

Eva Paradiž¹, Maša Skelin Klemen², Andraž Stožer³

Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : sprožilna in presnovna ojačitvena pot

Stimulus Secretion Coupling in Pancreatic β Cells: the Triggering and the Metabolic Amplifying Pathway

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: celica β , izločanje inzulina, sprožitev, presnovna ojačitev, glukoza, aminokislina, proste maščobne kisline

V celicah β je spodbujanje s presnovnimi, hormonskimi, živčnimi in farmakološkimi dejavniki sklopljeno z izločanjem inzulina preko treh različnih med seboj prepletenih znotrajceličnih signalnih poti. Po več kot 40 letih intenzivnih raziskav je daleč najbolj raziskana t. i. sprožilna pot izločanja inzulina, ki se prične z vstopom glukoze v celico β in njeno presnovo, pri čemer nastaja ATP. Slednji je ključen za zapiranje od ATP odvisnih K^+ -kanalov, čemur sledi depolarizacija celične membrane, odpiranje napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov in oscilatorni porast citosolne koncentracije Ca^{2+} , ki sproži eksocitozo sekretornih mešičkov z inzulinom. Opisana sprožilna pot izločanja inzulina je nujna, a ne zelo učinkovita brez presnovne in nevrohormonske ojačitvene poti, ki vplivata predvsem na občutljivost sekretornega aparata na citosolne ione Ca^{2+} . Sestavek o sklopitvi med spodbujanjem in izločanjem v celicah β smo razdelili na dva dela. V tem prispevku bomo podrobneje opisali tako sprožilno pot izločanja inzulina kot tudi mehanizme presnovne ojačitve z glukozo in drugimi hranili, kot so aminokislina in proste maščobne kisline. Opis nevrohormonske ojačitvene poti je predstavljen v posebnem članku z naslovom Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : nevrohormonska ojačitvena pot.

ABSTRACT

KEY WORDS: β cell, insulin secretion, triggering, metabolic amplification, glucose, amino acids, free fatty acids

In pancreatic β cells, stimulation by metabolic, hormonal, neuronal, and pharmacological factors is coupled to insulin secretion through different interconnected intracellular signalling pathways. After more than forty years of intensive research, the so-called

¹ Asist. Eva Paradiž, dr. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor; eva.paradiz1@um.si

² Doc. dr. Maša Skelin Klemen, dr. vet. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

³ Izr. prof. dr. Andraž Stožer, dr. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

triggering pathway of insulin secretion is by far the most investigated. It comprises several steps, the first of which is the influx of glucose and its metabolism, resulting in an increase in cytosolic ATP. The latter is crucial for the closure of ATP-dependent K^+ channels, which leads to cell membrane depolarization and opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels. This is then followed by an oscillatory increase in cytosolic Ca^{2+} concentration, triggering exocytosis of insulin-containing granules. The described triggering pathway of insulin secretion is essential, but not very efficient without the so-called metabolic and neurohormonal amplifying pathways, which mainly affect the sensitivity of the secretory machinery to cytosolic Ca^{2+} . We present the stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells in two articles. In this article, we describe the triggering pathway of insulin secretion, as well as the mechanisms of metabolic amplification by glucose and other nutrients, such as amino acids and free fatty acids. The neurohormonal amplifying pathway will be described in the following article, titled Stimulus-Secretion Coupling in Pancreatic β Cells: the Neurohormonal Amplifying Pathway.

UVOD IN TAKSONOMIJA POTI DO IZLOČANJA INZULINA

V homeostazi glukoze celice β trebušne slinavke delujejo kot senzor, ki se na porast koncentracije glukoze v krvi odzove s povečanim izločanjem inzulina. Prekomerno izločanje inzulina lahko povzroči življenjsko nevarno hipoglikemijo, medtem ko dolgotrajno nezadostno izločanje privede do nenadnih in kroničnih zapletov, povezanih s sladkorno boleznijo (1). Natančno uravnavanje koncentracije glukoze preko izločanja inzulina je za zdravje posameznika ključnega pomena, na kar kaže tudi sigmoidna oblika krivulje odvisnosti količine izločenega inzulina od koncentracije glukoze, ki je najstrmejša v področju fiziološke koncentracije glukoze, 5–8 mmol/l (2). Čeprav glukoza za celice β predstavlja primarni in najpomembnejši dražljaj, so v fizioloških razmerah celice izpostavljene zapleteni mešanici hranil, številnim hormonom in živčnim prenašalcem, ki preko prepleteneh znotrajceličnih signalnih poti sodelujejo pri uravnavanju njihovih odzivov na to heterogeno spodbujanje (3). Presnova glukoze ima poglavitno vlogo pri nastajanju t. i. sprožilnega (angl. *triggering*) signala, kar večina literature s področja opredeljuje kot porast citosolne koncentracije

Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$). Dvig $[Ca^{2+}]_c$ je ključni dogodek, ki v celici β sproži eksocitozo sekretornih mešičkov (4). Čeprav govorimo o citosolnem porastu $[Ca^{2+}]_c$, raziskave kažejo, da globalni porast $[Ca^{2+}]_c$ na ravni cele celice ni tako bistven kot lokalni dvigi koncentracije v omejenih področjih, kot je npr. predel subplazmaleme ob notranjem ustju Ca^{2+} -kanalov. Večjo gostoto teh kanalov najdemo na celični membrani v bližini sekretornih mešičkov z inulinom, kar omogoča, da porast koncentracije $[Ca^{2+}]_c$ v določenih omejenih področjih po odprtju kanalov deluje neposredno na sekretorni aparat.

Druga hranila, hormoni in živčni prenašalci lahko delujejo preko mehanizmov, ki $[Ca^{2+}]_c$ ne spreminjajo neposredno, ampak delujejo v signalni kaskadi izločanja inzulina pozneje od tega koraka, predvsem preko povečanja občutljivosti sekretornega aparata na porast $[Ca^{2+}]_c$. Tudi pri presnovi glukoze nastajajo številne signalne molekule, ki pomembno vplivajo na izločanje inzulina, ne da bi (dodatno) spremenile $[Ca^{2+}]_c$ (1). Opisane dodatne poti uravnavanja izločanja inzulina opredelimo kot presnovno ojačitveno (angl. *amplifying*) pot, kadar govorimo o glukozi in drugih hranilih, oz. kot nevrohormonsko ojačitev, kadar na celico β delujejo živčni prenašalci in hor-

moni. Proces dodatno zaplete dejstvo, da lahko tudi posamezne učinkovine iz t.i. ojačitvene skupine povzročijo porast $[Ca^{2+}]_c$ in tako prispevajo k sprožilnemu signalu. Ta porast je večinoma minimalen in brez sočasnega delovanja glukoze pri izločanju inzulina sam po sebi neučinkovit oz. nezadosten (5). Alternativen način razvrščanja učinkovin je delitev na sprožilce, ki lahko samostojno sprožijo izločanje inzulina, in ojačevalce, ki povečajo izločanje inzulina, a za svoj učinek potrebujejo prisotnost sprožilca. V skupino prvih poleg glukoze uvrščamo še aminokislino levcin in arginin ter nekatere farmakološke učinkovine (sulfonilsečnine), pod druge pa večino preostalih aminokislin (AK), proste maščobne kisline (PMK), hormone in živčne prenašalce (6). Ključni mehanizmi, preko katerih v članku predstavljene učinkovine vplivajo na izločanje inzulina, so grafično prikazani na sliki 1. Ta naj bralcu olajša sledenje opisanim kompleksnim potem, ki so med seboj pogosto tudi prepletene.

SPROŽILNA POT

Sprožilna pot je najboljše raziskana in v znanstveni skupnosti sprejeta pot do izločanja inzulina, ki se prične z vstopom glukoze v celico β preko membransko vezanih prenašalcev. Pri človeku so v večji meri izraženi predvsem glukozni prenašalci (angl. *glucose transporters*, GLUT) tipov 1 in 3, preko katerih je vstop glukoze v celico hiter in sorazmeren koncentraciji glukoze v krvnem obtoku (7). Sledi prvi korak glikolize, tj. fosforilacija glukoze preko encima glukokinaza (heksokinaza IV), kar predstavlja omejujoči korak z vidika hitrosti presnove. Pri tem velja omeniti dve ključni lastnosti glukokinaze, po katerih se razlikuje od drugih izoencimov iz družine heksokinaz in ki celici β omogoča ustrezno izločanje inzulina (8):

- nizka afiniteta za glukozo ($K_m \approx 6\text{--}11$ mmol/l), kar preprečuje neustrezno izločanje inzulina pri nizkih vrednostih glukoze in

- odsotnost zaviranja encima s produktom glukoza-6-fosfatom, kar bi sicer ob visokih koncentracijah glukoze povzročilo zasičenje reakcije in s tem preprečilo nadaljnje izločanje inzulina.

Mutacije glukokinaze so tudi klinično pomembne in vodijo do razvoja trajnega neonatalnega diabetesa ali zrelostne oblike diabetesa pri mladih (angl. *maturity onset diabetes of the young*, MODY) v primeru zmanjšane aktivnosti encima, v primeru aktivirajoče mutacije pa do hiperinzulinemije v otroški dobi (9).

Celice β imajo razvite mehanizme, ki omogočajo, da piruvat kot produkt glikolize praktično v celoti prehaja v mitohondrij, kjer vstopa v Krebsov cikel oz. cikel citronske kisline (CCK). Nizka stopnja izražnosti encima laktat dehidrogenaze in monokarboksilatnega prenašalca preprečuje, da bi laktat, ki se sprošča ob telesni aktivnosti, v celici β po pretvorbi v piruvat sprožil neustrezno izločanje inzulina. Končni produkt CCK in oksidativne fosforilacije je ATP (10, 11).

Od ATP odvisni K^+ -kanali (kanali K_{ATP}) so membranski kanali, sestavljeni iz štirih transmembranskih podenot Kir6.2 (angl. *inward-rectifier potassium channel*) in štirih regulatornih podenot sulfonilsečninskega receptorja tipa 1 (angl. *sulfonylurea receptor type 1*, SUR1). Ob porastu koncentracije glukoze se poveča hitrost presnove v celicah β , kar se kaže kot porast citosolne koncentracije ATP. Vezava ATP na podenoto Kir6.2 zmanjša verjetnost odprtja kanalov K_{ATP} , kar zmanjša tok ionov K^+ iz celice in privede do depolarizacije celične membrane. Ko membranski potencial doseže kritično vrednost, se poveča verjetnost odpiranja napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov (angl. *voltage dependent Ca^{2+} channels*, VDCC), posledično poraste $[Ca^{2+}]_c$, to pa predstavlja ključni sprožilni signal za izločanje sekretornih mešičkov z inulinom (12). Pomemben, a pogosto spregledan, del k porastu

$[Ca^{2+}]_c$ prispeva sproščanje Ca^{2+} iz znotraj-celičnih zalog. Gre za s Ca^{2+} sproženo izločanje Ca^{2+} (angl. *calcium induced calcium release*, CICR) ob aktivaciji rianodinskih receptorjev in receptorjev za inozitol 1,4,5-trisfosfat (angl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*, IP_3) na endoplazemskem retikulumu. CICR poteka v obliki lokalnih, omejenih porastov $[Ca^{2+}]_c$, imenovanih tudi iskrice (angl. *Ca²⁺ sparks*), katerih znotrajcelična lokalizacija verjetno ključno vpliva na njihovo funkcijo. Tako poleg usmerjenega vpliva na izločanje sekretornih mešičkov nekateri raziskovalci predlagajo tudi možnost vpliva CICR na aktivacijo od Ca^{2+} odvisnih K^+ -kanalov in s tem repolarizacijo celice. CICR pa pomembno prispeva k nastanku sprožilnega signala, ko je v glukozi izpostavljeni celici hkrati tudi povišana koncentracija cAMP (več v članku z naslovom Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : nevrohormonska ojačitvena pot) (13).

Kanali K_{ATP} so tudi tarča za delovanje zdravil iz skupine sulfonilsečnin, ki preko vezave na podenoto SUR1 posnemajo delovanje glukoze (14, 15). Elektrofiziološke raziskave celic β opozarjajo, da zaprtje kanalov K_{ATP} samo po sebi ne zadošča za pomik membranskega potenciala, ki bi povzročil aktivacijo napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov. Povzroči pa povečanje membranske upornosti, ki omogoča, da se izrazi učinek depolarizirajočih tokov iz ozadja (angl. *background currents*), katerih identiteta ni povsem jasna, verjetno pa k tem tokovom prispevajo tudi predstavniki široke skupine kationskih kanalov prehodnega receptorskega potenciala (angl. *transient receptor potential*, TRP) (6, 15, 16). Vloga nekaterih med njimi pri normalnem izločanju inzulina in vpletenost v patogenezo sladkorne bolezni je delno že opisana (17, 18).

PRESNOVNA OJAČITVENA POT GLUKOZE

Zgoraj opisana sprožilna pot je prepozna na kot ključna za sklopitev spodbujanja in

izločanja v celicah β , a dogajanja v celicah ne zajame v celoti. Izkazalo se je, da glukoza poveča izločanje inzulina tudi kadar zaobidemo kanale K_{ATP} , npr. kadar z diazoksidom preprečimo zaprtje kanalov K_{ATP} in ob prisotnosti povišane zunajcelične koncentracije K^+ celico depolariziramo ali kadar so kanali K_{ATP} zaradi vezave sulfonilsečnin zaprti oz. zaradi odsotnosti gena povsem odsotni (1). To kaže na prisotnost dodatne (presnovne) ojačitvene poti, ki predvsem poveča občutljivost sekretornega aparata na dvig $[Ca^{2+}]_c$ in brez katere je sekretorni odziv na glukozo zmanjšan za približno polovico (1, 15). Presnovna ojačitvena pot je pomembna pri obeh delih sicer dvofaznega izločanja inzulina, obstaja pa med obema potema jasna hierarhija, v kateri je ojačitvena pot podrejena sprožilni (5). Prva je namreč lahko aktivna že pri podpraznih vrednostih glukoze, ki ne zadostujejo za električno aktivnost celic, a se funkcionalno ne izrazi, dokler ni prisoten sprožilni signal (1, 19). Aktivnost ojačitvene poti v bazalnih pogojih bi lahko bila pomembna za vzdrževanje zadostne zaloge sekretornih mešičkov z inulinom ob celični membrani, ki so pripravljene na izločanje (angl. *readily releasable pool*, RRP), s čimer vpliva na amplitudo sekretornega odziva v prvi in drugi fazi izločanja inzulina (19). Dvofaznega izločanja inzulina, ki ga zaznamo v eksperimentalnih pogojih ob stopničastem dvigu koncentracije glukoze, sicer v fizioloških razmerah, ko koncentracija glukoze v krvnem obtoku po obroku narašča postopoma, ne zaznamo. Zaradi zmanjšanja prve faze v obdobju predstopnje sladkorne bolezni in skorajšnjega izginotja ob nastopu sladkorne bolezni tipa 2, pa je pojav koristen pri raziskovanju razvoja bolezni in zaznavanju njenih zgodnejših oblik. Okvara presnovne ojačitvene poti zgodaj v poteku sladkorne bolezni tipa 2 tako morda lahko zmanjša bazen sekretornih mešičkov ki so pripravljene na izločanje, kar lahko zaznamo kot okrnjeno prvo fazo izločanja inzulina (19, 20).

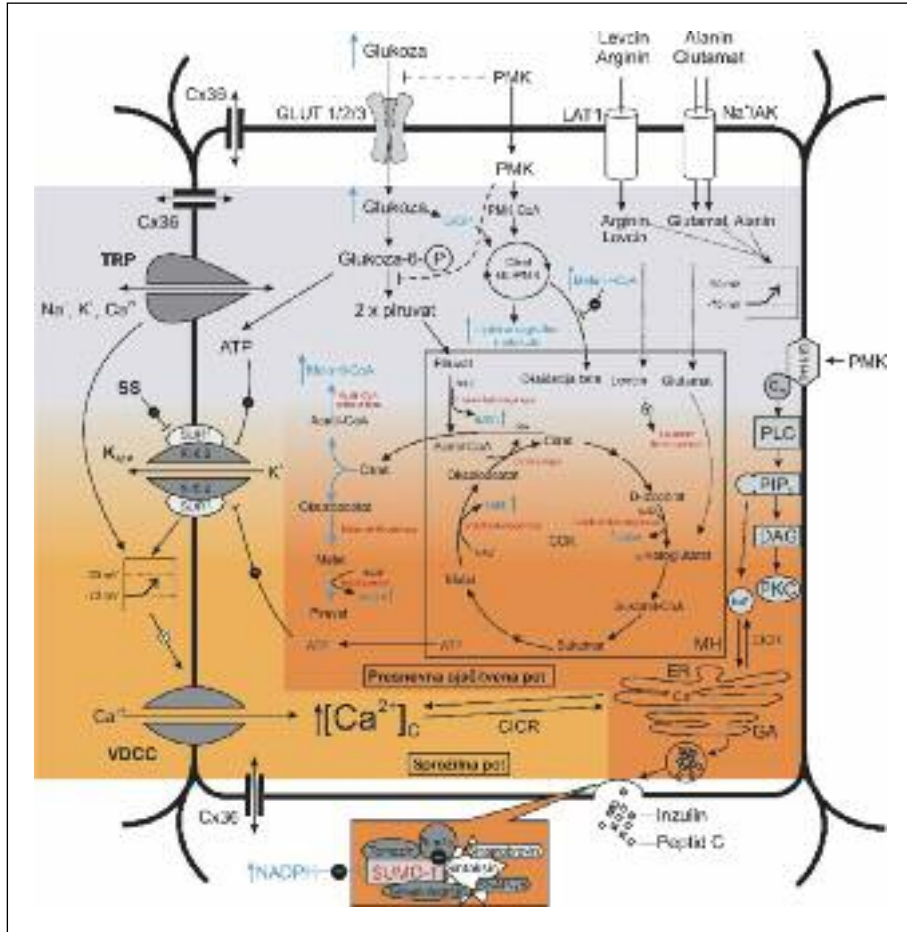
Mehanizmi presnovne ojačitve

Aktivacija ojačitvene poti z glukozo zahteva njeno presnovo (11). Anapleroza označuje reakcije obnavljanja vmesnih produktov presnovnih poti, ki se sicer tekom presnove porabljajo in ki torej omogočajo nemoteno delovanje ključnih presnovnih ciklov, predvsem CCK. Primera tega sta nastanek oksaloacetata iz piruvata ali pretvorba glutamata v α -ketoglutarat. Pri kataplerozi gre za obraten proces prehajanja teh intermediarnih produktov iz mitohondrija v citosol, s čimer se preprečuje njihovo prekomerno kopičenje, hkrati pa se s tem omogoči njihova uporaba v drugih biosintetskih poteh. Tako se npr. citrat po prehodu v citosol porablja za sintezo malonil-CoA (angl. *malonyl-Coenzyme-A*) (21). Širok nabor intermediarnih produktov in kofaktorjev, ki nastajajo tekom presnove glukoze ter drugih hranil, s skupnim imenom imenujemo presnovni sklopitveni dejavniki. Glede na njihov vpliv na izločanje inzulina jih delimo na regulatorje, ki širše in posredno vplivajo na presnovne poti, ter na efektorje, ki neposredno sodelujejo pri ojačitveni in sprožilni poti do izločanja inzulina (2). Kot možne kandidate so preučevali številne snovi, med drugim citrat, malonil-CoA, glutamat, GTP, monoacilglicerol (MAG), ATP, cAMP, beljakovine citoskeleta in številne druge. Vloga in mehanizem delovanja nekaterih izmed njih sta precej jasno raziskana in dobro sprejeta (npr. ATP, cAMP), medtem ko pri drugih kandidatih ostaja več nejasnosti glede njihovega vpliva na izločanje inzulina (21, 22).

Kot eden pomembnejših dejavnikov se v zadnjih letih izpostavlja vpliv reducirane oblike nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (angl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) na eksocitozo. Proces vključuje obliko posttranslacijske modifikacije beljakovin, t. i. sumoilacijo, pri kateri vezava beljakovin majhnih ubikvitinu podobnih modifikatorjev (angl. *small ubiquitin-like modifier 1*, SUMO-1) na sinaptotagmin VII,

sintaksin 1A, RIM1 α (angl. *Rab3-interacting molecule 1a*), tomozin in druge beljakovine, vključene v proces eksocitoze, ovira njihovo delovanje in s tem zavira izločanje inzulina (19, 23). Ob porastu koncentracije glukoze se poveča aktivnost encimov, ki sodelujejo pri njeni presnovi, med drugimi tudi izocitrat dehidrogenaze in malat dehidrogenaze, kar poveča nastanek NADPH kot stranskega produkta. NADPH poveča aktivacijo sentrin/SUMO specifične proteaze (angl. *sentrin-specific protease 1*, SENP1), ki učinkom sumoilacije nasprotuje ter tako spodbuja izločanje inzulina (24). Skladno s tem je oslabljeni ojačitveni učinek glukoze na eksocitozo pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 možno izboljšati preko aktivacije SENP1, hkrati pa imajo miši z delekcijo gena *Senp1* zmanjšano glukozno toleranco (25).

Druga pomembnejša pot, preko katere glukoza neodvisno od vpliva na električno aktivnost poveča izločanje inzulina, je povečan nastanek malonil-CoA preko acetil-CoA karboksilaze, ki zavira karnitin palmitoiltransferazo-1 (angl. *carnitine palmitoyltransferase 1*, CPT-1), encim, ključen pri oksidaciji dolgoverižnih β -maščobnih kislin. Zaviranje aktivnosti CPT-1 prepreči vstop dolgoverižnega acil-CoA v mitohondrij ter poveča aktivnost cikla glicerolipidi/proste maščobne kisline (angl. *glycerolipid/free fatty acid*, GL/FFA) (26). Glukoza poveča aktivnost omenjenega cikla tudi preko sinteze glicerol-3-fosfata, njegova aktivnost pa poveča sintezo maščobnih signalnih molekul, ki povečajo izločanje inzulina (27). Primer je MAG, ki preko beljakovine Munc13-1 (angl. *protein unc-13 homolog A*) spodbuja pravo (angl. *priming*) sekretornih mešičkov z inzulinom na zlivanje s celično membrano (19, 28). Opisan cikel predstavlja pomembno stičišče med presnovo glukoze in maščob, motnje v njegovem uravnavanju pa prispevajo tudi k razvoju sladkorne bolezni tipa 2 (29).



Slika 1. Povezave med sprožilno in presnovno ojačitveno potjo v celici β . Glukoza se po vstopu preko glukoznih prenašalcev (angl. *glucose transporters*, GLUT) tipa 1, 2 ali 3 (tip 2 je najverjetneje količinsko najpomembnejši pri miših) presnovi v procesu glikolize do piruvata, ki vstopi v cikel citronske kisline (CCK, imenovan tudi Krebsov cikel ali cikel trikarboksilnih kislin) v mitohondriju (MH), kjer nastane ATP. Ta zapre od ATP odvisne K⁺-kanale (kanali K_{ATP}), sledi depolarizacija membrane in odpiranje napetostno odvisnih Ca²⁺-kanalov (angl. *voltage dependent Ca²⁺ channels*, VDCC). Zvišana znotrajcelična koncentracija Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) je glavni dražljaj za eksocitozo sekretornih mešičkov z insulinom. Poleg opisane sprožilne poti izločanja insulina (rumena barva), lahko tako sama glukoza kot tudi aminokislina (AK) in proste maščobne kisline (PMK) dodatno uravnavajo izločanje insulina preko presnovne ojačitvene poti (oranžna barva). Modra barva označuje učinke visoke koncentracije glukoze v krvi. Minus (-) pomeni zaviranje, plus (+) pa spodbujanje. Za podrobnejšo razlago glejte besedilo. Cx36 – presledkovni stik, ki ga tvori beljakovina koneksin 36 (angl. *connexin 36*), LAT1 – aminokislinski prenašalec tipa L (angl. *large neutral amino acid transporter*), TRP – kanal prehodnega receptorskega potenciala (angl. *transient receptor potential*), Gli3P – glicerol-3-fosfat (angl. *glycerol-3-phosphate*), GL – glicerolipidi, SS – sulfonilsečnine, SUR1 – sulfonilsečninski receptor (angl. *sulfonylurea receptor*), ki je regulatorna enota K⁺-kanalov (angl. *sulfonylurea receptor type 1*), Kir6.2 – transmembranska podenota od ATP odvisnih K⁺-kanalov, NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid, NADPH – reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata, GPR40 – z beljakovino G povezan receptor 40 (angl. *G-protein-coupled receptor 40*), Gαq – podenota α beljakovine Gq, PLC – fosfolipaza C (angl. *phospholipase C*), PIP₂ – fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (angl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) DAG – diacilglicerol, PKC – proteinska kinaza C, IP₃ – inozitol 1,4,5-trisfosfat (angl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*), CICR – s Ca²⁺ sproženo izločanje Ca²⁺ (angl. *calcium-induced calcium release*), ER – endoplazemski retikulum, GA – Golgijev aparat, SUMO-1 – majhni ubikvitinu podobni modifikator 1 (angl. *small ubiquitin-like modifier 1*).

DRUGA HRANILA

Aminoksiline

Privzem AK v celico β večinoma povzroči majhen v celico usmerjen tok pozitivnih ionov, ki pa v odsotnosti glukoze ne povzroči večje spremembe membranskega potenciala. Količinsko se inzulinotropen učinek posameznih AK in njihovih kombinacij razlikuje, za večino pa je značilno, da ob hkratnem zaužitju glukoze povečajo izločanje inzulina in s tem zmanjšajo porast koncentracije glukoze (30, 31). V celico vstopajo preko aktivnih prenašalnih sistemov, kakršen je npr. aminokislinski prenašalec 1 tipa L, prenašalec nevtralnih AK (angl. *large neutral amino acid transporter*, LAT1), ki je v celicah β močno izražen (32). Levcin in arginin sta najbrž edini AK, ki lahko ob podpraznih vrednostih glukoze sprožita izločanje inzulina. Levcin se v celice β prenaša preko omenjenega LAT1, pri čemer je prenos neodvisen od Na^+ in torej neelektrogen. Celici je levcin na voljo kot gorivo, hkrati pa je alosterični aktivator glutamat dehidrogenaze (33). Arginin je AK z nabojem, kar po vstopu v celico povzroči depolarizacijo celične membrane, alanin in glutamat pa v celico vstopata preko kotransporta z Na^+ ter s tem povzročita tok pozitivnih ionov v celico (6). Z vidika vpliva na izločanje inzulina je pomembno tudi vstopanje AK ali njihovih presnovkov v anaplerotične/kataplerotične reakcije, predvsem preko encima glutamat dehidrogenaza, ki katalizira dvosmerno reakcijo pretvorbe med glutatom in α -ketoglutaratom. Slednji je pomemben substrat v CCK. Povečana aktivnost glutamat dehidrogenaze ob aktivirajočih (angl. *gain of function*) mutacijah je povezana s sindromom hiperinzulinemične hipoglikemije, ki jo značilno poslabša beljakovinsko bogat obrok, kar je posledica povečanega nastanka anaplerotičnih produktov in s tem večjega obrata CCK ob vstopu AK, predvsem glutamina, v celico (34, 35). Hkrati so miši z izbitim genom za glutamat dehidrogenazo odporne na razvoj debelo-

sti in glukoze intolerance ob visoko kalorični dieti, kar kaže na vpletenost te veje ojačitvene poti pri razvoju sladkorne bolezni tipa 2 (36). Možen je tudi obraten potek reakcije, ki jo katalizira glutamat dehidrogenaza, in sicer v smeri nastanka glutamata ob presnovi glukoze. Ta iz celice izstopa preko ekscitatornega aminokislinskega prenašalca (angl. *excitatory amino acid transporter 3*, EAAT3) in s tem v celici sproži hiperpolarizacijski tok, ki zavira izločanje inzulina. Nekateri menijo, da je ta pot v fiziološkem smislu pomembnejša, na kar kaže tudi povečano izločanje inzulina ob zaviranju omenjenega prenašalca (6, 37). AK na izločanje inzulina vplivajo tudi posredno, preko spodbujanja izločanja inkretinskih hormonov, glukagonu podobnega peptida-1 (angl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1) ter od glukoze odvisnega inzulinotropnega peptida (angl. *glucose-dependent insulinotropic peptide*, GIP) (več v članku z naslovom Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : nevrohormonska ojačitvena pot) (38).

Proste maščobne kisline

PMK v odsotnosti glukoze nimajo večjega učinka na izločanje inzulina, pomembno pa ojačajo z glukozo sproženo izločanje inzulina in so tako predvsem *in vivo* nujne za normalno izločanje inzulina (21, 39). Pomembno je opozoriti na večurni časovni zamik med zaužitjem mešanega obroka, ki vsebuje tudi trigliceride, in pojavom PMK v krvnem obtoku. Neposredno po obroku zaradi učinkov inzulina in zaviranja lipolize v krvnem obtoku zaznamo celo upad ravnih PMK (6). Takojšen učinek maščobnih kislin bi lahko bil posreden, preko aktivacije z beljakovino G sklopljenega receptorja (angl. *G protein-coupled receptor*, GPR) 119 na enteroendokrinih celicah tipa L, ki ob tem izločajo GLP-1. Več o učinkih GLP-1 v članku z naslovom Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : nevrohormonska ojačitvena pot (40). Tudi celice β

izražajo GPR za PMK, preko katerih se izrazi del njihovih učinkov na izločanje inzulina.

Vpliv PMK neposredno na celice β trebušne slinavke lahko razdelimo na tri veje. Prvi dve sta delno že bili opisani, saj se v veliki meri prekrivata tudi s presnovo glukoze. Prva je povezana s t. i. Randlovim ciklom, poimenovanim po raziskovalcu, ki je prvi opisal, da oksidacija PMK zavira oksidacijo glukoze v skeletni in srčni mišičnini, jetrih in celicah β trebušne slinavke. Pri tem PMK zavirajo predvsem delovanje piruvat dehidrogenaze in s tem nastanek acetil-CoA, v manjši meri pa tudi vstop glukoze v celico ter delovanje drugih encimov v procesu glikolize. Pomen cikla se izrazi med pomanjkanjem hranil v telesu, ko aktivacija lipolize poveča koncentracijo PMK v plazmi, slednje pa ob oksidaciji zavirajo porabo glukoze. S tem jo prihranijo za tkiva, ki jim glukoza predstavlja ključen vir energije (predvsem možgani). Podobno tudi porast PMK med telesno vadbo omogoči, da se glukoza, ki je ne porabijo aktivne mišice, uporabi za hitrejšo nadomeščanje izpraznjenih zalog mišičnega glikogena (41). Da obstaja tudi obraten proces, zaviranje oksidacije PMK ob oksidaciji glukoze, je Randle predvideval že na začetku, njegov obstoj in molekularni mehanizmi pa so bili dokazani kasneje. Gre za zgoraj opisani nastanek malonil-CoA, zaviranje CPT-1 in posledično kopičenje dolgoverižnega acil-CoA v citosolu. Ta kot ena izmed signalnih molekul uravnava aktivnost kanalov K_{ATP} in preko acetilacije beljakovin, ki sodelujejo pri eksocitozi, denimo sinaptotagmina ali s sinaptosomom povezane beljakovine 25 (angl. *synaptosomal-associated protein 25*, SNAP 25), ojača njihovo vezavo na celično membrano in s tem spodbuja izločanje inzulina (27, 42). Drugi del mehanizma, preko katerega se PMK vključujejo v izločanje inzulina, je povečana aktivnost že omenjenega cikla GL/FFA, kjer prav tako nastajajo maščobne signalne molekule, ki ojačajo izločanje inzulina (29). Tretja veja pa je učinek

PMK preko vezave na GPR40. Aktivacija receptorja preko fosfolipaze C sproži sproščanje Ca^{2+} iz endoplazemskega retikuluma in tako pripomore k sprožilnemu signalu (43). To tudi razlaga ugotovitve raziskave, da PMK sprožijo izločanje inzulina, ki je sicer minimalno, tudi pri podpraznih koncentracijah glukoze ali celo v njeni odsotnosti (6, 44). Miši brez GPR40 izločajo manj inzulina po spodbujanju s PMK, hkrati pa imajo normalno homeostazo glukoze kljub visokokalorični dieti. Drugi sorodni receptorji, ki morda na soroden način uravnavajo izločanje inzulina ob izpostavljenosti PMK (njihova vloga še ni povsem dokazana) so npr. GPR120, GPR41 in GPR119 (3). Približno polovica izločenega inzulina, ki ga spodbujajo PMK, je posledica neposredne aktivacije receptorja za PMK GPR40, preostali del pa zahteva njihovo presnovo (43).

Pomemben je tudi dvojni učinek PMK na delovanje celic β . Čeprav ima kratkotrajna izpostavljenost nezaestrenim PMK spodbujevalen učinek na izločanje inzulina, pa dolgotrajna izpostavljenost povišanim vrednostim negativno vpliva na delovanje celic β (27). Pri tem se raziskave še vedno ukvarjajo z vprašanjem, če je pri tem procesu ključna povišana raven PMK ali glukoze in če morajo biti za škodljivo delovanje daljša povišana vrednosti obeh skupin hranil. Povedano drugače – ali gre za lipotoksičnost, glukotoksičnost ali glukolipotoksičnost. V eksperimentalnih pogojih *in vitro* povišane vrednosti tako glukoze kot PMK samostojno negativno vplivajo na funkcijo celic β , zaradi številnih omejitev teh raziskav pa je pri prenosu ugotovitev na modele *in vivo* ali človeško fiziologijo potrebna previdnost. Čeprav zgodba o glavnem krivcu za disfunkcijo celic β še zdaleč ni zaključena, številne raziskave opisujejo škodljiv učinek PMK zgolj v prisotnosti kronično povišanih ravni glukoze. Hiperglikemija, ki ima lahko sicer sama po sebi negativen učinek na funkcijo celic β , naj bi bila tako nujen pogoj, da se izrazijo škodljivi

učinki povišanih ravni PMK. Gre za t. i. permisivno vlogo hiperglikemije (45–47). Koncept med raziskovalci sicer ni enotno sprejet in nekateri menijo, da je za funkcionalno okvaro celic β nujna prekomerna izpostavljenost kombinaciji hranil (48).

HORMONI IN ŽIVČNI PRENAŠALCI

Številne učinkovine iz skupine hormonov in živčnih prenašalcev imajo prav tako kot AK ter PMK spodbujevalen ali zaviralen učinek na izločanje inzulina. V skupini spodbujevalcev najdemo med drugimi GLP-1, GIP, holecistokinin, gastrin, acetilholin in vazoaktivni intestinalni polipeptid, med zaviralce pa uvrščamo somatostatin, adrenalina in grelina. Vse omenjene učinkovine in njihov mehanizem delovanja smo podrobneje opisali v članku z naslovom Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : nevrohormonska ojačitvena pot.

POGLED V PRIHODNOST

Že dalj časa poznamo številne učinkovine, ki vplivajo na izločanje inzulina, a njihovi mehanizmi še vedno niso razkriti. Prav tako odkrivamo tudi vedno nove plasti njihovega delovanja. Dober primer so učinkovine iz skupine sulfonilsečnin. Zanimiva zgodba o njihovem odkritju sega v obdobje druge svetovne vojne in je, kot nakazuje že ime, povezana z uporabo sulfonamidnih antibiotikov. Zaradi vsesplošnega pomanjkanja so ljudje uživali higiensko oporečno hrano, posledica tega pa so bili številni primeri tifoidne vročice, ki jih je francoski zdravnik Marcel Janbon zdravil z novoodkritimi predstavniki iz skupine sulfonamidov. Pri bolnikih so se pričeli pojavljati neželeni učinki v obliki krčev, kome in hipoglikemije, ki jih je fiziolog Auguste Loubatieres v sledečih letih povezal s spodbujevalnim učinkom

uporabljenih učinkovin na izločanje inzulina (49).

Z odkritjem novih signalnih poti, kot je denimo s cAMP povezana beljakovina (angl. *exchange protein directly activated by cAMP 2*, Epac2), in dokazi, da to pot aktivirajo tudi omenjeni hipoglikemiki, se razkrivajo novi mehanizmi njihovega delovanja, katerih pomen *in vivo* še ni povsem jasen (50, 51). Omenjena pot delno razlaga tudi klinično pomembno vzajemno delovanje inkretinov in sulfonilsečnin. Boljše razumevanje mehanizmov sprožilne in ojačitvene poti razjasnjuje pogosto zmotno prepričanje, da je delovanje sulfonilsečnin od glukoze neodvisno. Sicer drži, da lahko sulfonilsečnine preko zaprtja kanalov K_{ATP} povzročijo nastanek sprožilnega signala tudi v odsotnosti glukoze, so pa za to potrebne visoke koncentracije zdravila v plazmi. Nasprotno je znotraj terapevtskih koncentracij delovanje sulfonilsečnin pomembno odvisno od koncentracije glukoze, kar je posledica tako seštevavanja učinkov na delovanje kanalov K_{ATP} kot tudi ojačitvenih presnovnih učinkov glukoze (51). Tako tudi pri učinkovinah, ki veljajo za stare znance klinične prakse, nova dognanja razkrivajo nove vidike njihove uporabe. Pri drugih je več znanega o tem, kako uravnavajo delovanje celic β pri laboratorijskih živalih, manj pa imamo znanja o prenosu teh ugotovitev na delovanje trebušne slinavke pri ljudeh. Pojavljajo se tudi nove učinkovine, ki na izločanje inzulina vplivajo preko doslej manj znanih mehanizmov. Primer so glikozidi stevia, pogosto uporabljani nadomestki sladkorja brez kalorij, ki preko omenjenih kanalov TRP ojačujejo z glukozo sproženo izločanje inzulina, hkrati pa kažejo zaščitne učinke pri razvoju sladkorne bolezni tipa 2 ob dieti z visoko vsebnostjo maščob (52).

LITERATURA

1. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000; 49 (11): 1751–60.
2. Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SR. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab*. 2013; 18 (2): 162–85.
3. Newsholme P, Keane KK, Gaudel C, et al. (Dys)regulation of insulin secretion by macronutrients. In: Islam MS, ed. 2nd ed. Dordrecht: Springer; 2015. p. 126–156.
4. Satin LS. Localized calcium influx in pancreatic beta-cells: Its significance for Ca²⁺-dependent insulin secretion from the islets of langerhans. *Endocrine*. 2000; 13 (3): 251–62.
5. Henquin JC. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in beta-cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 93 (Suppl 1): S27–31.
6. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic beta-cell electrical activity and insulin secretion: Of mice and men. *Physiol Rev*. 2018; 98 (1): 117–214.
7. Skelin Klemen M, Dolensek J, Slak Rupnik M, et al. The triggering pathway to insulin secretion: Functional similarities and differences between the human and the mouse beta cells and their translational relevance. *Islets*. 2017; 9 (6): 109–39.
8. Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: History and current status. *J Biol Chem*. 2014; 289 (18): 12189–94.
9. Gloyn AL. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: Maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat*. 2003; 22 (5): 353–62.
10. Pullen TJ, Rutter GA. When less is more: The forbidden fruits of gene repression in the adult beta-cell. *Diabetes Obes Metab*. 2013; 15 (6): 503–12.
11. Bensellam M, Jonas JC, Laybutt DR. Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: Recent findings and future research directions. *J Endocrinol*. 2017; 236 (2): R109–43.
12. Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: A pas de deux. *Diabetes*. 2004; 53 (Suppl 3): S113–22.
13. Islam MS. Calcium signaling in the islets. In: Islam M, ed. *Islets of Langerhans*. 2nd ed. Dordrecht: Springer; 2015. p. 605–32.
14. Henquin JC, Dufrane D, Gmyr V, et al. Pharmacological approach to understanding the control of insulin secretion in human islets. *Diabetes Obes Metab*. 2017; 19 (8): 1061–70.
15. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: A matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*. 2009; 52 (5): 739–51.
16. Stožer A. Nernstov potencial in ohmski model membranskega potenciala. *Med Razgl*. 2014; 53 (2): 193–202.
17. Vennekens R, Mesuere M, Philippaert K. TRPM5 in the battle against diabetes and obesity. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018; 222 (2).
18. Yosida M, Dezaki K, Uchida K, et al. Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. *Diabetes*. 2014; 63 (10): 3394–403.
19. Ferdaoussi M, MacDonald PE. Toward connecting metabolism to the exocytotic site. *Trends Cell Biol*. 2017; 27 (3): 163–71.
20. Cheng K, Andrikopoulos S, Gunton JE. First phase insulin secretion and type 2 diabetes. *Curr Mol Med*. 2013; 13 (1): 126–39.
21. Nolan CJ, Prentki M. The islet beta cell: Fuel responsive and vulnerable. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2008; 19 (8): 285–91.
22. Lu M, Li C. Nutrient sensing in pancreatic islets: Lessons from congenital hyperinsulinism and monogenic diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2018; 1411 (1): 65–82.
23. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: A regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 357–85.
24. Dai XQ, Plummer G, Casimir M, et al. Sumoylation regulates insulin exocytosis downstream of secretory granule docking in rodents and humans. *Diabetes*. 2011; 60 (3): 838–47.
25. Ferdaoussi M, Dai X, Jensen MV, et al. Isocitrate-to-SENPI signaling amplifies insulin secretion and rescues dysfunctional beta cells. *J Clin Invest*. 2015; 125 (10): 3847–60.
26. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, et al. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes*. 2004; 53 (4): 1007–19.

27. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, et al. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*. 2006; 55 (Suppl 2): S16–23.
28. Zhao S, Poursharifi P, Mugabo Y, et al. α/β -Hydrolase domain-6 and saturated long chain monoacylglycerol regulate insulin secretion promoted by both fuel and non-fuel stimuli. *Molecular Metabolism*. 2015; 4 (12): 940–50.
29. Prentki M, Madiraju SR. Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 353 (1-2): 88–100.
30. Gannon MC, Nuttall FQ. Amino acid ingestion and glucose metabolism—a review. *IUBMB Life*. 2010; 62 (9): 660–8.
31. Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, et al. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest*. 1966; 45 (9): 1487–502.
32. Moulle VS, Ghislain J, Poitout V. Nutrient regulation of pancreatic beta-cell proliferation. *Biochimie*. 2017; 143: 10–7.
33. Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, et al. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev*. 2010; 68 (5): 270–9.
34. Stanley CA. Two genetic forms of hyperinsulinemic hypoglycemia caused by dysregulation of glutamate dehydrogenase. *Neurochem Intl*. 2011; 59 (4): 465–72.
35. Li C, Chen P, Palladino A, et al. Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2010; 285 (41): 31806–18.
36. Vetterli L, Carobbio S, Frigerio F, et al. The amplifying pathway of the beta-cell contributes to diet-induced obesity. *J Biol Chem*. 2016; 291 (25): 13063–75.
37. Feldmann N, del Rio RM, Gjinovci A, et al. Reduction of plasma membrane glutamate transport potentiates insulin but not glucagon secretion in pancreatic islet cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 338 (1-2): 46–57.
38. Carr RD, Larsen MO, Winzell MS, et al. Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295 (4): E779–84.
39. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, et al. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest*. 1996; 97 (12): 2728–35.
40. Moss CE, Glass LL, Diakogiannaki E, et al. Lipid derivatives activate GPR119 and trigger GLP-1 secretion in primary murine I-cells. *Peptides*. 2016; 77: 16–20.
41. Hue L, Taegtmeier H. The randle cycle revisited: A new head for an old hat. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2009; 297 (3): E578–E91.
42. Deeney JT, Gromada J, Høy M, et al. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem*. 2000; 275 (13): 9363–8.
43. Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, et al. G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia*. 2012; 55 (10): 2682–92.
44. Berne C. The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The oxidation of fatty acids and ketone bodies. *Biochem J*. 1975; 152 (3): 661–6.
45. Poitout V, Robertson RP. Minireview: Secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*. 2002; 143 (2): 339–42.
46. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: Fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 2008; 29 (3): 351–66.
47. Poitout V, Amyot J, Semache M, et al. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801 (3): 289–98.
48. Kim JW, Yoon KH. Glucolipotoxicity in pancreatic β -cells. *Diabetes Metab J*. 2011; 35 (5): 444–50.
49. Loubatieres-Mariani MM. [The discovery of hypoglycemic sulfonamides]. *J Soc Biol*. 2007; 201 (2): 121–5.
50. Seino S, Sugawara K, Yokoi N, et al. β -cell signalling and insulin secretagogues: A path for improved diabetes therapy. *Diabetes Obes Metab*. 2017; 19 (Suppl 1): 22–9.
51. Henquin JC. Misunderstandings and controversies about the insulin-secreting properties of antidiabetic sulfonylureas. *Biochimie*. 2017; 143: 3–9.
52. Philippaert K, Pironet A, Mesuere M, et al. Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity. *Nat Commun*. 2017; 8: 14733.