Physiology and Pharmacology, 13(4), 386 - 396
Winter 2010 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The Effect of Intravascular Injection of Ghrelin on the Mean Plasma Concentrations of Insulin and ACTH in Immature Camels Fed with Diets Containing Different Levels of their Energy Requirements

Roshanak Rashedi*, Homayoon Khazali

Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti Univercity, Tehran, Iran

Received: 3 Aug 2009 **Accepted: 16 Jan 2010**

Abstract

Introduction: Ghrelin is a peptide hormone secreted from the stomach with both endocrine and paracrine effects. Ghrelin and its mRNA as well as growth hormone (GH) secretagogue receptor mRNAs are expressed in the pancreas and islet cells and regulate insulin release. Also the immounoreactivity of ghrelin is proved to be high in the hypothalamus and parts of the brain responsible for the regulation of the HPA axis. However, the effect of ghrelin on insulin and ACTH secretion before puberty in semi ruminant animals has never been examined. Therefore the purpose of the following research was to determine the effect of ghrelin on insulin and ACTH secretion before puberty in camels.

Methods: In this investigation, 12 camels were randomly divided into two groups. Animals in each group were fed with either 50% or 100% energy content in diet for 2 weeks. After 2 weeks camels received 8 μg ghrelin/Kg body weight into their jugular vein for 4 days. Blood samples were collected from jugular vein 20 minutes after injection of ghrelin. Blood plasma was assayed for plasma insulin and ACTH concentrations by a RIA method.

Results: Injection of ghrelin in 50% and 100% dietary energy intake significantly decreased the mean plasma concentrations of insulin and increased ACTH secretion in prepubertal camels.

Conclusion: The results of these experiments showed that ghrelin's reducing effect on insulin secretion and its increasing effect on ACTH in prepubertal camels in starvation condition depends on the presence of glucose in their bodies.

Key words: Ghrelin, Insulin, Adernocorticotropin hormone (ACTH), immature camel

*Corresponding author e-mail: Roshanak.Rashedi@gmail.com

Available online @:www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۴)، ۳۸۶ – ۳۹۶
زمستان ۱۳۸۸

فیزیولوژی و فارماکولوژی

تأثیر تزریق درون وریدی گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی انسولین و ACTH در شترهای نابالغ تغذیه شده با سطوح مختلف انرژی

روشنک راشدی*، همایون خزعلی
۱. گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۱۲ مرداد ۸۸ پذیرش: ۲۶ دی ۸۸

چکیده

مقدمه: گرلین یک هورمون پپتیدی مترشحه از معده با اثرات مختلف پاراکرینی و آ ندوکرینی می باشد. گرلین وmRNA ی آن مانند رسپتور هورمون محرک رشد در پانکراس وسلولهای ایسلیت بیان شده و ترشح انسولین را تنظیم می کند. هم چنین مطالعات ایمنورادیواکتیو برروی گرلین، وجود میزان زیادی از این نوروترانسمیترا در هیپوتالاموس وقسمتهایی از مغز که کنترل کننده ی محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–آدرنال (HPA) هستند ثابت کرده است. از آنجا که تاکنون آزمایشات مبنی بر اثر گرلین بر ترشح هورمونهای انسولین و ACTH در حیوانات شبه نشخوارکننده در مرحله ی قبل از بلوغ انجام نشده است، بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر گرلین برروی ترشح هورمونهای مذکور در شتر های نابالغ می باشد.

روش‌ها: در این تحقیق ۱۲ شتر بطور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. حیوانات درگروه یک به مدت دو هفته در رژیم غذایی ۱۰۰٪ وحیوانات گروه دو به مدت دو هفته در رژیم غذایی ۵۰% تغذیه شدند بعد از دو هفته، شترهای هر گروه ۸ μ g/ kg BW به مدت چهار روز از طریق ورید وداج دریافت کردند. نمونه های خونی از تمام حیوانات ۲۰ دقیقه بعد از تزریق گرلین از رگ وداج جمع آوری گردیده و پلاسماهای خونی، جهت تعیین غلظت انسولین و ACTH بوسیله ی روش رادیو ایمنو اسی (RIA) مورد سنجش قرار گرفتند.

یافته‌ها: تزریق گرلین در شترهای نابالغ در رژیم های غذایی حاوی ۵۰٪ و۱۰۰٪ انرژی بترتیب اثر کاهشی قابل ملاحظه ای برمیانگین غلظت پلاسمایی انسولین و اثر افزایشی معنی داری بر ترشح ACTH داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می د هد که اثر کاهشی گرلین بر ترشح هورمون انسولین و اثر افزایشی آن در ترشح ACTH در شترهای نابالغ تحت شرایط گرسنگی، به وجود گلوکز در بدن بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی: گرلین، هورمون انسولین، هورمون محرک فوق کلیوی(ACTH) ، شتر نابالغ

مقدمه

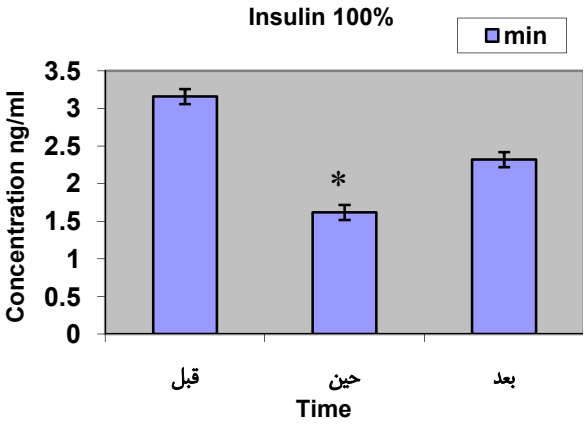
در سال ۱۹۹۹ گروه جدیدی از نوروپپتید ها با نام گرلین برای اولین بار از معده ی رت جدا شد (۲۳)، گرلین یک پپتید اورکسیژنیک (اشتها آور) ۲۸ آمینو اسیدی است که عمدتاً از سلولهای آندوکرینی X-A like cells معده ترشح می شود (۲۴،۱۲).

گرلین یک لیگاند درونی برای رسپتور هورمون محرک رشد بوده (۳،۲) و دارای اثرات مختلفی پار اکرینی و آندوکرینی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Roshanak.Rashedi@gmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

می باشد که تحریک ترشح هورمون GH و ACTH، افزایش اشتها، اثر روی بالانس انرژی و متابولیسم کربو هیدراتها برخی از این اثرات مهم گرلین در بدن می باشد (۴). میزان گرلین در پلاسمای خونی قبل از خوردن غذا افزایش یافته وبه هنگام گرسنگی ترشح آن تحریک و تقویت می شود.

در فرآیند جذب غذا سیستمی از سیگنالهای فیزیولوژیکی شامل مکانیسم های فیدبکی مثبت و منفی اثر می گذارد، این فرآیند ها بو سیلهٔ سیستم های نورو اندوکرینی شامل سیگنالهای محیطی از جمله گرلین و لپتین که اثر متقابل پایداری با سیگنال های سیستم عصبی مرکزی (CNS) دارند تنظیم می شود (۸). در این سیستم نورو اندوکرینی هم چنین نورو پپتیدY، AgRP، پرواپیوملانوکورتین (POMC) و هورمون محرک ملانوسیت (α-MSH) دخیل می باشند. مطالعات اخیر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و روش های ایمنوهیستوشیمی برهم کنش بین نورون های بیان کننده ی گرلین و نورون های بیان کننده ی نورو پپتید Y و AgRP را در هسته ی کمانی هیپوتالاموس (ArcN) ثابت کرده و هم چنین فراوانی نورون های گرلین را در ArcN گزارش دادند (۱۸،۵). افزایش بیان نورون های تولید کننده ی گرلین در شرایط گرسنگی در هسته ی کمانی هیپو تالاموس به صورت پیش سیناپسی باعث آزاد شدن این پپتید های اشتهاآور و افزایش ترشح آنها می شود، بطوریکه با افزایش بیان این نورو پپتیدها و اثر افزایشی آنها بر نوروترانسمیتر GABA اشتها تحریک شده و شرایط برای افزایش جذب غذا ایجاد می شود، به همین دلیل این نورو پپتیدها، نورون های اورکسیژنیک (اشتها آور) نامیده می شوند (۲۶). در مقابل نورون های تولید کنندهٔ POMC نیز، که نه تنها در هیپو تالاموس، بلکه در نواحی مختلف مغز بویژه ساقه ی مغزی با نورون های تولید کنندهٔ گرلین ارتباطات سیناپسی دارند از آنجا که باعث کاهش اشتها شده و عملکرد گرلین را مهار می کنند جز نورونهای غیر اورکسیژنیک (مهار کننده ی اشتها) محسوب می شوند (۱۶). گرلین به دلیل ترشح از بافتهای مختلف، دارای اثرات مختلف پاراکرینی و آندوکرینی در سطح غدد می باشد. بطور مثال ارتباطات سیناپسی بین پایانه های آکسونی حاوی گرلین با آکسونهای حاوی هورمون آزاد کنندهٔ کورتیکوتروپین (CRH) در هسته ی پاراونتریکولار هیپوتالاموس(PVN) و بیان رسپتورهای گرلین (GHS-R) در سلولهای کورتیکوتروف مترشحه ی CRH نقش تنظیم کنندهٔ گرلین را در ترشح هورمونهای اثر گذارنده بر غده ی فوق کلیه نشان می دهد (۱۹،۱۴). مطالعات اخیر نشان دهندهٔ اینست که گرلین و رسپتور GHS-R تعدیل کنندهٔ پاسخهای محور HPA به استرس، و ضعیت تغذیه و فرایندهای متابولیکی از طریق ترشح هورمونهای CRH وACTH و کورتیزول می باشد. در زمینه ی عملکرد گرلین به عنوان هورمون تنظیم کننده ی ترشح CRH و ACTH مطالعات زیادی صورت گرفته است، که نتایج حاصل از این مطالعات در آزمایشات مختلف حاکی از اثر افزایشی تزریق درون رگی گرلین بر ترشح هورمونهای CRH و ACTH و افزایش فعالیت محور HPA در شرایط invitro در رتها (۳۰،۱۹)، اثر تحریکی تزریق درون رگی GHS (لیگاند گرلین) در انسان بر فعالیت محور HPA و افزایش ترشح هورمونهای کورتیزول و ACTH درسطح هیپوتالاموس (۱۹) و هم چنین اثر افزایشی تزریق درون وریدی گرلین بر ترشح ACTH در سلولهای کورتیکوتروف تومورال در انسان و سلولهای کورتیکوتروف نرمال در رتها در شرایط invitro می باشد (۱۵). از طرف دیگر شناسایی سلولهای بیان کننده ی گرلین در پانکراس و داشتن رسپتور بروی سلولهای بتا که ترشح کنندهٔ انسولین هستند، نقش گرلین را در تنظیم ترشح انسولین و متابولیسم کربو هیدرا تها نیز پیشنهاد می کند. مطالعات گسترده نشان داده که گرلین در برخی آزمایشها ترشح انسولین را مهار و در برخی دیگر ترشح آن را افزایش می دهد. علت این تناقض ها هنوز بدرستی مشخص نشده اما احتمال می رود که بدلیل تفاوتهای بین گونه ای ویا بخاطر شرایط آزمایش باشد (۳۳،۳۲). مطالعات گسترده نشان داده است که سطوح گرلین و انسولین پلاسما بوسیله ی سطح گلوکز خون تحت تأثیر قرار می گیرد، سطوح بالای گلوکز ترشح گرلین را مهار و ترشح انسولین را تحریک می کند و بالعکس. به همین دلیل سطح گلوکز پلاسما در آزمایشات مربوط به اثرات گرلین بر ترشح هورمونهای پانکراسی اهمیت زیادی دارد، بطوریکه نتایج حاصل از آزمایشات مختلف انجام شده در زمینه ی عملکرد گرلین به عنوان هورمون تنظیم کننده ی ترشح انسولین، اثر کاهشی این هورمون را بر غلظت پلاسمایی هورمون انسولین در انسان، رت و خرگوش در شرایط



شکل۱- اثرتزریق درون وریدی (۸ µg/kg BW) گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون انسولین در سه دوره ی زمانی مختلف، دوره ی زمانی قبل از تزریق (روزهای ۱تا ۴ آزمایش)، دوره ی حین تزریق(روزهای۵ تا۸ آزمایش)، دورهٔ زمانی بعداز تزریق (روزهای ۹ تا۱۲ آزمایش) در شترهای نابالغی که تحت رژیم ۱۰۰ درصد انرژی تغذیه شده‌اند.
مقادیر به صورت Mean ± SEM بیان شده‌اند ($p<0.05$ *).

هیپوگلیسمی نشان داده است (۱۳،۱۱،۱۰). هم چنین اثرات افزایشی گرلین بر ترشح انسولین نیز با مطالعات Colombo و همکارانش در سال ۲۰۰۳ گزارش شده که در این آزمایشات گرلین آزاد شدن انسولین را در حضور سطوح بالای گلوکز تحریک کرده و در نهایت منجر به آزاد شدن انسولین از سلولهای بتا می شود (۶).

هرچند اثر گرلین بر ترشح هورمو ن های پانکراسی و فوق کلیوی در رت ها بطور گسترده بررسی شده، اما تاکنون اطلاعات بسیار کمی در زمینهٔ نقش گرلین در تنظیم ترشح انسولین و هورمون ACTH در حیوانات شبه نشخوار کننده وجود دارد. بدین جهت هدف از این تحقیق، تعیین اثر تزریق درون وریدی گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمونهای انسولین و ACTH در شترهای نابالغ یک کوهانه که در رژیمی متفاوت از لحاظ سطح انرژی تغذیه شده اند می باشد.

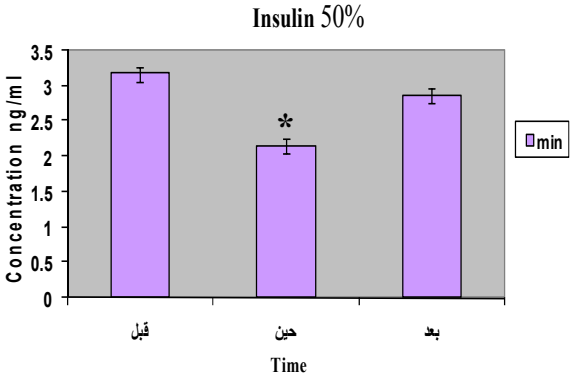
مواد و روش ها

برای انجام این پژوهش از دوازده شتر نابالغ چهار ماهه ی نژاد ترکمن که بطور تصادفی انتخاب شده بودند، استفاده شد. حیوانات قبل از انجام تحقیقات از نظر هر گونه بیماری معاینه شده و در دو گروه در رژیم های غذایی ۵۰٪ و۱۰۰٪ انرژی قرار داده شدند. در مدت آزمایش شترها در داخل گارچ (محل نگهداری شتر) در مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی بافق نگهداری شدند و کلیه شرایط نگهداری، تغذیه وبهداشت برای همه ی شترها بصورت یکسان اعمال شد. همچنین برای این تحقیق از گرلین (sigma, USA) و کیت مخصوص سنجش هورمون انسولین و ACTH (شرکت تابشیارنور، همدان) استفاده شد که اجزا کیتهای استفاده شده عبارتند از : ۱. لوله - های آزمایش کد شده با آنتی بادی های انسولین وACTH ۲. انسولین و ACTH نشاندار شده با I^{125} (tracer) ۳. محلول رقیق کننده تریسر: یک ویال که جهت رقیق سازی معرف تریسر به کار می رود. ۴. استانداردهای انسولین، شامل شش ویال آماده مصرف و استاندارد های ACTH که شامل هفت ویال آماده مصرف می باشند.

در این تحقیق یک تیمار در نظرگرفته شد، حیوانات درگروه یک با رژیم غذایی ۵۰٪ (به مدت ۱۲ ساعت در روز تحت شرایط گرسنگی بصورت یک روز در میان) وحیوانات گروه دو بارژیم غذایی ۱۰۰٪ (به مدت ۲۴ ساعت در روز تحت شرایط گرسنگی بصورت یک روز در میان) به مدت دو هفته تغذیه شدند. بعد از دو هفته با ادامه دادن مراحل رژیم غذایی بصورت روزانه، ابتدا چهار روز (روزهای ۱ تا ۴ آزمایش) فقط عمل خونگیری بدون تزریق گرلین از تمام حیوانات درشرایط گرسنگی انجام شد، در مدت چهار روز بعد یعنی روزهای ۵ تا ۸ آزمایش، حیوانات هر دو گروه 8µg گرلین که بصورت پایلوت با توجه به وزن بدن حیوانات محاسبه گردید به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند، تزریقات گرلین به صورت وریدی، در ساعت ۸ صبح و به وسیله سرنگ cc ۵ و cc ۱۰ و سرسوزن شماره ۲۱ در ورید وداج انجام شد. در روزهای ۹ تا ۱۲ آزمایش نیز به مدت چهار روز فقط عمل خونگیری انجام گردید. نمونه- های خونی جمع‌آوری شده در طی چهار روز قبل از تزریق گرلین (روزهای ۱ تا ۴ آزمایش) و چهار روز بعد تزریق (روزهای ۹ تا ۱۲ آزمایش) به‌عنوان گروههای کنترل محسوب شدند که با نمونه های خونی چهار روز حین تزریق گرلین (روزهای ۵ تا ۸ آزمایش) برای بررسی اثر تزریق گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون انسولین و ACTH مقایسه شدند. نمونه های خونی از تمامی دام ها در مرحله ی تزریق یعنی(روزهای ۵ تا ۸ آزمایش)، ۲۰ دقیقه بعد از تزریق گرلین، (چون نیمه عمر گرلین ۳۰ دقیقه بوده و حداکثر زمان اثر آن

روی غلظت هورمونها ۲۰ دقیقه می باشد) با استفاده از لوله - های خلأ حاوی مواد ضد انعقاد (ونوجکت)، از ورید وداج جمع- آوری و تا زمان سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد درون یخدان نگهداری شدند. نمونه های خونی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در آزمایشگاه مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی بافق، سانتریفیوژ شده و به داخل ویال های شیشه ای درب دار منتقل گردید. پلاسمای نمونه های خونی جداشده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز شدند، اندازه گیری غلظت هورمون انسولین و ACTH نمونه های خونی با استفاده از روش رادیوایمینو اسی و با استفاده از کیت های سنجش هورمون های مذکور و دستگاه شمارشگرگاما انجام شد. مبنای روش رادیوایمینو اسی رقابت بین مولکول‌های انسولین و ACTH موجود در نمونه‌های مورد آزمایش و انسولین و ACTH نشاندار شده با I^{125} برای اتصال به آنتی‌بادی منوکلونال ثابت شده در لوله آزمایش می‌باشد.

در این آزمایش علاوه بر مقایسه رژیم های غذایی مختلف (۵۰ درصد و۱۰۰ درصد)، سه دوره ی آزمایشی قبل از تزریق (روزهای ۱تا ۴ آزمایش)، حین تزریق (روزهای۴ تا ۸ آزمایش) و بعد از تزریق (روزهای ۹ تا ۱۲آزمایش) با یکدیگر مقایسه شدند. کلیه داده ها برای مقایسه میانگین غلظت پلاسمایی هورمونهای انسولین و ACTH در مراحل قبل ، حین و بعد از تزریق گرلین با کمک نرم افزارآماری Spss (نسخه ۱۴) و با استفاده از آزمون آماری repeated measures –ANOVA مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون Dancan استفاده گردید. رسم نمودارها با نرم افزار Excel 2003 انجام شد. داده ها بصورت Mean± SEM بیان شدند و مقادیر $P<0/05$ معنی دار تلقی گردید.



شکل۲- اثرتزریق درون وریدی (۸ µg/kg BW) گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون انسولین در سه دوره ی زمانی مختلف، در شترهای نابالغی که تحت رژیم۵۰ انرژی تغذیه شده‌اند.
مقادیر به صورت Mean ± SEM بیان شده‌اند ($p<0.05$ *).

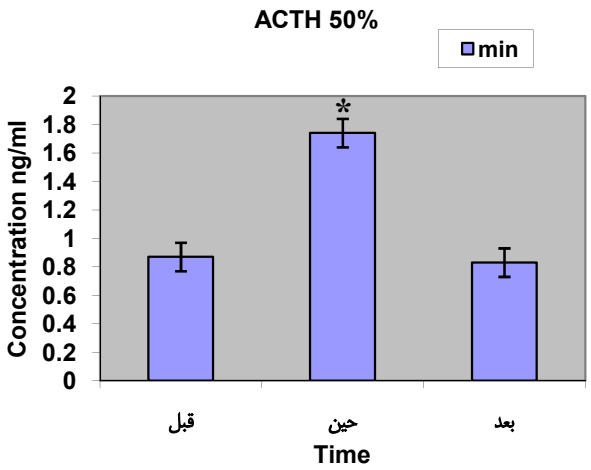
یافته ها

نتایج حاصله از آنالیز داده ها نشان داد که میانگین غلظت هورمون انسولین در پلاسمای خونی شترها دردوره ی حین تزریق (روز های ۵ تا ۸ آزمایش) نسبت به دوره ی قبل از تزریق (روزهای ۱ تا ۴ آزمایش) کاهش پیدا کرده و در دوره ی بعد از تزریق (روزهای ۹ تا ۱۲ آزمایش) با برداشته شدن اثر گرلین مقدار هورمون تقریباً به مقدار اولیه بر می گردد.

کاهش مشاهده شده در غلظت انسولین در رژیم های غذایی ۵۰٪ و۱۰۰٪ بترتیب ۲۵/۷۸٪ و ۲۸/۲۳٪ می باشد که این میزان کاهش معنی دار بوده و در هر دو رژیم غذایی تقریباً یکسان بوده و نشان دهنده ی عدم تاثیر رژیم های غذایی مختلف بر اثرات گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی انسولین می باشد. هم چنین تجزیه و تحلیل داده ها ی بدست آمده از اندازه گیری غلظت های پلاسمایی ACTH بعد از تزریق درون وریدی (۸ µg/kg BW) گرلین درشترهای نابالغ وخون گیری در زمان های متفاوت نشان داد که تزریق گرلین با افزایش در غلظت پلاسمایی ACTH همراه است. افزایش مشاهده شده در غلظت ACTH در رژیم غذایی ۵۰٪ و۱۰۰٪ بترتیب ۵۶/۷۶٪ و۶۴/۸۷٪ می باشد که این میزان افزایش نیز معنی دار بوده و در هر دو رژیم غذایی تقریبا یکسان است.

نتایج مربوط به تزریق وریدی ۸ µg/ kg BW گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون انسولین در رژیم های غذایی ۵۰٪ و۱۰۰٪ در شکل شماره ی ۱و۲ نشان داده شده است، با توجه به اشکال مذکور اختلاف معنی داری بین دو گروه با رژیم های مختلف (۵۰% و۱۰۰ %) از لحاظ کاهش غلظت انسولین وجود ندارد ولی کاهش در مقدار انسولین در مرحله ی حین تزریق گرلین (روز های ۵ تا ۸ آزمایش) با مراحل قبل و بعد دارای اختلاف معنادار می باشد .($p<0.05$) مقادیر به صورت Mean ± SEM بیان شده اند.

هم چنین درشکل شماره۳ و شکل شماره ۴ نشان داده شده

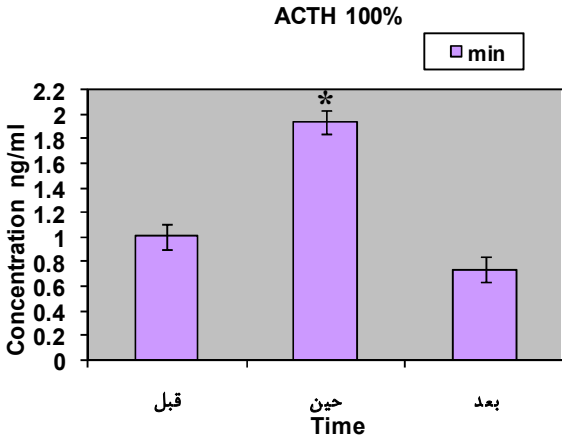


شکل ۳- اثرتزریق درون وریدی (۸ µg/kg BW) گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ACTH در سه دوره ی زمانی مختلف، در شترهای نابالغی که تحت رژیم۵۰ انرژی تغذیه شده‌اند.
مقادیر به‌صورت Mean ± SEM بیان شده‌اند ($p<0.05$ *).

است، تزریق درون رگی گرلین دررژیم های۵۰٪ و۱۰۰٪ اثر افزایشی معنی داری بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ACTH دارد. ($p<0.05$)، مقادیر به صورت Mean ± SEM بیان شده اند.

بحث

گرلین به دلیل اثرات متعددی که بر ترشح انسولین و یا اثر مستقیمی که درسطح پانکراس می گذارد به عنوان یکی از عوامل تنظیم کننده ترشح انسولین و گلوکاگون به ویژه در جوندگان شناخته شده است. نتیجه این بررسی هم مؤثر بودن گرلین را در تنظیم ترشح هورمون انسولین تأییدمی کند. اما در این مطالعه برای اولین بار تاثیر تزریق درون رگی گرلین درحیوانات شبه نشخوارکننده ایی (شترهای نابالغ) که با سطوح مختلف انرژی تغذیه شده بودند بررسی شد. با بررسی های متعدد مشخص شده است که اثر گرلین بر متابولیسم گلوکز و ترشح انسولین اثری کاهنده است،
نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که تزریق وریدی گرلین منجربه کاهش غلظت پلاسمایی انسولین در هر دو رژیم غذایی ۵۰٪ و۱۰۰٪ انرژی می شود، این نتایج با نتایج Edigo و همکارانش درسال ۲۰۰۲ که با تزریق گرلین در رتهایی که ایسلیت های پانکراسی آنها در شرایط invitro ایزوله شده بود نشان دادند که گرلین اثر کاهشی بر ترشح هورمون انسولین و سوماتواستاتین پانکراسی دارد، مطابقت دارد (۱۳). همچنین با نتایج Dezaki و همکارانش که در سال۲۰۰۴ با تزریق درون وریدی گرلین در خرگوش ها گزارش دادندکه تزریق درون رگی گرلین منجر به کاهش ترشح انسولین می شود نیز مطابقت دارد (۱۰) اما با نتایج آزمایشی که در سال ۲۰۰۲ توسط Date و همکارانش برای بررسی اثرات تزریق درون بطنی گرلین را در رتهای بالغ با شرایط تغذیه ای نرمال انجام شد، مطابقت ندارد چرا که این تحقیق نشان داد که تزریق درون بطنی گرلین پاسخ و ترشح انسولین را نسبت به گلوکز افزایش می دهد، به نظر می رسد علت تضاد نتایج این تحقیق با نتایج Date و همکارانش روش تزریق گرلین و شرایط تغذیه ای اعمال شده باشد (۹).
اما اینکه گرلین اساساً از طریق چه مکانیسم هایی منجر به کاهش ترشح انسولین می شود هنوز به درستی مشخص نشده و نیاز به بررسی های بیشتری دارد.
نتایج آزمایشات Qader و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در این زمینه در رتهای نابالغی که ایسلیت های پانکراس آنها در شرایط invitro ایزوله شده بود نشان داد که تزریق گرلین در دوز۱ میکرو مول از طریق فعال کردن آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز و افزایش تولید NO منجر به کاهش ترشح انسولین و افزایش گلوکاگون در ایسلیت های پانکراسی رتهای نابالغ می شود (۳۱). در این تحقیق با توجه به آنالیز داده ها از آنجا که میزان هورمون انسولین حین تزریق گرلین در هر دو سطح انرژی کاهش معنی داری نسبت به دوره های قبل و بعد از تزریق نشان داد چند احتمال مطرح می شود که از طریق آن گرلین می تواند در شرایط گرسنگی و کمبود گلوکز منجر به کاهش غلظت انسولین شود: به خوبی روشن شده است که نوروپپتید Y و پلی پپتید پانکراسی پپتید هایی هستند که نقش مهمی در تنظیم ترشحات پانکراسی دارند، مطالعات ایمنورادیو اکتیو نشان داده که mRNA رسپتور Y نوروپپتید Y درسلولهای اندوتلیال و سلولهای بتا پانکراس تولید کننده ی انسولین بیان می شود (۱). Moltez و همکارانش درسال ۱۹۸۵ و Greely و همکارانش در سال ۱۹۸۸ گزارش دادند که نوروپپتید Y از طریق رسپتور Y1 اثر مهاری بر ترشح انسولین و ترشحات اگزوکرینی پانکراس در شرایط گرسنگی دارد (۲۹)، از طرفی مطالعات اخیر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و



شکل ۴ - اثرتزریق درون وریدی (۸ µg/kg BW) گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ACTH در سه دوره ی زمانی مختلف، در شترهای نابالغی که تحت رژیم۱۰۰ انرژی تغذیه شده‌اند.
مقادیر به‌صورت Mean ± SEM بیان شده‌اند ($p<0.05$ *).

روشهای ایمنوهیستوشیمی برهم کنش بین نورونهای بیان کننده ی گرلین و نورونهای NPY را در هسته ی کمانی هیپوتالاموس ثابت کرده و فراوانی نورونهای گرلین را در این ناحیه گزارش دادند، هم چنین مطالعات رادیو ایمنورادیو اکتیو دراین ناحیه از هیپوتالاموس نشان داده است که نورون های تولید کننده ی گرلین بصورت پیش سیناپسی باعث آزاد شدن نوروپپتید Y و افزایش ترشح آن می شوند (۳۷،۳۶،۲۱). در زمینه ی اثرات گرلین بر ترشح انسولین محققان با بکار بردن آنتاگونیست گیرنده ی NPY نقش این نوروپپتید را در مسیر تاثیر گرلین بر ترشح انسولین نشان دادند.

با توجه به مطالعات انجام شده منطقی بنظر می رسد که نورون های گرلین در شرایط گرسنگی و هیپوگلیسمی با دریافت سیگنال های تنظیم کننده ی نوروپپتید Y درکاهش ترشح انسولین، می توانند منجر به مهار ترشح انسولین شوند (۴۰،۳۹،۲۲). مکانیسم کاهشی دیگر ازطریق نوروترانسمیتر مهاری GABA می باشد که غلظت بالایی در سلولهای بتا ایسلیتهای پانکراس دارد(۳۸) ، GABA موجود در سلولهای بتا از طریق رسپتور GABA-RS منجر به کاهش ترشح انسولین شده و از طرفی نیز اثر مهاری در ترشح گلوکاگون دارد (۱۷)، از آنجا که در ایسلیتهای پانکراس فیبرهای گرلین با نورونهای تولید کننده GABA ارتباط نورونی دارند و افزایش ترشح گرلین در شرایط گرسنگی، منجربه افزایش ترشح GABA در سلولهای بتا می شود شاید بتوان بخشی از اثرات کاهشی گرلین در ترشح انسولین را از این طریق توجیه کرد که در شرایط گرسنگی از طریق افزایش بیان گرلین و ارتباطات سیناپسی آن با GABA در ایسلیتهای پانکراسی ترشح انسولین مهار شده و کاهش می یابد (۸).

از طرف دیگر تحقیقات نشان داده است که عمل فیزیولوژیک لپتین برعکس گرلین افزایش مصرف انرژی وکاهش جذب غذا بوده و افزایش سطح گرلین پلاسما اثر کاهنده در غلظت لپتین دارد (۸). اتصال لپتین به گیرنده های خود (ob-R) در سطح نورونهای NPY و AGRP سبب هایپر پلاریزه شدن این نورونها و مهار GABA شده و با آزاد کردنPOMC را از حالت مهاری، سنتز و آزاد شدن پپتید های مشتق شده از POMC را درArcN تحریک کرده و یک سیگنال ضد اشتهای قوی را با فعال کردن گیرنده های MC3-R و MC4-R را بر روی نورونهای هدف ایجاد می کند (۷) با انجام، مطالعات گسترده مشخص شده است که لپتین با اتصال به گیرنده های خود در سطح نورونهای POMC و با دپلاریزه کردن این نورونها، سبب افزایش فعالیت غده ی پانکراس و افزایش ترشح انسولین می شود (۲۰)، بنابراین مکانیسم دیگری که شایدبتواند بخشی از این اثرمهاری در شرایط گرسنگی را توضیح دهد از طریق اثر متقابل گرلین و لپتین می باشد چرا که افزایش ترشح گرلین می تواند با کاهش دادن غلظت لپتین و همچنین ممانعت از اثرات تحریکی آن بر فعالیت سلولهای بتا سبب کاهش غلظت انسولین در شرایط هیپوگلیسمی شود.

از طرف دیگر در این مطالعه که برای اولین بار تاثیر تزریق وریدی گرلین بر ترشح هورمون ACTH درحیوانات شبه نشخوارکننده (شترهای نابالغ) بررسی شده بود، نتایج به دست آمده نشان داد که تزریق درون رگی گرلین منجر به افزایش غلظت پلاسمایی ACTH در شترهای نابالغ می شود. این نتایج موافق با نتایج تحقیقات Stevanovic و همکارانش در۲۰۰۶ بر روی رتها و Pecori Giraldi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ می باشد که بر روی انسان انجام شده بود. با بررسی های متعدد مشخص شده است که اثر گرلین بر ترشح ACTH اثری افزاینده است، نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که تزریق وریدی گرلین منجر به افزایش غلظت پلاسمایی

ACTH در هر دو رژیم غذایی ۵۰٪ و۱۰۰٪ انرژی مـی شـود. در آزمایشات انجام شده بر روی رتها جهت تعیین مکانیسمهایی کـه گـرلین بـرای تنظـیم ترشـح ACTH اسـتفاده مـی کنـد، مشخص شده است که افزایش فعالیت محور HPA و افـزایش ترشـح هورمـون ACTH توسـط گـرلین در شـرایط invitro احتمالاً از طریق تحریک ترشح هورمونهای CRH و مخصوصاً آرژنین وازوپرسین (VIP) مترشحه از هیپوتالاموس مـی باشـد (۲۸). با توجه به یافته های تحقیق انجام شده بر روی شترهای نابالغ تحت شرایط گرسنگی، چند احتمال مطرح می شود که از طریق آن گرلین می توا ند در شرایط گرسنگی و کمبود گلـوکز منجر به افزایش ترشح ACTH شود: تحقیقات اخیر نشان داده که نوروترانسمیترهایی همچونNPY اثر افزاینده ای بر ترشـح هورمـون محـرک فـوق کلیـوی(ACTH) در بـدن انسـان و جانوران دارد.

هسته PVN هیپوتالاموس مکان اصلی تجمع پایانـه هـای عصبی نورون های NPY می باشد که پری کـاریون هـای آن اساساً در هسته قوسی هیپوتالاموس و جزئی در ساقه مغز قـرار دارند. بررسی ها با میکروسکوپ الکترونی سیناپس هـایی بـین نورون های NPY و دندریت ها و جسـم سـلولی نـورون هـای CRH ارژیک را آشکار کرده و از طرفـی مطالعـات in vitro و in vivo نشـان داده کـه NPY آزادسـازی CRH را تحریـک کرده و بیان ژن CRH را افزایش می دهد (۲۵). از طرف دیگر نـورون هـای تولیـد کننـده ی گـرلین در هسـته ی کمـانی هیپوتالاموس دارای ارتباطات سیناپسی بـا نـورون هـای بیـان کننده یNPY بوده و با تحریک نورون های پـیش سیناپسـی GHS-R منجر به افزایش ترشح نوروپپتید Y می شود (۳۷).

در این تحقیق نیز که تزریق وریـدی گـرلین اثـر افزایشـی معنـی داری بـر ترشـح هورمـون ACTH دارد منطقـی بنظـر می رسد که بگوییم در شرایط گرسنگی با کمبود میزان گلـوکز پلاسما، گرلین از طریق افـزایش بیـان NPY و بـه دنبـال آن افزایش ترشح CRH از طریق آن، منجـر بـه افـزایش غلظـت هورمون ACTH می شود چـرا کـه افـزایش ترشـح CTH در شرایط گرسنگی از یک طرف بعنوان یک هورمون اورکسیژنیک منجر به افزایش اشتها شـده و هـم چنـین بـا تحریـک ترشـح هورمون کورتیزول شرایطی را بوجود می آورد تا حیوان بتوانـد با گرسنگی مبارزه کند (۳۴).

هم چنین مکانیسم دیگری که شاید بتواند بخشی از این اثر افزایشی را توضیح دهد از طریق مراکز نورو اندوکرین می باشد از آنجـا کـه مراکـز نوروانـدوکرین ماننـد هسـته PVN هیپوتالاموس نورون هایی را از سلول های تولید کننده گـرلین دریافت می کند و با توجه به اینکه رسپتورهای گرلین در هستهٔ PVN هیپوتالاموس بیان می شوند.

مشخص شده است که توانـایی گـرلین بـرای تحریـک محـور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال عمدتاً به واسطه یک عملکـرد مرکزی در مغز است که باعث آزادسـازی هورمـون آزاد کننـده کورتیکوتروپین CRH از نـورون هـای پاروسـلولار در هسـته PVN به داخل برجستگی میانی و سپس انتشـار آن بـه داخـل عـروق بـاب هیپـوفیزی بـرای دسترسـی بـه سـلول هـای کورتیکوتروف هیپوفیز پیشین می شود (۳۵).

پس احتمال اینکه گرلین از طریق افزایش تولید CRH در PVN هیپوتالاموس ترشح ACTH را افزایش می دهد منطقی است چرا که شرایط گرسنگی حیوان از طریق نـورون هـایی از اعصاب محیطی در ساقه مغز تقویت شده و به PVN فرستاده می شود و چون در این ناحیه نورونهای تولید کننده ی گرلین با نورونهای CRH ارتباط سیناپسی دارنـد ایـن نوروپپتیـد سـپس آزادسازی ACTH از هیپوفیز قدامی را تحریک کـرده و باعـث آزادسازی کورتیکوسترون از بخش قشری غده آدرنال می شـود و در مدتی کوتاه این پاسخ به حیـوان اجـازه مـی دهـد کـه بـا شرایط گرسـنگی مبـارزه کنـد (۳۴،۳۰). نتـایج حاصـل از ایـن تحقیق نشـان داد کـه احتمـالاً اثرگـرلین بـر ترشـح هورمـون انسولین در شترهای یک کوهانه تحـت شـرایط گرسـنگی بـه وجودگلوکز در بدن بسـتگی دارد. در رژیـم هـای ۵۰٪ و۱۰۰٪ انرژی که حیوانات تحت شرایط گرسنگی قرار داشتند چـون در زمان تزریق گرلین، بدن در شرایط هیپوگلیسمی قـرار داشـته و میزان گرلین پلاسما بالا بود، پس منطقی بنظر می رسد که بـا افزایش میزان گرلین در شرایط کمبود گلوکز و گرسـنگی، بایـد غلظت انسولین کاهش یابد. با توجه به یافته های ایـن تحقیـق می توان بطور کلی نتیجه گرفت که اثر کاهشی گرلین بر ترشح هورمون انسولین در شرایط گرسنگی و هیپوگلیسمی، احتمالاً از طریق ارتباطات نورونی آن با نوروترانسـمیترهای اثـر گـذار بـر ترشح انسولین در شرایط کمبود گلوکز میانجی گری می شـود. هم چنین مشخص شد که اعمال اثر افزایشی گرلین بـر ترشـح

ACTH در حیواناتی که تحت شرایط استرس زای گرسنگی وکمبود گلوکز قرار داشتند، از طریق افزایش فعالیت محور HPA در سطح هیپوتالاموس و بدنبال آن افزایش ترشح هورمون ACTH و کورتیزول صورت می گیرد تا حیوان بتواند با شرایط استرس زای گرسنگی و هیپوگلیسمی مقابله کند.

سپاسگزاری

از همکاری مرکز تحقیقات وجهاد کشاورزی استان یزد (شهرستان بافق) که درتامین حیوانات و وسایل آزمایشگاهی کمک کردند کمال تشکر و قدردانی راداریم.

References

[1] Adeghate E, Donth T. Distribution of neuropeptide-Y and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive nerves in normal and transplanted pancreatic tissue. ***Peptides*** 11(1990) 1087-1092.

[2] Arvat, E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva F.F, (...), Ghigo, E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans**.** ***Journal of Endocrinological Investigation*** 23(2000) 493-495.

[3] Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M., (...), Ghigo,E. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: Comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. ***Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*** 86 (2001) 1169-1174.

[4] Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, Van Der Lely A.J., (...), Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans.***Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*** 86(2001) 5083-5086.

[5] Chen H.M., Trumbauer E, Chen D.T, Weingarth J.R, Adams E.G, Frazier.Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein, ***Endocrinology*** 145 (2006) 2607-2612.

[6] 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*** 27 (2003) 61-166.

[7] Cowely M.A, Smart J.M., Rubinsteni M, Cerdan M.G, Diano S, Horvath T.L, et al.Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in arcuate nucleus . ***Nature*** 411(2001) 480-485.

[8] Daniel B, Williams. A novel, rapid, inhibitory effect of insulin on $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ γ-aminobutyric acid type A receptors .***Neuroscience letters*** 433 (2008) 27-31.

[9] Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal, M.S, Hosoda H, Kojima, M, (...), Matsukura, S. Ghrelin is present in pancreatic α-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion.***Diabetes*** 51 (2002)124-129.

[10] Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada M. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca^{2+} signaling in β-cells: Implication in the glycemic control in rodents. ***Diabetes*** 53 (2004) 3142-3151.

[11] Dezaki K, Kakei M, Yada M.Ghrelin uses Gα and activates voltage-dependent K channels to attenuate glucose-induced Ca^{2+} signaling and insulin release in islet β-cells: Novel signal transduction of ghrelin. ***Diabetes*** 56 (2007) 2319-2327.

[12] Dornonville de la Cour, C, Bjo¨rkqvist M., Sandvik A,K, Bakke I, Zhao C.M, Chen D et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control**.** ***Regulatory Peptides*** 99 (2001) 141–150.

[13] Edigo EM, Rodriguez-Gallardo J, Sivestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secration. ***Endocrinology*** 290(2002) 241-244.

[14] Ferrini, F.; Salio, C.; Lossi, L.; Merighi, A. Ghrelin in Central Neurons, Current ***Neuropharmacology***, 34 (2009) 37-49(13).

[15] Giraldi, F.P., Bucciarellii, G.Saccani , A., Scacchi,M., Pesce, S., Losa, M., Cavagnini, F. Ghrelin stimulates adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion by human ACTH-secreting pituitary adenomas in vitro. Department of ***Endocrinology***, 87 (2005) 2988-2991.

[16] Gnanapavan S, Kola B, Bustin S.A, Morris D.G, McGee

P, Fairclough, P, Bhattacharya, S, (...), Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. ***Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*** 87 (2002) 2988-2991.

[17] Gu XH, Kurose T, Kato S, Masuda K, Tsuda K, Ishida H, et al. Suppressive effect of GABA on insulin secretion from the pancreatic beta cells in the rat**.** ***Life Sci*** 52 (1993) 687-694.

[18] Jaszberenyi M, Bujdoso E, and Telegdy G. The role of neuropeptide Y in ghrelin-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activation. J. ***Neuroendocrinol***. 13 (2001) 438–441.

[19] Jessop, D.S. Stimulatory and inhibitory regulators of the hypothalamo-pituitary adrenocortical axis. Baillieres Best Pract. Res. Clin. ***Endocrinol. Metab***. 13(1999) 491–501.

[20] Jian-Lian, G., Hiromi, O., Fumiko, T., Yuri, K., Michiko, Y., Lihua, W., Mayumi, S., Yasunori, H., Haruaki, K., and Seiji Shioda. Synaptic relationships between proopiomelanocortin- and ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. ***Regulatory peptides*** 145 (2005): 128-132.

[21] Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats**.** ***Diabetes*** 50 (2001): 2438–43.

[22] Kohno D, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, (...), Yada T. Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediatedpathway**.** ***Endocrinology*** 148 (2007) 2251-263.

[23] Kojima M., Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. ***Nature*** 402 (1999) 656-660.

[24] Kojima M, Hosoda H, Sawaguch A, Mondal M.S, Suganuma T, Matsukura S. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. ***Endocrinology*** 141(2000) 4255-4261.

[25] Korbonits M and Grossman A.B. Ghrelin: update on a novel hormonal system. ***European Journal of Endocrinology*** 151 (2004) S67–S70.

[26] Lixin W, David H, Saint-Pierre Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y – synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. ***Neuroscience Letters*** 325 (2002) 47-51.

[27] Masafumi K, Suzuko H, Masatomo W, Kenji K, and Toshihiko Y. Ghrelin in Pancreatic Islets Restricts Insulin Release by Attenuating Ca^{2+} Signaling in ß-Cells. ***University Graduate School of Medical and Dental Science*** 254 (2008) 591-598.

[28] Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Zet al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. ***Biochemical and Biophysical Research Communications*** 276(2000) 905–908.

[29] Moltz JH, McDonald JK. Neuropeptide Y: direct and indirect action on insulin secretion in the rat**.** ***Peptides*** 6 (1985) 1155–1159.

[30] Mozid AM, Tringali G, Forsling ML, Hendricks MS, Ajodha S, Edwards R, Navarra P, Grossman AB, Korbonits M. Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. ***National Library of Medicine***, 35(2003):455-9.

[31] Qader SS, Lundquist I, Ekelund M, Håkanson R, Salehi A. Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. ***Department of Surgery*** 15(2005)128(1):51-6.

[32] Prado, C.L, Pugh-Bernard, A.E, Elghazi, L, Sosa-Pineda, B, Sussel, L. Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development .***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** 101 (2004) 2924-2929.

[33] Prodam F, Bellone S, Corneli G. Ghrelin: A molecular target for weight regulation, glucose and lipid metabolism. Recent Patents on Endocrine, ***Metabolic and Immune Drug Discovery*** 2 (3) (2008) 178-193**.**

[34] Romeo R. D, Bellani R, Karatsoreos I. N, Chhua N, Vernov M, Conrad C. D, and McEwen B. S. Stress History and Pubertal Development Interact to Shape Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Plasticity. ***Endocrinology*** 147(2006) 1664–1674.

[35] Samson W.K, Bagley S.L, Ferguson A.V, and White

M.M. (2006). Ghrelin receptor in brain: a role in cardiovascular control the neuroendocrine response to immobilization stress**.** ***Physiology regulation*** 402: 656-660.

[36] Shintani M, Ogawa Y , Ebihara K, Aizawae M, Miyanaga F ,Takaya K., et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. ***Diabetes*** 50 (2001) 227-232.

[37] Victoria S, Donna M, Simon M. Rapid changes in the sensitivity of arcuate nucleus neurons to central ghrelin in relation to feeding status. ***Physiology&Behavior*** 23 (2007) 180-185.

[38] Von Blankenfeld G, Turner J, Ahnert-Hilger G, John M, Enkvist MO, Stephenson F, et al. Expression of functional GABAA receptors in neuroendocrine gastro pancreatic cells. ***Pflugers Arch*** 430 (1995) 381-388.

[39] Waeber G, Thompson N, Waeber B. Neuropeptide Y expression and regulation in a differentiated rat insulin-secreting cell, ***Endocrinology*** 133 (2007) 1061-1067.

[40] Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F.The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. ***Regulatory Peptides*** 107 (2002) 63-69.

.