

Wpływ chromu III, estradiolu i genisteiny na komórkową lokalizację insulinozależnego białka transportującego glukozę 4 (Glut-4) w hodowli zróżnicowanych mięśniowych komórek linii C2C12

Effect of chromium (III), estradiol and genistein on cellular localizations of glucose transporter type 4 (Glut-4) in differentiated mouse myocytes cells C2C12

SŁAWOMIR LEWICKI ^{1/}, ROBERT ZDANOWSKI ^{1/}, MAŁGORZATA GAJEWSKA ^{2/}, BOLESŁAW KALICKI ^{3/}, ANETA LEWICKA ^{4/}, BOGDAN DĘBSKI ^{2/}

^{1/} Zakład Medycyny Regeneracyjnej, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie

^{2/} Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

^{3/} Klinika Pediatrii, Nefrologii i Alergologii Dziecięcej, Wojskowy Instytut Medyczny, Centralny Szpital Kliniczny MON w Warszawie

^{4/} Zakład Higieny i Fizjologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie

Wprowadzenie. W regulacji poziomu glukozy we krwi kluczową rolę odgrywa insulina i tkanki (mięśnie, tłuszcz), które posiadają insulinozależne białko transportujące glukozę (Glut-4).

Cel pracy. W badaniach postanowiono określić wpływ 48 h inkubacji komórek z jonami chromu (10 µg Cr³⁺/L) podawanymi w formie chlorku lub pikolinianu, estradiolu (1; 10; 100 nM) oraz genisteiny (0,1; 1; 50 µM) na translokację Glut-4 z cytoplazma/błona komórkowa. Dodatkowo określono wpływ badanych czynników na efekty wywołane stymulacją insuliną (100 nM, 15 min.).

Materiały i metody. Badania wykonano na mysich komórkach mięśniowych linii C2C12 poddanych 6-dniowemu różnicowaniu (dodatek 2% surowicy końskiej). Oznaczenie ilości Glut-4 cytoplazma/błona komórkowa wykonano przy użyciu swoistych przeciwciał w mikroskopie konfokalnym.

Wyniki. Chrom w formie pikolinianu (10 µg Cr³⁺/L) oraz genisteiny (0,1 µM) znacząco zwiększał ilość Glut-4 na błonie komórkowej. Oba związki hamowały efekt stymulacyjny insuliny. Dla estradiolu (10; 100 nM) oraz chlorku chromu zauważono nieistotnie statystycznie zwiększenie ilości Glut-4 na błonie komórkowej i podobny efekt wywołany dodatkiem insuliny.

Wniosek. Uzyskane wyniki nie wykluczają możliwości oddziaływania chromu poprzez receptory estrogenowe, jednakże nie dają jednoznacznej odpowiedzi, który z receptorów może być stymulowany przez chrom.

Słowa kluczowe: chlorek chromu, estradiol, genisteina, białko transportujące glukozę 4 (Glut-4), miocyty C2C12

Introduction. Insulin and selected tissues (e.g. muscle or adipose) play a key role in regulation of blood glucose level. These tissues has insulin-dependent glucose transporter member 4 (Glut-4).

Aim. In the present study, we determined the effect of 48 h cell incubation with chromium ions (Cr³⁺ 10 µg / L administered as chloride or picolinate), estradiol (1, 10, 100 nM) or genistein (0.1, 1, 50 µM) on Glut-4 cytoplasm/cell membrane translocation. In addition, the influence of the studied factors on the effects caused by insulin stimulation (100 nM, 15 min.) was examined.

Materials and methods. Research was carried out on mouse muscle cell line C2C12 with prior six-day differentiation (addition of 2% horse serum). The receptor localization (cytoplasm/cell membrane) was performed using confocal microscopy after specific antibody staining.

Results. Chromium picolinate (10 µg Cr³⁺ / L) and genistein (0.1 µM) significantly increased the amount of Glut-4 in cell membrane. In the same time, both compounds inhibited the stimulatory effect of insulin. Insignificant increase in the number of Glut-4 on the cell membrane in the case of 10 nM and 100 nM of estradiol, and chromium chloride supplementation was observed.

Conclusion. The results do not exclude the possibility of chromium action through estrogen receptors, but do not give a definite answer which receptor can be stimulated by chromium ions.

Key words: chromium chloride, estradiol, genistein, glucose transporter type 4 (Glut-4), C2C12 myocytes

Wprowadzenie i cel pracy

Homeostaza glukozy w organizmie uwarunkowana jest odpowiedzią tkanek na działanie insuliny. W warunkach prawidłowych insulina wiąże się z receptorem insulinowym, co prowadzi do autofosforylacji reszt tyrozynowych w części cytoplazmatycznej receptora. Prowadzi to do fosforylacji białek z rodziny IRS (*insulin receptor substrate*) takich jak IRS 1-4 czy Gab-1 i aktywacji 3-kinazy fosfatydiloinozytolu (PI 3-K). PI 3-K katalizuje biosyntezę 3-fosfatydiloinozytolu, wtórnych molekuł sygnałowych. Inicjują one łańcuch reakcji prowadzących do aktywacji czynników odpowiedzialnych za efekty wywołane przez insulinę: kinaz białkowych B i C (PKB, PKC), fosfatydiloinozyto-zależnej kinazy (PDK-1) czy ścieżki zależnej od kinazy mTOR. Głównym efektem działania tego procesu jest translokacja białka transportującego glukozę 4 (Glut-4) z cytoplazmy na błonę komórkową, w wyniku czego następuje inicjacja aktywnego transportu glukozy do komórek [1, 2]. Proces wyciszania sygnału wzbudzonego przez hormon regulowany jest w kilku etapach i zależy od fosfataz wewnątrzkomórkowych. Powoduje to powrotne przeniesienie białka Glut-4 z błony komórkowej do cytoplazmy, przez co zahamowany zostaje dokomórkowy transport glukozy.

Zaburzenia w przekazywaniu sygnału pochodzącego od insuliny są przyczyną cukrzycy typu 2, jednej z najszybciej rozwijającej się choroby cywilizacyjnej. Według prognozy, przeprowadzonej przez Kim i wsp., w roku 2030 na całym świecie będzie około 300 milionów osób cierpiących na tę chorobę [3]. Dobrym kandydatem do wspomagania terapii cukrzycy typu 2 może być chrom. W badaniach, przeprowadzonych zarówno wśród ludzi z objawami cukrzycy, jak i u zwierząt laboratoryjnych z doświadczalnie wywołaną cukrzycą udowodniono, że suplementacja jonami chromu (III) zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia arteriosklerozy, zawału serca, obniża poziom cholesterolu, lipoprotein niskiej gęstości (LDL), zmniejsza sekrecję insuliny przy niezmiennym stężeniu glukozy [4-7]. Pomimo licznych badań przeprowadzonych z udziałem chromu, molekularny mechanizm oddziaływania tego pierwiastka nie jest do końca znany. Jedną z hipotez jest możliwość oddziaływania jonów chromu z receptorami estrogenowymi. Receptory estrogenowe (ER) posiadają w swojej budowie miejsce do wiązania metali, a względne powinowactwo chromu do ER badane w hodowli komórek MCF-7 było tylko około czterokrotnie niższe aniżeli do 17-beta-estradiolu (E) [8]. Prowadząc badania z udziałem receptorów estrogenowych należałoby rozróżnić efekt wywołany aktywacją receptora alfa lub beta. Taką możliwość dają związki selektywnie oddziałujące na jeden typ receptora estrogenowego. Niewątpliwie takim związkiem jest

genisteina (G), która reaguje głównie z receptorem estrogenowym beta [9].

Dlatego w niniejszej pracy postanowiono zbadać wpływ chromu, estradiolu (naturalnego liganda receptorów estrogenowych) i genisteiny na komórkową lokalizację insulinozależnego białka transportującego glukozę 4 (Glut-4). Głównymi tkankami zaangażowanymi w zależny od tego hormonu transport glukozy są mięśnie, komórki tłuszczowe i wątroba. Z tego względu badania zostały wykonane na linii komórkowej mysich mioblastów C2C12 poddanej różnicowaniu do miocytów.

Materiały i metody

Hodowle komórkowe. Badania wykonywano na komórkach mysich mioblastów linii C2C12 zakupionej w banku komórek *European Collection of Animal Cell Cultures* (Porton Down, Anglia). Komórki wykorzystywano w badaniach maksymalnie do 20 pasażu. Komórki hodowano zgonie z procedurą opisaną wcześniej [10]. Do różnicowania używano medium zawierającego 2% surowicę końską (HS) zakupionej w Gibco, Szkoja.

Związki chromu: chlorek (cCr) i pikolinian (pCr) zakupione w Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Chemical Co.; St. Louis, MO, USA) rozpuszczano w wodzie dejonizowanej i sterylizowano za pomocą filtrów strzykawkowych. Estradiol i genisteinę zakupiono w Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA i rozpuszczono w etanolu. Kontrolę dla genisteiny i estradiolu stanowiły media z odpowiednim dodatkiem etanolu. Stężenie związków do badań wybrane zostały we wcześniejszych badaniach na komórkach linii C2C12 jako te, które wykazują korzystny efekt biologiczny [10, 11].

Immunocytochemia. Komórki do oznaczeń wysiano na ośmiokomorowe szkiełka podstawowe typu Lab-Tek w stężeniu 25 tys. kom./cm². Po uzyskaniu 80-90% konfluencji komórki poddano różnicowaniu (dodanie medium z surowicą końską) przez okres 4 dni. Dwanaście godzin przed wykonaniem doświadczenia usuwano medium różnicujące i podawano DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium with Glutamax*) bez surowicy (która zawiera związki estrogenowe). Czynniki doświadczalne podawano DMEM na okres 48 godz. Dla każdego z badanych czynników przeprowadzono także stymulację insuliną (100 nM, 15 min. przed zakończeniem doświadczenia). Po inkubacji z badanymi czynnikami, komórki przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS i utrwalano 3,7% paraformaldehydem w PBS (w/o) przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Po 15 min. paraformaldehyd usuwano, komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS i dodawano 70% roztwór metanolu (metanol w PBS, o/o, 15 min, 40° C) w celu per-

mabilizacji błon komórkowych. Następnie metanol usuwano i przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS. Tak przygotowane komórki inkubowano w roztworze z pierwotnym przeciwciałem 1 $\mu\text{g/ml}$ w PBS (królicze poliklonalne przeciwciała IgG anty-Glut-4) przez 1,5 godz. w temperaturze pokojowej. Po usunięciu roztworu przeciwciał komórki przepłukiwano roztworem PBS i dodawano mieszaniny przeciwciał wtórnych znakowanych fluorochromami (Alexa Fluor 488 kurze anty-królicze) w stężeniu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ każde w PBS na godzinę w temperaturze pokojowej. Po usunięciu przeciwciał wtórnych komórki przepłukiwano 2-krotnie roztworem PBS i dodawano 2 $\mu\text{g/ml}$ 7-AAD (7-AAD w PBS, w/o, 15 min., temperatura pokojowa), po czym przepłukiwano 3-krotnie roztworem PBS. Następnie ze szkiełek podstawowych typu Lab-Tek usuwano ścianki boczne, dodawano kroplę mounting medium i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty oglądano następnego dnia w mikroskopie konfokalnym w powiększeniu 600 $\times$ (Olympus, Polska).

Dla każdego wariantu doświadczenia wykonywano po 10 zdjęć, na których widoczna była komórka (miotuba) posiadająca 3 lub więcej jąder. Wykonane zdjęcia analizowano przy pomocy programu MicroImage (MicroImage, Version 4,0 for windows 95/NT/98, Olympus, Hamburg, Niemcy).

Oceniając komórkową lokalizację białka Glut-4 obrysowywano widoczną na zdjęciu miotubę w całości i dokonywano pomiaru współczynnika integralności optycznej (IOD), a następnie zaznaczano obszar z pominięciem błony komórkowej i powtórnie dokonywano pomiaru. Z różnicy IOD wyliczano IOD błony komórkowej, które następnie dzielono przez IOD całej komórki. Tak uzyskane wyniki przeliczono

na % wartości uzyskanej dla warunków kontrolnych. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 odrębnych doświadczeń $\pm$ SEM. Dla badanych czynników różnice statystyczne wyliczano względem wartości uzyskanej dla kontroli, natomiast w przypadku dodatkowej stymulacji insuliną dla wartości uzyskanej dla warunków kontrolnych + insulina. Przykładowe zdjęcia z mikroskopu konfokalnego przedstawiono na rycinie 1.

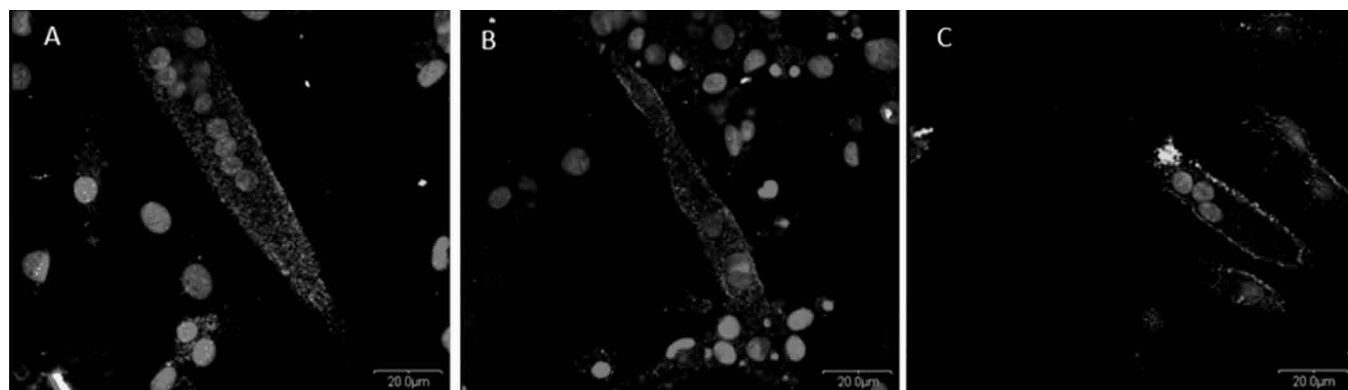
Analiza statystyczna. Wszystkie uzyskane z doświadczeń wyniki wykazywały parametry rozkładu normalnego. Dlatego analizę poziomu istotności wykonano przy użyciu one-way ANOVA (weryfikacja testem Tukeya) przy zastosowaniu programu komputerowego GraphPad Prism 4.0 (Microsoft, Seattle, USA).

Wyniki i omówienie

Kontrola. Stosunek ilości Glut-4 na powierzchni błony komórkowej do ilości zlokalizowanej wewnątrz komórki w warunkach kontrolnych wynosił $11,6 \pm 2,13\%$. Powierzchnia błony komórkowej wyliczona ze zdjęcia stanowiła poniżej 4% powierzchni całej komórki.

Dodatek insuliny spowodował zwiększenie ilości Glut-4 w błonie komórkowej (około 75%, $p < 0,05$) przy czym zaobserwowano komórki, gdzie ilości tego transportera w błonie komórkowej były ponad 3-krotnie wyższe.

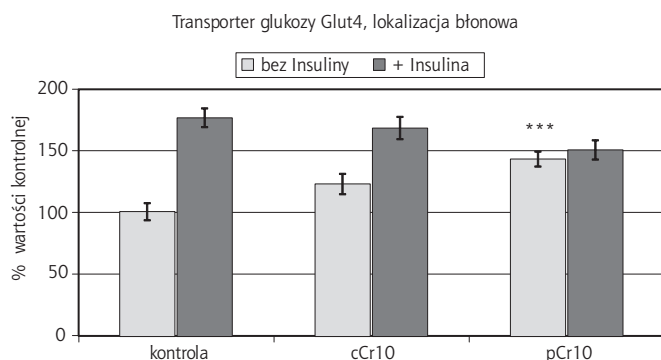
Chrom. Nie wykazano statystycznych różnic w ilości Glut-4 w błonie komórkowej po 48 godzinnej inkubacji z jonami chromu podawanymi w formie chlorku. Natomiast po 48 godzinnej stymulacji pikolinianem chromu zauważono około 40% wzrost ilości



Ryc. 1. Przykładowe zdjęcia komórek linii C2C12 wykonane w mikroskopie konfokalnym. Zdjęcia wykonano 6 dnia różnicowania. Na zdjęciach widoczne centralnie miotuby. Zielona fluorescencja oznacza ekspresję Glut-4, czerwonym fluorochromem wybarwiono jądra komórkowe. A – komórki hodowane w warunkach kontrolnych, B – komórki hodowane z dodatkiem jonów chromu ($10 \mu\text{g Cr}^{3+}/\text{L}$), C – komórki hodowane w warunkach kontrolnych, dodatkowo stymulowane insuliną (100 nM) przez 15 minut. Zdjęcia wykonano w mikroskopie konfokalnym „Olympus” w powiększeniu 600 $\times$

Fig. 1. Typical image of the C2C12 cell line taken by confocal microscope (Olympus, 600 $\times$ magnification). Photos were done after the 6th day of differentiation. Myotubes are shown in the central part of photos. Green fluorescence indicates the expression of GLUT-4, red – fluorochrome-stained nuclei. A – control, B – chromium supplementation ($10 \mu\text{g Cr}^{3+}/\text{L}$), C – control with addition insulin addition (100 nM , 15 min. before end of examination)

receptora Glut-4 w błonie komórkowej. Dwudniowa inkubacja komórek z jonami chromu (podawanego w formie chlorku) dodatkowo stymulowanych insuliną (100 nM) nie wpływało znacząco na zwiększenie ilości Glut-4 w błonie komórkowej (wzrost ilości o około 40%) w porównaniu do wartości uzyskanych dla kontroli z dodatkiem insuliny. Co ciekawe nie zauważono efektu stymulacyjnego insuliny w komórkach hodowanych z pikolinianem chromu (ryc. 2).

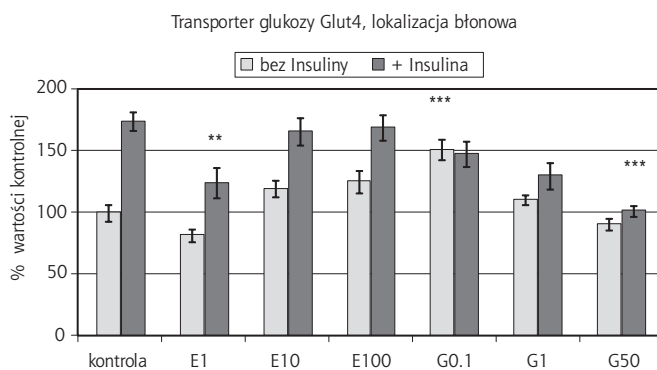


Ryc. 2. Wpływ jonów chromu (chlorku i pikolinianu, 10 $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{L}$) na ilość białka transportującego glukozę (Glut-4) na błonie komórkowej. Badanie wykonano w zróżnicowanych komórkach linii C2C12 po 48 godzinnej inkubacji z badanymi czynnikami DMEM. Dodatkowo wykonano 15 min. inkubację z insuliną o stężeniu 100 nM. Wyniki stanowią wartości średnie $\pm$ SEM. Różnice statystyczne wyliczono względem wartości uzyskanej dla kontroli lub kontroli z dodatkiem insuliny. *** $p < 0,001$

Fig. 2. Effect of chromium ions supplementation (10 $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{L}$, added as chloride or picolinate) on membrane glucose transporter type 4 (Glut-4). Experiment was performed on differentiated C2C12 cell line after 48 h incubation with tested compounds. Additionally 15 min. stimulation (before end of examination) with insulin (100 nM) was done. Results are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were calculated due to control (with or without insulin). *** $p < 0.001$

Estradiol. Nie zauważono istotnych różnic statystycznych po 48 inkubacji z estradiolem (w stężeniach 1, 10 i 100 nM). Zaobserwowano natomiast zależny od stężenia estradiolu wzrost ekspresji Glut-4 w błonie komórkowej (od 81,4 dla 1 nM do 125,5% dla 100 nM estradiolu). Ten sam efekt zauważalny był po dodatkowej stymulacji insuliną, która niezależnie od stężenia estradiolu zwiększała ilość Glut-4 na błonie o około 45% w porównaniu do wartości uzyskanej dla danego stężenia estradiolu (ryc. 3).

Genisteina. 48 h inkubacja z genisteiną w stężeniu 0,1 spowodowała zwiększenie ilości białka Glut-4 na błonie komórkowej o około 50% ($p > 0,01$). Porównując trzy zastosowane stężenia zaobserwowano zależne od stężenia obniżenie średniej ekspresji Glut-4 w błonie komórkowej (od 151,7% dla 0,1 μM do 90,5% dla 50 μM genisteiny). Dodanie insuliny do hodowli suplementowanej genisteiną nie wpływało znacząco na zwiększenie ilości Glut-4 w błonie komórkowej. Wartości te były porównywalne do wyników



Ryc. 3. Wpływ estradiolu (1, 10 i 100 nM) i genisteiny (0,1, 1, 50 μM) na ilość białka transportującego glukozę (Glut-4) na błonie komórkowej. Badanie wykonano w zróżnicowanych komórkach linii C2C12, po 48 godzinnej inkubacji z badanymi czynnikami DMEM. Dodatkowo wykonano 15 min. inkubację z insuliną o stężeniu 100 nM. Wyniki stanowią wartości średnie $\pm$ SEM. Różnice statystyczne wyliczono względem wartości uzyskanej dla kontroli lub kontroli z dodatkiem insuliny. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Fig. 3. Effect of estradiol (1, 10 i 100 nM) and genistein (0,1, 1, 50 μM) on membrane glucose transporter type 4 (Glut-4). Experiment was performed on differentiated C2C12 cell line after 48 h incubation with tested compounds. Additionally 15 min. stimulation (before end of examination) with insulin (100 nM) was done. Results are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were calculated due to control (with or without insulin). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

uzyskanych bez hormonu, dlatego wykazano różnice statystyczne pomiędzy wartością uzyskaną dla kontroli z insuliną a wartością uzyskaną dla genisteiny (50 μM) z insuliną (ryc. 3).

Fizjologiczne zmiany stężenia glukozy w organizmie podlegają regulacji hormonalnej, w której dużą rolę odgrywa insulina. Jest to hormon regulujący m.in. aktywację dokomórkowego, aktywnego transportu glukozy do insulinozależnych tkanek takich jak: mięśnie, tłuszcz czy wątroba. Białkiem bezpośrednio zaangażowanym w ten proces jest transporter Glut-4, który pod wpływem działania insuliny zostaje przeniesiony z cytoplazmy na błonę komórkową i umożliwia proces aktywnego transportu glukozy. Nieprawidłowości w przekazywaniu sygnału pochodzącego od insuliny powodują występowanie zaburzeń spowodowanych nadmierną ilością cukru (hiperglikemią). Leczenie tego typu zaburzeń jest skomplikowane, dlatego ciągle poszukuje się związków, które mogą w pewien sposób korzystnie wpływać na stan pacjentów. Do takich związków niewątpliwie należą jony chromu III. W licznych badaniach przeprowadzonych na zwierzętach z laboratoryjnie indukowaną cukrzycą (uszkodzenie trzustki streptozotocyną) wykazano, że suplementacja chromem zmniejsza poziom glukozy, cholesterolu i LDL we krwi oraz ogranicza ryzyko miażdżycy i zawału serca [12, 13]. U ludzi z objawami cukrzycy typu 2, dodatkowa podaż chromu w diecie, polepsza metabolizm glukozy i zwiększa efekt działania insuliny [14, 15]. Co ciekawe, Cefalu i wsp.

sugerują, że efekty wywołane przez chrom u pacjentów z cukrzycą typu 2 mogą być związane z genetycznymi uwarunkowaniami [16]. Pomimo licznych badań, mechanizm oddziaływania jonów chromu nie jest do końca poznany. Sugeruje się, że może on być związany z oddziaływaniem poprzez wole rodniki [17], ze zmianą płynności błony komórkowej [18] czy z oddziaływaniem na receptory estrogenowe [11].

Tematem niniejszej pracy było zbadanie wpływu 48 h suplementacji chromem, estradiolem i genisteiną na ilość transportera glukozy Glut-4 na błonie komórkowej. Dodatkowo zbadano wpływ wyżej wymienionych czynników na translokację białka Glut-4 wywołany dodaniem insuliny (100 nM, 15 minut). Wyniki uzyskane dla chromu (zwiększenie ilości Glut-4 na błonie komórkowej o 20% – chlorek i 40% – pikolinian) są podobne z badaniami przeprowadzonymi na linii 3T3-L1 (adipocyty) przez Chen i wsp. [19]. Wykazali oni również zwiększoną ilość Glut-4 w błonie komórkowej pod wpływem 16 godz. inkubacji z 10 μ M chlorkiem (44 %) i pikolinianem chromu (33%). Autorzy zaobserwowali również zwiększony efekt translokacji białek Glut-4 wywołany insuliną, co w niniejszej pracy obserwowane było tylko w przypadku inkubacji z chlorkiem chromu (10 μ g Cr^{3+} /L). W badaniach na linii 3T3-L1 wykazano również, że chrom podawany w postaci pikolinianu chromu zwiększał transport glukozy i translokację Glut-4 w warunkach wywołania oporności na insulinę (24h preinkubacja z wysokimi stężeniami glukozy) w hodowli *in vitro* [20]. Co ciekawe, jony chromu wpływają na transport glukozy w dwojaki sposób z jednej strony zwiększają ilość białka Glut-4 na błonie komórkowej, z drugiej zwiększają ilość mRNA Glut-4 w komórce [21].

Jest wiele dowodów, że estrogeny modulują wrażliwość na insulinę i są zaangażowane w homeostazę glukozy. W badaniach przeprowadzonych na myszach z nokautem genów receptora estrogenowego alfa ($\text{ER}\alpha$) lub beta ($\text{ER}\beta$) zauważono, że Glut-4 nie ulega kolokalizacji w mięśniach szkieletowych i komórkach tłuszczowych myszy. Dodatkowo brak genu $\text{ER}\alpha$ powoduje obniżenie poziomu białka Glut-4 i prowadzi do wywołania symptomów charakterystycznych dla cukrzycy, czego nie obserwuje się u myszy z brakiem $\text{ER}\beta$ [22, 23]. Odwrotną sytuację opisali Rüegg i wsp., którzy zaobserwowali zmniejszenie mRNA Glut-4 w zróżnicowanych komórkach embrionalnych fibroblastów mysich pozbawionych $\text{ER}\beta$ [24]. W niniejszej pracy inkubacja z estradiolem (48h, w stężeniach: 1, 10 i 100 nM, aktywacja głównie $\text{ER}\alpha$) nie wpływała znacząco na poziom Glut-4 na błonie komórkowej. Zauważono natomiast, że estradiol w stężeniach 10 i 100 nM powoduje zwiększenie ilości Glut-4 na błonie

komórkowej porównywalną dla tej uzyskanej dla jonów chromu podawanych w formie chlorku (około 20%). Opisane zmiany mają potwierdzenie w kinetyce transportu glukozy pod wpływem chlorku chromu (10 μ g Cr^{3+} /L) i estradiolu (10 nM) obserwowane w zróżnicowanych komórkach linii C2C12. W obu przypadkach obserwowano zwiększanie aktywności tego procesu [11]. Co ciekawe, efekt translokacji Glut-4 wywołany insuliną w przypadku estradiolu (10 i 100 nM) był taki sam jak w przypadku inkubacji z chlorkiem chloru (około 45%). W niniejszej pracy 48 h aktywacja $\text{ER}\beta$ genisteiną w stężeniu 0,1 μ M spowodowało zwiększenie ilości Glut-4 na błonie komórkowej o ponad 50% w porównaniu do kontroli. Podobne wyniki uzyskano dla pikolinianu chromu (10 μ g Cr^{3+} /L, 45%). Więcej podobieństw pomiędzy działaniem genisteiny w niskim stężeniu (0,1 μ M) a pikolinianem chromu dostarcza porównanie oddziaływania obu związków na stymulację insuliną. W obu przypadkach nie zauważono efektu stymulacyjnego (ryc. 2 i 3). Zastosowanie wyższych stężeń genisteiny, spowodowało obniżenie ilości Glut-4 na błonie komórkowej, z jednoczesnym brakiem efektów wywołanych poprzez dodatkową stymulację insuliną (100 nM, 15 min.). Brak zmian w ilości Glut-4 na błonie komórkowej są zgodne z wynikami Smith i wsp., którzy wykazali podobne zależności w hodowlach adipocytów [25]. Potwierdzają one również obserwacje związane z kinetyką transportu glukozy do komórek, która pod wpływem suplementacji genisteiną (10 μ M i powyżej) powoduje obniżenie wartości tego procesu w komórkach adipocytów i miocytów [11, 26].

Uzyskane dane potwierdzają wpływ jonów chromu na translokację białka transportującego glukozę (Glut-4). Porównanie efektów wywołanych przez chrom, estradiol i genisteinę nie wyklucza możliwości oddziaływania chromu poprzez receptory estrogenowe. Uzyskane wyniki nie dają w pełni odpowiedzi na pytanie, który z receptorów estrogenowych może być odpowiedzialny za efekt wywołany dodatkiem chromu, jednakże wydaje się, że oddziaływanie poprzez $\text{ER}\alpha$ jest bardziej prawdopodobne.

WNIOSKI

1. Chrom (10 μ g Cr^{3+} /L) podawany w postaci pikolinianu chromu wpływa na ilość Glut-4 w błonie komórkowej natomiast w postaci chlorku nie ma wpływu. Nie zauważono istotnego wpływu chromu na działanie insuliny.
2. Estradiol po 48 godz. inkubacji nie wpływa znacząco na poziom Glut-4 w błonie komórkowej, natomiast wraz ze wzrostem stężenia estradiolu zaobserwowano zwiększenie się ilości Glut-4 w błonie komórkowej. Nie zauważono istotnego

zwiększenia translokacji tego transportera na błonę komórkową po dodatkowej stymulacji insuliną.

3. Genisteina po 48 godzinach inkubacji w niskich dawkach (0,1 μM) zwiększała ilość Glut-4 w błonie komórkowej natomiast w wyższych (1 i 50 μM) nie miała wpływu. Genisteina we

wszystkich stężeniach znosiła stymulacyjne działanie insuliny na przemieszczenie się białka Glut-4 z cytoplazmy na błonę komórkową.

Praca została wykonana w ramach grantu MNiSW Nr 2PO6K00930.

Piśmiennictwo / References

1. McCarthy AM, Elmendorf JS. GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res* 2007, 125: 373-388.
2. Xiong W, et al. GLUT4 is sorted to vesicles whose accumulation beneath and insertion into the plasma membrane are differentially regulated by insulin and selectively affected by insulin resistance. *Mol Biol Cell* 2010, 21(8): 1375-86.
3. Kim KW. Islet transplantation: a realistic alternative for the treatment of insulindeficient diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2004, 66: 11-17.
4. Kuryl T, et al. Chromium(III) propionate and dietary fructans supplementation stimulate erythrocyte glucose uptake and beta-oxidation in lymphocytes of rats. *Biol Trace Elem Res* 2006, 114(1-3): 237-48.
5. Smith KL, et al. Metabolism of dairy cows as affected by prepartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the periparturient period. *J Dairy Sci* 2008, 91: 2011-2020.
6. Sumner JM, Valdez F, McNamara JP. Effects of chromium propionate on response to an intravenous glucose tolerance test in growing Holstein heifers. *J Dairy Sci* 2007, 90: 3467-3474.
7. Woodworth JC, et al. Influence of dietary L-carnitine and chromium picolinate on blood hormones and metabolites of gestating sows fed one meal per day. *J Anim Sci* 2007, 85(10): 2524-37.
8. Martin MB, et al. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinol* 2003, 144: 2425-2436.
9. Snochowski M, Romanowicz K. The use of estrogen receptor for evaluation of phytoestrogens activities in mammals. *Pol J Food Nutr Sci* 2003, 51(12/53): 175-187.
10. Lewicki S i wsp. Wpływ chromu (III) na metabolizm kwasów tłuszczowych oraz ekspresję genów szlaku insulinowego w komórkach mięśniowych myszy linii C2C12. *Żywn Nauk Technol Jakość* 2009, 4(65): 183-194.
11. Lewicki S i wsp. Wpływ chromu (III), estradiolu i genisteiny na aktywność transportu glukozy w komórkach mięśniowych myszy. *Probl Hig Epidemiol* 2011, 92(4): 908-911.
12. Kuryl T, Debski B, Martinik K. The effect of microelements supplementation on beta-oxidation activity in healthy and type 1 diabetic rats. *Centr Eur J Publ Health* 2008, 16(4): 205-208.
13. Komorowski JR, et al. Chromium picolinate modulates serotonergic properties and carbohydrate metabolism in a rat model of diabetes. *Biol Trace Elem Res* 2012, 149(1): 50-6.
14. Racek J, et al. Influence of chromium-enriched yeast on blood glucose and insulin variables, blood lipids, and markers of oxidative stress in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res* 2006, 109: 215-230.
15. Sharma S, et al. Beneficial effect of chromium supplementation on glucose, HbA1C and lipid variables in individuals with newly onset type-2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol* 2011, 25: 149-153.
16. Cefalu WT, et al. Characterization of the metabolic and physiologic response to chromium supplementation in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2010, 59: 755-762.
17. Balamurugan K, et al. Chromium III induced apoptosis of lymphocytes: Death decision by ROS and Src-family tyrosine kinases. *Free Radic Biol Med* 2002, 33: 1622-1640.
18. Raja NS, et al. Interaction of chromium (III) complexes with model lipid bilayers: Implications on cellular uptake. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1808(1): 332-340.
19. Chen G, et al. Chromium activates GLUT4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 2006, 20: 857-870.
20. Wang YQ, Yao MH. Effects of chromium picolinate on glucose uptake in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes involve activation of p38 MAPK. *J Nutr Biochem* 2009, 20(12): 982-91.
21. Qiao W, et al. Chromium improves glucose uptake and metabolism through upregulating the mRNA levels of IR, GLUT4, GS, and UCP3 in skeletal muscle cells. *Biol Trace Elem Res* 2009, 131(2): 133-42.
22. Barros RP, et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103: 1605-1608.
23. Barros RP, et al. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, 297: E124-E133.
24. Rüegg J, et al. Epigenetic regulation of glucose transporter 4 by estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 2011, 25(12): 2017-28.
25. Smith RM, et al. Genistein inhibits insulin-stimulated glucose transport and decreases immunocytochemical labeling of GLUT4 carboxyl-terminus without affecting translocation of GLUT4 in isolated rat adipocytes: additional evidence of GLUT4 activation by insulin. *Arch Biochem Biophys* 1993, 300: 238-246.
26. Bazuine M, van den Broek PJ, Maassen JA. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 326: 511-514.