Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Effect of metformin on the expression of SNARE proteins in the skeletal muscle of rats with type 2 diabetes

Yaser Mohammadi[1], Azam Rezaei Farimani[2]*

ABSTRACT

Background and Aims: SNARE proteins are composed of a combination of SNAP-23, Stx-4, and VAMP-2 isoforms that are significantly expressed in skeletal muscle. These proteins control the transport of GLUT4 to the cell membranes. The modifications in the expression of SNARE proteins can cause Type 2 diabetes. The present study aimed to assess the effect of metformin on the expression of these proteins in rats.

Materials and Methods: For the purpose of the study, 40 male Wistar rats were randomly selected. Streptozotocin and Nicotinamide were used for the induction of type 2 diabetes. The animals were assigned to five groups (n=8), including healthy and diabetic groups as control, as well as three experimental groups which were treated with different doses of metformin (100, 150, and 200 mg/kg body weight) for 30 days. The quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) method was applied to evaluate the expression of SNARE complex proteins.

Results: Based on the results, metformin (100, 150, and 200 mg/kg body weight) decreased serum glucose levels and increased serum insulin levels. This difference in dose of 200 mg/kg body weight was statistically significant ($P<0.05$). Moreover, all three doses of metformin increased the expression of SNAP- 23, syntaxin-4, and VAMP-2 proteins in skeletal muscle tissue. Metformin at a dose of 200 mg/kg body weight demonstrated the most significant effects ($P<0.05$).

Conclusion: As evidenced by the results of the current study, another anti-diabetic mechanism of metformin is to increase the expression of SNARE proteins, which effectively improves insulin resistance and lowers blood glucose.

Keywrods: Diabetic rats, Metformin, SNAP-23, SNARE proteins, Stx-4, Type 2 diabetes, VAMP-2

Citation: Mohammadi Y, Rezaei Farimani A. [Effect of metformin on the expression of SNAER proteins in the skeletal muscle of rats with type 2 diabetes]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(3): 270-278. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105

Received: July 10, 2021 **Accepted:** September 5, 2021

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[2] Cardiovascular Diseases Research center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

***Corresponding author:** Cardiovascular Diseases Research center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Tel: +989155599058 E-mail: rezaei1@yahoo.com

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

مقاله اصیل پژوهشی

اثر متفورمین بر بیان پروتئین‌های SNARE در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

یاسر محمدی[۱]، اعظم رضائی فریمانی[۲]**

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین های SNARE از مجموع ایزوفرم‌های SNAP-23، Stx-4 و VAMP-2 تشکیل شده‌اند که به میزان قابل توجهی در عضلات اسکلتی بیان می‌شوند. این پروتئین ها انتقال GLUT4 به غشای سلول را کنترل می‌کنند. دیابت نوع ۲ می‌تواند به دلیل تغییراتی در بیان پروتئین های SNARE ایجاد شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر متفورمین بر بیان این پروتئین‌ها بود.

روش تحقیق: ۴۰ سر موش صحرایی (رت) نر نژاد ویستار انتخاب شدند. از استرپتوزوتوسین و نیکوتین آمید برای القای دیابت نوع ۲ استفاده شد. حیوانات به پنج گروه ۸ تایی تقسیم شدند: گروه‌های سالم و دیابتی به عنوان کنترل و سه گروه تحت درمان با دوزهای مختلف متفورمین (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن). تکنیک RT-qPCR برای ارزیابی بیان پروتئین‌های SNARE استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که داروی متفورمین در دوزهای (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) باعث کاهش سطوح سرمی گلوکز و افزایش سطوح سرمی انسولین گردید، این تفاوت در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). علاوه بر این، هر سه دوز متفورمین بیان پروتئین‌های SNAP-23، Stx-4 و VAMP-2 را در بافت ماهیچه اسکلتی افزایش داد. متفورمین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن بیشترین تأثیر را نشان داد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: یکی دیگر از مکانیسم‌های آنتی دیابتیک متفورمین افزایش بیان پروتئین‌های SNARE می‌باشد که در بهبود مقاومت به انسولین و کاهش گلوکز خون مؤثر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: موش‌های صحرایی دیابتی، متفورمین، SNAP-23، پروتئین‌های SNARE، Stx-4، دیابت نوع ۲، VAMP-2

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۳): ۲۷۰-۲۷۸.

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۴

[۱] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات بیماری‌های قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی

تلفن: ۰۹۱۵۵۵۹۹۰۵۸ پست الکترونیکی: azam_rezaei1@yahoo.com

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

مقدمه

دیابت ملیتوس یکی از شایع‌ترین انواع اختلالات متابولیک با نقایصی در ترشح و یا عملکرد انسولین می‌باشد (۱). در حال حاضر، بیش از ۴۵۱ میلیون نفر در سراسر جهان از بیماری دیابت رنج می‌برند. فدراسیون بین‌المللی دیابت هشدار داده است که این تعداد تا سال ۲۰۴۵ به ۶۹۳ میلیون نفر افزایش خواهد یافت (۲). دیابت نوع ۲[1](T2D) یکی از رایج‌ترین انواع دیابت است که بیش از ۹۰٪ موارد بیماری را شامل می‌شود. علت اصلی این بیماری مقاومت به انسولین و اختلال در عملکرد سلول‌هایβ پانکراس می‌باشد که با اختلال در جذب و هومئوستاز گلوکز همراه است که می‌تواند منجر به افزایش قند خون شود (۳). ناقل GLUT4 یکی از مهم‌ترین انتقال دهنده‌های گلوکز است که وابسته به انسولین بوده و در سلول‌های بافت چربی و ماهیچه اسکلتی به میزان زیادی بیان می‌گردد.

عضله اسکلتی در حدود ۶۰-۴۰٪ از توده بدنی را در انسان شامل می‌گردد و یکی از اصلی‌ترین ارگان‌های مصرف کننده گلوکز محسوب می‌شود. در نتیجه به عنوان تنظیم کننده اصلی هومئوستاز گلوکز می‌باشد (۴). بنابراین اختلال در عملکرد انسولین و در نتیجه اختلال در انتقال و جابجائی ناقلGLUT4 به سطح غشای سلولی با کاهش برداشت گلوکز از خون توسط سلول های عضله اسکلتی و مقاومت به انسولین همراه می‌باشد (۵). پروتئین‌های SNARE[2] نقش مهمی در اتصال و ادغام وزیکول‌های حامل GLUT4 به غشا را بر عهده دارند. SNAP-23[3]، Stx-4[4] و VAMP-2[5]به عنوان اجزای اصلی مجموعه پروتئینی SNARE شناخته می‌شوند (۶). میزان بیان این ایزوفرم‌ها در بافت ماهیچه بالا می‌باشد و انتقال GLUT4 را در سلول‌های ماهیچه‌ای کنترل می‌کنند (۷). در نتیجه، اختلال در عملکرد این مجموعه سه گانه و تغییر در سطح پروتئین‌های SNARE می‌تواند باعث اختلال در انتقال GLUT4 و در نتیجه بروز بیماری T2D شود. برخی مطالعات نشان داده‌اند که اگزوسیتوز انسولین نیز به دلیل کاهش بیان پروتئین‌های SNARE در T2D کاهش می‌یابد. بنابراین، طبق شواهد موجود، تغییر در سطح پروتئین‌های SNARE با مقاومت به انسولین و T2D مرتبط است. ورزش و تنظیم رژیم غذایی از مهم‌ترین استراتژی‌ها در بهبود و پیشگیری T2D می‌باشند. با این وجود، متفورمین یک داروی کاهش دهنده قند خون است که به مدت طولانی برای درمان افراد مبتلا به دیابت T2D از آن استفاده شده است. مطالعات نشان داده است که متفورمین با کاهش تولید گلوکز در کبد، بهبود عملکرد سلول های β پانکراس و افزایش حساسیت به انسولین در کاهش قند خون مؤثر می‌باشد (۹, ۸). با این حال مکانیسم دقیق عملکردی متفورمین هنوز نامشخص است. به همین منظور مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر متفورمین بر بیان پروتئین‌های SNARE در موش‌های صحرایی دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین-نیکوتین آمید انجام شد.

روش تحقیق

مواد

پودر استرپتوزوتوسین (STZ) از شرکت آمازون ایالت متحده آمریکا و نیکوتین آمید (NA) از شرکت سیگما آلدریچ آلمان تهیه و خریداری شد. کیت الایزا جهت اندازه‌گیری انسولین از ALPCO، ایالات متحده آمریکا تهیه شد.

طراحی مطالعه حیوانی

۴۰ سر موش صحرایی (رت) نر نژاد ویستار (وزن تقریبی ۱۵۰-۲۰۰ گرم و سن ۲ ماه) از موسسه رازی، ایران خریداری شدند. کلیه مراحل کار مطابق با راهنمای اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی اجرا گردید. (کد اخلاق: ۹۳۰۹۲۵۵۰۶۵، دانشگاه علوم پزشکی همدان). به منظور سازگاری با محیط، حیوانات به مدت یک هفته در شرایط استاندارد دما (۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (۷۰٪-۶۰٪) با سیکل ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی و دسترسی آزاد به آب شیرین و غذای پلیت شده استاندارد نگه‌داری شدند.

[1] Type 2 Diabetes
[2] Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
[3] synaptosomal-associated protein 23
[4] syntaxin-4
[5] vesicle-associated membrane protein 2

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

القا دیابت و گروه بندی

جهت القای دیابت T2D در موش‌های صحرایی، با رعایت یک شبانه‌روز ناشتایی، یک دوز استرپتوزوتوسین-نیکوتین آمید (STZ-NA) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. طبق دستورالعمل، در ابتدا ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن STZ (حل شده در سدیم سیترات ۰/۱ مولار، PH=(۴/۵ به هر موش صحرایی تزریق گردید، بعد از ۱۵ دقیقه، ۱۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیکوتین آمید (محلول در نرمال سالین) تزریق شد (۱۰). بافر سیترات در موش‌های صحرایی گروه کنترل به عنوان دارونما تزریق شد. جهت تأیید القای دیابت، ۷۲ ساعت پس از تزریق، سطح گلوکز در حالت ناشتا با استفاده از یک دستگاه گلوکومتر مدل Accu Chek (Roche، آلمان) در خون حاصل از ورید دمی اندازه‌گیری شد. موش‌های صحرایی با دارا بودن مقادیر بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر گلوکز خون به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. درمان با داروی متفورمین به صورت خوراکی و با استفاده از سرنگ گاواژ، هفت روز پس از القا دیابت و به مدت ۳۰ روز انجام شد. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در پنج گروه قرار گرفتند (n = ۸). دو گروه موش‌های صحرایی سالم و دیابتی به عنوان کنترل و سه گروه موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان با دوزهای مختلف متفورمین (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) (۱۲, ۱۱). با توجه به پیش بینی احتمال مرگ و میر موش های صحرائی بدنبال القای دیابت، با وجود برآورد آماری ۷ موش صحرایی در هر گروه، تعداد بیشتری موش در هر گروه (n = ۸) در نظر گرفته شد. در مدت زمان مطالعه یک موش صحرایی در گروه کنترل دیابتی از بین رفت.

نمونه گیری

پس از اتمام دوره مداخله، موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵میلی‌گرم/ کیلوگرم) بیهوش شدند و بلافاصله با استفاده از سرنگ ۱۰ سی سی، از ورید اجوف تحتانی خون‌گیری انجام شد. بافت ماهیچه از عضله سولئوس[1] جدا و با نرمال سالین سرد شست و شو داده شد. کرایوویال‌های حاوی نمونه بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس در دمای۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره و نگهداری شدند. نمونه‌های خون در لوله‌های عاری از ماده ضد انعقاد ریخته شده و به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm[2] سانتریفیوژ و تا مدت زمان انجام آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره و نگهدای شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA به صورت دستی و با استفاده از معرف ترایزول (Invitrogen) انجام شد. ۱۰۰میلی‌گرم از هر نمونه بافت فریزشده به یک هاون استریل منتقل و با استفاده از نیتروژن مایع همگن شد. هر نمونه بافت کاملاً هموژن به لوله‌ای حاوی یک میلی‌لیتر ترایزول منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و مایع روئی به یک میکروتیوب منتقل شد. ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. میکروتیوب‌ها در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. فاز رویی حاوی RNA با احتیاط و بدون ایجاد ورود به فازهای دیگر، به میکروتیوب جدید منتقل شد. در مرحله بعدی، رسوب دهی RNA با حجم مساوی ایزوپروپانول انجام شد. برای حداکثر رسوب دهی RNA، انکوباسیون در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد (پروتکل اصلاح شده). پس از رسوب RNA، در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی برداشته شد و رسوب RNA با اتانول ۷۵٪ شستشو گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۵۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. در ادامه مراحل استخراجRNA ، رسوب RNA در مجاورت هوا به مدت ۵-۱۰ دقیقه خشک شد و در نهایت با چند بار عملیات پیپتینگ[3] در حجم مناسب آب مقطر استریل تیمار شده با DEPC[4]

[1] Soleus muscle

[2] Revolutions per minute
[3] Pipetting
[4] Diethyl pyrocarbonate

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

حل و برای استفاده طولانی مدت به فریزر ۸۰ -درجه سانتیگراد منتقل گردید. به منظور ارزیابی کیفیت و اینتگریتـــی RNA استخراج شده الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد. غلظت و خلوص RNA استخراجی نیز با استفاده از اسپکتروفتومتری نانودراپ (Biotech Laboratories, Inc., USA) انجام شد.

سنتز cDNA و انجام واکنش‌های Real-Time PCR

توتال RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Fermentas, Burlington, ON, Canada) به cDNA تک رشته‌ای، طبق دستورالعمل سازنده، رونویسی شد. واکنش‌های qPCR-RT با استفاده از کیت SYBR Premix ExTaq II (Tli RNase HPlus) (Takara, China) انجام شد. واکنش برای هر نمونه با سه بار تکرار در دستگاه CFX96 real-time PCR (Bio-Rad, USA) و طبق برنامه زیر انجام شد: یک سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. برای بررسی بیان ژن، 18sRNA به عنوان ژن کنترل داخلی به‌کار گرفته شد. توالی پرایمرهای 18sRNA شامل Forward:5`-dGTAACCCGTTGAACCCCATT و Reverse: 5`-dCCATCCAATCGGTAGTAGCG می‌باشد. توالی پرایمرهای مربوط به ژن‌های مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است. نرم افزار AlleleID7 (Premier Biosoft Corporation, USA) برای طراحی پرایمرهای اختصاصی هر ژن استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها در واکنش Real-Time PCR

	SNAP-23	Syntaxin-4	VAMP-2
NCBI accession number Sequence (5'->3')	NM_022689.2	NM_031125.1	NM_012663.2
Forward primer	TTCCGTTTCTGTGTCCAATAG	TCAGCAGACTATGTGGAAC	CTACTTGGTCCTAAGAATCC
Reverse primer	TTGTGCTTTCCAGAGACTCAT	CCAAGATGAGAACAGTGACA	CAGAAGAGTGAAGAGTAATGG

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. تفاوت آماری در مطالعه پارامترها در بین گروه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت. از آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی (Turkey's test) برای ارزیابی تفاوت میانگین داده‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه استفاده شد. در تمام مراحل تجزیه و تحلیل $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

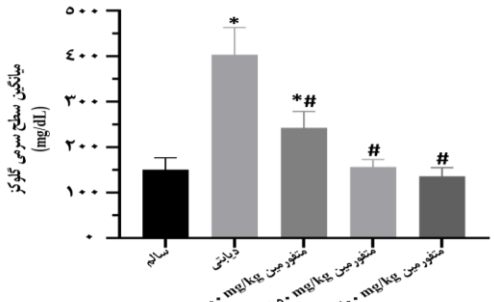
اثر متفورمین بر سطوح سرمی گلوکز، انسولین و اندکس HOMA-IR[1]

نتایج این مطالعه نشان داد که سطح سرمی گلوکز در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم بیشتر بود، این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P <۰/۰۵$) (نمودار ۱). درمان با دوزهای مختلف متفورمین سطح سرمی، گلوکز را در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش داد، به طوری که سطح سرمی گلوکز در موش‌های صحرایی تحت درمان با دوزهای mg/kg ۱۵۰ و ۲۰۰ متفورمین در مقایسه با موش‌های صحرایی دیابتی گروه کنترل

[1] Homeostatic model assessment (HOMA) (insulin resistance index)

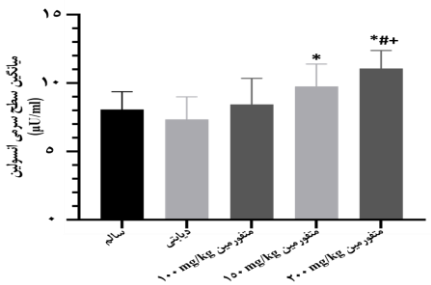
[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). سطوح سرمی انسولین به طور معنی‌داری در گروه تحت درمان با بالاترین دوز متفورمین (۲۰۰mg/kg) در مقایسه با گروه‌های سالم، دیابتی کنترل و دیابتی تحت درمان با دوز ۱۰۰ mg/kg بالاتر بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۲). مقادیر اندکس HOMA-IR نشان داد که این اندکس بالاترین میزان را در گروه دیابتی کنترل نسبت به سایر گروه‌ها دارد (P<۰/۰۵). درمان با دوزهای مختلف متفورمین با کاهش معنی‌دار اندکس HOMA-IR نسبت به گروه دیابتی کنترل همراه بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۳). اندکس HOMA-IR با استفاده از فرمول زیر انجام شد: انسولین (µU / میلی‌لیتر) × گلوکز (میلی‌مول/ لیتر) /۲۲/۵ (۱۳).



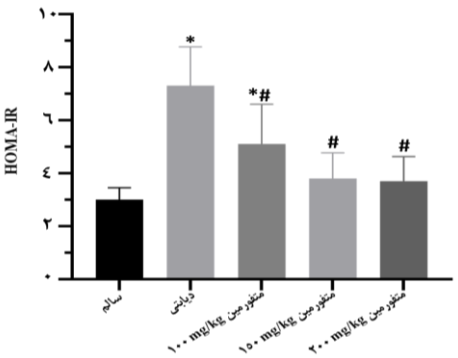
نمودار-۱: میانگین سطح سرمی گلوکز به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل سالم
# P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی



نمودار-۲: میانگین سطح سرمی انسولین به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل سالم
# P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی
+ P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی تحت درمان با متفورمین دوز ۱۰۰mg/kg



نمودار-۳: میانگین اندکس HOMA-IR به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل سالم
# P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی

اثر متفورمین بر بیان ژن‌های SNAP-23، syntaxin-4 و VAMP-2 در بافت عضله اسکلتی

مقایسه میانگین‌های ΔCt بین گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج مطالعه نشان داد که میانگین ΔCt مربوط به ژن‌های SNAP-23، syntaxin-4 و VAMP-2 در گروه‌های دیابتی و تحت درمان با دوزهای مختلف متفورمین (۱۰۰،۱۵۰ mg/kg و ۲۰۰) در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش داشت که این نشان دهنده افزایش بیان هر سه ژن در این گروه‌ها می‌باشد، هر چند به جز گروه تحت درمان با متفورمین دوز mg/kg ۲۰۰، این اختلاف معنی‌دار نبود. نتایج نشان داد که متفورمین با بالاترین دوز اثر قابل توجهی در افزایش بیان ژن‌های SNAP-23، Stx-4 و VAMP-2 دارد.

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

جدول ۲- مقایسه میانگین ΔCt مربوط به ژن های SNAP-23، Stx-4 و VAMP-2 در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	سالم	دیابتی	دیابتی+متفورمین ۱۰۰mg/kg	دیابتی+متفورمین ۱۵۰mg/kg	دیابتی+متفورمین ۲۰۰mg/kg
SNAP-23	۱۰/۰۸±۰/۶	۷/۴۷±۱/۲۲	۷/۳۸±۰/۱	۹/۰۱± ۰/۱۷	۴/۷۷±۱/۰۱[a]
Stx-4	۹/۹۴±۱/۱۴	۶/۷۵±۰/۶۷	۸/۴۶± ۰/۳۴	۶/۷۷±۱/۰۷	۵/۵۳±۰/۵۵[a]
VAMP-2	۹/۸۴±۰/۹۸	۹/۱۵±۰/۷۲	۸/۴۵±۰/۹۳	۹/۶۴± ۰/۳۷	۶/۵۱±۰/۴۵[a]

یافته‌ها به صورت میانگین±SD گزارش شده‌اند. اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) در مقایسه با a گروه کنترل سالم

بحث

از آنجایی که اختلال در ترشح انسولین و مقاومت به انسولین دو علت اصلی T2D هستند، شناسایی مکانیسم‌های مؤثر مولکولی درگیر، برای پیشگیری و درمان T2D ضروری می‌باشد. ناقل GLUT4 برای جذب گلوکز ضروری است که به طور اختصاصی در دو بافت حساس به انسولین یعنی بافت چربی و عضله اسکلتی بیان می‌شود. جابجایی وزیکول‌های GLUT4 از داخل سلول به غشای سلول با تحریک هورمون انسولین و با واسطه مجموعه‌ای از پروتئین‌ها تحت عنوان SNAREs صورت می‌گیرد. در میان ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های SNARE، SNAP-23، VAMP-2و Stx-4 نقش مهمی در انتقال GLUT4 در بافت ماهیچه به عهده دارند. بر اساس مطالعات انجام شده، اختلال در انتقال GLUT4 با واسطه پروتئین‌های SNARE منجر به ایجاد مقاومت به انسولین و در نتیجه افزایش گلوکز خون می‌شود (۴, ۳). در این مطالعه اثر متفورمین در بیان پروتئین‌های SNARE بررسی شد. دیابت نوع ۲ با تزریق STZ-NA در مدل حیوانی القا شد که تا حدودی مشابه به دیابت نوع ۲ در انسان می‌باشد. نیکوتین آمید با جلوگیری از فعالیت پلی ADP ریبوز پلی مراز و حفظ ATP و NAD^+ داخل سلولی، اثرات آنتی اکسیدانی ایجاد و تا حدی از سلول‌های β در برابر آسیب STZ محافظت می‌کند؛ بنابراین به عنوان یک رویکرد مناسب در القای مدلی برای T2D در نظر گرفته شده است (۱۴). متفورمین یکی از داروهای اصلی در درمان دیابت است که به صورت خوراکی مصرف می‌گردد. مطالعات نشان داده است که این ترکیب نقش تحریکی در انتقال GLUT4 دارد. با این حال، مکانیسم این اثر تا حد زیادی ناشناخته است.

نتایج ما نشان داد که درمان با متفورمین در دوزهای mg/kg ۱۵۰و ۲۰۰ در روز، میزان گلوکز خون را تا حد نرمال در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش داد؛ اما درمان یک ماهه با دوز mg/kg ۱۰۰ در کیلوگرم متفورمین در روز نتوانست سطح گلوکز خون را به حد نرمال برساند؛ اگرچه سطح گلوکز در مقایسه با موش‌های صحرایی دیابتی گروه کنترل کمتر بود. این احتمال وجود دارد که یکی از مکانیسم‌های متفورمین در کاهش گلوکز خون افزایش تولید و ترشح انسولین می‌باشد؛ به طوری که سطوح بالاتر انسولین در سرم موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان با متفورمین با دوزهای mg/kg ۱۵۰و ۲۰۰ در مقایسه با موش‌های صحرایی دیابتی درمان نشده مشاهده گردید. با این حال، برخی از مطالعات قبلی نشان داده‌اند که متفورمین تأثیر بیشتری در افزایش حساسیت به انسولین دارد (۸, ۹). مشابه با چنین مطالعاتی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که متفورمین باعث کاهش مقاومت به انسولین می‌گردد. مطالعات تجربی نشان می‌دهد که بهبود حساسیت به انسولین با واسطه متفورمین ممکن است با مکانیسم‌های مختلفی همراه باشد، از جمله افزایش فعالیت گیرنده تیروزین کینازی انسولین، افزایش سنتز گلیکوژن، افزایش فعالیت و به‌کارگیری ناقل GLUT4 (۱۵). مطالعات نشان داده است که درمان با متفورمین با کاهش اندوسیتوز GLUT4 از طریق فعال کردن سیگنالینگ[1] AMPK منجر به ماندگاری و حفظ بیشتر GLUT4 در غشای پلاسمایی می‌شود (۸, ۹).

[1] AMP-activated protein kinase

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

برخی مطالعات ارتباط بین اختلال در بیان پروتئین‌های SNARE و ایجاد T2D و مقاومت به انسولین را نشان داده‌اند. به طوری که مشخص گردیده است بیان برخی از ایزوفرم‌های پروتئین های SNARE به طور قابل توجهی در سلول‌های β پانکراس کاهش یافته است (۱۷, ۱۶). در مقابل، مطالعاتی نشان داده‌اند که بیان پروتئین های SNARE در عضلات اسکلتی تحت شرایط هیپرگلیسمی و هیپرانسولینمی افزایش یافته است (۷, ۱۸). طبق مطالعات انجام شده، میزان GLUT4 و سطح انسولین از عوامل مؤثر در بیان پروتئین هایSNARE می‌باشند. نتایج ما افزایش بیان ژن‌های SNAP-23، Stx-4 و VAMP-2 را در موش‌های صحرایی دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد؛ هر چند این اختلاف معنی‌دار نبود. افزایش بیان پروتئین‌های SNARE در عضله اسکلتی در T2D احتمالاً مکانیسم جبرانی در شرایط افزایش قند خون و مقاومت به انسولین می‌باشد؛ همچنین نتایج حاصل از مطالعات قبلی حاکی از آن است که بیان پروتئین Munc 18c تحت شرایط مقاومت به انسولین افزایش می‌یابد. پروتئین Munc 18c یک عامل تنظیم کننده برای پروتئین‌های SNARE است که به Stx-4 متصل می‌شود و از تشکیل کمپلکس سه گانه و در نتیجه انتقال GLUT4 به سطح سلول جلوگیری می‌کند (۱۹). تحت این شرایط، افزایش بیان پروتئین‌های SNARE، احتمالاً به عنوان یک مکانیسم جبرانی به موازات افزایش بیان این پروتئین بازدارنده می‌باشد که خود می‌تواند دلیلی در افزایش بیان پروتئین‌های SNARE در T2D می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان پروتئین‌های SNARE در موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان با متفورمین افزایش یافت. متفورمین با بالاترین دوز بیشترین اثر را بر بیان ژن‌های SNAP-23، Stx-4 و VAMP-2 از خود نشان داد. از آنجایی که محتوا و انتقال GLUT4 در دیابت به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد، احتمالاً متفورمین با افزایش بیان پروتئین‌های SNARE در صدد جبران این اختلال می‌باشد.

نتیجه‌گیری

یکی دیگر از مکانیسم‌های آنتی دیابتیک متفورمین افزایش بیان پروتئین های SNARE می‌باشد که در بهبود مقاومت به انسولین و کاهش گلوکز خون مؤثر می‌باشد.

تقدیر و تشکّر

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی همدان به دلیل فراهم آوردن امکانات لازم در جهت انجام این پروژه (کد طرح: ۹۳۰۹۲۵۵۰۶۵) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Chellappan DK, Yap WS, NA BAS, Gupta G, Dua K. Current therapies and targets for type 2 diabetes mellitus. Panminerva Med. 2018; 60(3): 117-31. DOI: 10.23736/s0031-0808.18.03455-9

2- Cho N, Shaw J, Karuranga S, Huang Yd, da Rocha Fernandes J, Ohlrogge A, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. Diabetes Res Clin Pract. 2018; 138: 271-81. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.02.023

3- Zhou T-T, Ma F, Shi X-F, Xu X, Du T, Guo X-D, et al. DMT efficiently inhibits hepatic gluconeogenesis by regulating the Gαq signaling pathway. J Mol Endocrinol. 2017; 59(2): 151-69. DOI: 10.1530/JME-17-0121

4- Lauritzen HP, Schertzer JD. Measuring GLUT4 translocation in mature muscle fibers. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. AM J PHYSIOL-ENDOC M. 2010;299(2):E169-E79. DOI: 10.1152/ajpendo.00066.2010

5- Stöckli J, Fazakerley DJ, James DE. GLUT4 exocytosis. J Cell Sci. 2011; 124(24): 4147-59. DOI: 10.1242/jcs.097063

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]

6- Mohseni R, ArabSadeghabadi Z, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, RezaeiFarimani A. Oral administration of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticle improves insulin resistance through targeting expression of SNARE proteins in adipose and muscle tissue in rats with type 2 diabetes. Nanoscale Res Lett. 2019; 14(1): 227. DOI: 10.1186/s11671-019-3042-7.

7- Farimani AR, Goodarzi MT, Saidijam M, Yadegarazari R, Zarei S, Asadi S. Effect of resveratrol on SNARE proteins expression and insulin resistance in skeletal muscle of diabetic rats. Iran J Basic Med Sci. 2019; 22(12): 1408-14. DOI: 10.22038/IJBMS.2019.13988

8- Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin Sci (Lond). 2012; 122(6): 253-70. DOI: 10.1042/CS20110386

9- Yang X, Xu Z, Zhang C, Cai Z, Zhang J. Metformin, beyond an insulin sensitizer, targeting heart and pancreatic β cells. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017; 1863(8): 1984-90. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.09.019

10- Sheela N, Jose MA, Sathyamurthy D, Kumar BN. Effect of Silymarin on Streptozotocin-Nicotinamide--induced Type 2 Diabetic Nephropathy in Rats. Iran J Kidney Dis. 2013; 7(2):117-23. DOI: 10.1002/jps.20744

11- Choi YH, Kim SG, Lee MG. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. J. Pharm. Sci. 2006; 95(11):2543-52. DOI: 10.1002/jps.20744

12- Zhai L, Gu J, Yang D, Wang W, Ye S. Metformin ameliorates podocyte damage by restoring renal tissue podocalyxin expression in type 2 diabetic rats. J. Diabetes Res. 2015; 2015. DOI: 10.1155/2015/231825

13- Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Furuta M, Araki-Sasaki R, et al. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. Diabetes care. 2001; 24(2): 362-5. DOI: 10.2337/diacare.24.2.362

14- Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. Acta Physiologica Hungarica. 2014;101(4):408-20 .DOI: 10.1556/APhysiol.101.2014.4.2

15- Giannarelli R, Aragona M ,Coppelli A, Del Prato S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. Diabetes Metab. 2003; 29(4): 6S28-6S35. DOI: 10.1016/S1262-3636(03)72785-2

16- Maier VH, Melvin DR, Lister CA, Chapman H, Gould GW, Murphy GJ. v-and t-SNARE protein expression in models of insulin resistance: normalization of glycemia by rosiglitazone treatment corrects overexpression of cellubrevin, vesicle-associated membrane protein-2, and syntaxin 4 in skeletal muscle of Zucker diabetic fatty rats. Diabetes. 2000; 49(4): 618-25. DOI: 10.2337/diabetes.49.4.618

17- Abbasi Oshaghi E, Goodarzi MT, Higgins V, Adeli K. Role of resveratrol in the management of insulin resistance and related conditions: Mechanism of action. Crit Rev Clin Lab Sci. 2017; 54(4): 267-93. DOI: 10.1080/10408363.2017.1343274

18- Boström P, Andersson L, Vind B, Håversen L, Rutberg M, Wickström Y, et al. The SNARE protein SNAP23 and the SNARE-interacting protein Munc18c in human skeletal muscle are implicated in insulin resistance/type 2 diabetes. Diabetes. 2010; 59(8): 1870-8. DOI: 10.2337/db09-1503

19- Schlaepfer IR, Pulawa LK, Ferreira LDC, James DE, Capell WH, Eckel RH. Increased expression of the SNARE accessory protein Munc18c in lipid-mediated insulin resistance. J Lipid Res. 2003; 44(6): 1174-81. DOI: 10.1194/jlr.M300003-JLR200

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.105]