

Wykorzystanie modelu mysich mioblastów linii C2C12 w badaniu mechanizmów insulinooporności w mięśniach szkieletowych*)

KATARZYNA GRZELKOWSKA-KOWALCZYK, WIOLETTA WIETESKA

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Grzelkowska-Kowalczyk K., Wieteska W.

Mouse C2C12 myoblasts exposed to high glucose and high insulin as a cellular model of insulin resistance in skeletal muscles

Summary

The aim of the present study was to examine the effect of high glucose alone and in combination with high insulin on insulin-stimulated protein synthesis and the activation of insulin signaling pathways in mouse C2C12 myogenic cells. The experiments were performed on mouse C2C12 myoblasts subjected to differentiation under normal glucose (5 mmol/l), high glucose alone (15 mmol/l), or in combination with high insulin (50 nmol/l). Six-day differentiation under high glucose alone or in combination with high insulin resulted in insulin resistance, manifested by the abolition of the stimulatory effect on protein synthesis. High glucose concentration in the culture medium did not affect the protein kinase B (PKB) cellular content in C2C12 myogenic cells, whereas in cells preincubated with a combination of high glucose and high insulin a slight but significant increase (of 19%) in PKB protein content was determined. Insulin caused the activation of protein kinase B (PKB) in control C2C12 myogenic cells. Pretreatment with high glucose did not affect PKB phosphorylation whereas in cells differentiated under high glucose and high insulin PKB activation by insulin was markedly attenuated as compared with the control (differentiation under normal glucose). Neither the p70^{S6k} protein content nor the pattern of insulin-mediated kinase activation was affected by pretreatment with high glucose, however high glucose and high insulin in combination caused an impairment in the p70^{S6k} phosphorylation when compared to the control. High glucose exerted no significant changes in MAP kinase protein content, however concomitant treatment with high glucose and high insulin resulted in the decrease in p42^{MAPK} and p44^{MAPK} proteins (by 20%). During the whole period of observation, p42^{MAPK} exhibited basal phosphorylation that was not modified in the presence of insulin. However, the phosphorylation of p42^{MAPK} was profoundly impaired in cells preincubated with high glucose alone or in combination with high insulin. In conclusion: 1) high glucose abolishes the stimulatory action of insulin on protein synthesis without changes in PKB and p70^{S6k} activation; 2) high glucose and high insulin in combination abolish the stimulatory effect of insulin dependent on PKB- and p70^{S6k}; 3) the stimulatory action of insulin on protein synthesis in C2C12 myogenic cells depends on basal phosphorylation of p42^{MAPK}.

Keywords: insulin resistance, protein synthesis

Współczesny model przekazywania sygnału insuliny opisuje sieć interakcji wielu białek wewnątrzkomórkowych. Związanie insuliny z podjednostką α receptora prowadzi do autofosforylacji podjednostki β i ujawnienia jej aktywności kinazy tyrozynowej. Endogennym substratem dla receptora insulinowego jest cytoplazmatyczne białko IRS-1 (insulin receptor substrate-1), które w formie ufosforylowanej wchodzi w niekowalencyjne połączenia z innymi białkami wewnątrzkomórkowymi, głównie z kinazą fosfatydyloinozytolu (PI-3K) oraz białkiem Grb2 (growth factor receptor-binding protein-2), stanowiącym ogniwo pomiędzy IRS-1 a szlakiem Ras (25). Związanie IRS-1 z tymi białkami powoduje ich aktywację i w konsekwen-

cji dywergencję sygnału na wiele różnych szlaków już na wczesnych etapach systemu przekazywania. Uważa się, iż kluczową rolę w wewnątrzkomórkowej kaskadzie przekazywania odgrywają białkowe kinazy serynowo-treoninowe (ser/thr). Liczne dowody wskazują, że pobudzenie receptora insuliny prowadzi do aktywacji przynajmniej dwóch ważnych szlaków: w skład pierwszego wchodzi PI-3K i zależne od niej: kinaza białkowa B (PKB) i niektóre izoformy kinazy białkowej C (PKC ζ/λ) oraz kinaza p70^{S6k}, natomiast drugi obejmuje białka Ras i Raf kontrolujące aktywację kinazy MAP (Mitogen-Activated-Protein kinase).

W pracach badawczych zmierzających do poznania wewnątrzkomórkowych dróg przekazywania sygnału

insuliny wiele uwagi poświęcono poszukiwaniu ich potencjalnych modyfikacji mogących wyjaśnić osłabione działanie insuliny, towarzyszące wielu stanom patologicznym. Oporność na insulinę występuje przede wszystkim w cukrzycy typu 2, chociaż wiadomo, że rozwija się również w cukrzycy typu 1 jako zjawisko wtórne do hiperglikemii (19). Wykazano, że w efekcie hiperglikemii częściowo mogą pośredniczyć metabolity szlaku heksozamin (5) lub aktywacja różnych izoform kinazy białkowej C (11).

Liczne obserwacje wskazują, że fosforylacja białka IRS-1 przez białkowe kinazy ser/thr spełnia istotną rolę w regulacji aktywności szlaku transdukcji sygnału insuliny (10, 28). Według ostatnich doniesień, czynniki środowiska zewnątrzkomórkowego wywołujące oporność na insulinę mogą oddziaływać na aktywność swoistych kinaz ser/thr i za ich pośrednictwem modulować aktywność szlaku przekazywania sygnału insuliny (7).

Powyższe obserwacje stały się przesłanką do podjęcia badań, które przeprowadzono w układzie *in vitro* na kulturach mysich mioblastów linii C2C12. Ich celem było określenie wpływu insuliny na syntezę białka w komórkach miogennych poddanych różnicowaniu w obecności wysokiego stężenia glukozy lub wysokiego stężenia glukozy i insuliny, występujących w cukrzycy insulinozależnej i insulinoniezależnej oraz wyjaśnienie roli wybranych elementów przekazywania sygnału wzbudzonego przez insulinę w regulacji syntezy białka mięśniowego.

Materiał i metody

Kultura mysich komórek miogennych linii C2C12.

Badania przeprowadzono na mysich mioblastach linii C2C12, otrzymanych z banku komórek European Collection of Animal Cell Culture (Porton Down, UK). Kultury mioblastów hodowano w pożywce DMEM, wzbogaconej 10% FCS (10% FCS/DMEM), z dodatkiem penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml), gentamycyny (10 mg/ml), tylozyny (8 mg/ml) i fungizonu (250 U/ml) w inkubatorze z dopływem CO₂ (Sanyo MCO-17-AIC, Sanyo Electric Co., Ltd. Japonia), w atmosferze 5% CO₂/95% wilgotności, w temperaturze 37°C (310 K). Pożywkę hodowlaną wymieniano co 48 godzin. Wszystkie prace prowadzone na kulturach komórkowych wykonywano w kabinie laminarnej z nawiewem sterylnego powietrza (Clean Air Technik B. V. DLF 460, Woerden, Holandia), przy pomocy sterylnego sprzętu laboratoryjnego i sterylnych odczynników z zachowaniem zasad aseptyki.

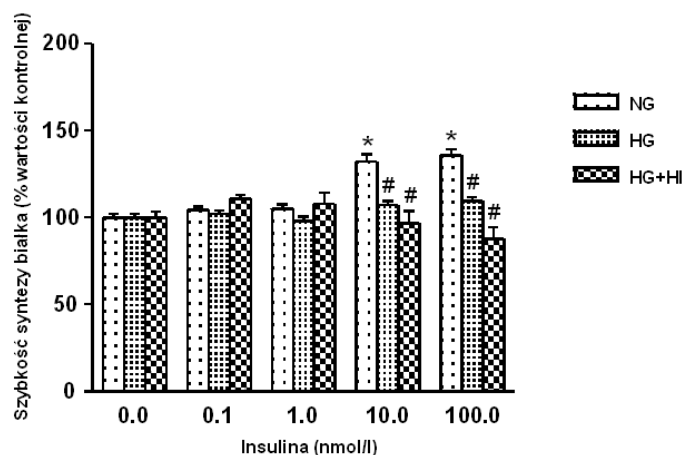
Badanie syntezy białka (metoda izotopowa). Mioblasty pozyskane z hodowli ciągłej wysiano na płytkach 24-zagłębieniowych. Po uzyskaniu 100% konfluentności pożywkę wzrostową wymieniono na podłoże różnicujące, wzbogacone 2% surowicy końskiej (2% HS/DMEM), do którego wprowadzono glukozę (15 mmol/l) lub glukozę (15 mmol/l) i insulinę (50 nmol/l). Hodowlę utrzymywano przez 5 dni, w tym czasie co 48 godzin wymieniano pożywkę. W piątym dniu różnicowania komórki poddano 24-godzinnemu działaniu insuliny w zakresie stężeń

0,1-100 nmol/l. Kultury kontrolne utrzymywano w pożywce 2% HS/DMEM, w której stężenie glukozy wynosiło 5 mmol/l.

Syntezę białka komórkowego oceniano na podstawie wbudowywania znakowanej [4,5-³H]leucyny (ICN Polfa Rzeszów) w białko komórkowe. Roztwór znacznika izotopowego w PBS-D podawano do kultur komórkowych (aktywność końcowa 1 µCi/ml) na 4 godziny przed zakończeniem inkubacji z insuliną. Pomiar przeprowadzono w beta-spektrofotometrze (1600 CA Tri-Carb Liquid scintillation analyzer, Packard, Canberra Comp.), a tempo syntezy białka wyrażano jako % radioaktywności znakowanej leucyny wbudowanej we frakcje kwasowo-nierozpuszczalne białka w stosunku do grupy kontrolnej.

Badanie ekspresji i aktywacji kinaz białkowych (immunoblotting). W celu zbadania ekspresji i aktywacji kinaz białkowych zawiesinę mysich mioblastów linii C2C12 w pożywce wzrostowej (10% FCS/DMEM) wysiano do sterylnych butelek (Nunclon™ Surface, Nunc™, Dania) i prowadzono hodowlę do czasu uzyskania 100% konfluentności, wymieniając pożywkę co 48 godzin. Następnie pożywkę wzrostową wymieniono na różnicującą (2% HS/DMEM), do której wprowadzono glukozę (15 mmol/l) lub glukozę (15 mmol/l) i insulinę (50 nmol/l). Kultury kontrolne prowadzono w pożywce 2% HS/DMEM. W szóstym dniu różnicowania usunięto podłoże różnicujące, komórki przepłukano PBS-D, poddano 3-godzinnej inkubacji w pożywce podstawowej DMEM, a następnie traktowano insuliną (100 nmol/l) w czasie 10-50 minut. Po upływie tego czasu komórki przepłukano zimnym PBS-D i zbierano przez zeskrobanie. Następnie komórki poddano lizie, a całkowite stężenie białka w lizatach oznaczono metodą Bradforda.

Białka rozdzielono elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarczanu dodecylu sodu w apa-



Ryc. 1. Wpływ insuliny na syntezę białka w mysich komórkach miogennych linii C2C12 poddanych różnicowaniu w obecności fizjologicznego stężenia glukozy (5 mmol/l, NG), wysokiego stężenia glukozy (15 mmol/l, HG) oraz wysokiego stężenia glukozy i wysokiego stężenia insuliny (50 nmol/l, HG + HI). Przedstawione wartości są średnimi arytmetycznymi (+ SEM), wyrażonymi jako % wartości kontrolnej (bez insuliny) w każdej grupie, n = 12

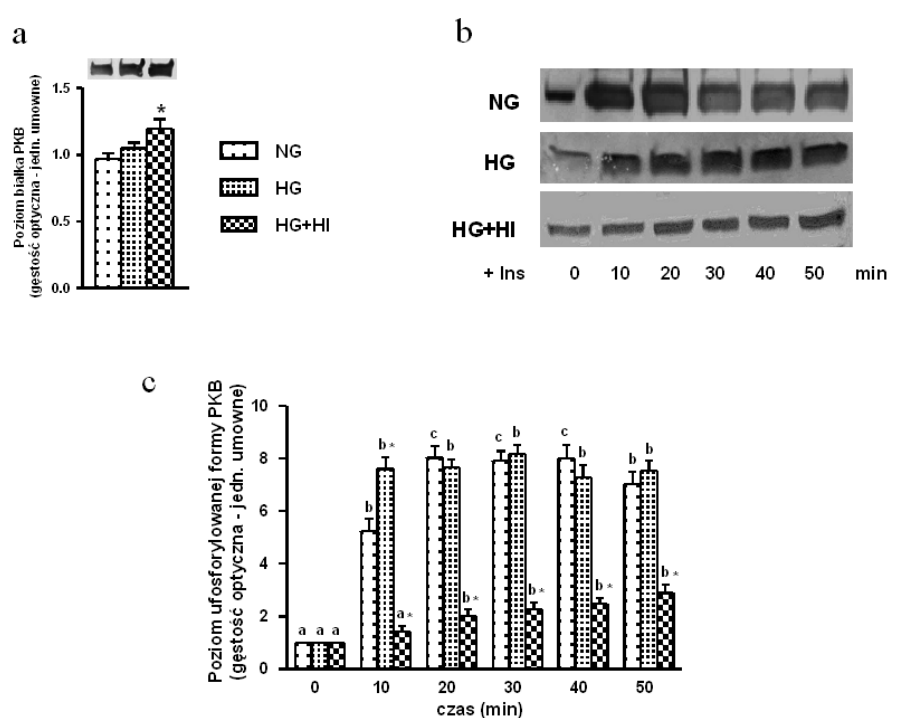
Objaśnienia: * oznacza statystycznie istotną różnicę w porównaniu z traktowaniem bez insuliny w tej samej grupie; # oznacza statystycznie istotną różnicę w porównaniu z traktowaniem tym samym stężeniem insuliny w obecności fizjologicznego stężenia glukozy (grupa NG)

racie Mini-Protean II Bio-Rad. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100 V przez 3 godziny. Elektrotransfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową wykonano przy napięciu 100 V przez 90 minut. Membrany inkubowano ze swoistym przeciwciałem pierwotnym przez 12 godzin w temperaturze 4°C (277 K), a następnie z odpowiednim przeciwciałem wtórnym sprzężonym z peroksydazą chrzastą. Reakcję nasilonej chemiluminescencji (enhanced chemiluminescence) wywołano z użyciem ECL Western Blotting Detection Reagents. Detekcję prążków na membranach wykonano przy użyciu filmu autoradiograficznego Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences UK Ltd.), który następnie skanowano i poddano analizie gęstości optycznej za pomocą oprogramowania Kodak 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Rochester, N. Y., USA).

Analiza statystyczna. Uzyskane wyniki wyrażono w formie średniej arytmetycznej \pm błąd standardowy. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta, jednoczynnikowej analizy wariancji i testu wielokrotnego rozstępu Tukeya. Różnice między wartościami średnimi na poziomie $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

Wyniki i omówienie

Wysokie stężenie glukozy lub glukozy i insuliny w środowisku inkubacyjnym różnicujących komórek linii C2C12 nie miało istotnego wpływu na syntezę białka mierzoną w warunkach podstawowych. Szybkość syntezy białka oceniana szóstego dnia różnicowania w komórkach traktowanych wstępnie wysokim stężeniem glukozy lub glukozy i insuliny wynosiła, odpowiednio, 102,8% i 111,9% wartości kontrolnej (różnicowanie w obecności fizjologicznego stężenia glukozy). Stymulujące działanie insuliny na syntezę białka w 6. dniu różnicowania stwierdzono w hodowli bez dodatku glukozy i insuliny, przy najwyższych zastosowanych stężeniach hormonu: 10 i 100 nmol/l (odpowiednio: 132,2% i 135,7% wartości kontrolnej) (ryc. 1). Sześciopięciodniowa preinkubacja komórek w pożywce zawierającej wysokie stężenie glukozy lub wysokie stężenie glukozy i insuliny wywołała oporność na insulinę w zakresie stymulacji syntezy białka, przejawiającą się całkowitym zniesieniem działania hormonu. Brak istotnych różnic między traktowaniami w podstawowej szybkości syntezy białka pozwala przypuszczać, że osłabiony wpływ insuliny na syntezę białka w komórkach preinkubowanych z wysokim stężeniem glukozy lub glukozy i insuliny, jest raczej przejawem



Ryc. 2.a. Poziom białka PKB w mysich komórkach miogennych linii C2C12 poddanych różnicowaniu w obecności fizjologicznego stężenia glukozy (5 mmol/l, NG), wysokiego stężenia glukozy (15 mmol/l, HG) oraz wysokiego stężenia glukozy i wysokiego stężenia insuliny (50 nmol/l, HG + HI). Immunoblotting przeprowadzono przy użyciu poliklonalnych przeciwciał rozpoznających białko PKB. Gęstość optyczną prążków przedstawiono w jednostkach umownych, przyjmując wartość uzyskaną w grupie kontrolnej (NG) jako 1.

b. – Wpływ insuliny na fosforylację PKB w mysich komórkach miogennych linii C2C12. Immunoblotting przeprowadzono przy użyciu poliklonalnych przeciwciał rozpoznających ufosforylowaną (aktywną) formę kinazy. Przedstawiony obraz jest reprezentatywny dla trzech niezależnych doświadczeń.

c. – Fosforylacja PKB w mysich komórkach miogennych linii C2C12 poddanych działaniu insuliny. Przedstawione wartości wyrażają stosunek gęstości optycznej prążków uzyskanych w analizie z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających ufosforylowaną formę kinazy do gęstości optycznej prążków uzyskanych w analizie z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających białko PKB. Wartość uzyskaną w czasie 0 w każdej grupie przyjęto jako 1

Objaśnienia: a, b, c – oznacza statystycznie istotną różnicę w obrębie tej samej grupy; * oznacza statystycznie istotną różnicę w porównaniu z grupą kontrolną (NG) w tym samym czasie

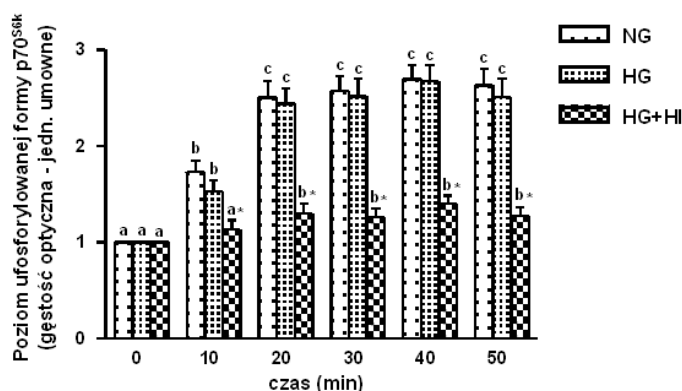
insulinooporności, a nie modyfikacji przebiegu miogenezy. Wobec wyraźnego wpływu wysokiego stężenia glukozy i insuliny na syntezę białka w komórkach miogennych poddanych działaniu insuliny, celem dalszych prac badawczych było prześledzenie ekspresji i aktywacji wybranych ogniw wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału wzbudzonego insuliną.

Wcześniejsze badania wykazały, że kinaza białkowa B podlega fosforylacji w ludzkich mięśniach szkieletowych i szczurzych miotubach L6 w odpowiedzi na insulinę i IGF-I w sposób zależny od kinazy PI-3 (1, 4), a zatem potencjalna modyfikacja ekspresji i/lub aktywacji PKB mogłaby tłumaczyć osłabioną odpowiedź komórek docelowych na hormon w stanach oporności na insulinę.

Wysokie stężenie glukozy w pożywce inkubacyjnej nie spowodowało zmian poziomu białka PKB w ba-

danych komórkach, zaobserwowano jednak niewielki, ale statystycznie istotny wzrost poziomu PKB (19%, $p < 0,05$) w komórkach poddanych różnicowaniu w obecności wysokiego stężenia glukozy i insuliny (ryc. 2a). W mioblastach C2C12 w 6. dniu różnicowania stwierdzono aktywację PKB przez insulinę (100 nmol/l), mierzoną metodą immunoblottingu przy pomocy przeciwciał rozpoznających ufosforylowaną (aktywną) formę kinazy (ryc. 2b, c). Szczyt fosforylacji/aktywacji wystąpił 20 minut po podaniu hormonu, a po 50 minutach jego działania zaobserwowano istotny spadek aktywności PKB. Aktywacja PKB przez insulinę w komórkach poddanych wstępnej 6-dniowej inkubacji w pożywce z wysokim stężeniem glukozy była podobna do obserwowanej w warunkach kontrolnych. Wzrost fosforylacji PKB pod wpływem insuliny był istotnie mniejszy w porównaniu ze zmianami aktywacji tej kinazy w kulturach komórkowych utrzymywanych w pożywce kontrolnej i w obecności wysokiego stężenia glukozy (ryc. 2c). Powyższe obserwacje potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych na szczurzych miotubach linii L6, w których fosforylacja PKB w obecności wysokich stężeń glukozy i insuliny była zmniejszona, podobnie jak dkomórkowy transport glukozy stymulowany przez insulinę (12). Zbliżone zmiany zanotowano w badaniach prowadzonych na szczurzych adipocytach traktowanych wysokim stężeniem glukozy i insuliny (3). Należy jednak zauważyć, iż dostępne dane bibliograficzne nie określają jednoznacznie znaczenia zmian aktywności PKB w stanach oporności na insulinę. Poza zmniejszoną aktywacją PKB w mięśniach szkieletowych w cukrzycy typu 2 (18) i po odnerwieniu (26), opisano również przypadki prawidłowej lub nasilonej aktywacji kinazy u szczurów z cukrzycą doświadczalną i podczas głodzenia (14, 22). Niektórzy autorzy podważają rolę kinazy białkowej B w efektach metabolicznych insuliny (23, 27). W prezentowanej pracy wzrost fosforylacji PKB pod wpływem insuliny był uzależniony od obecności hormonu w pożywce w czasie 6-dniowej preinkubacji (ryc. 2). Jedynie w przypadku mioblastów poddanych różnicowaniu w obecności wysokiego stężenia glukozy i insuliny zaobserwowano korelację między zmniejszoną aktywacją PKB i osłabionym efektem metabolicznym hormonu, mierzonym wbudowywaniem znakowanej leucyny w białko komórkowe. Powyższe wyniki sugerują, że kinaza białkowa B nie stanowi kluczowego elementu w regulacji syntezy białka przez insulinę w komórkach miogennych poddanych różnicowaniu w obecności wysokiego stężenia glukozy.

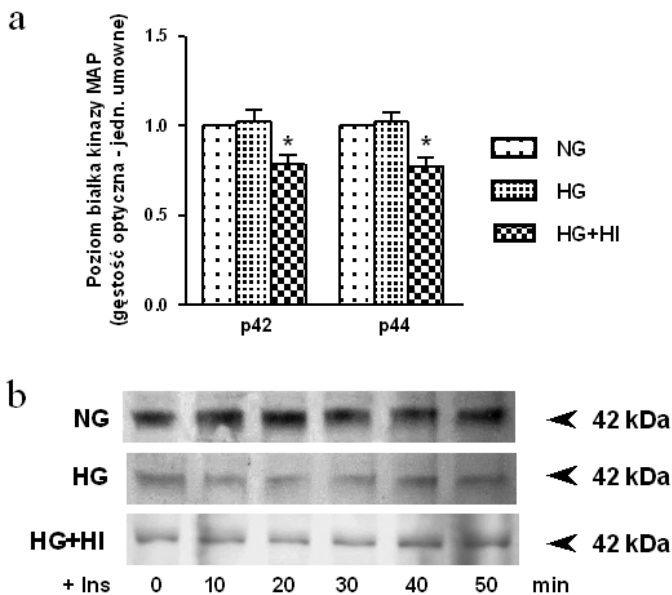
Ekspozycja komórek na insulinę wywołała aktywację kinazy $p70^{S6k}$, zależnej m.in. od PKB (ryc. 3). W warunkach podstawowych, po rozdiale elektroforetycznym $p70^{S6k}$ występuje w postaci pojedynczego prążka o masie ok. 70 kDa. W wyniku aktywacji kinazy pojawiają się formy wykazujące różny stopień ufosforylowania i w konsekwencji zmniejszoną ruchliwość



Ryc. 3. Wpływ insuliny na fosforylację $p70^{S6k}$ w mysich komórkach miogennych linii C2C12 poddanych różnicowaniu w obecności fizjologicznego stężenia glukozy (5 mmol/l, NG), wysokiego stężenia glukozy (15 mmol/l, HG) oraz wysokiego stężenia glukozy i wysokiego stężenia insuliny (50 nmol/l, HG + HI). Immunoblotting przeprowadzono przy użyciu poliklonalnych przeciwciał rozpoznających białko $p70^{S6k}$. Przedstawiony obraz jest reprezentatywny dla trzech niezależnych doświadczeń. Gęstość optyczną prążków przedstawiono w jednostkach umownych, przyjmując wartość uzyskaną w czasie 0 w każdej grupie jako 1

Objaśnienia: jak na ryc. 2.

elektroforetyczną. Dynamika fosforylacji $p70^{S6k}$ pod wpływem insuliny była podobna w kulturach kontrolnych i preinkubowanych w pożywce wzbogaconej w glukozę. W komórkach preinkubowanych w pożywce z wysokim stężeniem glukozy i insuliny aktywacja $p70^{S6k}$ pod wpływem insuliny była znacznie osłabiona. Sześciodniowa inkubacja komórek w pożywce z wysokim stężeniem samej glukozy lub w połączeniu z wysokim stężeniem insuliny nie miała wpływu na poziom białka $p70^{S6k}$. Rola kinazy $p70^{S6k}$ w systemie przekazywania sygnału polega przede wszystkim na regulacji ufosforylowania białka S6 podjednostki 40S rybosomu oraz swoistych białek komórkowych, kontrolujących etap inicjacji i wydłużania łańcuchów białkowych w procesie translacji (15). Zmniejszona aktywacja $p70^{S6k}$ przez insulinę w komórkach poddanych różnicowaniu w obecności wysokiego stężenia glukozy i insuliny (ryc. 3) oraz obserwowane osłabienie efektu biologicznego hormonu (ryc. 1) potwierdzają związek $p70^{S6k}$ z regulacją syntezy białka w komórkach mięśniowych. Wyniki te są zgodne z poprzednimi obserwacjami przeprowadzonymi na izolowanych mięśniach szczurów traktowanych deksametazonem (6). Słaba aktywacja $p70^{S6k}$ jest, prawdopodobnie, odzwierciedleniem zmian aktywności wyższych pięt wewnątrzkomórkowego systemu przekazywania sygnału, m.in. PKB, w następstwie traktowania wysokim stężeniem insuliny. Stwierdzono, iż komórki mięśniowe linii L6 preinkubowane przez 24 godziny z insuliną (stężenie od 0 do 1000 nmol/l) wykazują zmniejszoną aktywację szlaków kinaz: PI-3K/PKB oraz kinazy MAP (20). Z drugiej strony, istnieją doniesienia o prawidłowej aktywacji $p70^{S6k}$ przez insulinę w mięśniach szkieletowych szczurów z cukrzycą doświadczal-



Ryc. 4. a – Poziom białka kinazy MAP w mysich komórkach miogennych linii C2C12 poddanych różnicowaniu w obecności fizjologicznego stężenia glukozy (5 mmol/l, NG), wysokiego stężenia glukozy (15 mmol/l, HG) oraz wysokiego stężenia glukozy i wysokiego stężenia insuliny (50 nmol/l, HG + HI). Immunoblotting przeprowadzono przy użyciu poliklonalnych przeciwciał rozpoznających izoformę p42^{MAPK} i izoformę p44^{MAPK}. Gęstość optyczną prążków przedstawiono w jednostkach umownych, przyjmując wartość uzyskaną w grupie kontrolnej (NG) dla każdej izoformy jako 1. * oznacza statystycznie istotną różnicę w porównaniu z grupą kontrolną (NG). **b** – Fosforylacja p42^{MAPK} w mysich komórkach miogennych linii C2C12. Immunoblotting przeprowadzono przy użyciu poliklonalnych przeciwciał rozpoznających ufosforylowaną (aktywną) formę kinazy. Przedstawiony obraz jest reprezentatywny dla trzech niezależnych doświadczeń

ną, indukowaną przez streptozotocynę, u których stwierdzono insulinooporność (9).

W komórkach miogennych występują dwie izoformy kinazy MAP, różniące się nieznacznie ciężarem molekularnym i w konsekwencji ruchliwością elektroforetyczną: 42 kDa i 44 kDa. Obecność wysokiego stężenia glukozy w środowisku inkubacyjnym różnicujących mioblastów nie miała wpływu na poziom białka kinazy MAP, jednakże jednoczesne wstępne traktowanie komórek wysokim stężeniem glukozy i insuliny spowodowało spadek poziomu białek p42^{MAPK} i p44^{MAPK} (średnio o 20%, $p < 0,05$) (ryc. 4a). Badania z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających ufosforylowaną (aktywną) formę kinazy wykazały, że w badanych komórkach fosforylacji podlega przede wszystkim izoforma p42^{MAPK} (ryc. 4b). Nie stwierdzono wpływu insuliny na fosforylację badanych izoform kinazy MAP. W całym 50-minutowym okresie obserwacji p42^{MAPK} wykazywała podstawowy stopień ufosforylowania, niezależnie od obecności hormonu w pożywce. Należy jednak zauważyć, iż poziom ufosforylowania p42^{MAPK} był istotnie obniżony w komórkach poddanych różnicowaniu w obecności wysokiego stężenia samej glukozy lub w połączeniu z wysokim

stężeniem insuliny, w porównaniu z kulturą kontrolną. Częściowo potwierdza to cytowane powyżej obserwacje o hamującym wpływie wysokich stężeń insuliny na aktywność MAP w szczurzych komórkach mięśniowych L6 (20), pozostaje jednak w sprzeczności z doniesieniami o podwyższonej aktywności tej kinazy MAP w różnych tkankach w cukrzycy doświadczalnej (8, 16). Przyczyną tej pozornej rozbieżności wyników może być: 1) różna wrażliwość wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału w komórkach miogennych na wczesnych etapach różnicowania i w dojrzałej tkance mięśniowej na ten sam czynnik (wysokie stężenie glukozy) lub 2) udział innych czynników występujących w środowisku zewnątrzkomórkowym w cukrzycy. Wykazano, że czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α) powoduje wzrost fosforylacji kinazy MAP w mięśniach szkieletowych szczura (17) i w komórkach mięśni gładkich (13). Stwierdzono ponadto, że TNF- α może modyfikować aktywność niektórych elementów systemu przekazywania sygnału wywołanego przez insulinę (7). Pomimo braku aktywacji kinazy MAP przez insulinę w miocytach C2C12, następstwa obniżonego poziomu ufosforylowania tej kinazy zasługują na uwagę ze względu na dużą liczbę różnych białek cytozolowych i jądrowych będących jej potencjalnymi substratami, takich jak fosfolipaza A₂, c-Myc, p62^{TCF} (2), Raf (24), IRS-1 (21). Ponadto, zmniejszona fosforylacja kinazy MAP oraz osłabione działanie insuliny w komórkach miogennych poddanych różnicowaniu w obecności wysokich stężeń glukozy oraz glukozy i insuliny mogą wskazywać na pośredni udział kaskady MAP w regulacji syntezy białka w badanych komórkach.

Przedstawione wyniki badań, przeprowadzonych w układzie *in vitro* określają bezpośredni wpływ wysokiego stężenia glukozy oraz wysokiego stężenia glukozy i insuliny, wybranych czynników środowiska zewnątrzkomórkowego charakterystycznych dla cukrzycy insulinozależnej i insulino niezależnej, na odpowiedź komórek miogennych na insulinę w zakresie stymulacji syntezy białka oraz na ekspresję i aktywność białkowych kinaz ser/thr.

Wnioski

Na podstawie otrzymanych wyników można wysnuć następujące wnioski:

1. Wysokie stężenie glukozy w środowisku zewnątrzkomórkowym różnicujących mioblastów znosi stymulujący wpływ insuliny na syntezę białka na drodze mechanizmu niezależnego od kinazy białkowej B i p70^{S6k}.

2. Wysokie stężenie glukozy i insuliny w środowisku zewnątrzkomórkowym znosi stymulujący wpływ insuliny na syntezę białka w sposób zależny od PKB i p70^{S6k}.

3. Istnieje zależność pomiędzy podstawowym poziomem fosforylacji kinazy p42^{MAPK} a stymulującym działaniem insuliny na syntezę białka w badanych komórkach.

Piśmiennictwo

1. Alessi D. R., Andjelkovich M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B. A.: Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-I. *EMBO J.* 1996, 15, 6541-6551.
2. Blenis J.: Signal transduction via MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 5889-5892.
3. Buren J., Liu H.-X., Lauritz J., Eriksson J. W.: High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitization in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* 2003, 148, 157-167.
4. Cefalu F. T.: Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Exp. Biol. Med.* 2001, 226, 13-26.
5. Ceriello A.: New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a „casual” antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003, 26, 1589-1596.
6. Dardevet D., Sornet C., Grizard J.: Glucocorticoid-induced insulin resistance of protein synthesis is independent of the rapamycin-sensitive pathways in rat skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 1999, 162, 77-85.
7. De Alvaro C., Teruel T., Hernandez R., Lorenzo M.: Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a MAPK-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 17170-17178.
8. Grzelkowska K., Balage M., Dardevet D., Grizard J.: Altered insulin and IGF-I signaling in skeletal muscle of streptozotocin-diabetic rats. *Proceedings of Keystone Symposium: Diabetes Mellitus: Molecular mechanisms, genetics and prospects for new therapy.* Taos, USA 2000.
9. Grzelkowska K., Dardevet D., Balage M., Grizard J.: Involvement of rapamycin-sensitive pathway in the insulin regulation of muscle protein synthesis in streptozotocin-diabetic rats. *J. Endocrinol.* 1999, 160, 137-145.
10. Gual P., Gremeaux T., Gonzalez T., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J. F.: MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 2003, 46, 1532-1542.
11. Houdali B., Nguyen V., Ammon H. P., Haap M., Schechinger W., Machic M., Rett K., Haring H. U., Schleicher E. D.: Prolonged glucose infusion into conscious rats inhibits early steps in insulin signaling and induces translocation of GLUT4 and protein kinase C in skeletal muscle. *Diabetologia* 2002, 45, 356-368.
12. Huang C., Somwar R., Patel N., Niu W., Torok D., Klip A.: Sustained exposure of L6 myotubes to high glucose and insulin decreased insulin-stimulated GLUT4 translocation but upregulates GLUT4 activity. *Diabetes* 2002, 51, 2090-2098.
13. Hsu Y.-M., Chiu C.-T., Wang C.-C., Chien C.-S., Luo S.-F., Hsiao L.-D., Liang K.-Y., Yang C.-M.: Tumour necrosis factor- α enhance bradykinin-induced signal transduction via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK in canine tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2001, 13, 633-643.
14. Kanoh Y., Bandyopadhyay G., Sajan M. P., Standaert M. L., Farese R. V.: Risiglitazone, insulin treatment, and fasting correct defective activation of protein kinase C-zeta/lambda by insulin in vastus lateralis muscles and adipocytes of diabetic rats. *Endocrinology* 2001, 142, 1595-1605.
15. Kraemer F. B., Takeda D., Natu V., Sztalryd C.: Insulin regulates lipoprotein lipase activity in rat adipose cells via wortmannin and rapamycin-sensitive pathways. *Metabolism* 1998, 47, 555-559.
16. Naito Z., Takashi E., Xu G., Ishiwata T., Teduka K., Yokoyama M., Yamada N., Sugisaki Y., Asano G.: Different influences of hyperglycemic duration on phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 in rat heart. *Exp. Mol. Pathol.* 2003, 74, 23-32.
17. Nolte L. A., Hansen P. A., Chen M. M., Schluter J. M., Gulve E. A., Hollloszy J. O.: Short-term exposure to tumor necrosis factor- α does not affect insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes* 1998, 47, 721-726.
18. Oku A., Nawamo M., Ueta K., Fujita T., Umebayashi I., Arakawa K., Kano-Ishihara T., Saito A., Anai M., Funaki M., Kikuchi M., Oka Y., Asano T.: Inhibitory effect of hyperglycemia on insulin-induced Akt/protein kinase B activation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 2001, 280, E816-824.
19. Perseghin G., Lattuada G., Danna M., Sereni L. P., Maffi P., De Cobelli P., Battezzati A., Secchi A., Del Maschio A., Luzi L.: Insulin resistance, intramyocellular lipid content, and plasma adiponectin in patients with type I diabetes. *Am. J. Physiol.* 2003, 285, E1174-1181.
20. Pirola L., Bonnafous N., Johnston A. M., Chaussade C., Portis F., Vanobberghen E.: Phosphoinositide 3-kinase-mediated reduction of insulin receptor substrate-1/2 protein expression via different mechanisms contributed to the insulin-induced desensitization of its signaling pathways in L6 muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 15641-15651.
21. Qiao L. Y., Goldberg J. L., Russel I. C., Sun X. J.: Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 10625-10632.
22. Rojas F. A., Hirata A. E., Saad M. J.: Regulation of IRS-2 tyrosine phosphorylation in fasting and diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001, 183, 63-69.
23. Valverde A. M., Lorenzo M., Navarro P., Mur C., Benito M.: Okadaic acid inhibits insulin-induced glucose transport in fetal brown adipocytes in an Akt-independent and protein kinase C-dependent manner. *FEBS Lett.* 2000, 472, 153-158.
24. Wartmann M., Turowski P., Saltiel A. R., Hynes N. E.: Negative modulation of membrane localization of the Raf-1 protein kinase by hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 915-923.
25. White M. F., Kahn C. H.: The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 1-4.
26. Wilkes J. J., Bonen A.: Reduced insulin-stimulated glucose transport in denervated muscle is associated with impaired Akt- α activation. *Am. J. Physiol.* 2000, 279, E912-E919.
27. Wojtaszewski J. F. P., Hansen B. F., Gade J., Kiens B., Markuns J. F., Good-year L. J., Richter E. A.: Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. *Diabetes* 2000, 49, 325-331.
28. Zick Y.: Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends. Cell. Biol.* 2001, 11, 437-441.

Adres autora: dr Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: k_grzel_kow@poczta.fm