \mu\text{g/ml}$) نیز مشاهده گردید ($P \geq 0.05$). نتایج حاکی از آن است که با افزایش دوز هارمین غلظت گلوکز درون سلولی افزایش می یابد (شکل ۲، نمودار f).

بحث

در این مطالعه اثرهای وابسته به دوز هارمین بر ترشح انسولین و c - پپتید در رده سلولی PANC-1 بررسی گردید زیرا تومورهای تولید کننده انسولین که از جزایر لانگرهانس پانکراس بعضی انسان ها جداسازی می شوند برای مطالعه بیوسنتز انسولین منحصر به فرد هستند و به طور

عمده شامل سلول های بتا بوده و از بافت آسینار اطراف جدا شده اند (۲۴). با توجه به این که بتا کاربولین ها (هم چون هارمین) ترکیب های سمی هستند لذا لازم بود تا قبل از تیمار رده های سلولی PANC-1 و HT1080 با هارمین؛ ابتدا آزمون سمیت سلولی (MTT) صورت گیرد. همان طور که نتایج ما نشان داد (شکل ۱) ارتباط معنی داری در بین دوزهای اعمال شده هارمین و میزان سمیت سلولی وجود داشت. آگونیست گرلین نیز در بالاترین مقدار خود در هر دو رده سلولی، اثرهای توکسیسته نشان داد و منجر به کاهش بقاء سلولی گردیده بود. پژوهش صورت گرفته ای توسط Chen و همکارانش در قبل نشان داده بود که آلکالوئیدهای P.harmala هم چون هارمین و هارمالین بر روی خطوط سلولی پرومیلوسیتیک انسانی (سلول های HL60) اثرهای سیتواستاتیک داشته و رشد سلولی را متوقف می کنند. افزون بر این بعضی از مشتقات هارمین در شرایط *in vitro* سیتوتوکسیتی و آپوپتوز را القاء می کنند (۲۵). در مطالعه حاضر نیز اثرهای سیتوتوکسیک هارمین و کاهش بقاء سلول ها در لاین PANC-1 و HT1080 به صورت وابسته به افزایش دوز، مشاهده گردید. مکانیسم پیشنهاد شده در مطالعه *in vitro* انجام شده توسط Geng و همکارانش این بود که هارمین و مشتقات آن باعث شکست DNA یا مهار توپوایزومراز ۱ و ۲ می شوند (۲۶).

از سوی دیگر، مطالعه Horwitz و همکارانش نشان داده است که در شرایط *in vitro*، انسولین و c - پپتید در مقادیر مساوی از جزایر لانگرهانس ترشح می شوند در حالی - که در جریان گردش خون محیطی غلظت های مولار c - پپتید به طور قابل توجهی بالاتر از غلظت انسولین هستند (۲۷). در مطالعه حاضر، هارمین در محدوده غلظتی $\mu\text{g/ml}$ ۱ تا ۱۰ منجر به افزایش ترشح انسولین و c - پپتید شده بود و آگونیست گرلین در همین محدوده یعنی غلظت ($5 \mu\text{g/ml}$) منجر به کاهش ترشح انسولین و c - پپتید شده بود. مطالعه ها نشان داده اند که به لحاظ مولکولی؛ آن دسته از ژن های سلول های بتا که در تشخیص گلوکز، ترشح انسولین و رونویسی ژن انسولین درگیرند؛ به طور مستقیم توسط PPAR- γ تنظیم می شوند (۲۸) و هارمین یک تنظیم



شکل ۲. (a) نتایج تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر ترشح انسولین در لاین سلولی PANC-1؛ در این نمودار میزان ترشح انسولین توسط سلول های سلول های لاین PANC-1 با دوزهای (0.05، 0.5، 5، 50 µg/ml) آگونیست گرلین نشان داده شده است. (b) نتایج تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر ترشح انسولین در لاین سلولی PANC-1؛ در این نمودار میزان ترشح انسولین توسط سلول های سلول های لاین PANC-1 با دوزهای (0.01، 0.05، 0.1، 1، 10 µg/ml) هارمین نشان داده شده است. (c) نتایج تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر ترشح c - پپتید در لاین سلولی PANC-1؛ در این نمودار میزان c - پپتید توسط سلول های لاین PANC-1 با دوزهای (0.05، 0.5، 5، 50 µg/ml) آگونیست گرلین نشان داده شده است. (d) نتایج تأثیر دوزهای مختلف هارمین بر ترشح c - پپتید توسط سلول های لاین PANC-1؛ در این نمودار میزان c - پپتید توسط سلول های لاین PANC-1 با دوزهای (0.01، 0.05، 0.1، 1، 10 µg/ml) هارمین نشان داده شده است. (e) نتایج تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر غلظت گلوکز درون سلولی در لاین-سلولی HT1080؛ در این نمودار غلظت گلوکز داخل سلولی توسط سلول های لاین HT1080 با دوزهای (0.05، 0.5، 5، 50 µg/ml) آگونیست گرلین نشان داده شده است. (f) نتایج تأثیر دوزهای مختلف آگونیست گرلین بر غلظت گلوکز درون سلولی در لاین سلولی HT1080؛ در این نمودار غلظت گلوکز داخل سلولی توسط سلول های لاین HT1080 با دوزهای (0.01، 0.05، 0.1، 1، 10 µg/ml) هارمین نشان داده شده است. در همه گروه ها، تیمار با هر دوز با سه تکرار صورت گرفته است، سطح معنی داری ($P \leq 0.05$) و داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده است.

کننده بیان ژن $\text{PPAR-}\gamma$ به طور ویژه سلول است (۲۹). بنابراین این احتمال وجود دارد که در این مطالعه، هارمین با اثر $\text{PPAR-}\gamma$ چنین اثرهایی را اعمال کرده باشد. هم- چنین همسو با نتایج این مطالعه در مورد اثرهای سرکوب کننده آگونیست گرلین بر ترشح انسولین و c - پپتید، مطالعه Zhao و همکارانش نشان می دهد که گرلین اگزوزن، ترشح انسولین ناشی از گلوکز و ناپدید شدن گلوکز را در افراد سالم کاهش می دهد. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که گرلین اندوژن در فیزیولوژی ترشح انسولین نقش دارد و آنتاگونیست گرلین می تواند عملکرد سلول- های بتا را بهبود بخشد (۳۰). نتایج مطالعه Dezaki و همکارانش حاکی از آنست که گرلین به طور مستقیم سلول های بتا را مهار می کند. این اثرهای اینسولینواستاتیک گرلین تا حدودی از طریق اثرهای مستقیم آن بر سلول های بتا صورت می گیرد (۳۱). هم- چنین مطالعه Ikezaki و دیگر همکارانش نشان داده است که سطوح پلاسمایی پایین گرلین با افزایش سطوح انسولین مرتبط است. این رابطه منفی بین سطوح پلاسمایی گرلین و انسولین ممکن است تاحدی توسط مهار ترشح انسولین توسط گرلین توضیح داده شود (۳۲). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از این بود که در دوزهای بالاتر گرلین ترشح انسولین کاهش می یابد و در دوزهای متوسط این میزان بیش تر است. مطالعه های انجام شده بر روی جزایر جداسازی شده نیز نشان داده اند که گرلین به طور وابسته به دوز ترشح انسولین را سرکوب می کند و مطابق با پژوهش هایی است که اظهار کرده اند گرلین ترشح انسولین را در جزایر لانگرهانس استاتیک (۳۳) و در لاین سلولی Min-6 سرکوب می کند (۳۴). بنابراین با توجه به این که در مطالعه حاضر هارمین منجر به تحریک ترشح انسولین و c - پپتید از سلول های بتا شده است و اثرهایی عکس اثرهای آگونیست گرلین را در محدوده غلظتی مشابه نشان داده است؛ می تواند در مطالعه های آتی به عنوان یک مهار کننده ترشح گرلین و نیز آنتاگونیست گرلین مورد توجه باشد، اگرچه مطالعه های بیش تری نیاز است.

افزایش غلظت درون سلولی گلوکز در سلول های رده سلولی HT1080 تحت تیمار با دوزهای بالای هارمین در این مطالعه هم راستا با اثر تحریکی وابسته به دوز هارمین بر ترشح انسولین و c - پپتید در رده سلولی PANC-1، بود. به طوری که مطالعه ها نشان داده اند تحریک ترشح انسولین توسط گلوکز با افزایش سطوح داخل سلولی ATP توأم است. در محیط داخل سلولی، افزایش سطوح ATP منجر به بسته شدن کانال های پتاسیمی حساس به (ATP KATP) می شود در نتیجه غشاء دپلاریزه شده و قادر است کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ را باز کند و در ادامه با ورود جریان کلسیم خارج سلولی ترشح انسولین القاء می گردد (۳۵).

نتیجه گیری

با توجه به این که هارمین به طور وابسته به دوز منجر به افزایش ترشح انسولین و c - پپتید و نیز افزایش گلوکز داخل سلولی شده است می تواند به عنوان دارویی در دیابت انسانی، با مکانیسم تحریک ترشح انسولین از سلول های بتا مطرح باشد اگرچه با در نظر گرفتن سمیت وابسته به دوزی که بر بقاء جمعیت سلولی اعمال کرده است باید جنبه های بالینی و عوارض جانبی آن نیز بررسی شود. از سوی دیگر، با توجه به عملکردی عکس عملکرد آگونیست گرلین از سوی هارمین، شاید بتوان آن را به طور بالقوه به- عنوان مهارکننده و سرکوبگر ترشح گرلین مطرح نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می دانند از زحمات مرکز تحقیقات رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات برای انجام این مطالعه تشکر کنند.

- 1- Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, et al. Blockade of Pancreatic Islet-Derived Ghrelin Enhances Insulin Secretion to Prevent High-Fat Diet-Induced Glucose Intolerance. *Diabetes* [Internet]. 2006 Dec 1;55(12):3486 LP – 3493. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/12/3486.abstract>
- 2- Kulkarni RN, RoPer MG, Dahlgren G, Shih DQ, Kauri LM, Peters JL, et al. Islet secretory defect in insulin receptor substrate 1 null mice is linked with reduced calcium signaling and expression of sarco(endo)Plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)-2b and -3. *Diabetes*. 2004 Jun;53(6):1517–25.
- 3- Thong KY, McDonald TJ, Hattersley AT, Blann AD, Ramtoola S, Duncan C, et al. The association between PostPrandial urinary C-Peptide creatinine ratio and the treatment response to liraglutide: a multi-centre observational study. *Diabet Med*. 2014 Apr;31(4):403–11.
- 4- Rubenstein AH, Clark JL, Melani F, Steiner DF. Secretion of Proinsulin C-Peptide by Pancreatic β Cells and its Circulation in Blood. *Nature* [Internet]. 1969 Nov 15;224:697. Available from: <http://doi.org/10.1038/224697a0>
- 5- Briggs D, Andrews Z. A Recent Update on the Role of Ghrelin in Glucose Homeostasis. Vol. 7, *Current diabetes reviews*. 2011. 201–207 P.
- 6- Kuhtreiber WM, Washer SLL, Hsu E, Zhao M, Reinhold P 3rd, Burger D, et al. Low levels of C-Peptide have clinical significance for established Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2015 Oct;32(10):1346–53.
- 7- Saad MF, Bernaba B, Hwu C-M, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, et al. Insulin regulates Plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3997–4000.
- 8- Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the Pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol*. 2002;14(7):555–60.
- 9- Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, PaPotti M, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue Produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):5083.
- 10- Salehi A, de la Cour CD, Håkanson R, Lundquist I. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated Pancreatic islets and intact mice. *Regul PePt*. 2004;118(3):143–50.
- 11- Sun Y, Asnicar M, Smith RG. Central and Peripheral roles of ghrelin on glucose homeostasis. *Neuroendocrinology*. 2007;86(3):215–28.
- 12- Van Der Lely AJ, TschoP M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*. 2004;25(3):426–57.
- 13- Kim M-S, Yoon C-Y, Park K-H, Shin C-S, Park K-S, Kim S-Y, et al. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *NeuroReport*. 2003;14(10):1317–20.
- 14- Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *NeuroPeptides*. 2010;44(2):133–8.
- 15- Chen X, Ge Y-L, Jiang Z-Y, Liu C-Q, DePoortere I, Peeters TL. Effects of ghrelin on hypothalamic glucose responding neurons in rats. *Brain Res*. 2005;1055(1–2):131–6.
- 16- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, SaPer CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2006;494(3):528–48.
- 17- Solomon A, De Fanti BA, Martinez JA. The nucleus tractus solitarius (NTS) Participates in Peripheral ghrelin glucostatic hunger signalling mediated by insulin. *NeuroPeptides*. 2006;40(3):169–75.

- 18- Heijboer AC, Pijl H, Van den Hoek AM, Havekes LM, Romijn JA, Corssmit EPM. Gut-brain axis: regulation of glucose metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2006;18(12):883–94.
- 19- Herraiz T, ChaParro C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as Potent and reversible inhibitors. *Biochem BioPhys Res Commun*. 2005 Jan;326(2):378–86.
- 20- Miralles A, Esteban S, Sastre-Coll A, Moranta D, Asensio VJ, García-Sevilla JA. High-affinity binding of β -carbolines to imidazoline I2B receptors and MAO-A in rat tissues: norharman blocks the effect of morphine withdrawal on DOPA/noradrenaline synthesis in the brain. *Eur J Pharmacol*. 2005;518(2–3):234–42.
- 21- Pimpinella G, Palmery M. Interaction of β -carbolines with central dopaminergic transmission in mice: structure-activity relationships. *Neurosci Lett*. 1995;189(2):121–4.
- 22- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High Constitutive Signaling of the Ghrelin Receptor—Identification of a Potent Inverse Agonist. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2003 Nov 1;17(11):2201–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/me.2003-0069>
- 23- Ding Y, He J, Huang J, Yu T, Shi X, Zhang T, et al. Harmine induces anticancer activity in breast cancer cells via targeting TAZ. *Int J Oncol* [Internet]. 2019;54(6):1995–2004. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4777>
- 24- Steiner DF, Oyer PE. The biosynthesis of insulin and a Probable Precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1967 Feb;57(2):473–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed/16591494>
- 25- Chen Q, Chao R, Chen H, Hou X, Yan H, Zhou S, et al. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure- activity relationship analysis. *Int J cancer*. 2005;114(5):675–82.
- 26- Geng X, Ren Y, Wang F, Tian D, Yao X, Zhang Y, et al. Harmines inhibit cancer cell growth through coordinated activation of apoptosis and inhibition of autophagy. *Biochem BioPhys Res Commun* [Internet]. 2018;498(1):99–104. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/Pii/S0006291X18304613>
- 27- Horwitz DL, Starr JI, Mako ME, Blackard WG, Rubenstein AH. Proinsulin, insulin, and C-Peptide concentrations in human Portal and Peripheral blood. *J Clin Invest* [Internet]. 1975 Jun;55(6):1278–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed/1133173>
- 28- Gupta D, Kono T, Evans-Molina C. The role of Peroxisome Proliferator-activated receptor γ in Pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 2010 Dec;12(12):1036–47. Available from: <https://Pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20977574>
- 29- Waki H, Park KW, Mitro N, Pei L, Damoiseaux R, Wilpitz DC, et al. The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPARgamma expression. *Cell Metab*. 2007 May;5(5):357–70.
- 30- Zhao T-J, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(16):7467–72.
- 31- Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, et al. Endogenous ghrelin in Pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca^{2+} signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*. 2004 Dec;53(12):3142–51.
- 32- Ikezaki A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, Miura N, Matsuoka H, et al. Fasting Plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3408–11.

- 33- Tsubota Y, Owada-Makabe K, Yukawa K, Maeda M. HyPotensive effect of des-acyl ghrelin at nucleus tractus solitarii of rat. *NeurorePort*. 2005 Feb;16(2):163–6.
- 34- Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K. Effects of ghrelin and other neuroPeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas*. 2003 Aug;27(2):161–6.
- 35- Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of Phase control and amPlitude modulation. *Diabetologia*. 2009 May;52(5):739–51.

