اثرات مقاومت در برابر انسولین بر روی رشد عضله و توانایی انجام حرکات ورزشی؛ در موش‌های مبتلا به دیابت نوع 2

دیابت نوع 2

با از دست دادن حجم و بافت ماهیچه، کاهش عملکرد عضله و افزایش ناتوانی همراه است. برای درک بهتر مکانیسم‌هایی که موجب زوال عضله در دیابت نوع 2 می‌شوند، ما فاکتورهایی همچون وزن عضله، توانایی انجام حرکات ورزشی و شرایط بیوشیمیایی موش‌های db/db و TallyHo در سنین قبل از ابتلا به دیابت و بعد از ابتلا به آن را مورد ارزیابی قرار داده‌ایم. بالاترین سرعت و انعطاف‌پذیری عضله و وزن موش‌های db/db در مرحلهٔ پیش از ابتلا به دیابت کاهش می‌یابد و این کاهش در دورانی که موش مبتلا به دیابت می‌گردد، شدیدتر از قبل می‌باشد. در نقطهٔ مقابل، در مراحل پیشرفت بیماری، از مرحلهٔ پیش از ابتلا تا مرحلهٔ ابتلای موش‌های نوع TallyHo به دیابت، حجم عضله آنها افزایش چشم‌گیری داشته و سرعت عملکرد عضلاتشان نیز تغییری نکرد. تجزیه و تحلیل مکانیسم‌هایی که احتمالا در کاهش وزن عضلهٔ موش‌های db/db نقش دارند نشان داد که روند فسفریلاسیون آنزیم‌هایی که سنتز پروتئین را ترویج می‌کنند در موش‌های db/db بسیار کند می‌گردد. علاوه‌براین، مشخص شد در موش‌های db/db که در مراحل پیش از ابتلا به دیابت (6 هفتگی) و مرحلهٔ ابتلا به دیابت (12 هفتگی) قرار دارند، زوال نوعی پروتئین موسوم به پروتئین پروتئازومال با سرعت بیشتری ادامه می‌یابد و سطح پروتئین‌های پلی یوبی کوئیتین افزایش می‌یابد. حرکت مداوم روی تردمیل باعث می‌گردد تا سطح گلوکز و توانایی انجام حرکات ورزشی در موش‌های db/db بهبود یابد و نشانگرهای زوال پروتئین کاهش می‌یابند ولی وزن عضله به طور خفیف افزایش می‌یابد. تفاوت‌ها در فنوتایپ عضله بین این دو گونه موش مبتلا به دیابت نوع 2 نشان داد که مقاومت به انسولین و هایپرگلیسمی بالا، به تنهایی برای کاهش سریع حجم و عملکرد عضله ناکافی هستند و اینکه اثرات دیابت روی وزن و عملکرد عضله مختص مدل‌های حیوانی است.

سارکوپنیا؛ یوبی کوئیتین

در انسان‌ها، کاهش جرم و ضعیف‌تر شدن عضلات با بالا رفتن سن امری عادی است. وقتی زوال عضله تا جایی پیش می‌رود که از لحاظ آسیب‌شناسی، مشکل‌زا محسوب می‌شود به اصطلاح آن را سارکوپنیا می‌نامند و منجر به ناتوانی جسمی و بستری طولانی مدت فرد در بیمارستان می‌گردد. دیابت قندی نوع 2 (T2DM) با کاهش سریع جرم و عملکرد عضله در مسن‌ترها همراه است و منجر به افزایش شیوع سارکوپنیای بالینی در میان مبتلایان به T2DM می‌گردد. این کاهش عملکرد عضله ممکن است تا 400٪ خطر سقط جنین و شکستگی لگن را افزایش دهد، شیوع و شدت ناتوانی جسمی را افزایش دهد و مدت بستری مبتلایان به دیابت در بیمارستان را افزایش دهد.

اثرات دیابت روی عضلات اسکلتی انسان در افراد مسن‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است و مشخص شد که کاهش سالانهٔ جرم عضله و میزان افت سالانهٔ قدرت عضله در میان مبتلایان به دیابت، به ترتیب در حدود 26٪ و 32٪ بیشتر از آنهایی است که دیابت ندارند. درمان‌های فعلی برای لاغری عضله مبتلایان به دیابت، محدود به مصرف داروهای استاندارد، تغییر رژیم غذایی، ورزش و تزریق هورمون هستند. درمان دیابت تأثیر جزئی روی کاهش حجم و وزن عضلات مبتلایان به دیابت دارد و در یک مطالعه طولانی مدت که روی بیماران 70-60 ساله انجام شد و از ابزار جذب‌سنجی اشعهٔ ایکس با انرژی دوگانه استفاده شد، مشخص شد که افراد غیردیابتی 193 گرم از وزن عضلات خود را در طی یک سال از دست می‌دهند و این در حالی است که مبتلایان به دیابت که بیماری آنها تشخیص داده شده و در حال درمان هستند سالانه 293 گرم از وزن عضلات را از دست می‌دهند و آنهایی که بیماری‌شان تشخیص داده نشده است، 435 گرم در سال عضله از دست می‌دهند. مطالعات مبتنی بر روش‌های رادیوایزوتوپ روی انسان نشان می‌دهد که شتاب زوال عضله در بیماران مبتلا به دیابت ناشی از افت میزان پروتئین و رشد در نرخ کاهش پروتئین عضله است. علاوه بر افزایش میزان افت پروتئین در افراد دیابتی، درک ما از افت عضلهٔ دیابتی‌ها، عمدتا ناشی از مطالعه مدل‌های حیوانات جونده است.

موش‌های دیابتی استرپتوزوسین نوع 1 (T1DM) بهترین مدل حیوانی برای درک لاغری عضله مبتلایان به دیابت هستند که از لحاظ داروشناسی مشخص شده، کمبود انسولین منجر به

افزایش روند نابودی پروتئین در عضلات شده و سرعت لاغزی عضله افزایش می‌یابد. مسیرهای سیگنال‌دهی متکی به انسولین، مهمترین مولفه‌های این مدل هستند و از همین رو تأمین و جایگزین کردن انسولین یا انجام فرآیند فسفاتاز برای نجات عضله و جلوگیری از لاغری آن بسیار مناسب هستند. انسداد سیگنال‌دهی گلوکوکورتیدوئید نیز برای جلوگیری از لاغری عضله در موش‌های نوع استرپتوزوسین مناسب بوده و نشان دهندهٔ نقش موثر گلوکوکورتیدوئیدها در لاغری عضلهٔ دیابتی‌ها است. با وجود متقاعد کننده بودن این نتایج، مطالعات انجام گرفته روی موش‌های نوع T1DM با محدودیت‌هایی روبرو بوده‌اند زیرا دیابت نوع T1DM (کمبود انسولین) تنها در 10-5 درصد از مبتلایان به دیابت قندی مشاهده شده است و 95-90 درصد مابقی به دیابت نوع T2DM (مقاوم به انسولین) مبتلا هستند.

لاغری عضله در جوندگانی که به نوع 2 دیابت مبتلا هستند کمتر مشاهده می‌شود و مدل‌های مختلفی وجود دارند (از قبیل رژیم غذایی پر چرب، عضله با گیرایی بالای انسولین، IRS-1 و IRS-2) که تغییر خاصی در حجم عضله مشاهده نمی‌شود و در عین حال چندین مدل دیگر نیز وجود دارند (نظیر کمبود لپتین (ob/ob)، نقص گیرایی لپتین (db/db)، IRS-1/IRS-2) که کاهش شدیدی در حجم عضله مشاهده شده است. اغلب مطالعاتی که روی جوندگان مبتلا به دیابت نوع 2 انجام شده‌اند روی مدل-های ob/ob و db/db تمرکز نموده‌اند.

موش مبتلا به دیابت نوع ob/ob (لپتین جهش یافته)، بسیار چاق، دارای انسولین بسیار زیاد و دارای گلیسمی بالا می-باشد. وزن و حجم عضلات اسکلتی موش بزرگسال مبتلا به دیابت نوع ob/ob در مقایسه با حیوانات وحشی همسن خودش با سرعت بیشتری کاهش می‌یابد. از اثرات سریع بودن عضله موش مبتلا به دیابت ob/ob این است که کاهش قابل توجهی در سطح مقطع (CSA) و تناسب بین فیبرهای گلیکولیتیکی سریع مشاهده می-شود و تغییر خاصی در CSA یا تناسب بین فیبرهایی با سرعت اکسیداتیو آهسته مشاهده نمی‌شود. عملا، عضلات موش مبتلا به ob/ob در سطوح WT باقی می‌ماند و وقتی به CSA بهنجار می-شود تولید نیرو می‌کند اما سستی و خستگی زودرس در طول گرفتگی ماهیچه کاهش می‌یابد. کاهش تکثیر سلولی در طی

مراحل اولیه پس از تولد و در پاسخ به آسیب‌های شیمیایی در موش مبتلا به ob/ob گزارش شده است. اگرچه وجود لپتین در موش‌های ob/ob بالغ موجب می‌شود تا سطح گلیسمی بهنجار شود و تا حدودی توده عضلانی را بازیابی می‌کند ولی تغذیه موش بزرگسالان مبتلا به ob/ob، با وجود کاهش متوسط قند خون توده عضلانی را بهبود نمی‌بخشد.

فنوتایپ متابولیکی در موش مبتلا به db/db (جهش ژنی در پذیرش لپتین) مشابه با موش مبتلا به ob/ob است که دارای هیپرپالژی، چاقی ناشی از جوانی و دیابت است. بسته به پیش زمینهٔ ژنتیکی، موش‌های مبتلا به دیابت db / db دارای هیاپرپلازی در پانکراس [C57BL / 6J] یا لاغری در پانکراس / [C57BL KsJ] هستند و لاغری پانکراس منجر به بروز فنوتایپ‌های دیابتی شدید، کاهش وزن در اوایل شروع و طول عمر کوتاه در مقایسه با موش‌های مبتلا به دیابت ob/ob می‌گردد. موش‌های مبتلا به دیابت ob/ob همچنین دچار کاهش در اندازه عضلات اسکلتی، افزایش تجزیه پروتئین عضله، افزایش عملکرد پروتئازم و کاهش CSA فیبری در عضلات می‌شوند. ناتوانی در جذب گلوکز و کاهش اندازه عضلات در موش db/db تا حدی با درمان رویزیگلیتازون برطرف شده و حاکی از نقش موثر متابولیسم در کاهش اندازه عضله است.

در مجموع، یافته‌های قبلی نشان می‌دهد کهT2DM با افت سریع گلیکولیتیکی عضله اسکلتی همراه است که به بهبود سوخت و ساز بدن کمک می‌کند (مانند روشیگلیتازون در موش‌هایdb / db ، لپتین در موش‌های ob / ob یا درمان ضد دیابتی در انسان). توانایی انسولین در نجات کامل عضلات از لاغری در موش‌های T1DMنشان می‌دهد که کاهش سیگنال‌دهی انسولین به طور مستقیم می‌تواند باعث کاهش افت عضله در T2DM شود. سیگنال-دهی متعارف انسولین باعث افزایش سنتز پروتئین (از طریق تولید پروتئین کیناز B (Akt) و رپامایسین (mTOR) در پستانداران) و جلوگیری از تجزیه پروتئین است (از طریق سیگنال‌دهی (Akt/forkhead box O (FOXO) ؛ از لحاظ منطقی، مقاومت به انسولین می‌تواند سنتز پروتئین را کاهش و تجزیه پروتئین را افزایش دهد. با این حال، اگر پروتئین کاهش یابد، مشخص نیست سیگنال‌دهی انسولین در T2DM به طور مستقیم باعث از دست دادن عضلات یا سایر عوامل مرتبط با

لاغری عضلات در دیابتی‌ها می‌شود. در واقع، شروع، پیشرفت، فنوتایپ بیوشیمیایی و عواقب سیگنال‌دهی هنوز برای از دست دادن عضلات در T2DM معلوم نیست.

بنابراین، برای درک بهتر پیشرفت و علت مکانیسم لاغری عضلانی در T2DM، ما به مقایسه روند رشد و کاهش حجم عضله در هر دو مدل db / db و TallyHo در دیابت نوع T2DM می‌پردازیم. مدل TallyHo مورد مطالعه قرار گرفت، زیرا این یک مدل پلی ژنی از T2DM با سیگنال‌دهی آشکار لپتین است. علاوه‌براین، بیماری دیابت موش‌های TallyHo در دوران بلوغ گسترش می‌یابد و به ما اجازه می‌دهد تا تاثیر مقاومت به انسولین و هایپرگلیسمی را روی عضله را بررسی کنیم که بیشتر معطوف به مقایسه شرایط در شروع ابتلا به دیابت در موش های db/db است. ما همچنین بررسی کردیم که چگونه یک درمان معمول برای دیابت (ورزش مزمن) بر اندازه عضلانی، تحمل گلوکز و نشانگرهای سنتز و تخریب پروتئین عضلانی در موش‌های db/db تاثیر می‌گذارد. ما فرض کردیم که مشخص کردن شروع روند لاغری عضلانی در مدل‌های T2DM و همچنین اثرات ورزش کمک می‌کند تا مشخص شود کدام اجزای فنوتایپ دیابت عامل افت عضله در T2DM هستند.

طراحی و روش تحقیق

حیوانات

موش‌های db/db (BKS.Cg-Dock 7m $^{+/+}$ Leprdb/J)، کنترل‌های WT (C57BLKS/J) و موش‌های TallyHo (TallyHo/JngJ) از آزمایشگاه‌های جکسون (bar Harbor و ME) خریداری شدند. از آنجاییکه موش‌های TallyHoدر آزمایشگاه‌های جکسون به روش چند نژادی دو رگه پرورش یافتند و هیچ گونه کنترل دقیقی روی موش‌ها در مقایسه با موش‌های TallyHo وجود نداشت. برای غلبه بر این چالش، موش‌های TallyHo 8 هفته‌ای مورد مطالعه قرار گرفتند تا پیشینه دیابت در مقایسه با موش‌هایTallyHo 22 تا 24 هفته‌ای مورد بررسی قرار بگیرند. چاقی در موش‌های انتخاب شده WT C57BLKS / Jبا ارائه یک رژیم غذایی با چربی بالا (HFD، 4.73 کیلو کالری/گرم، 45% کیلو کالری از چربی؛D12451 ؛ رژیم غذایی مورد تحقیق، نیوبرانزویک، نیوجرسی) از سن 8 هفتگی

تا مرگ آنها در 20 هفتگی القا شد، در حالیکه تمام موش‌ها از یک رژیم غذایی استاندارد (3□0 کیلو کالری/گرم، 4.25٪ کیلوکالری از چربی) همانطور که قبلا شرح داده شد پیروی نموده اند. موش‌های نر تنها به دلیل فنوتایپ متابولیکی نسبتا همگن در مقایسه با ماده‌ها در مدل‌های db/db و TallyHo مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها در شرایط 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی با دسترسی ad libitum به غذا و آب نگه داشته شدند، به جز زمانی که از خوردن منع شده بودند (تحت شرایطی که در زیر شرح داده شده اند). موش‌ها با قرار گرفتن در معرض CO2 کشته شدند. تمام آزمایشات توسط کمیته مراقبت از حیوانات سازمان غیردولتی دانشگاه ایالتی اوهایو تأیید شد.

آزمایش تحمل گلوکز

پس از سپری کردن یک شب با تحرک سریع (موش db/db) و یا 6 ساعت تحرک سریع (موش TallyHo)، سطح قند خون ناشتا با استفاده از خون دم در یک کیت مانیتورینگ قند خون TRUEtrack (Walgreens, Columbus,OH) اندازه‌گیری شد. حداکثر حد فیزیکی گلوکومتر 33.3 میلی مول بود؛ سطوح گلوکز بیش از 33.3 میلی‌مولی (با عنوان HI) به عنوان روش درمان 33.3 میلی‌مولی برای مقایسه داده‌های کمی مورد استفاده قرار گرفتند. مقداری گلوکز (2 گرم بر کیلوگرم ip؛ سیگما-آلدریچ)، که در محلول نمکین Dulbecco’s phosphate-buffered حل شده بود (DPBS; Invitrogen, Carlsbad, CA)، به هر موش تزریق شد و قند خون در 30، 60، 90، 120 و 240 دقیقه پس از تزریق اندازه گیری شد. تست‌های تحمل گلوکز با محاسبه سطح یکپارچه تحت منحنی (AUC) سطح قند خون برای 240 دقیقه از آزمون مقایسه شد.

اندازه‌گیری اندازه بدن و وزن عضله

وزن بدن در حالت تغذیه‌ای تعیین شد. برای تعیین وزن عضلانی، پس از مرگ با استنشاق CO2، عضلات با دقت تشریح شد و تاندون‌ها تا لبه اولیه بافت عضله برداشته شدند. عضلات به طور مختصر در DPBS غوطه ور شدند، روی دستمال کاغذی پیچیده شد تا مایع اضافی حذف شود، بر روی یک تعادل

تحلیلی دیجیتالی قرار گرفته و سپس در نیتروژن مایع منجمد شدند.

آزمایش حداکثر مصرف اکسیژن روی تردمیل

حداکثر عملکرد اعضای قلبی عروقی و سرعت دویدن با استفاده از یک تردمیل متابولیک مدولار (Columbus Instruments, Columbus, OH) با اعمال تعدادی از تغییرات برای تطابق با ظرفیت پایین موش‌های db / db برای انجام حرکات ورزشی، به شرح زیر ارزیابی شد.

سازگاری: موش‌ها 1 تا 3 روز قبل از آزمایش و با قرار گرفتن بر روی یک تردمیل متحرک به مدت 3 دقیقه با آن سازگار شدند، سپس تردمیل به شبکه برق متصل شد (3 هرتز و 1.5 میلی آمپر) و با سرعت 6 متر در دقیقه به مدت 5 دقیقه روی آن پیاده‌روی نمودند.

آزمایش حداکثر مصرف اکسیژن. موش‌ها بر روی تردمیل قرار گرفتند (با شیب 0 درجه) و دستگاه به برق وصل شد. سرعت تردمیل تا زمان خستگی افزایش می‌یابد و به شرح زیر است: سرعت، مدت زمان، 0 متر بر دقیقه، 6 متر در دقیقه، 7، 8، 9 و 10 متر در دقیقه، هر کدام به مدت 30 ثانیه؛ 11متر بر دقیقه به مدت 1 دقیقه؛ 12، 13، 14 و 15 متر بر دقیقه، هر کدام به مدت 2 دقیقه؛ و 1+ متر در دقیقه بصورت متوالی. خستگی (نقطه توقف تردمیل) به عنوان نقطه‌ای تعریف می‌شود که موش بصورت مداوم و به مدت 5 ثانیه با برق شوک داده می‌شود. حداکثر مصرف اکسیژن (V_{O2max}) با قلهٔ مصرف اکسیژن در طی این آزمایش و رسیدن ضربان به بیش از 1/0 تعیین شد. حداکثر سرعت حرکت به عنوان سرعت حرکت روی تردمیل در نظر گرفته شده است که به شکل V_{O2max} تعریف شد.

اندازه‌گیری فعالیت‌های اختیاری

سطح فعالیت موش با اندازه‌گیری فاصله افقی پرتوهای مادون قرمز در طی 24 ساعت و با استفاده از سیستم جامع آزمایشگاهی مانیتورینگ حیوانات در دمای اتاق (CLAMS، Columbus Instruments) ارزیابی شد.

آزمایش قدرت چنگ‌زنی

قدرت چنگزنی بالاتنه با استفاده از یک ابزار دیجیتالی سنجش قدرت (ابزار کلمبوس) مورد سنجش قرار گرفت. موش‌ها توسط دمشان از جا می‌جهند که به آنها اجازه می‌دهد تا میله جلویی را به سمت خود بکشند و به صورت افقی روی صفحه رو به جلو حرکت کنند و حداکثر نیروی اعمال شده روی مبدل ثبت شد. این آزمایش 3 دفعه و هر مرتبه با 10 حرکت با 15 دقیقه استراحت بین دفعات تکرار شد؛ حداکثر تلاش توسط هر موش به عنوان حداکثر قدرت موش تعیین شد.

آزمایش پاسخ به مقدار بحرانی از انسولین

برای ارزیابی پاسخ بافت به انسولین، مقدار گلوکز موجود در خون دم موش مورد بررسی قرار گرفت و سپس مقداری انسولین انسانی نوترکیب (Humulin, 0.2 U/g body wt ip; Eli Lilly, Indianapolis, IN) یا DPBS به موش تزریق شد. ده دقیقه بعد از تزریق، گلوکز موجود در خون دم اندازه‌گیری شد، موش‌ها بلافاصله کشته شدند و بافت‌ها برداشته شدند.

ورزش شدید

موش‌ها در فاصله 5 تا 13 هفتگی و همانطور که قبلا شرح داده شد، با کمی تغییرات جزئی، وادار به انجام ورزش شدند. موش‌ها 80 دقیقه در روز، 5 روز در هفته و برای 8 هفته روی تردمیل ورزش کردند. ورزش بر روی شیب 20 درجه به صورت 4 دقیقه با سرعت بالا و 2 دقیقه با سرعت کم (بالا: 90-80% از سرعت V_{O2max} ، آهسته: 50٪ از سرعت V_{O2max}) انجام شد. سرعت حداکثری V_{O2max} برای موش‌هایی بود که ورزش می‌کردند و کنترل آنها به شکلی بود که در بالا توضیح داده شد، اما با اعمال تغییرات زیر در سرعت و شیب، به دنبال یافتن سرعت مناسب برای دویدن روی شیب بودیم: سرعت، مدت، شیب؛ 0 متر بر دقیقه، 5 دقیقه، 0 درجه؛ 6 متر در دقیقه، 5 دقیقه، 0 درجه؛ 6 متر در دقیقه، 2 دقیقه، 20 درجه؛ و 2 متر بر دقیقه، 2 دقیقه با شیب 20 درجه انجام شد. در پایان مطالعه، موش‌ها در یک حالت تغذیه‌ای و 3 تا 5 روز پس از آخرین تمرین کشته شدند. هیچ انسولین خارجی به موش‌ها تزریق نشده بود.

مقدارسنجی پروتئین با استفاده از Western Blotting

روش وسترن بلوتینگ با استفاده از تکنیک‌های استانداردی که قبلا شرح داده شد انجام می‌گیرد. غلظت پروتئین با روش برادفورد تعیین شد و مقادیر معادلی از پروتئین در هر مسیر پلی آکریلامید ژل بارگیری شد. پس از الکتروفورسیز، پروتئین به عمق 0/45 میکرومتری از غشای نیتروسلولزی منتقل شد و با رنگ پونکائو لکه‌دار شد (0.1٪ wt / vol Ponceau قرمز در 5٪ اسید استیک) تا روند بارگذاری پروتئین مشخص گردد. غشاء با محلول تریس بافر حاوی 0/5 درصد توویـن 20 (TBS-T) شسته شده و برای اتصال غیر اختصاصی آماده شد (دمای اتاق (RT)، 2 ساعت و 5٪ (wt/vol) از شیر بدون چربی در TBS-T). غشاها با پادتن‌های اولیه برای هر 3 ساعت در دمای اتاق یا کل شب در دمای 4 درجه سانتیگراد در محلول‌هایی با غلظت زیر مورد بررسی قرار گرفتند: سارکو (اندو) سلول‌های بنیادی پلاسمایی Ca^{2+}-ATPase (SERCA) 1:5.000 1a، پادتن سفارشی؛ SERCA2a، 1: 5000، پادتن سفارشی؛ α -آکتین، 1:25.000؛ CSQ، 1: 5000؛ فسفوآکت، 1:2.000 (pSer^{473}, Clone D9E XP؛ تکنولوژی سیگنال‌دهی سلول، Danvers، MA)؛ آکت 1: 2000؛ MuRF-1، 1: 1000 AP2041؛ ECM Biosciences، (ورسای، KY)؛ atrogin-1، 1: 1000 MP3401؛ ECM Biosciences)؛ پروتئین P-4E-1 (4EBP-1)، 1: 5000 (pThr$^{37/46}$, Clone 236B4؛ تکنولوژی سیگنال‌دهی سلول)؛ p70S6K، 1: 5000 (pSer$^{235/236}$، Clone D57.2.2E XP؛ تکنولوژی سیگنال‌دهی سلول)؛ phosphor-m TOR، 1: 2000 (pSer^{2448}؛ تکنولوژی سیگنال‌دهی سلول)؛ pFOXO1، 1:1000 (pSer^{256}، تکنولوژی سیگنال‌دهی سلول)؛ ضد پان ubiquitin، 1: 1000 (Clone FK2؛ تکنولوژی سیگنال‌دهی سلول)؛ و anti-polyubiquitin، Lys 48 -pecific، 1: 5000 (Clone Apu2: Millipore). پس از شستشو با 0.05٪ TBS-T، لکه‌ها با پادتن گرفته شده از ریشه خردل به مدت 1 ساعت در دمای اتاق مورد آزمایش قرار گرفتند و سپس دوباره با 0.05٪ TBS-T شستشو داده شده که مواد شیمي معدنی افزایش یافته بود (SubStrail Chemiluminescent Supraxignal West Dura؛ Thermo Fisher Scientific، Rockport، IL) و روی یک فیلم قرار گرفته است. لکه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (HP Imaging) و میزان پروتئین با استفاده از ضریب سنجی هر نوار انجام شد، که با شدت نسبی نوارهای کنترل بارگیری (α-آکین یا رنگ پونکائو) تعدیل یافته و با استفاده از نرم افزار تحلیل تصویر Image J (موسسات بهداشت ملی) تجزیه و تحلیل شدند.

آرایه‌های کورتیکواسترون و سیتوکین التهابی

از موش‌های WT C57BLKS / j 16 هفته‌ای، موش‌های 16 هفته‌ای db / db و موش‌های 8 ماهۀ TallyHo در حالت تغذیه‌ای بین 0900 و 1000 خون‌گیری شد. پنج دقیقه پیش از خون‌گیری، موش‌ها در یک قفس با دمای 37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا جریان خون در دم آنها افزایش یافته و روند خون‌گیری تسهیل شده و به سرعت انجام پذیرد. خون‌گیری در کمتر از 2 دقیقه انجام شد تا احتمال تغییرات ناشی از دستکاری در سیگنال-دهی گلوکوکورتیکوئید / التهابی کاهش یابد. سرم برای کورتیکوسترون آزاد با استفاده از یک کیت ELISA کورتیکواسترول (ADI-900؛ Farmingdale، NY) و طبق دستورالعمل سازنده، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطوح نسبی پروتئین‌های التهابی سرم با استفاده از پانل آرایه‌ای پادتن سیتوکین موشی (سیستم‌های تحقیق و توسعه، مینیاپولیس، MN)، بر اساس دستورالعمل‌های تولید کننده تعیین شد.

بافتشناسی. عضلات (به تعداد 2 تا 5) به آرامی در DPBS شسته شدند، برای حذف رطوبت اضافی در دستمال کاغذی پیچیده شدند و سپس در فرمالین 10٪ (vol / vol) نگهداری شدند. سپس بافت در پارافین آغشته شده، برش داده شد و با هماتوکسیلین / ائوزین یا رنگ آمیزی ماسون-تریکوم و با استفاده از تکنیک‌های استاندارد لکه‌دار شد. تصاویر با استفاده از یک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 20 برابر (Zeiss Axioskop 40، Oberkochen، آلمان) به دست آمدند. مقدار CSA الیاف با استفاده از نرم افزار Axiovision LE با حداقل 90 الیاف مجاور در هر نمونه محاسبه شد.

تفسیر داده‌ها

داده‌های آماری قابل توجهی با استفاده از آزمون t دو سویه به دست آمدند و $\alpha = 0.05$ تعیین شد. تمام آزمایشات متابولیک، عملکردی و بیوشیمیایی حداقل روی سه تا چهار حیوان در شرایط مشابه انجام شد. لکه‌های وسترن حداقل دو بار تکرار شدند.

نتایج

هدف اصلی این مطالعه شناسایی این موضوع است که چه مولفه-هایی از فنوتایپ دیابتی در افت عضله در دیابت نوع 2 نقش دارند. برای این منظور، ما از موش نر مبتلا به دیابت نوع 2 db/db و موش TallyHo استفاده کردیم که دیابت نوع 2 تقریبا در 8 و 14 هفتگی این موش‌ها آشکار می‌گردد. ما رابطه دیابت با توده و عملکرد عضله را با مقایسه وضعیت موش در سنین پیش از ابتلا و پس از ابتلا به دیابت بررسی نموده ایم.

پیشرفت فنوتایپ متابولیکی در موش‌های db/db

در ابتدا، ما رشد فنوتایپ دیابت در موش‌های db/db در سن 6 و 12 هفته در مقایسه با کنترل‌های WT همسن را مشاهده نمودیم. وزن کل بدن در موش‌های db/db در سن 6 هفته به تدریج زیاد می‌شود و در سن 12 هفتگی به میزان قابل توجهی نسبت به شاخص‌های کنترلی افزایش یافت (شکل A1). قند خون ناشتا در سن تا 6 هفتگی (WT mM 0/6 ± 8/3 در مقابل mM db/db 1/8 ± 13/83 ، P<0 / 05) به آرامی افزایش یافته و در موش‌های db/db 12 هفته، افزایش شدید در مقایسه با شاخص‌های کنترلی WT مشاهده شد (WT mM 0/6 ± 6/3 در مقابل mM db/db 2/8 ± 27/1، P<0/05). تحمل گلوکز در موش db/db در سنین 6 هفتگی نسبتا پایین بود (AUC 38/2±1/6 mM.h WT در مقابل mM.h db/db 78/9±0/3، P<0/05) اما در موش db/db در سنین 12 هفتگی به شدت پایین بود (AUC 37/1±7/8 mM.h WT در مقابل mM.h db/db 122/5±3/7، P<0/05) (شکل B1). در موش db/db در سن 12 هفته و ناشتا، سطح بالا از کلسترول خون، لیپوپروتئین با چگالی بالا، لیپوپروتئین با چگالی پایین و تری گلیسیرید (شکل C1) مشاهده شده است. این یافته ها مطابق نتایجی است که قبلا گزارش شده است. بر اساس این یافته‌ها، ما تصمیم به بررسی تغییرات عضله قلبی و اسکلتی در مراحل قبل از ابتلا (5-6 هفتگی) و پس از ابتلا به دیابت (12-13 هفتگی) گرفتیم.

کاهش توانایی موش‌های db/db برای ورزش

با رسیدن به سرعت نهایی V_{O2max} بر روی تردمیل، شاهد کاهش عملکرد ماهیچه‌های قلب و اسکلتی بودیم. در موش‌های 6 هفته-ای که در سن پیش از ابتلا بودند و یا در موش‌های 12 هفته‌ای

که در سن ابتلا بودند در مقایسه با شاخص‌های کنترلی، اختلالات قابل توجهی در حداکثر عملکرد قلب (V_{O2max}) مشاهده نشد (6 هفته: 0/01 ± 2/28 ml O_2/min WT در مقابل 0/08 ± 2/54 ml O_2/min db/db؛ 12 هفته: 0/18 ± 3/28 ml O_2/min WT در مقابل 0/10 ± 3/04 ml O_2/min db/db، P<0/05) (شکل 1D). حداکثر سرعت حرکت در 6 و 12 هفتگی به ترتیب 34.6 درصد و 64/1 درصد کاهش یافت (6 هفته: 1±36 m/min WT در مقابل 1±24 m/min db/db و 12 هفته: 1±38 m/min WT در مقابل 13/0±8/9 m/min db/db، P<0/05) (شکل 1E). کاهش ظرفیت عملکرد عضلانی اسکلتی با اندازه گیری قدرت درون بافتی تایید شد که در گروه 12 هفته‌ای به میزان 28٪ در مقایسه با شاخص کنترلی کاهش نشان داد (شکل E1).

شکل 1: رشد چاقی، عدم تحمل گلوکز و کاهش فعالیت ورزشی در موش‌های نر db/db: الف) وزن بدن موش db/db سریعتر از موش‌های وحشی (WT) و در 5 هفتگی شروع به افزایش می‌کند. ب) تحمل گلوکز به تدریج و از سنین 6 تا 12 هفتگی از بین می‌رود. پ) سطح کلسترول و تری گلیسیرید در موش‌های 12 هفته‌ای در حالت ناشتا، HDL یعنی لیپوپروتئین با چگالی بالا و LDL یعنی لیپوپروتئین با چگالی پایین. ت): حداکثر ظرفیت قلبی عروقی در موش‌های 5 یا 12 هفته‌ای، فرق چندانی با مدل‌های شاخص و همسن ندارند. ث) حداکثر سرعت حرکت V_{O2max} به طور معنی‌داری در موش‌های db/db در مقایسه با WT پایین‌تر است. ج) قدرت بالاتنه در موش‌های 12 هفته‌ای به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد.

پیشرفت فنوتایپ متابولیکی در موش TallyHo

موش نر TallyHo یک مدل لپتین سالم ، بالغ و مدل پلی ژنی از T2DM است که جذب گلوکز عضلانی وابسته به انسولین در سنین بالاتر از 6 هفته، مقاومت کل بدن به انسولین در 8 هفتگی و هیپرگلیسمی در 16 هفتگی شروع به کاهش می‌کنند. بر اساس نتایج منتشر شده، ما موش‌های TallyHo در سنین 8 تا 9 هفته و 22-24 هفته را انتخاب کردیم تا به مقایسه فنوتایپ عضله در مراحل پیش از ابتلا و پس از ابتلا بپردازیم. اول، فنوتایپ متابولیکی TallyHo به تایید رسید تا این مقایسه مورد تأیید باشد. افزایش وزن موش‌های TallyHo در طی این مدت شروع شد (6/5±31/0 گرم در 8 هفتگی تا 4/7±36/0 گرم در 24 هفتگی). علاوه بر این، هیپرگلیسمی ناشتا در موش‌های غیرمبتلا در سن 8 هفتگی مشاهده شد و به طور قابل توجهی بالاتر از موش‌های مبتلا به دیابت در سن 23 هفتگی بود (mM

22±2/5، P<0/05). تحمل گلوکز در موش TallyHo در دوران پیش از ابتلا پایین بود و بعد از ابتلا نیز به شدت پایین‌تر آمد. این نتایج با یافته های قبلی موافق است.

ظرفیت موش TallyHo برای انجام ورزش

ظرفیت موش‌های TallyHo برای انجام ورزش با شروع دیابت کاهش نمی‌یابد (شکل 2). به طور خاص، حداکثر ظرفیت عملکرد قلب با افزایش سن موش‌های TallyHo از 7 ماهگی (دوران پیش از ابتلا) تا 22 هفتگی (دوران ابتلا)، افزایش می‌یابد (ml O_2/min 0/02 ± 3/07 برای TallyHo 7 هفته‌ای در مقابل 0/08ml O_2/min ± 3/68 برای TallyHo 22 هفته‌ای) (شکل 2C). علاوه‌براین، حداکثر سرعت حرکتی که در طول آزمایش‌ها به دست آمد، بین گروه‌های سنی تفاوت چندانی نداشت (m/min 1 ± 31 برای TallyHo 7 هفته‌ای در مقابل 0/6m/min ±29/5 برای TallyHo 22 هفته‌ای، P>0/05) (شکل 2D).

وزن عضلانی در موش‌های db/db به طور قابل توجهی پایین است اما در مدل TallyHo چنین نیست

برای درک پایین بودن سرعت حرکت و قدرت در موش‌های db/db، وزن عضلانی و بافت‌شناسی بررسی شد. در مقایسه با شاخص‌های کنترلی WT، اندازه عضلات اندام عقبی در موش‌های 6 و 12 هفته ای کاهش یافت (شکل 3A). عدم افزایش در هسته مرکزی عضله (که نشان از آسیب عضلانی و بازسازی است) در عضلات قُدامی موش‌های db/db مشهود بود (شکل B و 3A). رشد سریع توده عضلانی (gastrocnemius، tibialis anterior و extensor digitorum longus) در موش‌های 6 هفته‌ای (قبل از ابتلا) شروع شده و در موش‌های 12 هفته‌ای (پس از ابتلا) با شدت بیشتری ادامه می‌یابد. به طور قابل توجهی، اختلاف بین وزن عضلانی db/db و WT با افزایش سن افزایش یافت، وزن عضلانی db/db در طول این دوره افزایش پیدا کرد، اما با میزان بسیار پایین‌تری نسبت به شاخص کنترلی WT. این نشان دهندهٔ کاهش رشد عضله و کاهش افت عضلات ناشی از کاهش وزن عضلانی در موش‌های db/db است. تغییرات قابل توجهی در طول استخوان ساق پای موش db/ db، وزن قلب یا وزن سلولی (اکسیداتیو آهستهٔ عضله) در مقایسه با شاخص کنترلی WT مشاهده نشد (جدول 1). متوسط CSA در فیبر عضله در ماهیچه‌های سریع (تیبالیال قدامی) کاهش یافته است اما

در عضله با روند اکسیداتیو آهسته چنین نبود (شکلE و D 3) .

از سوی دیگر، وزن عضله اسکلتی و قلبی و طول درشتنی در موش TallyHo از سن 9 تا 24 هفتگی رو به افزایش بود ولی عدم تحمل گلوکز و هیاپرگلیسمی چنین نبود (جدول 1). مقایسه وزن عضلانی TalyHo با وزن عضلانی موجود "سالم" محدود به استفاده از TalyHo پیش از ابتلا به بیماری دیابت است و دلیل آن عدم دسترسی به کنترل‌های غیردیابتی در موش TallyHo است (به دلیل تفاوت زیاد بین گونه‌های مختلف برای توسعه این مدل پلی ژنی). علاوه‌براین، متوسط وزن عضلانی و CSA فیبر هم در عضلات کُند و عضات تُند (تیبالیال قدامی) در مقایسه با شاخص‌های کنترلی C57BLK/s WT افزایش یافت (شکل E و D 3). در طی بافت‌شناسی موش TallyHo، هیچ شواهدی مبنی بر افزایش هسته‌های مرکزی عضله مشاهده نشد (شکل 3B). در روش ماسون نشانی از افزایش فیبروز در عضلات قدامی موش‌های db/db و TallyHo مشاهده نمی‌شود.

شکل 2. افزایش چاقی و عدم تحمل گلوکز و حفظ ظرفیت انجام حرکات ورزشی در موش TallyHo : الف) وزن بدن موش TallyHo از 8 تا 24 هفته افزایش می‌یابد. ب) تحمل گلوکز در TallyHo 8 هفته‌ای پایین است و با رسیدن به 22 هفتگی ضعیفتر نیز می‌شود. پ) حداکثر ظرفیت قلبی عروقی (V_{O2max}) با افزایش سن موش TallyHo از 7 تا 22 هفته افزایش می‌یابد. ت) حداکثر سرعت حرکت ثبت شده در طول آزمایش V_{O2max} در موش‌های 7 تا 22 هفته‌ای مبتلا به دیابت یکسان بود.

شکل 3. کاهش چشمگیر اندازه عضلات موش‌های db/db و بافت‌شناسی عضله موش‌های db/db و TallyHo. الف) اندازه ظاهری عضلات در موش‌های db/db نسبت به شاخص‌های کنترلی همسن به شدت کاهش می‌یابد. ب) رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، افزایشی در هسته‌های مرکزی عضلات قدامی db/db یا وTallyHo نشان ندادند. پ) رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون افزایش قابل ملاحظه‌ای در رنگ کلاژن (آبی) در عضلات قدامی نشان نمی‌دهد. ت و ث) در موش‌های db/db، مقطع عرضی فیبر عضلانی در عضلات قدامي کاهش یافت (D)، اما در عضله با اکسیداتیو کند چنین نبود (E) . سطح مقطع فیبر در عضلات کند و تند در مقایسه با شاخص‌های کنترلی WT افزایش یافت.

جدول 1. وزن بدن، وزن عضلات و اندازه درشتنی در موش‌های db/db و TallyHo در دوران پیش از ابتلا و پس از ابتلا به دیابت

	n	Body Wt, g	Ventricles, mg	Gastrocnemius, mg	Tibialis Anterior, mg	Extensor Digitorum Longus, mg	Soleus, mg	Tibia Length, mm
9-wk-old TallyHo	4	31.7 ± 0.9	108.8 ± 0.6	114.1 ± 2.8	44.4 ± 1	8.1 ± 0.7	6.2 ± 0.2	17.4 ± 0.3
24-wk-old TallyHo	6	37.7 ± 1.6‡	172.3 ± 9.1‡	150.3 ± 4.5‡	53.6 ± 0.9‡	12.2 ± 0.3‡	9.5 ± 0.4‡	19.2 ± 0.2‡
6 wk C57BLKS control	4	20.2 ± 0.4	97.5 ± 4.2	91.1 ± 6.1	32.7 ± 0.9	6 ± 0.3	4.7 ± 0.3	7 ± 0.7
6-wk-old *db/db* Diabetic	4	30.9 ± 1.6*	86.7 ± 4.3	60.5 ± 8.4*	27.8 ± 0.9*	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.3	6.3 ± 1
12-wk-old C57BLKS control	4	25.4 ± 0.8	117.2 ± 4	128.4 ± 3.6	42.9 ± 2.3	10.4 ± 0.7	6.4 ± 0.5	18.7 ± 0.3
12-wk-old *db/db* Diabetic	4	48.9 ± 1.2*	117.6 ± 4.9	71.9 ± 2.5*	26.5 ± 1.9*	6.8 ± 0.5*	6.3 ± 0.6	18.4 ± 0.2
13-wk-old C57BLKS control	4	21.5 ± 0.40	NM	132 ± 3.7	53.6 ± 1.9	NM	NM	NM
13-wk-old *db/db* Sedentary	8	47.7 ± 2.5*	NM	63.3 ± 1.4*	30.3 ± 0.9*	NM	NM	NM
13-wk-old *db/db* Exercised	8	46.8 ± 1.4*	NM	77 ± 3*†	28.6 ± 0*	NM	NM	NM

افزایش فسفریلاسیون مبتنی بر انسولین مربوط به تنظیم-کننده‌های سنتز پروتئین در موش‌های db/db

برای درک بهتر مکانیزم‌هایی که باعث کاهش اندازه عضلات در مدل db/db دیابتی می‌شوند، تنظیم‌کننده‌های سنتزپروتئین که به انسولین وابسته هستند مورد بررسی قرار گرفتند. تزریق انسولین در موش‌هایی که کل شب ناشتا بودند باعث افزایش فسفریلاسیون پروتئین‌های کلیدی برای فعال شدن سنتز پروتئین (پروتئین‌های Akt، mTOR، 4EBP-1 ، p70S6K و S6) گردید. سطح پایه فسفریلاسیون این پروتئین‌ها به طور کلی در موش-های WT به طور کلی کمی بیشتر از مدل‌های WT است، به استثنای پروتئین 4EBP-1، که این امر نشان‌دهندهٔ بالاتر بودن سطح فسف0ریلاسیون در موش‌های db/db در مقایسه با موش‌های WT است (شکل 4). پس از تحریک با انسولین، در موش‌های WT افزایش فسفریلاسیون این پروتئین‌ها در عضلات قدامی و بطنی با شدت بیشتری انجام می‌شود. در موش‌های db/db، فسفریلاسیون این تنظیم‌کننده‌های سنتز پروتئین، اگرچه واضح است ولی به طور قابل توجهی در عضلات کند/مرکب (دیافراگم)، سریع (تیبالیال قدامی) و عضله قلب کاهش یافت. این داده‌ها منطبق بر نتایج مطالعات قبلی بودند و نشان می‌دهند که روند فعال‌سازی تنظیم‌کننده‌های سنتز پروتئین با انسولین در عضلات موش‌های بزرگسال db/db کند می‌گردد. با اینکه تزریق انسولین برای فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی 10 دقیقه پس از تزریق انسولین مناسب بود ولی کاهش قابل توجهی در غلظت گلوکز خون در موش‌های WT یا db/db در طی زمان تزریق رخ نداد؛ این ممکن است به خاطر این باشد که برخی از مسیرهای درون‌سلولی در این نقطه زمانی فعال هستند، انتقال گلوکز به اندازه کافی برای تغییر غلظت گلوکز خون افزایش نیافته است.

افزایش پروتئین‌های یوبی کوئیتین شده و لاغری لیگازهای یوبی کوئیتین E3 در عضلات دیابتی

در ادامه به بررسی نقش پروتئین پروتئازومال در کاهش اندازه عضلانی و عملکرد در موشهای db/db پرداخته‌ایم. مطالعات قبلی نشان داده که میزان تجزیه پروتئین و عملکرد پروتئازوم 26 Sدر عضله افزایش یافته است. ما به بررسی پروتئازومایک پروتئازوم پرداختیم و با تجمع polyubiquitinatedدیده می‌شود که پروتئین‌ها با کاهش اندازه عضلات و عملکرد در موش‌های پیش دیابتی و دیابتی پیشرفت می-کنند. وسترن بلاتینگ از کل هموگلوبین عضلانی با پادتن خاصی نشان داد که افزایش قابل توجهی در مقدار پروتئین‌های polyubiquitinated بیش از حد بوده است. انباشت پروتئین‌های polyubiquitinated در حال حاضر به طور قابل توجهی در عضلات تند، کند و عضلات قلبی موش‌های db/db وجود داشته است.

کاهش فعالیت انسولین وابسته به FOXO1 و افزایش میزان MuRF-1، آتروژن 1 در عضلات موش db/db

MuRF-1 و آتروژن-1 شناخته‌شده‌ترین لیگازهای ubiquitin E3 هستند که به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و روند یوبی کوئیتین سازی پروتئین را کاتالیز می‌کنند و پروئتینی که در حال کاهش است را مشخص می‌کنند. از خانواده بزرگ لیگازهای E3، MuRF-1 و Atrogin-1 هستند که نقش قابل توجهی در ایجاد ارتباط بین بسیاری از انواع لاغری عضلانی ایفا می‌کنند. روش غربالگری وسترن نشان داد که روند افزایش سطح لیگازهای E3 در عضلات تند (قدامی) و کند در موش‌های db/db 12 هفته‌ای چندان فرقی با شرایط مشابه در موش WT ندارند (5F شکل).

سیگنال‌دهی خانواده FOXO دلیل تراریختگی آتروژین 1 و MuRF-1

فسفریلاسیون مبتنی بر انسولین FOXO1 با انتقال FOXO1 به بیرون از هستهٔ مرکزی عضله، موجب غیر فعال‌سازی روند تراریختگی می‌گردد. ما متوجه شدیم که روند فسفریلاسیون مبتنی بر انسولین FOXO1 در تیبالیال قدامی، دیافراگم، و

عضلات قلب موش db/db 12 هفته‌ای در مقایسه با شاخص کنترلی WT کند گردیده است (شکل D5).

افزایش انباشت پروتئین Polyubiquitinated در عضلات موش TallyHo و مدل‌های HFD دیابت که در برابر انسولین مقاوم هستند مشاهده نشد

ما برای آزمایش اینکه آیا انباشت پروتئین Polyubiquitinated یک ویژگی معمول برای دیابت است یا فقط مختص موش db/db است، دو مدل اضافی از دیابت‌های مقاوم در برابر انسولین را مورد آزمایش قرار دادیم (شکل E5). ما دریافتیم که سطح پروتئین‌های polyubiquitinated در موش TallyHo (24 هفته‌ای) که در مرحله ابتلا قرار دارند تفاوت چندانی با موش TallyHo (24 هفته‌ای) که در مرحله پیش از ابتلا قرار دارد ندارند. علاوه‌براین، هیچ تغییری در تجمع پروتئین‌های polyubiquitinated در موش‌های تغذیه شده به روش HFD مشاهده نشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که افزایش تجمع پروتئین Polyubiquitinated در عضلات، یک ویژگی مشترک برای همه مدل‌های مقاوم به انسولین یا جوندگان مبتلا به دیابت نیست.

شکل 5. نشانگرهای افزایش تجزیه پروتئین در عضلات موش db/db که مقاوم به انسولین است مشهود است ولی در سایر مدل‌های دیابت نوع 2 (T2DM) دیده نمی‌شود. سطح پروتئین Ubiquitin در مقایسه با WT در موش-های db/db که در مراحل قبل از ابتلا و بعد از ابتلا به دیابت قرار دارند افزایش یافته است (gastrocnemius) ، A) آهسته (B) (soleus) و (C) قلبی. ایمونوبولت؛ مقاوم در برابر فسفوریلاسیون وابسته به انسولین (همراه با غیرفعال کردن) فاکتور رونویسی جعبه FOXO1) O1) است. در میان اهداف رونویسی FOXO1 فعال شدن MuRF-1 و آتروژن-1 E3 است لیگاز ubiquitin، که نشان می دهد روند آماری ناچیز به سمت افزایش است بیان پروتئین در عضله اسکلتی db / db سریع و آهسته 12 هفته‌ای در مقایسه با کنترل های WT هستند. F و E: انباشت پروتئین های کنجوویکی ubiquitin با شروع فنوتیپ دیابتی در موش های TallyHo یا موش های چاق مبتلا به HFD افزایش می یابد. G: کورتیکوسترون سرم سطوح در موش db/db افزایش می‌یابد اما در موش TallyHo در مقایسه با WT کاهش می-یابد.

افزایش کورتیکوسترون و سیتوکین‌های التهابی در موش‌های db/db برخلاف موش‌های TallyHo

سطوح کورتیکوسترون اول صبح در موش‌های db/db در مقایسه با شاخص‌های کنترلی C57BLKS/j WT بالا است. کورتیکوسترون در موش TallyHo نسبت به گروه کنترلی WT و موش‌های db/db کاهش داشت

(شکل G5) . این روند با افزایش سرمی C5a، IL-4 و CXCL-9 در موش db/db همخوانی دارد اما در موش TallyHo دیده نشده است (جدول 2) . همچنین، α – TNF در موش‌های TallyHo به طور معنی داری کاهش یافت ولی در موش db/db در مقایسه با موش‌های کنترل کاهش نداشت. در نهایت، تجزیه و تحلیل تجمعی از تمام 39 نشانگر سیتوکین التهابی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که موش db/db سطح سیتوکین التهابی بالاتری نسبت به هر دو گروه موش‌های WT و TallyHo دارد (0% ± 100 = WT، 28% ± 169=db/db، 104 ± 8%=TallyHo، P<0/05).

جدول 2- پروفایل سیتوکین التهابی در گروه کنترلی C57BLKS/j، موش db/db و موش TallyHo

	Control (n = 3), %	*db/db* (n = 3), %	TallyHo (n = 5), %	WT vs. *db/db*	WT vs. TallyHo	*db/db* vs. TallyHo
BLC	100 ± 19	213 ± 156	66 ± 24	5.1×10^{-1}	3.7×10^{-1}	2.6×10^{-1}
C5/Ca	100 ± 7	97 ± 10	11 ± 6	8.5×10^{-1}	9.7×10^{-5}*	2.1×10^{-4}*
Eotaxin	100 ± 43	107 ± 52	110 ± 23	9.2×10^{-1}	8.3×10^{-1}	9.5×10^{-1}
G-CSF	100 ± 32	21 ± 3	55 ± 25	7.7×10^{-2}	3.8×10^{-1}	3.6×10^{-1}
GM-CSF	100 ± 44	103 ± 61	91 ± 16	9.7×10^{-1}	8.2×10^{-1}	8.2×10^{-1}
I-309	100 ± 26	96 ± 37	88 ± 21	9.4×10^{-1}	7.4×10^{-1}	8.4×10^{-1}
IFN-γ	100 ± 33	119 ± 83	165 ± 37	8.4×10^{-1}	2.8×10^{-1}	5.8×10^{-1}
IL-1α	100 ± 30	137 ± 53	116 ± 21	5.7×10^{-1}	6.6×10^{-1}	6.8×10^{-1}
IL-1β	100 ± 54	225 ± 198	125 ± 36	5.8×10^{-1}	7.0×10^{-1}	5.4×10^{-1}
IL-1 RA	100 ± 42	142 ± 67	83 ± 30	6.2×10^{-1}	7.5×10^{-1}	3.8×10^{-1}
IL-3	100 ± 40	280 ± 113	84 ± 26	2.1×10^{-1}	7.4×10^{-1}	7.1×10^{-2}
IL-4	100 ± 31	301 ± 90	34 ± 6	1.0×10^{-1}	3.4×10^{-2}*	6.8×10^{-3}*
IL-5	100 ± 39	111 ± 31	78 ± 15	8.4×10^{-1}	5.5×10^{-1}	3.2×10^{-1}
IL-6	100 ± 65	66 ± 31	57 ± 25	6.6×10^{-1}	4.9×10^{-1}	8.5×10^{-1}
IL-7	100 ± 56	198 ± 72	161 ± 33	3.5×10^{-1}	3.5×10^{-1}	6.2×10^{-1}
IL-10	100 ± 61	106 ± 80	71 ± 21	9.5×10^{-1}	6.0×10^{-1}	6.1×10^{-1}
IL-13	100 ± 34	131 ± 63	287 ± 95	6.9×10^{-1}	2.0×10^{-1}	2.9×10^{-1}
IL-16	100 ± 30	107 ± 42	80 ± 21	9.0×10^{-1}	6.0×10^{-1}	5.4×10^{-1}
IL-17	100 ± 46	149 ± 124	146 ± 41	7.3×10^{-1}	5.0×10^{-1}	9.8×10^{-1}
IL-23	100 ± 36	138 ± 70	58 ± 18	6.6×10^{-1}	2.8×10^{-1}	2.1×10^{-1}
IL-27	100 ± 44	146 ± 117	158 ± 50	7.3×10^{-1}	4.7×10^{-1}	9.2×10^{-1}
IP-10	100 ± 37	354 ± 154	128 ± 50	1.8×10^{-1}	7.1×10^{-1}	1.3×10^{-1}
I-TAC	100 ± 3	1,111 ± 873	135 ± 48	3.1×10^{-1}	6.0×10^{-1}	1.8×10^{-1}
JE CCL2/MCP-1	100 ± 17	150 ± 33	81 ± 22	2.5×10^{-1}	5.8×10^{-1}	1.2×10^{-1}
KC CXCL1	100 ± 28	148 ± 35	123 ± 41	3.4×10^{-1}	7.2×10^{-1}	6.9×10^{-1}
MCP-5	100 ± 46	125 ± 48	100 ± 27	7.3×10^{-1}	1.0×10^{0}	6.4×10^{-1}
M-CSF	100 ± 36	80 ± 32	105 ± 24	6.9×10^{-1}	9.0×10^{-1}	5.4×10^{-1}
MIG CXCL9	100 ± 19	160 ± 65	187 ± 21	4.2×10^{-1}	3.1×10^{-2}*	6.5×10^{-1}
MIP-1α	100 ± 36	165 ± 114	118 ± 27	6.1×10^{-1}	7.0×10^{-1}	6.2×10^{-1}
MIP-1β	100 ± 54	139 ± 94	97 ± 20	7.4×10^{-1}	9.6×10^{-1}	5.9×10^{-1}
MIP-2	100 ± 57	130 ± 70	99 ± 28	7.5×10^{-1}	9.9×10^{-1}	6.4×10^{-1}
RANTES	100 ± 42	123 ± 91	76 ± 19	8.3×10^{-1}	5.7×10^{-1}	5.4×10^{-1}
SDF-1	100 ± 31	65 ± 33	88 ± 21	4.8×10^{-1}	7.5×10^{-1}	5.5×10^{-1}
sICAM-1	100 ± 24	168 ± 72	163 ± 39	4.2×10^{-1}	3.0×10^{-1}	9.5×10^{-1}
TARC	100 ± 41	275 ± 183	84 ± 29	4.0×10^{-1}	7.6×10^{-1}	2.2×10^{-1}
TIMP-1	100 ± 22	100 ± 35	67 ± 20	9.9×10^{-1}	4.1×10^{-1}	4.1×10^{-1}
TNF-α	100 ± 45	27 ± 9	115 ± 21	1.8×10^{-1}	7.5×10^{-1}	2.4×10^{-2}*
TREM-1	100 ± 38	110 ± 49	72 ± 21	8.8×10^{-1}	5.0×10^{-1}	4.3×10^{-1}
Positive control	100 ± 14	91 ± 14	103 ± 6	6.6×10^{-1}	8.3×10^{-1}	3.8×10^{-1}
Average changes in inflammatory cytokine panel	100 ± 0	169 ± 28	104 ± 8	1.6×10^{-2}*	5.9×10^{-1}	2.8×10^{-2}*

بهبود ظرفیت انجام حرکات ورزشی و تحمل گلوکز در موش‌های db/db با تمرینات ورزشی شدید

فعالیت بدنی داوطلبانه در موش db/db، موجب ایجاد وقفه در جذب پرتوهای مادون قرمز شده و در مقایسه با گروه WT، در موش‌های db/db 12 هفته‌ای به شدت کاهش می‌یابد ($4.00\times10^{5} \pm 1\times10^{3}$

پرتو در روز برای گروه WT در مقابل $1.84\times10^5 \pm 4\times10^3$ پرتو در روز برای موش db/db، P<0/05) (شکل 6A). ما فرض بر این است که کاهش فعالیت عضلانی، دلیل کافی برای کاهش وزن عضلانی می‌باشد. برای آزمایش اینکه آیا افزایش فعالیت بدنی می‌تواند فنوتایپ عضله را تغییر دهد یا نه، از ورزش مداوم استفاده می‌کنیم که این درمان معمولا برای افرادی که به کاهش اندازه عضلانی و دیابت نوع 2 مبتلا هستند تجویز می‌شود. ورزش مداوم روی تردمیل برای 8 هفته باعث نشد افزایش وزن تغییرکنند (شکل C6) اما میزان تحمل گلوکز را بهبود بخشید (شکل D6) و حداکثر سرعت حرکت موش (شکل E6) و حداکثر ظرفیت عملکرد قلب را افزایش داد (شکل F6). درمان با ورزش موجب افزایش اندازه ظاهری عضلات اندام‌های عقبی نمی‌گردد و موجب هسته مرکزی عضله نیز نمی‌شود (شکل B6). ورزش مداوم به آرامی وزن عضلات gastrocnemius را افزایش داد اما وزن عضلانی را به سطح وزن سالم در گروه WT نرساند. با این حال، وزن عضله قدامي با ورزش کردن خیلی افزایش چشمگیری نداشته است (جدول 1).

کاهش سطح پروتئین‌های Ubiquitinated و افزایش فسفریلاسیون پروتئین Akt با ورزش مداوم در سطح بیوشیمیایی، تمرین مداوم روی تردمیل به مدت 8 هفته برای کاهش تجمع پروتئین Polyubiquitinated در موش‌های دیابتی db/db روند مناسبی است تا سطح این پروتئین به سطوح گروه کنترلی WT برسد (شکل 6G). رهایی از پروتئین ubiquitination با کاهش قابل توجهی در آتروژن-1 همراه بود و موجب یک روند کاهشی در سطح پروتئین MuRF-1 گردید (شکل 6H). اگرچه سطح پروتئینAkt در موش db/db کاهش می‌یابد، ورزش نمی‌تواند موجب افزایش سطح پروتئین Akt شود اما سطح فسفوریلاسیون آکت را افزایش می‌دهد (شکل 6I).

بحث و نتیجه‌گیری

شروع روند کاهش اندازه عضله در موش‌های db/db

یکی از یافته‌های کلیدی در مورد موش‌های db/db این است که روند کاهش اندازه عضلات اسکلتی و کاهش توانایی حرکت در پنجمین هفته شروع می‌شود (شکل 1). این نشان می‌دهد که در دوران دیابت، هایپرگلیسمی مزمن رخ داده و همین امر موجب

تشدید دیابت گردیده است (مانند نوروپاتی دیابتی و نفروپاتی دیابتی) و این روند برای کاهش وزن عضلانی ضروری نبوده است. اگر فنوتایپ عضله db/db نماینده افت عضلات انسانی در شرایط دیابتی باشد، شروع زود هنگام کاهش اندازه عضلات نشان می‌دهد که مقاومت به انسولین ممکن است برای ایجاد لاغری عضلات قبل از شروع دیابت نوع T2DM کافی باشد. مطالعات محدود در مردان جوان (تعداد=51 نفر ، 18 تا 35 ساله) نشان دهنده وجود یک همبستگی مثبت بین حساسیت به انسولین و بررسی توده بدن است. با این حال، برای تعیین اینکه مقاومت اولیه به انسولین برای افت عضله در انسانی که در مرحله پیش از ابتلا قرار دارد کافی است یا نه، کارهای تحقیقاتی بیشتری باید انجام شود.

در عوض، کاهش اندازه و عملکرد عضلات در موش‌های db/db ممکن است نشان‌دهندهٔ افت عضلات دیابتی نباشد بلکه در عوض نشان-دهندهٔ وجود نقص در روند رشد فیزیولوژیکی عضلات اسکلتی می-باشد. در واقع، شروع کاهش حجم عضلات در موش‌های db/db نشان می‌دهد که متابولیسم ناکارآمد (به عنوان مثال، تغییر سیگنال‌دهی لپتین، مقاومت به انسولین و هایپرلیپیدمیا) در طی رشد عضلات ممکن است موجب رشد نامطلوب محیط عضله شده و مانع رشد طبیعی عضلات شود. علاوه بر سوخت و ساز گلوکز، تعامل سیگنال‌دهی انسولین با رشد حیاتی و رشد مسیری (مانند انسولین عامل رشد I ، لپتین، پروتئین کیناز فعالAMP ، Akt و mTOR) برای ادغام کنترل متابولیک و کنترل رشد همراه است. در واقع، نشان داده شده است که بهبود پارامترهای متابولیک در موش‌های مقاوم به انسولین ناشی از رژیم غذایی و افزایش سن است. بنابراین، منطقی است که ابتلای نوجوانان به مقاومت در برابر انسولین، بدون سیگنال‌دهی لپتین باشد و تغییر متابولیسم می‌تواند زودتر از موعد، روند رشد عضله دچار مشکل شود.

شواهد دیگر حاکی از آن است که موش‌های db/db با کمبود لپتین و کمبود انسولین مواجه هستند. موش‌های db/db دارای gastrocnemius طبیعی هستند و با افزایش سن، کاهش می‌یابد. بنابراین، کاهش تودهٔ عضله در موش‌های db/db به احتمال زیاد نتیجه هایپرتروفی فیزیولوژیک باشد و به جای لاغری، عضله رشد می‌کند. اگر چه این عضله کاهش می،یابد رشد می تواند به دلیل محیط متابولیک تغییر یافته و ناشی از

مقاومت اولیه به انسولین باشد و نیز می‌تواند به علت اثرات ترکیبی لپتین، lipotoxicity، یا کمبود هورمون رشد سیگنال‌دهی بر رشد ماهیچه اسکلتی و متابولیسم باشد.

از این داده‌ها، منطقی است که نتیجه بگیریم که مقاومت به انسولین، کاهش اندازه عضلات و تشدید دیابت در موش‌های db/db ممکن است به طور دقیق الگوی معمول در ابتلا به دیابت و لاغری عضلانی در بیماران انسانی مبتلا به T2DM را نشان دهد. این نتایج هشدار می‌دهد که مطالعات آینده در مورد کمبود سیگنال لپتین مدل‌ها باید وجود رشد عضله در مرحله پیش از ابتلا را بررسی کنند و یافته‌ها را در مدل-های اضافی بررسی کنند.

عدم کاهش رشد و عملکرد ماهیچه‌ها در موش‌های Tallyho

برای بسط یافته‌های ما به مدل لپتین با رشد بالغ از T2DM، مدل موش TallyHo را مورد مطالعه قرار دادیم. موش TallyHo یک مدل مبتنی بر مولکول پلی گنیکی است که به شدت در بیان دیابت نوع 2 مورد استفاده قرار می گیرد و مقاومت به انسولین و جذب گلوکز خاص با عضله کم می‌شود. ما شگفت زده شدیم که نشانه‌ای از افت عضلات در موش TallyHo؛ وزن عضلانی با سن افزایش یافت (جدول 1) و در صورت مقایسه، ظرفیت انجام حرکات ورزش (شکل 2) در موش‌های 2 ماهه (پیش دیابتی) و 6 ماهه (دیابتی) حفظ شد. با این حال، ما نمی‌توانیم این توده عضلانی را حذف کنیم زیرا عملکرد موش‌های TallyHo تحت تاثیر قرار می‌گیرد. کمبود در طی 6 ماه اول، موش‌های TallyHo مشاهده شد و زندگی آنها نشان می‌دهد که مقاومت به انسولین و هیپرگلیسمی مزمن به تنهایی برای افت سریع عضلات موش کافی نیست.

ناهمگنی فنوتایپ‌های عضلانی در مدل‌های T2DM بیشتر در مدل-های اضافی T2DM نشان داده شده است. چربی بالا در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی دارای ضعف خفیف در اندازه عضله بوده و هیچ تغییرات قابل توجهی در آپوپتوز عضله اسکلتی، پروتئولیز یا autophagy در مقایسه با شاخص‌های کنترلی وجود ندارد. فنوتایپ‌های دیابتی خفیف موش‌های چاق ناشی از رژیم غذایی در مقایسه با انسان و دیگر مدل‌های T2DM بوده و ممکن است برای کمبود آسیب عضلانی در موش‌های تغذیه شده

کافی باشد. مدل‌هایی با جهش‌های IRS-2 / IRS-1، سیگنال‌دهی انسولین، نشان دادند که کاهش IRS-1 یا IRS2 تاثیر منفی بر روی رشد ماهیچه و متابولیسم آن دارد، جهش‌های دوگانه IRS-1 و IRS-2 به شدت باعث کاهش رشد عضلات، مقاومت به انسولین و اختلال در متابولیسم گلیکولیتی می‌شود. بنابراین تفاوت‌های بین مدل‌های حیوانی T2DM نشان می‌دهد که عوامل اضافی مانند سن ابتلا به دیابت، افت سیگنال‌دهی لپتین، درجه هایپرانسولینمی، فشار ژنتیکی، سیگنال‌دهی سیتوکین تغییر کرده و با اختلالاتی همراه است که ممکن است بر رشد عضلات تأثیر بگذارد و نشان می‌دهد که T2DM با تشدید ضررهای عضلانی همراه است (مثلا سن، آسیب، بی‌اختیاری و بیماری مزمن).

افزایش گلوکوکورتیکوئید و التهاب با کاهش اندازه عضله و عملکرد در موش مقاوم در برابر انسولین

مطالعات قبلی نشان داده است که سیگنال‌دهی مستقیم گلوکوکورتیکوئیدی برای کاهش سریع عضلات ضروری است. نتایج ما نشان می‌دهد که گلوکوکورتیکوئید و سیگنال‌دهی التهابي نیز در کاهش عضلات در T2DM اهمیت دارند. در واقع، در موش T2DM با حجم و عملکرد ضعیف عضلانی (db/db)، کورتیکواسترون و سیگنال‌دهی سیتوکین التهابی افزایش می‌یابد (شکل. جدول 5 جدول 2). برعکس، در مدل موش T2DM با رشد و عملکرد ماهیچه‌های دست نخورده (TallyHo)، کورتیکوسترون در واقع کمتر از موش‌های کنترل بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که یک رابطه مثبت بین افزایش سیگنال‌دهی گلوکوکورتیکوئید/التهابی و رشد/عملکرد ضعیف عضله در T2DM وجود دارد که می‌تواند درمان شود. با این حال با استفاده از رویکردهای ژنتیکی و دارویی باید برای تعیین اینکه آیا افزایش سیگنال‌دهی گلوکوکورتیکوئیدی افزایش می‌یابد یا نه، ضروری است روند افت عضلات در افراد مبتلا به T2DM ارزیابی شود.

سنتز پروتئین وابسته به انسولین در موش‌های db / db بسیار خفیف است

برای درک کاهش اندازه عضله در موش‌های db/db، ما نشانگرهای بیوشیمیایی از سنتز پروتئین و سطح پروتئین‌های پروتئازوم را بررسی نمودیم. چندین مطالعه انسانی نشان

می‌دهد که در بیماری دیابت، در حالی که سنتز پروتئین ناشی از غذا طبیعی است، زوال پروتئین افزایش یافته است و باعث از دست دادن پروتئین خالص می‌شود، هر چند یافته-های متناقض [دیابت نوع 1 و دیابت نوع 2] نیز وجود دارد. یافته‌های ما از فسفوریلاسیون مستقل انسولین و تنظیم‌کننده-های سنتز پروتئین (آکت، mTOR، p70S6K، S6 و EBP-14) در عضلات کند، تند، و عضلات قلب در موش‌های 12 هفته‌ای نشان می-دهد که مقاومت به انسولین می‌تواند سنتز پروتئین وابسته به انسولین را کاهش دهد و به کاهش اندازه عضلات کمک کند (شکل 4). این یافته‌ها ممکن است با مطالعات انسانی و اندازه گیری سنتز پروتئین مشتق از مواد غذایی به دلیل استفاده از کربوهیدرات و یا خوردن پروتئین برای ایجاد سنتز پروتئین باعث افزایش فشار خون بالا شود که ممکن است برای عادی‌سازی سنتز پروتئین در افراد مقاوم در برابر انسولین کافی باشد. در مقابل، تزریق انسولین جوابگو بوده است.

نشانگرهای تجزیه پروتئین در موش‌های مقاوم به انسولین

مطالعات قبلی روی موش‌های db/db نشان داد که میزان تجزیه پروتئین عضله افزایش می‌یابد. این یافته بیشتر با مشاهدات ما در مورد کاهش انسولین وابسته به فسفوریلاسیون FOXO1، لیباز E3 ubiquitin مرتبط با لاغری (به عنوان مثال MuRF-1 و آتروگین-1) و افزایش تجمع K48-polyubiquitin-conjugatedproteins تقویت می‌شود (شکل 5). وانگ و همکاران افزایش عملکرد پروتئازامیک در عضله در سنین 9 هفتگی را مشاهده کردند و نشان دادند که افزایش پروتئین conjugated ubiquitin مشاهده شده توسط افزایش میزان ubiquitination، به جای کاهش عملکرد پروتئازومایک وجود دارد. علاوه بر این، انباشت پروتئین‌های ubiquitin ارتباط نزدیک با افزایش میزان تجزیه پروتئین عضله در طول گرسنگی و لاغری عضلانی دارند. این افزایش در پروتئین‌های ubiquitinated در عضلات تند، کند و قلبی آشکار بوده و در شرایط ابتلا به دیابت افزایش بیشتری داشته است، که نشان می‌دهد که افزایش تجمع پروتئین عضله کمک به رشد عضلات لاغر می‌کند. از سوی دیگر، انباشت پروتئین ubiquitinated در عضله gastrocnemius موش‌های تغذیه شده با HFD یا موش‌های Tallyho نشان داد که عوامل

دیگری مانند مقاومت به انسولین و هایپرگلیسمی مزمن ممکن است باعث افزایش سطح پروئتین‌های ubiquitinated شوند.

بهبود عملکرد و تحمل گلوکز با انجام تمرینات ورزشی در موش‌های db/db

افت عضلات در بیماران از عملکرد فیزیکی مداخله می‌کند، ورزش مداوم درمان معمولی است که به طور معمول تجویز می-شود تا عملکرد عضله، توده عضلانی و تحمل گ لوکز افزایش یابد. اگر چه ورزش مداوم توسط موش‌های db/db باعث بهبود تحمل گلوکز، ظرفیت عملکرد قلب و سرعت حرکت می‌گردد و فقط افزایش اندکی در وزن عضلات رخ می‌دهد. ورزش کافی برای نجات عضلات کافی نیست. این نشان می‌دهد که کاهش عضلات (شکل A6) برای کاهش حجم عضله کافی نیست. علیرغم ناتوانی در نجات کامل رشد ماهیچه‌ای، ورزش برای افزایش میزانروئتین آکت سر 473 فسفوریلاسیون و کاهش مقدار muRF-1 و تجمع پروتئین‌های پلی یوبیوتیویتین (شکل 6، G-I) کافی است و این نشان می‌دهد که کاهش تجزیه پروتئین و افزایش سنتز پروتئین باعث افزایش شدید وزن عضلانی در تمرینات ورزشی شد. علاوه بر این، این یافته‌ها برای بهبود تحمل گلوکز، عملکرد عضلانی و ظرفیت انجام ورزش، از استفاده بالینی از ورزش حمایت می‌کند.

به طور خلاصه، مطالعات ما در مورد موش‌های db/db و TallyHo نشان می‌دهد که اثر دیابت نوع 2 بر توده عضله و عملکرد آن وابسته به مدل و همبستگی با میزان گلوکوکورتیکوئید و سیگنال‌دهی التهابي است. کاهش اندازه عضلات قبل از شروع هایپرگلیسمی و دیابت نشان می‌دهد که مدل موش db / db یک مدل دیابتی مزمن است که در آن متابولیسم تغییر یافته است و این امر ناشی از مقاومت به انسولین و سیگنال‌دهی لپتین است و موجب نقص در رشد عضلانی می‌باشد. کاهش توده عضلانی و ظرفیت ورزش در موش TallyHo نشان می‌دهد که مقاومت به انسولین و هایپرگلیسمی مزمن به تنهایی برای کاهش سرعت عضلات و عملکرد آنها کافی است و این احتمال وجود دارد که عوامل دیگری مانند ژنتیک، hyperinsulinemia، lipotoxicity، سیگنال‌دهی لپتین، سن شروع و ترکیبات دیابتی، رشد و نگهداری عضلات اسکلتی در T2DM را تحت تاثیر قرار می‌دهد.