

# Insulinsensitivitet i fettvev fra diabetiske mus - effekt av en ny antidiabetisk forbindelse

Diabetiske db/db  
mus (øverst)



Ikke-diabetiske  
db/+ mus  
(nederst)



5.årsoppgave i Stadium IV – medisinstudiet ved universitetet i Tromsø

**Forfattere:**

**Raymond Dokmo, medisin kull 98**

**Trond Harald Hafstad, medisin kull 98**

**Veileder:**

Terje S. Larsen

professor, Dr. Philos.

Avdeling for medisinsk fysiologisk, Institutt for medisinsk biologi, Universitetet i Tromsø.

Tromsø 05.09.03.

# Innholdsfortegnelse

Resymé	Side 3
Introduksjon	Side 4
Bakgrunn	Side 4
Farmakologisk behandling av type 2 diabetes	Side 4
Insulinsignalering og insulinresistens	Side 7
Problemstilling	Side 9
Hypotese	Side 10
Metoder	Side 10
Protokoll 1 og 2	Side 12
Isolering av adipocytter	Side 12
Filtrering og skylling	Side 13
Inkubasjon og separering av celler	Side 13
Løsninger og forberedelser	Side 14
Cellemedia	Side 15
Separering og målinger av inkuberte celler fra inkubasjonsmediet	Side 16
Resultater	Side 17
Diskusjon	Side 21
Referanser	Side 23

## Resymé

Mus blir i stadig større utstrekning tatt i bruk som eksperimentell modell i medisinsk forskning på grunn av tilgjengeligheten på musestammer med genetisk betinget sykdom) og den økte tilgjengeligheten på genetisk konstruerte transgene mus. Diabetiske (db/db) mus er en akseptert modell for type 2 diabetes som viser mange av de samme karaktertrekk som det en ser i den human formen av type 2 diabetes (overvekt, hyperglykemi, dyslipidemi, hyperinsulinemi og insulinresistens). Vi forventer at fettvevet fra diabetiske mus er forholdsvis lite sensitiv til insulin, slik at insulin i liten grad vil påvirke glukose-opptaket og lipolysen i dette vevet. Målet med oppgaven var å finne ut om kronisk behandling med en ny insulin sensitizer, BM 17.0744, kunne forebygge slik insulin-resistens. BM 17.0744 er en såkalt PPAR (peroxisome proliferator activated receptor)-agonist; PPAR er spesifikke reseptorer i cellekjernen som fungerer som transkripsjonsfaktor og regulerer ekspresjonen/aktiviteten til en rekke enzymer i lipidmetabolismen.

## Konklusjon

Vi fant ingen statistisk signifikant forskjell mellom ubehandlede og BM 17.0744-behandlede diabetiske mus når det gjaldt og opptak av glukose utslipp av glyserol (et mål for lipolyse hastigheten). Denne konklusjonen svekkes imidlertid av stor spredning i resultatene på grunn av uforutsette metodologiske vansker.

## Betydning av prosjektet

Disse grunnleggende studiene vil kunne gi informasjon om hvordan moderne antidiabetiske medikamenter påvirker fettvevets følsomhet for insulin, med tanke på glukose-opptak og lipolyse. Undersøkelser har vist at eksisterende behandlingsformer for type 2 diabetes ikke har vært spesielt vellykkede med hensyn til glykemisk kontroll, og intensiv behandling av NIDDM-pasienter ga bare 16% reduksjon i insidensen av hjerteinfarkt {1049}.

## Introduksjon

### Bakgrunn.

Omfanget av diabetes - først og fremst type 2 diabetes (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) har økt markert de siste tiårene, og sykdommen berører nå omtrent 200 millioner mennesker på verdensbasis. Type 2 diabetes representerer mer enn 90% av alle tilfeller av diabetes, og det er spesielt bekymringsfullt at andelen av unge mennesker som rammes av denne sykdommen er økende. Økt hyppighet av kardiovaskulær sykdom (retinopati, nefropati og neuropati) er den vanligste komplikasjon forbundet med NIDDM. Kardiale komplikasjoner assosiert med NIDDM skyldes: (i) økt koronar hjertesykdom sekundært til aterosklerose på grunn av tilhørende risikofaktorer som hypertensjon, fedme og dyslipidemi, pluss et bidrag av diabetes som en uavhengig risikofaktor og (ii) en spesifikk kardiomyopati som resulterer i redusert ventrikkelfunksjon i fravær av aterosklerotisk koronar hjertesykdom.

### Farmakologisk behandling av type 2 diabetes

Insulinresistens er en av de tidlige karakteristika i forbindelse med utviklingen av type 2 diabetes som bidrar til utvikling av risikofaktorer for koronar hjertesykdom som fedme, dyslipidemi, hypertensjon og aterosklerose (samlet omtalt som det metabolske syndrom eller syndrom X).

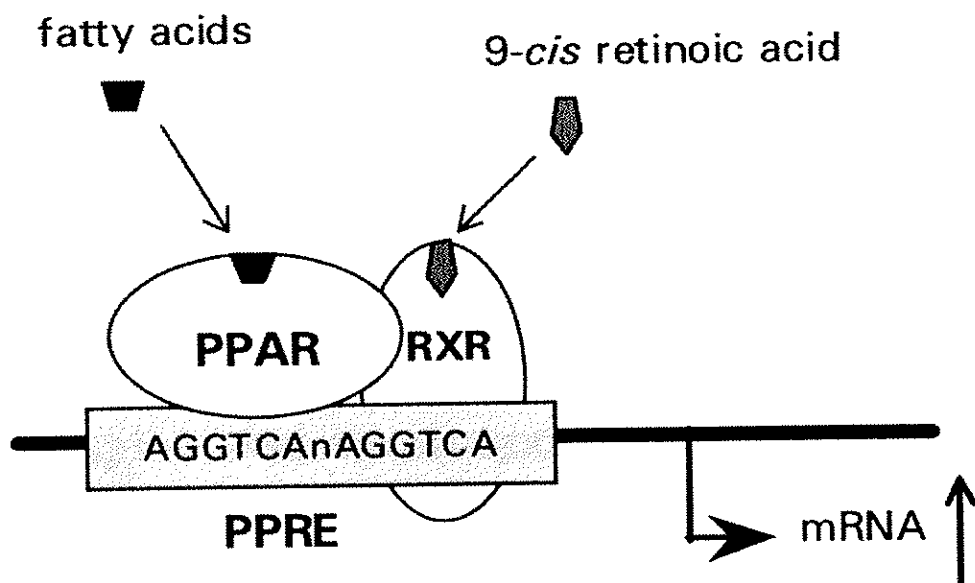
Ved oppstart av behandling av NIDDM starter en med kostregulering for å få ned blodsukkeret.

Det kan etter hvert være nødvendig med medikamenter som hindrer opptak av sukker/ karbohydrater fra tarmen og reduserer glukoseutskillelse fra lever. Disse medikamentene er f.eks. Metformin og Akarbose. Andre medikamenter virker på beta-cellene i de Langerhanske Øyer og stimulerer disse til økt produksjon av insulin. Hvis en ikke kommer i havn med peroral behandling kan en gi sub-kutane injeksjoner av insulin.

Nyere prinsipper for farmakologisk behandling av type 2 diabetiske pasienter går ut på å øke å insulinsensitiviteten, spesielt i fettvev, lever og muskel med såkalte "insulin sensitizers". Blant de antidiabetiske forbindelser som i dag markedsføres som "insulin sensitizers" er *metformin* og thiazolidinedione-analogene (TZD); *trogliatzone*, *rosiglitazon* og *pioglitazone*. Sistnevnte gruppe medikamenter er vist å være ligander for peroxisom proliferator-aktivererte reseptorer (PPAR).

## 1. Peroxisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR)

PPAR er nukleære transkripsjonsfaktorer som tilhører superfamilien av steroid/thyroid-reseptorer. Disse reseptorene har stor betydning for genekspressjonen av proteiner i lipid- og lipoprotein-metabolismen, adipocyt differensiering og insulinets virkning i kroppen. Til nå er 3 distinkte PPAR-isoformer blitt identifisert, og de er uttrykt i forskjellig grad i ulike vev. Mens PPAR  $\gamma$  primært er uttrykt i fettvev og har stor betydning for reguleringen av adipocyttdifferensiering og lipid-deponering, er PPAR  $\alpha$  uttrykt i vev med høy kapasitet for fettsyreoksidasjon, spesielt i lever<sup>(6,7)</sup>. PPAR  $\beta$  fins i alle vev, men dens rolle er lite kjent. PPAR aktiveres av naturlige ligander som fettsyrer (deriblant arakidonsyre-metabolitter) og antas å bidra til de metabolske endringene en ser i forbindelse med en rekke fysiologiske (faste, postnatal utvikling) og patofysiologiske forhold (diabetes, hypertrofi, hjertesvikt, kardiomyopati). I tillegg aktiveres PPAR av en rekke syntetiske ligander/medikamenter, for eksempel fibrater og antidiabetiske tiazolidindion (TZD)-analoger. Fibratene, som er førstelinjemedikamenter i behandlingen av hyperlipidemi, er vist å være PPAR  $\alpha$  ligander, mens TZD-analogene er PPAR  $\gamma$  ligander. Rapporter om økt lipogenese, myokard-hypertrofi og levertoksisitet fra kliniske studier med TZD-analoger har nødvendiggjort utvikling av nye antidiabetiske medikamenter, og en rekke PPAR-aktiverende forbindelser (WY 14.643, ETYA, BM 17.0744, L8805,645) er nå tilgjengelig for eksperimentell utprøving.



Figur 1: Enkel skisse som viser interaksjon mellom Peroxisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR), retinoid x reseptor (RXR) og peroxisom proliferativ-respons element (PPRE).

Det er usikkert hvorvidt PPAR-gamma er uttrykt i hjertet <sup>(8,9)</sup>, men PPAR  $\alpha$  er derimot vist uttrykt både i adulte hjerter <sup>(9,10)</sup> og neonatale cardiomyocytter <sup>(11)</sup>. PPAR  $\alpha$  antas å være assosiert med reguleringen av transkripsjon av mRNA for proteiner involvert i opptak og intracellulær transport av fettsyrer (FAT/C36; fatty acid translocase, H-FABP; heart-type fatty acid-binding protein) og mitokondriell og peroxisomal  $\beta$ -oksidasjon (m-CPT1; muscle-type carnitine palmitoyltransferase-1, MCAD; medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, LCAD; long-chain acyl-CoA dehydrogenase, AOC; acyl-CoA oxidase). Videre mener man at genekspressjonen av såkalte uncoupling proteiner (UCP) i mitokondriene også er regulert av PPAR  $\alpha$ . Selv om betydningen av PPAR  $\alpha$  i hjertet er belyst i PPAR  $\alpha$  knock-out mus <sup>(12)</sup>, er største delen av vår viten om betydningen av PPAR  $\alpha$  i hjertet fra studier på neonatale myocytter <sup>(13,14)</sup>. Neonatale hjertemuskelceller har lav fettsyre-oksydasjon i forhold til adulte celler, og tidligere studier sett primært på den direkte effekten av PPAR  $\alpha$  aktivatorer i isolerte celledsystemer. Dette illustrerer nødvendigheten av også å studere in vivo effekter av slike ligander på hjertet.

## 2. Modifisering av systemisk og myokardiell metabolisme med en ny PPAR $\alpha$ ligand.

Både glukose- og lipidsenkende effekter er beskrevet i eksperimentelle modeller etter behandling med ulike PPAR ligander. Videre kan aktivering av PPAR  $\alpha$  og PPAR  $\gamma$  påvirke utviklingen av aterosklerose via endringer i lipoprotein-metabolismen <sup>(7)</sup>, og muligens også direkte påvirke blodårene <sup>(6)</sup>. Derimot vet en lite om de kardiale effekter av disse stoffene <sup>(15,16)</sup>, spesielt i type 2 diabetiske modeller. BM 17.0744 er en antidiabetisk forbindelse utviklet av Roche Pharmaceuticals <sup>(17)</sup>, som er beskrevet å være en ligand for PPAR  $\alpha$  <sup>(18)</sup>. Studier i Tromsø <sup>(1)</sup> har vist at kronisk behandling av *db/db* mus med BM 17.0744 førte til en rask normalisering av blodsukkernivået og vanninntaket. Analyser av plasma etter endt behandling viste videre normaliserte plasmakonsentrasjoner av fettsyrer og triglyserider, samt reduksjon av insulin (tabell 1) <sup>(1)</sup>.

**Tabell 1.** Kroppsvekt, plasmakonsentrasjon av glukose, frie fettsyrer (FFA), triglyserider (TG) og insulin, samt vanninntak i ikke-diabetiske (*db/+*), diabetiske (*db/db*) og BM 17.0744-behandlede *db/db* mus.

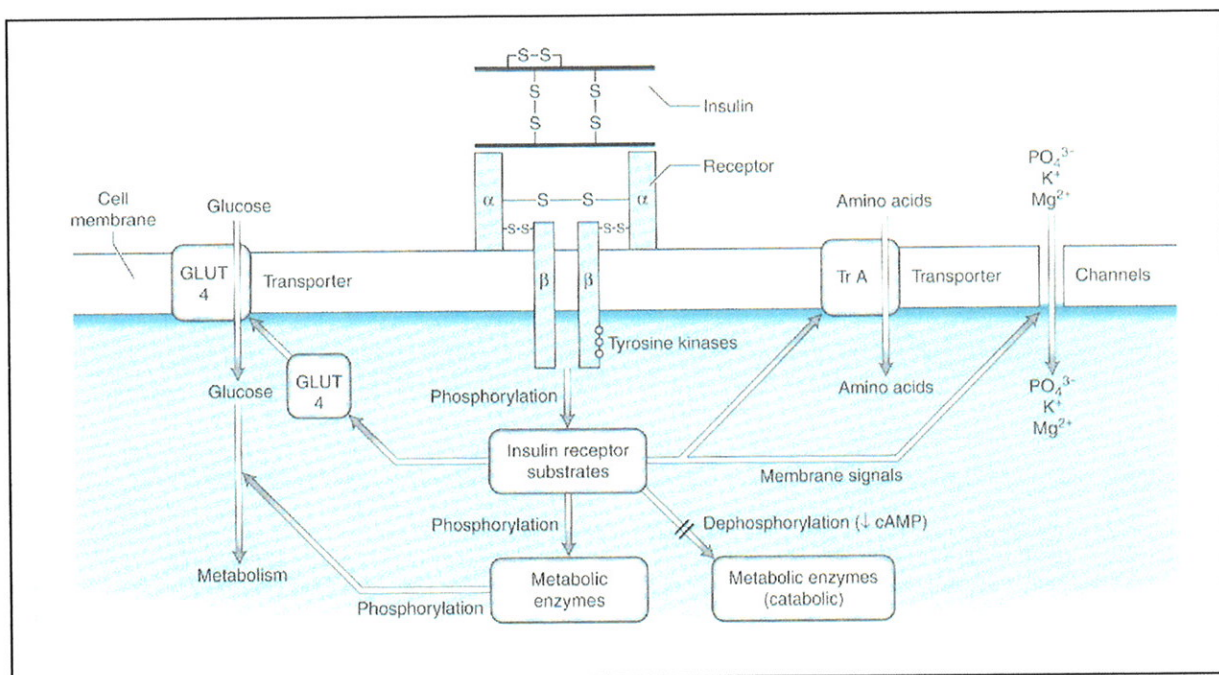
	Kroppsvekt (g)	Glukose (mM)	FFA (mM)	TG (mM)	Insulin (mM)	Vanninntak (ml/dag)
<i>db/+</i>	22.0±0.5 *	12.5± 0.6 *	1.0±0.1 *	0.6±0.1 *	14±1 *	3.7±0.2 *
<i>db/db</i>	41.2±0.7	34.0± 3.6	2.0±0.4	0.9±0.1	195±38	16.6±0.9
<i>db/db</i> + BM 17.0744	37.5±1.5 *	10.8± 0.6 *	1.1±0.1 *	0.6±0.1 *	49±6 *	6.4±0.4 *

## INSULINSIGNALERING OG INSULINRESISTENS

Når sirkulerende insulin når fram til sitt målorgan reagerer det med sin tilhørende reseptor. Insulinreseptoren, som er uttrykt i mange vev (først og fremst muskel og fettvev), er en transmembran tyrosin kinase som er uttrykt som en tetramer med  $\alpha_2\beta_2$  konfigurasjon. Binding av insulin til spesifikke regioner i  $\alpha$  -subenheten fører til en rask konformasjons-forandring i reseptoren som resulterer i autofosforylering av spesifikke tyrosin-enheter i den intracellulære regionen av  $\beta$  -subenhetene via en transfosforylerings-mekanisme.

Autofosforyleringen fører til aktivering av reseptorens tyrosin kinase aktivitet. I inaktiv tilstand er det katalytiske setet til tyrosin kinasen blokkert av en “aktiverings-sløyfe”. Autofosforylering av tyrosin-enhetene i posisjon 1158, 1162 og 1163 i aktiverings-sløyfen fører til en konformasjons-forandring som gjør at ATP og andre substrater (proteiner) når fram til det aktive setet.

Overføringen av insulin-signalet fra reseptoren skjer via to hoved-signalveier: mitogen- aktivert protein (MAP) kinase og fosfatidylinositol 3-kinase (PI3-K). Molekyler som SHC og IR substrate (IRS-1, IRS-2) kopler seg direkte til insulin-reseptoren og fungerer som fortøyningsplasser for interaksjon med nedstrøms substrater. Den metabolske responsen av insulin medieres primært via PI3-K. Etter interaksjon mellom IRS-molekyler og p85/p110 komplekset på PI3-K, fører PI3-K aktiviteten til produksjon av fosfatidylinositol 3,4,5-fosfat (PIP<sub>3</sub>) som binder seg til (og aktiverer) andre regulatoriske proteiner (PDK1/Akt) som i neste omgang fører til translokasjon av GLUT4, en insulin-sensitiv glukose-transportør som vi finner uttrykt i muskel og fettvev. (Se figur 2)



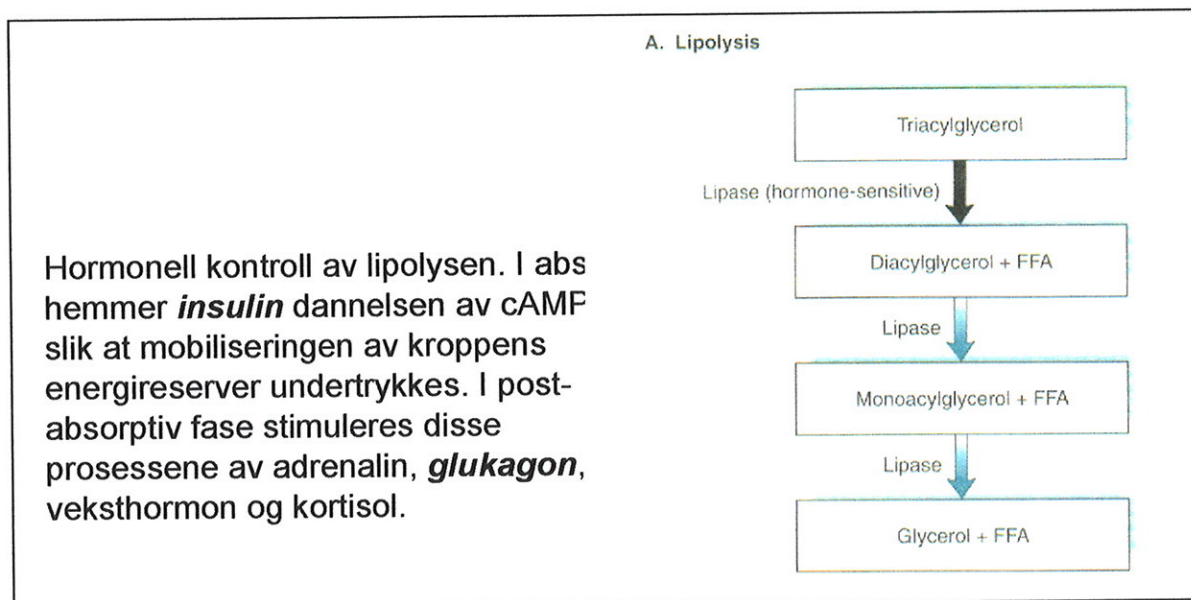
Figur 2: Viser intracellulære mekanismer som initieres når insulin bindes til α-subenheten av insulinreseptoren.



Insulinresistens er en vanlig patologisk tilstand hvor målcellene for insulin ikke responderer normalt på vanlige nivåer av insulin. Tilstanden er ofte forbundet med en rekke sykdommer som kronisk infeksjon, overvekt og type 2 diabetes. På det molekylære plan skyldes hemmet insulin-signalering mutasjoner eller post-translasjons forandringer i selve insulin-reseptoren eller i effektor molekylene i signalveien. I noen tilfeller kan insulinresistens tilskrives defekt binding av insulin til sin reseptor, men som oftest er insulinresistens satt i sammenheng med defekter i signalveien etter binding av insulin (post-reseptor defekt).

## Problemstilling

Konsekvensen av insulinresistens er at opptaket av glukose i muskel og fettvev reduseres, med det resultat at konsentrasjonen av glukose i blodet øker (hyperglykemi). En annen konsekvens er at hemmingen av hormonsensitiv lipase i fettvevet faller bort (Fig. 2), slik at lipolysehastigheten øker og resulterer i økt frisetting av fettsyrer til plasma (hyperlipidemi).



Figur 3: hormonell kontroll av lipolysen i fettvev.

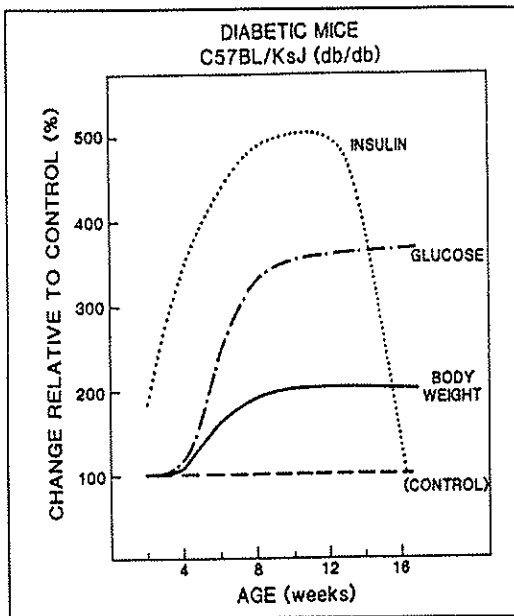
## Hypotese

Isolerte fettceller fra type 2 diabetiske mus er lite sensitive for insulin med hensyn på henholdsvis stimulering av glukoseopptak og hemming av lipolysen. Kronisk behandling av disse musene med BM 17.0744 vil føre til høyere glukoseopptak og redusert lipolyse i nærvær av insulin, sammenlignet med fettceller fra ikke-behandlede diabetiske mus.

## Metoder

### Eksperimentell modell

Eksperimentelle dyremodeller gir mulighet til å studere diabetes utvikling over relativt kort tid. De fleste rapportene om diabetes er imidlertid basert på modeller hvor insulinproduksjonen er slått ut med pancreas-giften streptozotocin, det vil si insulin-avhengig (type 1) diabetiske modeller. *Det er derimot relativt få studier av diabetes profilen som har benyttet dyremodeller med type 2 diabetes og insulinresistens.* En rekke spontant diabetiske dyremodeller er i dag tilgjengelig; korpulente JCP:LA-*cp* rotter<sup>(4,5)</sup>, Zucker-*fa* rotte<sup>(3)</sup>, KK-mus og musestammene C57BL/KsJ-*ob* og C57BL/KsJ-*db*. I den sistnevnte musestammen skyldes utviklingen av diabetes en autosomal recessiv genmutasjon (kromosom 4 i *db*-genet), som fører til en defekt leptinreseptor i homozygote (*db/db*) individer. Homozygote (*db/db*) individer overspiser, blir overvektige med hyperglykemi, dyslipidemiske og hyperinsulinemi (insulin resistens); mens de heterozygote (*db/+*) individer er fenotypisk normale. En oversikt over dette diabetiske syndrom er gitt i Figur 4. Insulinresistens kompenseres initielt ved økt insulinsekresjon, og økte plasmainsulin finnes allerede i 10-12 dagers alderen. Hyperglykemi utvikles først når den økt insulinsekresjon ikke lenger kan kompensere for insulinresistensen. Maksimal hyperinsulinemi forekommer når dyrene er 2-3 måneder gamle og faller deretter på grunn av  $\beta$ -celler defekt. Kroppsvekten til *db/db* mus øker kraftig til de når 2 månedersalderen, og da er vekten omtrent dobbelte av den hos ikke-diabetiske (*db/+*) kontrollmus. *De metabolske egenskaper til db/db mus, med initiell insulin-resistens fulgt av en defekt insulinsekresjon, er svært lik patogenesisen til NIDDM i diabetiske pasienter.* <sup>(2)</sup>



Figur 4: Utvikling av diabetisk syndrom i type 2 (db/db) diabetiske mus.

## Behandling av forsøksdyrene og prøvetaking

En gruppe dyr ble tilført BM 17.0744 via drikkevannet. I behandlingsperioden ble det målt blodsukker, kroppsvekt, før- og vanninntak registreres ukentlig. Etter endt behandling ble dyrene avlivet med pentobarbital anestesi, og det ble tatt blodprøver (for bestemmelse av plasmakonsentrasjonen av insulin, glukose, TG og FFA). Disse resultatene er publisert i artikler av Aasum og medarbeidere <sup>(1)</sup>. Til vår oppgave tok vi visceralt fettvev for å isolere fettceller.

Vi vil samtidig undersøke i hvilken grad opptaket av radioaktivt merket glukose påvirkes av insulin i fettceller fra ubehandlede og BM 17.0744-behandlede db/db mus. Metoden for isolering av fettceller er etablert ved Avdeling for medisinsk fysiologi, og bygger på collagenasebehandling av vevet.

## Protokoll 1: effekt av insulin på lipolyse hastigheten i isolerte fettceller

Disse forsøkene ble gjennomført med fettceller hvor lipolysen var sub-maksimalt stimulert med adrenalin (50 nmol/l). Denne dosen av adrenalin ble bestemt på grunnlag av noen innledende forsøk hvor vi undersøkte dose-respons forholdet mellom adrenalin og glyserolutslipp fra fettcellene (Figur 5). Derne st målte vi glyserolutslipp fra fettceller (både fra ubehandlede og BM 17.0744-behandlede db/db mus) i løpet av en 30 min inkubasjonsperiode. Vi lagde en nullverdi for både t=0 min og t=30 min (inkubasjonstiden for opptak av glukose). De andre glassene inneholder fra  $10^{-16}$  mol/l insulin til  $10^{-8}$  mol/l insulin. Til sammen skal det da være 10 glass.

## Protokoll 2: effekt av insulin på glukoseopptaket i isolerte fettceller

I den andre serien så vi på effekten av insulin i økende konsentrasjoner på basalopptaket av glukose. Vi lagde en nullverdi for både t=0 min og t=30 min (inkubasjonstiden for opptak av glukose). De andre glassene inneholder fra  $10^{-16}$  mol/l insulin til  $10^{-8}$  mol/l insulin. Til sammen skal det da være 10 glass. Vi brukte radioaktivt merket glukose ( $^3\text{H}$ -2-deoxy glukose) som ble målt ved hjelp av væskescintillasjon.

## Isolering av adipocytter

Til forsøkene våre brukte vi fettceller som var isolert henholdsvis fra ubehandlede diabetiske mus (db/db) og diabetiske mus som var blitt behandlet med BM 17.0744 (db/db + BM 17.0744).

For å isolere fettcellene fra det viscerale fett, har vi brukt collagenasebehandling fulgt av filtrering og vasking av cellene. Denne metoden er etablert ved Avdeling for medisinsk fysiologi i Tromsø.

Ca 1 gram fettvev fra bukhulen overførte vi til en petriskål (plast) med litt skyllemedium. Synlige blodkar og bindevev ble fjernet og vevet ble snittet forsiktig med en skarp saks eller skalpell. Materialet overførte vi til en 50 ml Erlenmeyerkolbe som inneholdt 10 ml collagenasemedium. Dette rystet vi (140c/min, 4 cm slaglengde) i ca 60 minutt ved 37°C.

## Filtrering og skylling

1. Når collagenaseinkubasjonen er ferdig, filtrerte vi cellesuspensjonen gjennom en 10 ml avkuttet engangssprøyte med 2 lag gaz over i et 50 ml plastrør. Deretter skylte vi etter med litt skyllebuffer for å få med celler som sitter i "filtret".
2. Så filtrerte vi på nytt, men denne gangen gjennom 3 lag gaz. Cellesuspensjonen ble helt over i et 15 ml plastrør. På forhånd hadde vi plassert en tynn plastslange (med påmontert sprøytespiss) i plastrøret.
3. Suspensjonen sentrifugerte vi ca 20 sek. ved 300 x g slik at cellene ble samlet i et løst lag på overflaten.
4. Så sugde vi av mediet under cellene med en sprøyte som ble koblet til plastslangen.
5. Deretter resuspenderte vi forsiktig i ca 10 ml skyllemedium, fjernet plastslangen, satte på kork og vendte røret forsiktig noen ganger slik at cellene fordelte seg jevnt i mediet. Så satte vi på plass plastslangen.
6. Vi gjentok punkt 3-5 ytterligere 3 ganger.
7. Til sist fylte vi på inkubasjonsmedium til ønsket volum (cellekonsentrasjon) og gikk i gang med eksperimentet.

## Inkubasjon av celler

Vi tynnet cellesuspensjonen med inkubasjonsmedium ned til ønsket konsentrasjon (10  $\mu$ l PCV (packed cell volume)/ ml. Porsjoner á 1 ml inkuberte vi ved 38 °C på rystebad (90c/min, 4 cm slaglengde). Inkubasjonstiden for lipolyse er **60** minutt.

## Separering av inkuberte celler fra inkubasjonsmediet

Vi tilsatte 800  $\mu$ l silikonolje (MS 200/200, 0,97 g/ml). Dernest satte vi til 1 ml prøve med avklipt pipettespiss fra inkubasjonene, og rørene ble sentrifugert i 1 minutt. Vi kuttet rørene like under silikonivået og kastet den øvre delen av cellene. Fra den nedre delen tok vi prøver for bestemmelse av ulike parametere, i dette tilfellet glyserol.

## Løsninger og forberedelser:

Til hvert forsøk lagde vi 3 bufferløsninger; skyllebuffer, collagenasebuffer og inkubasjonsbuffer.

### Stamløsninger: A (Krebs-Ringer)

<u>Salt:</u>	<u>Gram:</u>	<u>Konsentrasjon (mM)</u>
NaCl	34,48	590
KCl	1,85	24,8
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	1,87	12,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,81	5,95
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,47	5,95

Løses i 1 liter destillert vann og fryses i porsjoner à 20 ml.

### B (HEPES (150 mM))

17,87 g HEPES (2[4-(2-hydroxyethyl)-piperazinyl-(1)]ethanesulfonic acid)

Løses i 500 ml destillert vann og fryses i porsjoner á 16 ml.

### C (Glukose (312,5 mM))

5,63 gram glukose (MW=180,16)

Løses i 100 ml destillert vann og fryses i porsjoner á 4 ml.

Cellemedia:

### Skyllebuffer

Krebs-ringer (A)	20 ml
Hepes (B)	16 ml
Glukose	4 ml

1 porsjon fra hver av stamløsningene ble tint, blandet, tilsatt og helt over i en 100 ml målesylinder. Så satte vi til destillert vann til nesten 100 ml. Denne løsningen helte vi over i et 200 ml begerglass og satte til 1 g albumin (la albuminet synke inn uten omrøring). pH ble justert til 7,4 med 1M NaOH. Til slutt helte vi løsningen tilbake til målesylinderen og justerte volumet til nøyaktig 100 ml.

Finale konsentrasjoner i skyllebufferen (mM):

NaCl	118,00
KCl	4,96
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	2,54
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,19
BSA	1 %

### Collagenasebuffer:

Denne bufferen lagde vi på samme måte som skyllebufferen, med unntak av tilsats av 20 mg collagenase (Boehringer-Mannheim, Collagenase A, nr. 1088 793). Collagenasen er holdbar i løsning ved -20°C, og det er derfor praktisk å fryse collagenasebufferen i porsjoner á 10 ml.

## Separering av inkuberte celler fra inkubasjonsmediet

Tilsett 800  $\mu$ l silikonolje (MS 200/200, 0,97 g/ml). Dernest tilsettes 1 ml prøve med avklipt pipettespiss fra inkubasjonene, og rørene sentrifugeres i 1 minutt. Rørene kuttes like under silikonnivået og øvre delen av cellene kastes. Fra den nedre delen tas prøver for bestemmelse av ulike parametere, i dette tilfellet glyserol.

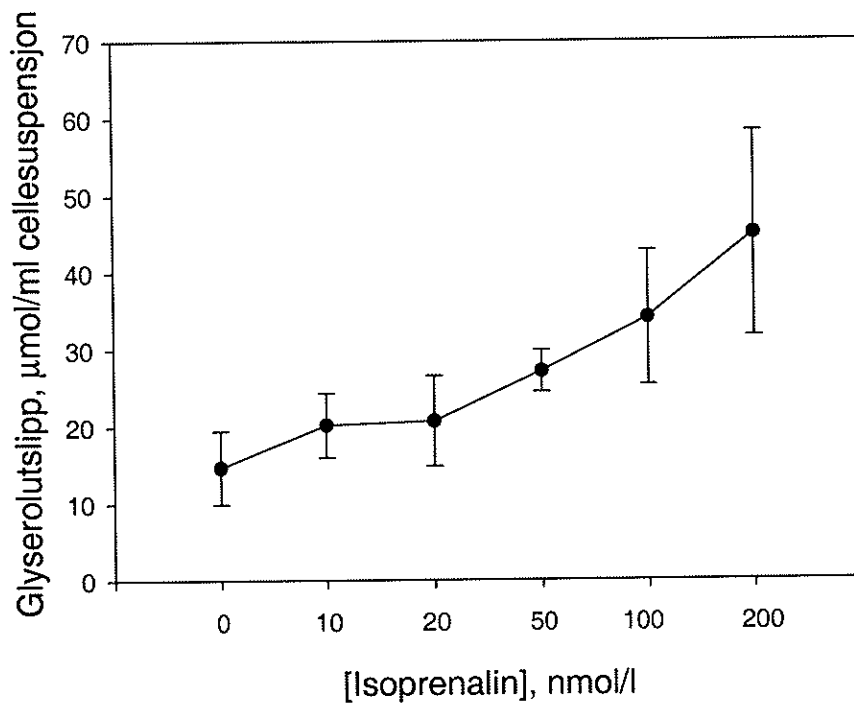
## Målinger

Vi målte glyserolutslipp ved hjelp av en standard enzymatiske metode.

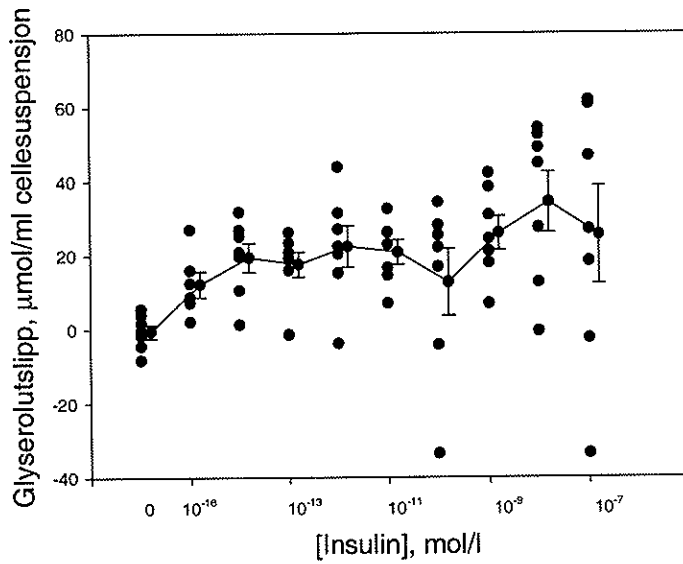
Målingene av sukkeropptak ble gjort ved at vi filtrerte ut cellene fra inkubasjonsmediet over et milliporefilter. Disse filtrene puttet vi i kolber med tellevæske og telte glukoseopptaket ved hjelp av væskescintillasjon i en  $\beta$ -teller.



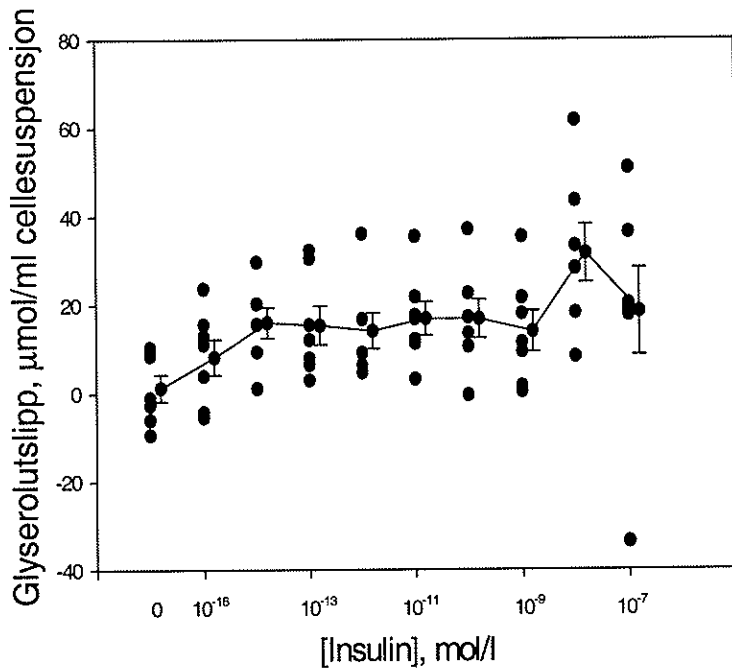
## Resultater



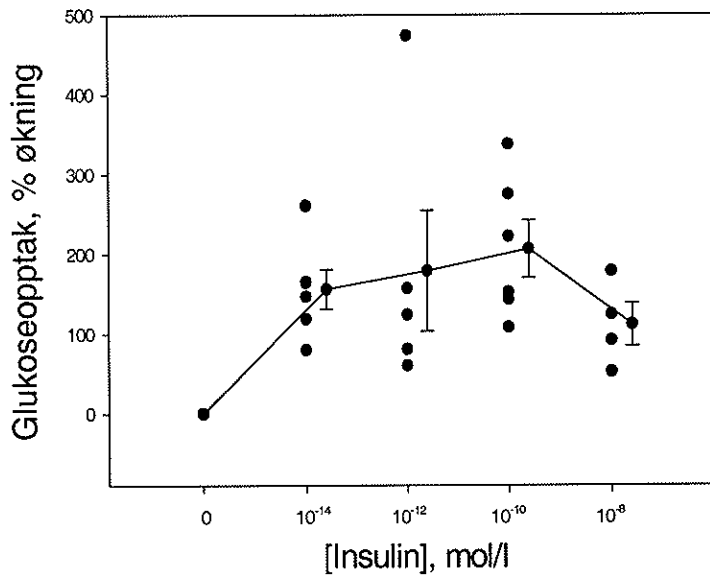
*Figur 5: Grafen viser glyserol-utslipp fra isolerte fettceller i begge gruppene med mus i nærvær av økende konsentrasjon av adrenalin. Halv-maksimal lipolyse hastighet oppnås ved en adrenalin-konsentrasjon på 50 nmol/l.*



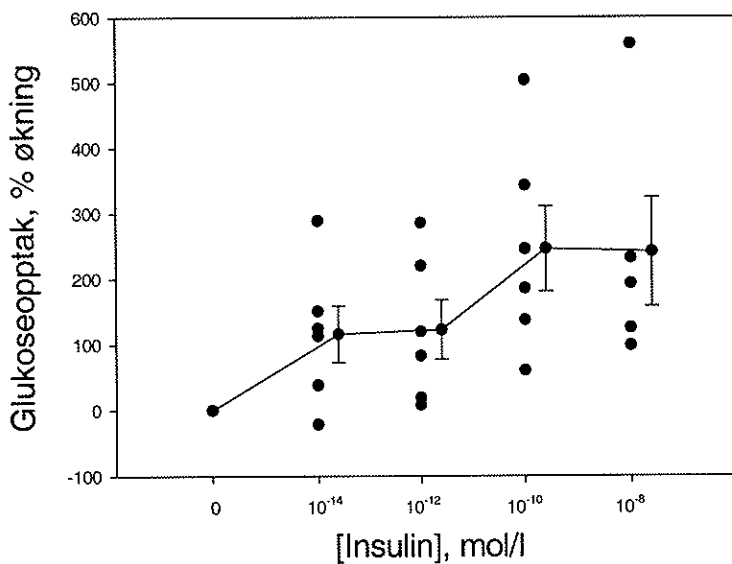
Figur 6: Grafen viser glyserolutslipp fra isolerte fettceller fra ubehandlede (db/db) diabetiske mus i nærvær av en konstant konsentrasjon av adrenalin (50 nM) samt økende konsentrasjon med insulin. I motsetning til det en ville forvente, var glyserolutslippet tilsynelatende lavest i fravær av insulin. Ser en bort fra basalverdien (null insulin), hadde insulin ingen effekt på lipolysehastigheten i disse forsøkene.



Figur 7: Grafen viser glyserolutslipp fra isolerte fettceller fra behandlede diabetiske mus (db/db + BM) i nærvær av konstant konsentrasjon av adrenalin (50 nM) samt økende konsentrasjon med insulin. Også i dette tilfellet var glyserolutslippet tilsynelatende lavest i fravær av insulin. Insulin hadde ikke den forventede hemmende effekten på lipolysehastigheten.



Figur 8: Grafen viser glukoseopptak i isolerte fettceller fra ubehandlede diabetiske mus (db/db) i nærvær av økende konsentrasjon av insulin. Verdiene er normaliserte i forhold til basaloopptaket (null insulin) som er satt til null. Vi ser en signifikant økning av glukoseopptaket i nærvær av insulinkonsentrasjoner mellom  $10^{-14}$  og  $10^{-10}$  mol/l.



Figur 9: Grafen viser glukoseopptak i isolerte fettceller fra behandlede diabetiske mus (db/db + BM) i nærvær av økende konsentrasjon av insulin. Verdiene er normaliserte i forhold til basaloopptaket (null insulin) som er satt til null. Glukoseopptaket øker signifikant i nærvær av insulin.

## Diskusjon

Figur 5 viser at glyserolutslipet fra isolerte fettceller fra diabetiske mus øker med økende konsentrasjon av adrenalin. Halvmaksimal stimulering ble oppnådd med ca 50 nmol/l adrenalin, en konsentrasjon som også ble brukt i forsøkene hvor vi undersøkte effekten av insulin på lipolysen. Disse resultatene er i overensstemmelse med at adrenalin stimulerer hormonsensitiv lipase, som er det hastighetsregulerende enzym i lipolysen.

Når det gjelder forsøkene hvor vi tilsatte en konstant konsentrasjon med adrenalin og økende konsentrasjon av insulin hadde vi forventet en hemming av glyserolutslipet, i hvert fall i fettceller fra db/db mus behandlet med BM 17.0744. Insulin har nemlig en sterkt hemmende effekt på den hormonsensitive lipasen i fettvev. Hos de ubehandlede skulle man forvente en mindre effekt av insulin. Vi fant imidlertid ingen statistisk signifikant forskjell mellom gruppene.

Når det gjelder glukoseopptaket, så viser resultatene en økning av glukoseopptak hos begge gruppene, men forskjellen mellom de to gruppene er ikke statistisk signifikant. Til det er spredningen i resultatene for stor, og det er også for få forsøk.

## Konklusjon

Ut i fra disse resultatene er det ingen forskjell i glyserolutslipp og glukoseopptak mellom ubehandlete og BM 17.0744-behandlede diabetiske mus. Kan derfor ikke beholde vår hypotese om at cellene skulle bli mer sensitiv for insulin etter behandling og dermed vise høyere glukoseopptak og økt hemming av glyserolutslipp, sammenlignet med ubehandlede diabetiske kontroller.

## Feilkilder

Må først og fremst trekke fram antall vellykkede forsøk. Det tok tid å lære seg metoden og det ble brukt mange mus før vi klarte å isolere fettceller uten skade. Metoden for fettcelle isolering hadde også mange fallgruver. Metode som tidligere var etablert ved fysiologisk avdeling her i Tromsø var utviklet for fettvev fra rotte og erfaringene fra rotte kunne tydeligvis ikke ekstrapoleres til mus. Fettceller på overspiste mus med mye visceralt fett er mye større i omkrets

enn normale fettceller. Dette så vi med det blotte øyet i mikroskopet. Vi observerte i tillegg et lag med olje (triglyserider) i inkubasjonsrørene med fettceller fra db/db mus, noe som tyder på sprukne fettceller. Det er også grunn til å tro at fettcellene fra db/db mus er mer skjøre enn fra ikke-diabetiske mus pga. økt veggtegensjon som øker med radius. På grunnlag av dette er det grunn til å tro at disse diabetiske cellene er mer skjøre enn de fra kontrollene. En medvirkende årsak til sprukne fettceller vil være den mekaniske skaden cellene blir påført under inkubasjonen, når de slynges mot veggen i inkubasjonsrøret.

En annen faktor er celleantallet i hver prøve. Når vi skulle ta ut celler til inkubasjon så ble det tatt ut 1 ml cellesuspensjon. Det er vanskelig å anslå om cellekonsentrasjonen var den samme for alle inkubasjonene pga. cellene flyter opp i suspensjonen. Vi forsøkte og riste forsiktig på suspensjonen for så å pipettere ut 1ml med homogen cellesuspensjon, men det er grunnlag for å tro at dette ikke lyktes særlig bra. Det ble forsøkt DNA- og protein-analyser for å finne ut hvor mange celler det var i hver prøve, for så å få anslått glukose opptak i relasjon til celleantall. Dette lyktes ikke pga. det ikke var etablert rutiner for dette ved Avdeling for medisinsk fysiologi. Vi måtte da gå ut fra at det var en homogen masse, og vi normaliserte glukoseopptaket i forhold til nullprøven og regnet ut prosentvis økning for hvert enkelt forsøk.

En annen mulighet for sprikende resultater (glukoseopptaks-målingene) er filtrasjons prosessen der filtrert kan ha fått små rifter og celle materialet kan ha gått tapt.

## REFERANSER

1. Aasum E, Belke DD, Severson DL, Riemersma RA, Larsen TS. Cardiac function and metabolism in Type 2 diabetic mice following treatment with BM 17.077, a novel insulin sensitizer. *Am.J.Physiol.* 2001;
2. Patti ME, Kahn CR. Transgenic animal models: insights into the pathophysiology of NIDDM. *Diabetes Rew.* 1997; 5:149-164.
3. Rosen P, Herberg L, Reinauer H. Different types of postinsulin receptor defects contribute to insulin resistance in hearts of obese Zucker rats. *Endocrinology* 1986; 119:1285-1291.
4. Lopaschuk GD, Russell JC. Myocardial-function and energy substrate metabolism in the insulin-resistant JRC:LA corpulent rat. *J.Appl.Physiol.* 1991; 71:1302-1308.
5. Maddaford TG, Russell JC, Pierce GN. Postischemic cardiac performance in the insulin-resistant JCR:LA- cp rat. *Am.J.Physiol.* 1997; 42:H1187-H1192
6. Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 1999; 10:245-257.
7. Torra IP, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr.Opin.Lipidol.* 1999; 10:151-159.
8. Van-Bilsen M, Van-der-Vusse GJ, Reneman RS. Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflugers Arch.* 1998; 437:2-14.
9. Cook WS, Yeldandi AV, Rao MS, Hashimoto T, Reddy JK. Less extrahepatic induction of fatty acid beta-oxidation enzymes by PPAR alpha. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 2000; 278:250-257.
10. Kliewer SA, FORMAN BM, Blumberg B, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994; 91:7355-7359.
11. Braissant O, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 1998; 139:2748-2754.
12. Djouadi F, Brandt JM, Weinheimer CJ, Leone TC, Gonzalez FJ, Kelly DP. The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac lipid metabolism. *Prostaglandins.Leukot.Essent.Fatty.Acids.* 1999; 60:339-343.
13. van-der-Lee KA, Vork MM, De-Vries JE, et al. Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J.Lipid Res.* 2000; 41:41-47.
14. van-der-Lee KA, Willemsen PH, Van-der-Vusse GJ, Van-Bilsen M. Effects of fatty acids on uncoupling protein-2 expression in the rat heart. *FASEB J.* 2000; 14:495-502.

15. Verma S, McNeill JH. Metformin improves cardiac-function in isolated streptozotocin- diabetic rat hearts. *Am.J.Physiol.* 1994; 266:H714-H719
16. Zhu P, Lu L, Xu Y, Schwartz GG. Troglitazone improves recovery of left ventricular function after regional ischemia in pigs. *Circulation* 2000; 101:1165-1171.
17. Meyer K, Voss E, Neidlein R, Kuhnle HF, Pill J. omega-Substituted alkyl carboxylic acids as antidiabetic and lipid-lowering agents. *Eur.J.Med.Chem.* 1998; 33:775-787.
18. Meyer K, Volkl A, Endeke R, Kuhnle HF, Pill J. Species differences in induction of hepatic enzymes by BM 17.0744, an activator of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha). *Arch.Toxicology.* 1999; 73:440-450.