



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Mgr farm. Agnieszka Stelmaszyk

**WPLYW DAPAGLIFLOZYN
NA WYBRANE ASPEKTY PATOMECHANIZMU
PRZEWLEKLYCH POWIKLAŃ CUKRZYCY**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor:
dr hab. n. med. Marzena Dworacka
prof. UM

Promotor pomocniczy:
dr n. farm. Anna Wesołowska

Katedra i Zakład Farmakologii

Poznań 2018

SŁOWA KLUCZOWE

Cukrzyca, powikłania cukrzycy, eksperymentalne modele zwierzęce, dapagliflozyna

Diabetes Mellitus, Diabetic Complications, Experimental Animal Models, Dapagliflozin

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania
składam całej Rodzinie,
a zwłaszcza Bartoszowi,
za wyrozumiałość i wsparcie

PODZIĘKOWANIA

Pani Profesor Marzenie Dworackiej

dziękuję

za opiekę merytoryczną,

wskazówki i sugestie

Dr n. farm. Annie Wesołowskiej

dziękuję

za cierpliwość i chęć pomocy

w każdych okolicznościach

Dziękuję także wszystkim pracownikom

Katedry i Zakładu Farmakologii,

a w szczególności Panu Andrzejowi Kobzdzie

i Pani Magister Joannie Domagale

za pomoc w trakcie badań doświadczalnych

Składam podziękowania

Panu Profesorowi Pawłowi Jagodzińskiemu

i Panu Magistrowi Bartoszowi Fryczowi

za umożliwienie i pomoc w przeprowadzeniu

badań metodami biologii molekularnej

SPIS TREŚCI

I. Część teoretyczna	1
I.1. Wstęp.....	1
I.2. Epidemiologia cukrzycy	2
I.3. Najczęstsze przewlekłe powikłania cukrzycy typu 2	2
I.4. Patogeneza miażdżycy ze szczególnym uwzględnieniem wpływu cukrzycy typu 2.....	4
I.5. Dapagliflozyna	8
I.5.1. Charakterystyka farmakologiczna	8
I.5.2. Kotransporter sodowo-glukozowy 2 jako punkt uchwytu dla dapagliflozyny.....	9
I.5.3 Wpływ dapagliflozyny na przebieg cukrzycy i jej powikłań	11
I.6. Zjawisko insulinooporności obwodowej.....	13
I.7. Wykładniki wczesnej aterogenezy i rozwoju makroangiopatii	14
I.7.1. Czynniki angiogenezy jako element patogenezy miażdżycy	14
I.7.2. Niektóre wskaźniki wzrostowe jako wykładniki zmian w układzie sercowo-naczyniowym.....	19
I.7.3. Wybrane regulatory epigenetyczne związane z rozwojem miażdżycy i insulinooporności obwodowej.....	21
I.7.4. Odsetek krążących komórek śródbłonka i krążących progenitorowych komórek śródbłonka jako wykładnik stanu śródbłonka naczyniowego	24
II. Cel.....	26
III. Część doświadczalna	27
III.1. Przebieg doświadczeń na zwierzętach	27
III.1.1. Zwierzęta doświadczalne	27
III.1.2. Indukcja modelu cukrzycy typu 2	27
III.1.3. Eksperyment główny	28
III. 2. Metodyka badań	30
III.2.1. Oznaczanie glikemii	30
III.2.2. Oznaczanie stężenia hemoglobiny glikowanej HbA _{1c} w krwi pełnej	30

III.2.3. Oznaczanie stężenia insuliny w surowicy	30
III.2.4. Oznaczanie stężenia peptydu C w surowicy	33
III.2.5. Oznaczanie stężenia VEGF w surowicy	34
III.2.6. Oznaczanie stężenia TGF- β 1 w surowicy	35
III.2.7. Oznaczanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF, VEGF-R1 i VEGF-R2 oraz TGF- β 1 w tkankach.....	37
III.2.8. Oznaczanie ekspresji białek sirtuiny 1 i kotransportera sodowo-glukozowego w tkankach.....	39
III.2.9. Ocena dystrybucji krążących komórek śródbłonka i krążących komórek progenitorowych śródbłonka	40
III.3. Materiały	41
III.3.1. Odczynniki zastosowane w doświadczeniu głównym	41
III.3.2. Pasze	42
III.4. Statystyczna ocena wyników	43
IV. Wyniki	44
IV.1. Charakterystyka ogólna badanych grup.....	44
IV.2. Stężenie VEGF w surowicy oraz ekspresja mRNA dla czynników angiogennych związanych z VEGF w poszczególnych grupach	47
IV.3. Stężenie TGF- β 1 w surowicy oraz ekspresja mRNA dla TGF- β 1 w tkankach w poszczególnych grupach	54
IV.4. Ekspresja sirtuiny 1 w tkankach w poszczególnych grupach	57
IV.5. Dystrybucja krążących komórek śródbłonka i krążących progenitorowych komórek śródbłonka we krwi w poszczególnych grupach.....	59
IV.6. Związek pomiędzy wyrównaniem metabolicznym cukrzycy, czynnością komórek β wysp trzustki i nasileniem insulinoporności obwodowej a ekspresją badanych czynników związanych z patogenezą przewlekłych powikłań cukrzycy	65
IV.7. Ekspresja kotransportera SGLT2 w różnych tkankach	66
V. Dyskusja i omówienie wyników	69
VI. Wnioski	80
VII. Streszczenie	81

VIII. Summary	84
Bibliografia	86
Wykaz skrótów	98
Wykaz rycin.....	99
Wykaz tabel	100
Załączniki	101

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Przedmiotem niniejszej rozprawy jest wpływ dapagliflozyny – leku przeciwhiperglikemicznego stosunkowo niedawno zarejestrowanego do terapii cukrzycy typu 2 – na wybrane czynniki sprzyjające rozwojowi przewlekłych powikłań cukrzycy, szczególnie powikłań o charakterze aterosogenezy i angiopatii. Badanie patomechanizmu tych zmian pozwoli na pełniejsze poznanie biochemicznego podłoża działania dapagliflozyny na układ sercowo-naczyniowy na wczesnych etapach rozwoju miażdżycy.

I.1. WSTĘP

Cukrzyca to powszechne schorzenie, związane z wieloma odległymi powikłaniami, obejmującymi nawet trwale kalectwo. Odnotowuje się rosnącą liczbę zachorowań na cukrzycę typu 2, a możliwości terapeutyczne są nadal ograniczone. Cukrzyca typu 2 jest zatem problemem społecznym, a złożone podłoże choroby sprawia, że preferowane są leki o działaniu plejotropowym. Pożądane jest nie tylko wyrównanie glikemii u pacjentów, ale i efekty chroniące przed rozwojem powikłań.

Zmiany o charakterze mikroangiopatii mogą prowadzić do utraty wzroku, niewydolności nerek, neuropatii i kardiomiopatii cukrzycowej [1]. Jednakże najważniejszymi z przewlekłych powikłań, będących przyczyną zgonów pacjentów z cukrzycą typu 2, są powikłania ze strony układu sercowo-naczyniowego o charakterze makroangiopatii. Mogą się one manifestować jako choroba niedokrwienna serca, zawał serca, miażdżycy naczyń obwodowych, a także choroby naczyniowe mózgu [2].

Rekomendacja dotycząca stosowania nowych leków do leczenia cukrzycy typu 2 powinna opierać się nie tylko na wynikach badań przedklinicznych, oceniających mechanizmy i skuteczność działania leku, ale także na rezultatach badań klinicznych, których celem jest m. in. ocena wpływu leku na przeżywalność leczonych chorych. Dapagliflozyna jest lekiem stosunkowo nowym, którego wpływ na przewlekłe powikłania cukrzycy typu 2 jest jeszcze nie w pełni poznany. Trwają badania kliniczno-epidemiologiczne nad wpływem dapagliflozyny na punkty końcowe takie jak: zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych, zawał mięśnia sercowego, udar niedokrwienny, hospitalizacja z powodu niewydolności serca, wystąpienie niewydolności nerek bądź zgon z jej powodu [3].

I.2. EPIDEMIOLOGIA CUKRZYCY

Nie ulega wątpliwości, że cukrzyca to rosnący problem społeczny, a wzrost liczby zachorowań pozostaje – jak dotychczas – poza kontrolą [4,5]. Cukrzyca typu 2 jest chorobą przewlekłą, wyniszczającą, prowadzącą do groźnych komplikacji i kosztowną w leczeniu. Jest postrzegana jako pierwsza niezakaźna choroba o charakterze epidemii [4]. Jest też jedną z dziesięciu chorób, będących najczęstszymi przyczynami niepełnosprawności [4] i jedną z czterech chorób niezakaźnych odpowiedzialnych za ponad połowę zgonów na świecie [5]. Cukrzycę typu 2 zdiagnozowano u niemal 400 milionów pacjentów na całym świecie, a do roku 2035 liczba ta może wzrosnąć do prawie 600 milionów [4].

Zachorowalność na cukrzycę osób dorosłych w Polsce wynosi 8% [6]. Oszacowano, że w roku 2013 liczba Polaków chorych na cukrzycę wynosiła 2,7 miliona, a co czwarta z tych osób nie była świadoma choroby [7]. Około 90% osób z cukrzycą stanowią chorzy na cukrzycę typu 2 [6].

Umieralność na cukrzycę w Polsce wynosiła:

- w roku 2000: 1,4;
- w roku 2010: 1,7;
- w roku 2015: 2,1 osób na 10 tysięcy ludności [8].

Ze względu na częste współwystępowanie zaburzeń gospodarki węglowodanowej z otyłością, schorzeniami układu sercowo-naczyniowego i niewydolnością nerek [9], poszukuje się leków mających wpływ nie tylko na korektę hiperglikemii, ale także wykazujących działania plejotropowe, które mogłyby zahamować lub spowolnić rozwój powikłań cukrzycy typu 2. Aktualne wyzwania dla farmakoterapii to zmniejszenie ilości zawałów, udarów, epizodów hipoglikemii. Odpowiedzią na te wyzwania mogą być nowe leki przeciwhiperglikemiczne, między innymi inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego 2 (*sodium-glucose cotransporter 2* – SGLT2), do których należy dapagliflozyna.

I.3. NAJCZĘSTSZE PRZEWLEKŁE POWIKŁANIA CUKRZYCY TYPU 2

Najistotniejsze przewlekłe powikłania cukrzycy typu 2 dotyczą układu sercowo-naczyniowego. W zapobieganiu tym powikłaniom w przebiegu cukrzycy typu 2 istotna jest ścisła kontrola glikemii. Niekorzystna jest zarówno hipoglikemia, jak również nawet krótkotrwałe epizody hiperglikemii.

W warunkach hipoglikemii zwiększa się uwalnianie cytokin prozapalnych, aktywacja płytek krwi i neutrofilii, a także uwalnianie katecholamin. W odniesieniu do układu sercowo-naczyniowego,

zmiany te mogą stanowić czynnik spustowy zaburzeń rytmu serca i być powodem zwiększonego zapotrzebowania mięśnia sercowego na tlen [10].

Natomiast hiperglikemia, nawet krótkotrwała, wiąże się ze zwiększoną glukotoksycznością, czyli stymulacją komórek β wysp trzustki [2]. Następca hiperinsulinemia pozwala przynajmniej czasowo przewyciężyć insulinooporność obwodową, ale u osób otyłych z cukrzycą, insulina może być jednym z czynników nasilających dysfunkcję śródbłonna naczyń [11].

U pacjentów otyłych, w odpowiedzi na insulinę przeważa szlak kinazy MAP (*mitogen-activated protein kinase* – MAPK), powodujący zwiększenie produkcji entoteliny 1, co prowadzi do skurczu naczyń, zwiększenia stresu oksydacyjnego i wzmożonej proliferacji komórek śródbłonna [12]. Ponadto, hiperinsulinemia może być przyczyną nasilonej resorpcji zwrotnej sodu w nerkach. Retencja sodu i wody zwiększa ciśnienie tętnicze krwi i może prowadzić do dalszego uszkodzenia naczyń krwionośnych [1]. W związku z tym można jednoznacznie stwierdzić, że stan hiperinsulinemii jest związany ze zwiększonym ryzykiem schorzeń układu sercowo-naczyniowego [11,12].

W zakresie funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego, negatywny wpływ hiperglikemii przejawia się jako trwałe zmiany zachodzące w naczyniach. Zależnie od średnicy naczyń krwionośnych, powikłania cukrzycy typu 2 klasyfikuje się jako zmiany o charakterze mikro- lub makroangiopatii [2]. Retinopatia, nefropatia, neuropatia oraz kardiomiopatia cukrzycowa są przede wszystkim wynikiem zmian o charakterze mikroangiopatii, czyli zmian zachodzących w naczyniach o średnicy nieprzekraczającej 100 μm [1,2]. Makroangiopatie dotyczą naczyń o średnicy co najmniej 100 μm . Zmiany miażdżycowe, występujące u chorych na cukrzycę typu 2, występujące w naczyniach o większej średnicy są pod względem histopatologicznym tożsame z makroangiopatią. Klinicznymi przejawami makroangiopatii są: choroba niedokrwienna serca, choroby naczyniowe mózgu, choroby tętnic obwodowych, a także nadciśnienie tętnicze [2,13].

Schorzenia rozwijające się na podłożu makroangiopatii stanowią najczęstszy rodzaj powikłań u chorych na cukrzycę typu 2, jak również są najczęstszą przyczyną zgonów [13]. Spośród uprzednio wspomnianych, sama choroba wieńcowa jest przyczyną zgonów nawet 50% osób z cukrzycą. Choroba niedokrwienna serca jest związana z wywołanym miażdżycą zwężeniem naczyń wieńcowych i jej istotę stanowią zaburzenia ukrwienia mięśnia sercowego. Progresa choroby niedokrwiennej serca może być związana z rozwojem niewydolności serca, zaburzeń rytmu serca lub ostrych zespołów wieńcowych [2]. Choroba niedokrwienna serca występuje w postaci jawnej klinicznie u około połowy pacjentów z cukrzycą typu 2 [13]. Do częstego współwystępowania cukrzycy, miażdżycy i choroby naczyń wieńcowych przyczynia się nasilona insulinooporność obwodowa, często współwystępująca z hiperinsulinemią. Insulinooporność jest częstym składnikiem zespołu metabolicznego, w którym obserwuje się także otyłość, dyslipidemię, nadciśnienie i nadkrzepliwość. Wszystkie te

czynniki wpływają na zwiększenie ryzyka sercowo-naczyniowego, ale zmniejszona insulinowrażliwość jest istotnym, niezależnym predyktorem wystąpienia choroby naczyń wieńcowych [14]. Ze względu wspólne podłoże cukrzycy i choroby wieńcowej, jakim jest insulinooporność obwodowa, przyjmuje się, że choroby te w równym stopniu wpływają na zwiększanie ryzyka wystąpienia schorzeń układu sercowo-naczyniowego i traktuje je jako wzajemny ekwiwalent [15].

Makroangiopatia naczyń kończyn dolnych jest trzecim co do częstości (po nadciśnieniu tętniczym i chorobie wieńcowej) typem powikłania, występującym u chorych na cukrzycę typu 2. Makroangiopatia naczyń kończyn dolnych przejawia się chromaniem przestankowym, a w skrajnych przypadkach ostrym niedokrwieniem kończyny i amputacją. Częstość występowania choroby tętnic obwodowych u osób z cukrzycą, oceniana na podstawie zaniku tętna na tętnicach grzbietowych stopy, wynosi około 15% [2,13].

Choroba naczyń mózgowych, która może prowadzić do udaru (najczęściej niedokrwiennego) stanowi także bardzo poważny problem w przebiegu cukrzycy typu 2. Częstość występowania udarów wśród pacjentów z cukrzycą ocenia się na od 2% do ponad 8%, zależnie od czasu trwania cukrzycy [2,13]. Udary są przyczyną zgonu co siódmego pacjenta chorego na cukrzycę [13].

I.4. PATOGENEZA MIAŻDŻYCY ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM WPLYWU CUKRZYCY TYPU 2

Miażdżyca może być traktowana jako przewlekła choroba zapalna tętnic, w przebiegu której w ścianie naczyń powstają nacieki zapalne, dochodzi do akumulacji lipidów i miejscowego zwłóknienia. Procesy miażdżycowe mogą zostać zapoczątkowane m.in. przez utlenione cząsteczki cholesterolu frakcji LDL, ale także przez stres oksydacyjny i zaawansowane produkty glikacji białek [16].

Najwcześniejszym z szeregu zjawisk, prowadzących do dysfunkcji śródbłonka jest adhezja jednojądrzastych leukocytów do śródbłonka, w którym zachodzi wzmożona ekspresja naczyniowej cząsteczki przylegania komórkowego typu 1 (*vascular cell adhesion molecule 1* – VCAM1). Leukocyty wnikają do ściany naczynia pod wpływem chemokin produkowanych przez komórki śródbłonka i mięśni gładkich. W ścianie naczynia, pod wpływem czynnika stymulującego kolonie monocytów, jednojądrzaste leukocyty cechują się wydłużonym przeżywaniem, podlegają podziałom, przekształcają się w makrofagi, a następnie, na skutek fagocytozy LDL, w komórki piankowe [16].

Obecność komórek piankowych decyduje o zaklasyfikowaniu wczesnej zmiany miażdżycowej do typu I wg wytycznych Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego (*American Heart Association* – AHA). Kolejny, II etap formacji zmiany miażdżycowej charakteryzuje się akumulacją lipidów w komórkach mięśni gładkich – tego typu zmiany określane są jako nacieczenia tłuszczowe

(ang. *fatty streaks*). Ostatecznie dochodzi do nagromadzenia lipidów także w macierzy pozakomórkowej, a zmiany o takim charakterze zalicza się do III typu wg AHA [17].

Typ IV charakteryzuje się obecnością lipidowego rdzenia, wyraźnie odgraniczzonego od sąsiadujących tkanek (rycina 1). Zmianę miażdżycową typu IV klasyfikuje się jako zaawansowaną. Zwykle blaszki są na tyle duże, że stają się widoczne gołym okiem w przekroju poprzecznym. Na tym etapie, w zmianie obecne są makrofagi, limfocyty i mastocyty. Rdzeń lipidowy jest otoczony przez naczynia kapilarne, a od strony światła tętnicy pokrywa go warstwa mięśni gładkich i macierz proteoglikanowa. Zapoczątkowanie włóknienia czapeczki pokrywającej lipidowy rdzeń przyczynia się do wyróżnienia kolejnego – V – typu blaszek miażdżycowych. Komplikacje polegające na uszkodzeniu włóknistej pokrywy blaszki, krwotoku, bądź lokalnym wykrzepianiu charakteryzują zmiany o VI stopniu zaawansowania wg AHA (rycina 2) [17].



Rycina 1. Mikrofotografia przekroju blaszki miażdżycowej typu IV, zlokalizowanej w tętnicy wieńcowej [17]

A – *tunica adventitia* – przydanka

M – *tunica media* – błona środkowa

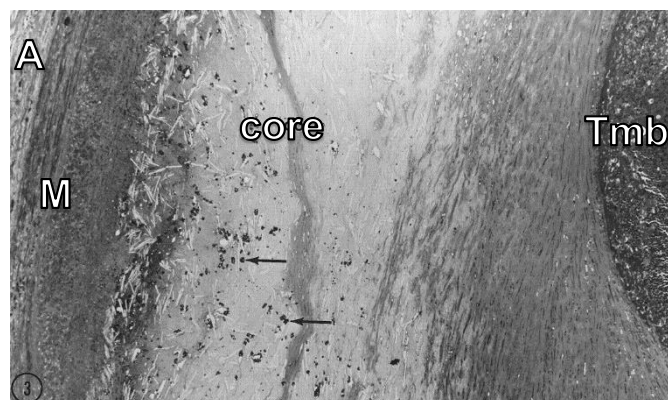
core – rdzeń lipidowy z widocznymi kryształami cholesterolu

fc – *foam cells* – komórki piankowate

pgc – *proteoglycan layer* – warstwa proteoglikanowa

ciemno wybarwione punkty wskazane strzałkami – makrofagi

e – *endothelium* – śródbłonek



Rycina 2. Mikrofotografia przekroju zmiany miażdżycowej typu VI, zlokalizowanej w tętnicy wieńcowej [17]

A – *tunica adventitia* – przydanka

M – *tunica media* – błona środkowa

core – rdzeń lipidowy

ciemno wybarwione punkty wskazane strzałkami – złogi wapniowe

Tmb – *thrombus* – skrzeplina

W powstawaniu zmian miażdżycowych biorą udział: komórki śródbłonna, mięśnie gładkie ściany naczyń krwionośnych oraz składniki krwi – płytki i czynniki krzepnięcia. Wszystkie te elementy w przebiegu cukrzycy typu 2 podlegają niekorzystnym zmianom, sprzyjającym powstawaniu i progresji blaszek miażdżycowych [18].

U pacjentów z cukrzycą typu 2, relaksacja mięśniówki naczyń pod wpływem tlenku azotu jest zaburzona. Hiperglikemia i wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych blokują wytwarzanie tlenku azotu w śródbłonku, a jednocześnie sprzyjają wytwarzaniu wolnych rodników tlenowych, które nasilają blokadę enzymu – syntazy tlenku azotu – m.in. poprzez utlenianie jego kofaktora. Wolne rodniki reagują także z samym tlenkiem azotu, przekształcając go do nadtlenoazotynu, który zmniejsza syntezę prostacyklin o działaniu wazodylatacyjnym i przeciwzakrzepowym [18].

W cukrzycy zwiększa się ponadto ekspresja czynników o działaniu promującym skurcz naczyń – najważniejszym z nich jest endotelina 1, która wpływa także na wzrost retencji sodu i wody, co powoduje wzrost ciśnienia tętniczego i może prowadzić do dalszego uszkodzenia ściany naczyń [11,18].

Dysfunkcja śródbłonna, niedobór tlenku azotu, stres mechaniczny i oksydacyjny oraz dyslipidemia zwiększają aktywację czynnika jądrowego kappa beta (*nuclear factor kappa beta* – NFκβ), ten zaś powoduje wzrost przylegania leukocytów do śródbłonna i ich chemoatrakcję – czyli ułatwia zapoczątkowanie procesu miażdżycowego. W zaawansowanych zmianach natomiast, współistniejące

zaburzenia gospodarki węglowodanowej sprzyjają pękaniu pokrywy blaszek przez zwiększenie aktywności metaloproteinaz macierzy, rozkładających kolagen [18].

Czynnik jądrowy NF κ B oddziałuje także na komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, powodując wzmożoną produkcję wolnych rodników. Ponadto, wykazano, że komórki mięśni gładkich pochodzące od pacjentów z cukrzycą typu 2 wykazują nasiloną migrację w stosunku do komórek pobranych od osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Migracja komórek mięśni gładkich do pokrywy blaszki miażdżycowej jest wyznacznikiem zaawansowania zmian zaliczanych do typu IV. Niestety, hiperglikemia sprzyja także apoptozie mięśni gładkich, znajdujących się w pobliżu światła tętnicy, co powoduje destabilizację blaszki i jej pęknięcie [17,18]. Mięśnie gładkie w zmianie miażdżycowej są odpowiedzialne zarówno za syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej, czyli wzrost rozmiarów blaszki, jak i za produkcję degradujących macierz metaloproteinaz, co destabilizuje włóknistą pokrywę zmiany miażdżycowej [16].

Wreszcie, w cukrzycy obserwuje się zwiększoną krzepliwość. Możliwym wytłumaczeniem jest aktywacja kinazy białkowej C, zaburzenie syntezy tlenu azotu i nasilona produkcja wolnych rodników w płytkach krwi w warunkach hiperglikemii. Ponadto, płytki krwi pochodzące od osób z cukrzycą wykazują zwiększoną ekspresję glikoprotein, umożliwiających adhezję płytek do fibryny i czynnika von Willebrandta, a także zaburzoną homeostazę wapnia – nieorganicznego czynnika krzepnięcia. Nadmierna krzepliwość może prowadzić do powstania skomplikowanych zmian typu VI [17,18]. Warto również nadmienić, że w blaszkach miażdżycowych stwierdzono także obecność białek produkowanych przez płytki krwi. Płytki wchodzi w interakcję ze ścianą naczynia, pozostając w jej bezpośredniej bliskości (tocząc się po niej) przy udziale selektyny P, produkowanej przez śródbłonek. Wydzielając serotoninę i czynniki wzrostowe, płytki powodują wzmożoną proliferację mięśni gładkich w zmianach miażdżycowych [16].

Konsekwencją miażdżycy i nadkrzepliwości jest aterotromboza, prowadząca do ostrego zespołu wieńcowego, tj. niestabilnej choroby wieńcowej bądź zawału mięśnia sercowego [16]. Ze względu na około 50% śmiertelność pacjentów z cukrzycą typu 2 z powodu choroby wieńcowej i jej następstw [2], należy jeszcze raz podkreślić rolę profilaktyki miażdżycy u pacjentów z cukrzycą.

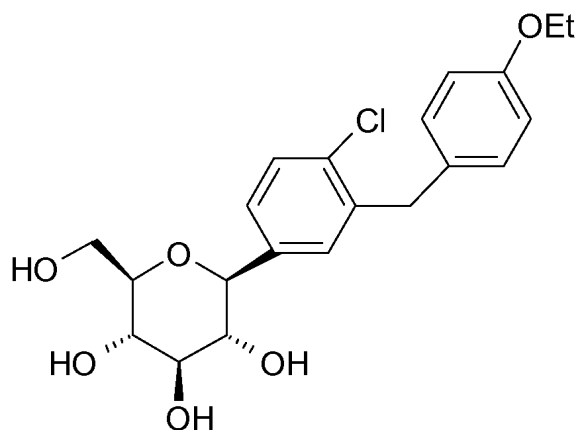
I.5. DAPAGLIFLOZYNA

I.5.1. CHARAKTERYSTYKA FARMAKOLOGICZNA

Dapagliflozyna – zgodnie z nazewnictwem zalecanym przez IUPAC: (2S,3R,4R,5S,6R)-2-[4-chloro-3-[(4-etoksyfenylo)metylo]fenylo]-6-(hydroksymetylo)oksano-3,4,5-triol – jest C-glikozydem. Struktura dapagliflozyny jest oparta na budowie związku występującego naturalnie – florydzy, znanej od dawna ze swojej zdolności do wywoływania glikozurii, a przez to obniżania glikemii w zwierzęcych modelach cukrzycy [19].

Właściwości florydzy wynikają z neselektywnego hamowania kotransporterów sodowo-glukozowych 1 i 2 (SGLT1 i SGLT2) [19]. Dapagliflozyna natomiast jest silnym, selektywnym inhibitorem SGLT2 – pierwszym związkiem spośród wielu pochodnych florydzy, który został zatwierdzony do leczenia cukrzycy typu 2 u ludzi. Jej cząsteczka stała się podstawą do modyfikacji i stworzenia nowych leków przeciwcukrzycowych: kanagliflozyny, empagliflozyny, ipragliflozyny oraz tofogliflozyny. Tym samym, dapagliflozyna stała się pierwszym lekiem w swojej klasie [19].

Budowę cząsteczki dapagliflozyny przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Wzór strukturalny dapagliflozyny [20]

Wskazania do stosowania dapagliflozyny, ujęte w charakterystyce produktu leczniczego, obejmują terapię cukrzycy typu 2 u osób dorosłych, u których kontrola glikemii nie jest zadowalająca pomimo wdrożenia diety, ćwiczeń fizycznych bądź leczenia farmakologicznego. Dapagliflozyna może być stosowana w monoterapii u pacjentów, którzy nie tolerują metforminy, bądź w leczeniu skojarzonym [21]. Niezależnie od charakterystyki produktu leczniczego, bieżące wytyczne Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego umiejscawiają dapagliflozynę wśród leków pierwszego wyboru dla niektórych pacjentów z cukrzycą typu 2 [22].

Dapagliflozynę stosuje się doustnie, raz na dobę, w trakcie posiłku lub pomiędzy posiłkami, w początkowej dawce 10 mg [21]. W badaniach klinicznych oceniano wpływ dawki 2,5 – 10 mg [23–29], a w badaniach eksperymentalnych – 1 mg/kg m.c. zwierząt [30,31].

Lek jest szybko wchłaniany, maksymalne stężenie we krwi obserwuje się w ciągu 2 godzin po podaniu na czczo. Biodostępność wynosi około 80%. Dapagliflozyna w około 90% wiąże się z białkami osocza. Objętość dystrybucji wynosi około 120 l, okres półtrwania w osoczu około 13 godzin [21].

Badania dotyczące rozmieszczenia dapagliflozyny w tkankach wykazały, że około 37% dawki przenika do ludzkich krwinek czerwonych w czasie dwugodzinnej inkubacji *ex vivo*. W badaniach *in vivo* na szczurach, stwierdzono najwyższe względne stężenia dapagliflozyny w jelicie i korze nerkowej (w odniesieniu do osocza) [32]. Kilkakrotnie wyższe stężenie niż w osoczu odnotowano także w wątrobie [33]. Dapagliflozyna w niewielkim stopniu przekraczała barierę krew-mózg, a najniższe stężenie osiągała w soczewce oka i kościach [32].

Dapagliflozyna podlega intensywnemu metabolizmowi, głównie w wątrobie i nerkach, z udziałem urydyno-5'-difosfoglukuronylotransferazy 1A9. Produktem końcowym jest nieaktywny metabolit: 3-O-glukuronid dapagliflozyny. Niewielki odsetek podanej dawki leku jest wydalany z kałem i z moczem w postaci niezmienionej [21].

Oceniając właściwości farmakokinetyczne dapagliflozyny podkreślić należy jej znaczną biodostępność, a także brak wpływu na jej metabolizm czynników modyfikujących aktywność CYP450. Oznacza to znaczne ograniczenie ryzyka interakcji pomiędzy dapagliflozyną a innymi lekami, stosowanymi przez chorych na cukrzycę typu 2.

I.5.2. KOTRANSPORTER SODOWO-GLUKOZOWY 2 JAKO PUNKT UCHWYTU DLA DAPAGLIFLOZYNY

Właściwości SGLT2 i SGLT1

SGLT2 jest zlokalizowany w kanaliku proksymalnym nerki, a jego rolą jest zwrotna resorbcja glukozy i kationów sodowych z moczu. Całkowitą masę glukozy, jaką nerki filtrują w ciągu dnia, ocenia się na około 180 g, z czego ponad 90% podlega aktywnej resorbcji zwrotnej z udziałem SGLT2 [34,35]. Pozostałe 10% jest wychwytywane w dalszej części kanalika proksymalnego nefronu przez kotransportery SGLT1 [36].

Kotransportery SGLT1 i SGLT2 należą do rodziny ludzkich białek transportowych typu SLC (*solute carrier*). Są kodowane odpowiednio przez gen SLC5A1 i SLC5A2. Wszystkie geny kodujące

SGLT(1-6) zawierają po 15 egzonów, kodujących białka o masie 60-80 kDa, składające się z 580-718 aminokwasów [37].

Wszystkie białka transportowe zaliczające się do SGLT cechują się obecnością co najmniej 13 helis transbłonowych i zdolnością transportowania różnych cząsteczek organicznych wraz z jonami nieorganicznymi przez błonę komórkową. W przypadku SGLT1 i SGLT2, domen transbłonowych jest po 14, przypuszczalnie mają one strukturę α -helisy. Struktura SGLT1 prawdopodobnie jest stabilizowana przez mostki disiarczkowe łączące reszty cysteinowe znajdujące się na zewnątrz komórki. Budowa SGLT1 i SGLT2 jest bardzo zbliżona [38].

Ludzki SGLT2 jest białkiem transbłonowym, składającym się z 672 aminokwasów, którego N-koniec i C-koniec są zlokalizowane poza komórką [39]. Początkowo został mylnie zaklasyfikowany jako kotransporter aminokwasowy, jednakże wykazuje znacznie większe powinowactwo do glukozy, niż do aminokwasów [38,39].

SGLT2 jest kotransporterem, który jednorazowo jest zdolny do przeniesienia jednej cząsteczki glukozy i jednego kationu sodowego przez błonę komórkową, w odróżnieniu od SGLT1, który jest transporterem przenoszącym dwa kationy sodowe na każdą cząsteczkę glukozy. W warunkach fizjologicznych, powinowactwo obydwu podtypów SGLT do glukozy jest zbliżone. Prędkość wychwytu glukozy przez SGLT2 zależy od obecności jonów sodowych, ale także napięcia po obu stronach błony komórkowej [34].

Przenoszenie kationów sodu zgodnie z gradientem ich stężeń z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy dostarcza energii wystarczającej do przeniesienia w tym samym kierunku cząsteczki glukozy. Jednakże utrzymanie stałego gradientu stężeń wymaga działalności Na^+/K^+ -ATPazy, która transportuje kationy sodu i potasu wbrew gradientowi stężeń, zużywając ATP – a zatem, funkcjonowanie kotransporterów SGLT także jest pośrednio zależne od ATP. Dla zachowania homeostazy wewnątrz komórki niezbędne jest również przeniesienie do jej wnętrza jednego anionu organicznego przypadającego na jeden kation sodowy. Wraz z rozpuszczalnymi substancjami, do wnętrza komórki przenika także woda [39].

SGLT1 zlokalizowany jest głównie w rąbku szczoteczkowym nabłonka jelitowego, gdzie odpowiada za wchłanianie glukozy z pokarmu; oraz w kanalikach nerkowych, gdzie odpowiada za resorpcję glukozy niewychwyconej przez SGLT2. SGLT1 wykryto także w śliniankach przyusznych i podżuchwowych oraz w sercu [39].

Ekspresję mRNA dla SGLT2 stwierdzono w gruczołach mlekowych, wątrobie, płucach, jelicie, mięśniach szkieletowych i śledzionie, ale najintensywniej zachodzi ona w bliższej części kanalika proksymalnego nerki [39].

W warunkach fizjologicznych, stężenie glukozy w moczu pierwotnym zależy bezpośrednio od stężenia glukozy w osoczu, zatem wysokie wartości glikemii mogą spowodować przekroczenie zdolności kotransporterów do resorpcji zwrotnej glukozy (tzw. próg nerkowy). Klinicznie obserwuje się wówczas glukozurię. U pacjentów z cukrzycą typu 2 obserwuje się podwyższenie progu nerkowego w stosunku do osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej [35].

Zjawisko podwyższenia progu nerkowego dla glukozy prawdopodobnie wynika ze zwiększonej ekspresji SGLT2 u pacjentów z cukrzycą typu 2 [35]. W zwierzęcym modelu cukrzycy wykazano także zwiększenie ekspresji SGLT1 [36]. Nasiloną ekspresją obu podtypów kotransportera sodowo-glukozowego przyczynia się do bardziej efektywnej resorpcji glukozy z moczu i w efekcie nasilenia hiperglikemii w cukrzycy typu 2 [35,36].

Bezpośrednie skutki hamowania SGLT2

Zahamowanie czynności kotransportera SGLT2 skutkuje utratą glukozy z moczem, przy wartościach glikemii nie przekraczających progu nerkowego. Równocześnie dochodzi do utraty jonów sodowych z moczem w stosunku molowym 1:1 w odniesieniu do wydalanych cząsteczek glukozy. Glukozuria prowadzi do utraty części kalorii pochodzących z pożywienia, co sprzyja zmniejszeniu masy ciała pacjentów otrzymujących inhibitory SGLT2. Natomiast utrata jonów sodowych i wzmożona diureza są istotne dla redukcji ciśnienia tętniczego, jak również mogą mieć wpływ na wystąpienie działań niepożądanych SGLT2 pod postacią hipotensji i hiponatremii [40,41].

Zahamowanie SGLT2 powoduje stałą obecność glukozy w moczu, co zwiększa częstość infekcji układu moczowego. Wzmożona diureza prowadzi także do poliurii (wielomoczu) i pollakisurii (częstomoczu) [40].

Wskutek zablokowania kotransporterów SGLT2, dominującą rolę w resorpcji zwrotnej glukozy przejmują kotransportery SGLT1. Jednakże ich maksymalna wydajność pozwala na resorpcję co najwyżej 70% filtrowanej glukozy. Wykazano, że niektóre z inhibitorów SGLT2 (empagliflozyna) zmniejszają także ekspresję SGLT1, co stanowi dodatkowy mechanizm, redukujący efektywność resorpcji glukozy z moczu [36].

I.5.3 WPŁYW DAPAGLIFLOZYNY NA PRZEBIEG CUKRZYCY I JEJ POWIKŁAŃ

Korzystny wpływ dapagliflozyny w cukrzycy typu 2 przejawia się w różnorodny sposób:

- stosowanie dapagliflozyny redukuje glikemię na czczo oraz po posiłku lub po obciążeniu glukozą, nie zwiększając częstości występowania hipoglikemii [23–27,42];

- utrata glukozy z moczem powoduje redukcję stężenia hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} po 6 miesiącach o około 0,5% umożliwiając osiągnięcie celów terapeutycznych u tych pacjentów, u których kontrola glikemii była niewystarczająca pomimo stosowania innych leków przeciwcukrzycowych [40];
- utrata kalorii z moczem może wpłynąć na redukcję masy ciała w grupie pacjentów stosujących dapagliflozynę względem grupy otrzymującej *placebo* [40];
- stosowanie dapagliflozyny zwiększa insulinowrażliwość tkanek [26];
- inhibitory SGLT2 jako klasa leków mogą zmniejszać ryzyko sercowo-naczyniowe poprzez obniżenie ciśnienia tętniczego i zmniejszenie sztywności tętnic [43];
- dapagliflozyna zmniejsza nasilenie mikroalbuminurii, będącej czynnikiem ryzyka powikłań zarówno ze strony układu sercowo-naczyniowego, jak i nefropatii, a efekt ten jest istotny nawet po uwzględnieniu zmian stężenia HbA_{1c}, ciśnienia tętniczego krwi, masy ciała i oszacowanej szybkości filtracji kłębuszkowej [28];
- flozyny, czyli inhibitory SGLT2, jako klasa leków zmniejszają stężenie triglicerydów w osoczu, a zwiększają stężenie HDL. Niestety, jednocześnie obserwuje się także zwiększenie stężenia LDL, jednakże stosunek kardioprotekcyjnego HDL do aterogennego LDL pozostaje niezmienny [29,43].

Na podstawie wyników przeprowadzonych do tej pory badań klinicznych, można stwierdzić, że dapagliflozyna dzięki swojemu unikalnemu mechanizmowi działania przyczynia się do zmniejszenia ryzyka sercowo-naczyniowego wśród pacjentów z cukrzycą typu 2. Bezpieczeństwo i skuteczność stosowania dapagliflozyny wykazano u pacjentów z nadciśnieniem, chorobą wieńcową, po udarze, bądź ze schorzeniami tętnic obwodowych [25]. W chwili obecnej nadal oczekujemy na końcowe wyniki badań nad wpływem dapagliflozyny na przeżywalność pacjentów z niewydolnością serca [43] i na występowanie zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych [3]. Na podstawie wyników już zakończonych badań klinicznych, dotyczących empagliflozyny (EMPA-REG OUTCOME) [44], kanagliflozyny (CANVAS) [45], oraz kanagliflozyny, dapagliflozyny i empagliflozyny (CVD-REAL) [46] można sądzić, że korzystne dla układu sercowo-naczyniowego efekty obejmują wszystkie leki z tej klasy. Mechanizm ochronnego działania inhibitorów SGLT2 przypuszczalnie jest wielokierunkowy i może być związany zarówno z obniżeniem ciśnienia tętniczego i objętości krwi krążącej, jak również z efektami dotyczącymi metabolizmu, otyłości i zaopatrzenia organizmu w energię. Potencjalną rolę może odgrywać także działanie przeciwzapalne, zwiększenie produkcji tlenu azotu, oraz zwiększenie wydzielania glukagonu [47].

W przypadku samej dapagliflozyny, na szczególną uwagę zasługuje zdolność tej substancji do zmniejszenia dobowej zmienności glikemii, tj. różnicy między najniższą glikemią w ciągu dnia

(zwykle rano, na czczo) a najwyższą glikemią (zwykle poposiłkową). Duża zmienność glikemii wiąże się m.in. z nasileniem dysfunkcji śródbłonka naczyniowego [10] i neuropatią autonomiczną układu sercowo-naczyniowego [48], co może prowadzić do nietolerancji wysiłku fizycznego, bezobjawowego niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego [49]. Duże wahania dobowej glikemii zwiększają częstość zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z ostrym udarem niedokrwinnym [50], a także zwiększają śmiertelność pacjentów w dłuższym okresie obserwacji klinicznej [51]. W związku z powyższym, wyrównanie profilu dobowej glikemii u pacjentów otrzymujących dapagliflozynę może przyczyniać się do zwiększenia bezpieczeństwa sercowo-naczyniowego, a eliminacja epizodów hiperglikemii poposiłkowej może korzystnie modulować proces aterogenezy.

Jednakże działanie ochronne dapagliflozyny w zakresie zahamowania progresji aterogenezy najprawdopodobniej nie ogranicza się wyłącznie do efektu związanego z dobrą kontrolą glikemii. W zwierzęcym modelu cukrzycy typu 2 wykazano wpływ dapagliflozyny na redukcję nasilenia zmian miażdżycowych w ścianie aorty, przypuszczalnie poprzez zmniejszenie powstawania reaktywnych form tlenu, inhibicję inflamasomu NLRP3 (*nod-like receptor family pyrin domain containing 3*) i następczą inhibicję kaspazy 1 oraz zmniejszenie ekspresji IL-1 β i IL-18. Stwierdzono także, że w grupach zwierząt z indukowaną cukrzycą typu 2 oraz bez cukrzycy, otrzymujących dapagliflozynę, infiltracja makrofagów do ściany aorty jest mniejsza, a stabilność blaszek większa, niż w odpowiednich grupach kontrolnych bez dapagliflozyny [30].

I.6. ZJAWISKO INSULINOOPORNOŚCI OBWODOWEJ

Insulinooporność obwodowa to zmniejszona wrażliwość tkanki tłuszczowej i mięśni szkieletowych na działanie insuliny. Na wczesnym etapie rozwoju cukrzycy typu 2, insulinooporność obwodowa jest kompensowana zwiększeniem produkcją insuliny w trzustce. Zatem oznaczając stężenie insuliny w surowicy na czczo, można pośrednio ocenić nasilenie insulinooporności. Istnieje wiele matematycznych modeli służących do oceny nasilenia insulinooporności obwodowej, opierających się na stężeniu insuliny [52].

Najczęściej insulinooporność obwodową ocenia się na podstawie wskaźnika HOMA_{IR} (*homeostatic model assessment-insulin resistance*), zaproponowanego przez Matthews i wsp. [53].

Wskaźnik ten wylicza się z następującego wzoru:

$$HOMA_{IR} = \frac{\text{stężenie insuliny na czczo} \left[\frac{mU}{l} \right]}{22,5^e - \ln(\text{stężenie glukozy na czczo} \left[\frac{mmol}{l} \right])}$$

Metoda HOMA_{IR} daje wyniki porównywalne z wartościami uzyskanymi metodą euglikemicznej klamry metabolicznej, która jest postrzegana jako „złoty standard” w ocenie nasilenia insulinooporności. Największe zalety wskaźnika HOMA_{IR} to powtarzalność wyników i mała inwazyjność metody [53].

I.7. WYKŁADNIKI WCZESNEJ ATEROGENEZY I ROZWOJU MAKROANGIOPATII

Jak wcześniej wspomniano, miażdżycy, czyli zaawansowana makroangiopatia jest uważana za proces zapalny o niewielkim nasileniu [16], ale w jego przebiegu istotną rolę odgrywają również czynniki modulujące angiogenezę i inne czynniki wzrostowe. Istotnymi czynnikami w procesie powstawania i wzrostu blaszek miażdżycowych są chemokiny – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) i transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor β* – TGF- β) [54].

Znaczący wpływ dla progresji miażdżycy może mieć także sirtuina 1 – regulator informacji epigenetycznej. Obniżona w przebiegu cukrzycy typu 2 ekspresja sirtuiny 1 może powodować m.in. nasilenie wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego, zmniejszenie syntezy tlenku azotu, przyspieszenie rozwoju zmian miażdżycowych przez zwiększoną przemianę makrofagów w komórki piankowate i destabilizację płytek przez przyspieszenie apoptozy komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [55].

I.7.1. CZYNNIKI ANGIOGENEZY JAKO ELEMENT PATOGENEZY MIAŻDŻYCY

VEGF jest czynnikiem wzrostowym wpływającym głównie na śródbłonek naczyniowy. Ma znaczenie dla waskulogenezy, czyli powstawania nowej sieci naczyń, a także dla angiogenezy, czyli rozgałęziania naczyń już istniejących. Odgrywa istotną rolę zarówno w procesach fizjologicznych (np. embriogenezie, gojeniu ran), jak i w zjawiskach patologicznych (m.in. retinopatii) [56].

W dorosłym organizmie, VEGF podlega ekspresji w tkankach mezenchymalnych, nabłonkowych bądź nowotworowych położonych w bezpośredniej bliskości drobnych naczyń krwionośnych, ale nie w samym śródbłonku, za wyjątkiem lokalizacji sąsiadujących z naczyniami okienkowatymi lub zatokowymi [57]. Ekspresja VEGF jest regulowana przez onkogeny i cytokiny, m. in. także przez TGF- β [56].

W ludzkiej aorcie pozbawionej blaszek miażdżycowych VEGF-A jest obecny w komórkach mięśni gładkich w *tunica media* i *tunica adventitia*, ale nie w komórkach śródbłonna. Sugeruje to, że procesy angiogenezy są ograniczone do sieci naczyń odżywiających mięśniówkę aorty, czyli *vasa vasorum*. Fizjologicznie, VEGF nie wpływa na śródbłonek aorty – zatem nie zachodzi stymulowana

prolifracja komórek bądź zmniejszenie przepuszczalności naczynia. Natomiast w aortach z obecnymi zaawansowanymi zmianami miażdżycowymi wykazano obecność białka VEGF-A zarówno w komórkach śródbłonkowych aorty, jak i w komórkach piankowatych i komórkach mięśni gładkich pokrywy blaszki. Świadczy to o roli VEGF-A w progresji zmian miażdżycowych [54].

Potwierdzono, że podanie egzogenego VEGF powoduje zwiększenie infiltracji śródbłonka przez makrofagi, co przekłada się na wzrost całkowitych rozmiarów płytki miażdżycowej. Oddziaływanie VEGF na komórki śródbłonka uwrażliwia je także na oddziaływanie czynnika martwicy nowotworu alfa (*tumor necrosis factor alpha* – TNF α). Skutkuje to zwiększoną produkcją czynnika tkankowego w płytkach miażdżycowych, a w przypadku pęknięcia płytki, prowadzi do zakrzepicy. U pacjentów z miażdżycą, wysokie stężenie VEGF jest czynnikiem predykcyjnym wystąpienia zawału mięśnia sercowego [58].

Do rodziny białek VEGF u ssaków należą:

- łożyskowy czynnik wzrostu (*placental growth factor* – PlGF₁₃₁ i PlGF₁₅₂).
- VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₄₈, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF₁₈₉ i VEGF-A₂₀₆. Najwcześniej odkryte białko z rodziny VEGF. W literaturze skrótów VEGF i VEGF-A występują zamiennie. Najbardziej aktywna biologicznie jest izoforma VEGF-A₁₆₅.
- VEGF-B₁₆₇ i VEGF-B₁₈₆. Podlega ekspresji głównie w mięśniach: sercowym, szkieletowych i gładkich dużych naczyń krwionośnych.
- VEGF-C. Niezbędny na etapie embrionalnym do tworzenia naczyń limfatycznych, współdziała z VEGF-A w tworzeniu naczyń krwionośnych.
- VEGF-D. Czynnikiem o działaniu mitogennym na komórki śródbłonka zbliżonym do VEGF-C.

Wyżej wymienione formy VEGF mogą tworzyć między sobą wiązania disiarczkowe, tworząc dimery o zróżnicowanej aktywności [56].

Zidentyfikowano 3 rodzaje receptorów dla VEGF-A:

- receptor 1 dla VEGF; in. kinaza tyrozynowa 1 związana z *fms* (*VEGF receptor 1* – VEGF-R1; *fms-related tyrosine kinase 1* – Flt1) [56].
- receptor 2 dla VEGF; in. receptor z domeną kinazową; in. płodowa kinaza wątrobową 1 (*VEGF receptor 2* – VEGF-R2; *kinase insert domain receptor* – KDR; *foetal liver kinase 1* – Flk1) [56].
- receptor 3 dla VEGF; in. kinaza tyrozynowa 4 (*VEGF receptor 3* – VEGF-R3; *fms-related tyrosine kinase 4* – Flt4) [59].

VEGF-R1 ma duże powinowactwo do VEGF-A, VEGF-B i PlGF. Odgrywa rolę w tworzeniu prawidłowych morfologicznie naczyń krwionośnych w życiu płodowym [56]. U dorosłych osobników, VEGF-R1 podlega ekspresji na błonach komórkowych makrofagów, m.in. monocytów i odpowiada za ich chemotaksję [54]. Pobudzenie VEGF-R1 zwiększa przeżycie komórek w warunkach stresu komórkowego, co może być zjawiskiem negatywnym np. w przypadku nowotworzenia, ale pozytywnym w innych sytuacjach, np. w zapobieganiu obliteracji naczyń krwionośnych w warunkach niedotlenienia [60].

VEGF-R2 ma niższe powinowactwo do VEGF-A, niż VEGF-R1, ale może wiązać się także z VEGF-C i VEGF-D. Jest odpowiedzialny za waskulogenezę i angiogenezę w życiu płodowym [56]. U dorosłych osobników, VEGF-R2 jest konstytutywnie ufosforylowany, tj. aktywny, w wątrobie, płucach, tkance tłuszczowej oraz nerkach i odpowiada za stabilizację istniejącej sieci dużych naczyń krwionośnych [57]. Ze względu na swoją znaczną aktywność kinazy tyrozynowej, aktywowany VEGF-R2 może oddziaływać z innymi białkami wewnątrzkomórkowymi, m. in. integrzynami. W ten sposób, pobudzenie VEGF-R2 prowadzi bezpośrednio i pośrednio do działania mitogennego na komórki śródbłonka oraz do angiogenezy [56].

Istnieją także rozpuszczalne (*soluble*) formy receptorów: sVEGF-R1 i sVEGF-R2. Są one negatywnymi regulatorami angiogenezy [56].

W cukrzycy typu 2 stwierdzono istnienie paradoksalnej angiogenezy. Stężenie VEGF u osób z cukrzycą typu 2 jest wyższe, niż u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej, ale w cukrzycy typu 2 angiogeneza może być zarówno wzmożona (np. w przebiegu retinopatii), jak i obniżona (np. w cukrzycy typu 2 obserwuje się pogorszenie gojenia ran). Zjawisko to można wytłumaczyć swego rodzaju "opornością na VEGF", która pogłębia dysfunkcję śródbłonka naczyniowego, wzmagając ryzyko nasilenia hiperglikemii, insulinooporności, hipercholesterolemii, nadciśnienia, pojawienia się powikłań w postaci przewlekłej niewydolności serca, choroby wieńcowej i niewydolności nerek [61].

Inna hipoteza skupia się na zaburzonym stosunku ilości VEGF-R1 do VEGF-R2. VEGF-R1 ma słabszą aktywność angiogenną niż VEGF-R2, a w dodatku często występuje w postaci rozpuszczalnego sVEGF-R1. VEGF-R1 i sVEGF-R1 wiążąc się z VEGF, zmniejszają ilość liganda dostępną dla VEGF-R2, powodując osłabienie angiogenezy. Ocenę wpływu VEGF na śródbłonek dodatkowo komplikuje zdolność receptorów VEGFR do tworzenia heterodimerów VEGF-R1/VEGF-R2 [62].

W związku z powyższym, rolę VEGF w patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycy należy analizować, biorąc pod uwagę:

- rodzaj tkanki; czy angiogeneza jest w tej tkance zjawiskiem korzystnym; czy możliwa jest sytuacja, w której nadmierny rozwój sieci nowych naczyń pogorszy funkcjonowanie sieci już istniejącej;
- stężenie VEGF w surowicy;
- ekspresję białek VEGF-R1 i VEGF-R2 oraz ich wzajemną proporcję;
- stężenia obu podtypów sVEGF-R w surowicy.

Ekspresja VEGF w mięśniu sercowym ma znaczenie dla utrzymania prawidłowego ukrwienia serca w warunkach zwiększonego obciążenia pracą, np. w przebiegu nadciśnienia, które często towarzyszy cukrzycy typu 2. W modelu zwierzęcym stwierdzono zmniejszoną ekspresję VEGF-A₁₆₄ i VEGF-A₁₈₈, a także mRNA dla receptorów VEGF-R1 i 2 w mięśniu komory serca szczurów z wyindukowaną cukrzycą typu 2 w stosunku do szczurów bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej [63].

Odnotowano także zmniejszenie ekspresji mRNA dla VEGF i VEGF-R2 w grupie zwierząt otyłych bez cukrzycy typu 2 w stosunku do grupy kontrolnej, przy czym stężenie VEGF-R1 pozostało bez zmian. Zwierzęta otyłe z cukrzycą typu 2 cechowało obniżenie ekspresji mRNA dla VEGF i obydwu jego receptorów [63]. Podobną zależność stwierdzono u ludzi: ekspresja VEGF i VEGF-R2 okazała się niższa w tkankach pozyskanych od osób z cukrzycą w stosunku do ekspresji w tkankach pozyskanych od pacjentów bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej [63].

Oznacza to, iż cukrzyca typu 2, ale także otyłość, zaburzą proces angiogenezy przebiegającej w mięśniu sercowym, zwiększając jego podatność na niedotlenienie. Ekspresja mRNA dla VEGF i jego receptorów zostaje przywrócona u zwierząt doświadczalnych po zastosowaniu egzogennej insuliny. Sugeruje to, że ekspresja VEGF w miokardium jest zależna od insuliny [63].

Wzmocniona ekspresja VEGF-R1 w mięśniu sercowym powoduje związanie VEGF-A i czyni go niedostępnym dla VEGF-R2, a zatem może jedynie pogłębić hamowanie angiogenezy [62]. Mimo to, pobudzenie VEGF-R1 może mieć także pozytywny efekt – na skutek związania z VEGF-B, co powoduje pośrednie pobudzenie VEGF-R2. U szczurów pozbawionych VEGF-B obserwowano zwiększone rozmiary blizny pozawałowej w stosunku do zwierząt o dzikim genotypie. VEGF-B zapobiega też apoptozie kardiomiocytów, poprawia kurczliwość mięśnia sercowego, powoduje powiększenie kapilar wieńcowych i zwiększenie rezerwy wieńcowej [64].

W aorcie, oddziaływanie VEGF przez receptor VEGF-R2 nasila angiogenezę, która w zmienionym miażdżycowo naczyniu jest zjawiskiem niekorzystnym – prowadzi do neowaskularyzacji

płytki przez *vasa vasorum*, powoduje zwiększoną przepuszczalność naczyń krwionośnych, skłonność do lokalnego obrzęku i krwotoku. W ten sposób, pobudzenie VEGF-R2 zmniejsza stabilność blaszek miażdżycowych i czyni je podatnymi na pęknięcie [58]. Podsumowując, zwiększone stężenie VEGF-A i następcze pobudzenie VEGF-R2 sprzyja rozwojowi miażdżycy w aorcie pacjentów z cukrzycą typu 2 poprzez proliferację komórek śródbłonkowych, zwiększenie przepuszczalności naczynia i infiltrację komórek zapalnych [54,58]. Z kolei wzmożona ekspresja VEGF-R1 w aorcie może pełnić rolę ochronną, poprzez zwiększenie wiązania VEGF-A z VEGF-R1, w związku z czym będzie on niedostępny dla VEGF-R2 [62].

W wątrobie, konstytutywna aktywacja proangiogenego receptora VEGF-R2 jest niezbędna dla utrzymania istniejącej sieci dużych naczyń krwionośnych [57]. VEGF podlega ekspresji nie tylko w mięśniówce, ale także w śródbłonku naczyń zatokowych w wątrobie [57]. Angiogeneza w wątrobie przebiega z różnym nasileniem, zależnie od dodatkowych czynników. Czynnikiem takim jest np. postępująca akumulacja lipidów w przebiegu stłuszczenia wątroby. Stłuszczenie indukuje rozwój stanu zapalnego i wzrost produkcji cytokin, jak również powoduje fizyczne zwiększenie objętości hepatocytów. Takie warunki stwarzają konieczność powstania nowej sieci naczyń krwionośnych i dlatego wzrost ekspresji VEGF w wątrobie może być związany z jej stłuszczeniem [65]. Jednakże wyniki badań wyjaśniających to zagadnienie nie są spójne.

Coulon i wsp. [65] wykazali wzrost ekspresji mRNA dla VEGF w wątrobie i wzrost stężenia VEGF w osoczu w grupach pacjentów ze stłuszczeniem wątroby w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast inni autorzy [66] zaobserwowali obniżone stężenie VEGF w osoczu w grupie osób z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wu i wsp. [67] w badaniu na myszach, u których wyindukowano wzrost insulinooporności przez wdrożenie diety wysokotłuszczowej zaobserwowali, że neutralizacja VEGF-A z użyciem specyficznego przeciwciała skutkuje przywróceniem insulino-wrażliwości w wątrobie i tkance tłuszczowej. Wyniki tego badania sugerują zatem negatywny wpływ nadmiernej ekspresji VEGF na funkcjonowanie wątroby w przebiegu cukrzycy typu 2, współistniejącej z insulinoopornością.

VEGF jest jednym z głównych czynników wzrostowych odpowiedzialnych za neowaskularyzację m.in. mięśni szkieletowych [68]. Wiadomo także, że obniżona aktywność VEGF-A w mięśniach szkieletowych jest związana z regresją sieci naczyń kapilarnych i koreluje z insulinoopornością, obserwowaną w przebiegu cukrzycy typu 2 i w otyłości [69].

I.7.2. NIEKTÓRE WSKAŹNIKI WZROSTOWE JAKO WYKŁADNIKI ZMIAN W UKŁADZIE SERCOWO-NACZYNIOWYM

TGF- β jest cytokiną o wielokierunkowym działaniu: reguluje procesy związane z podziałami komórkowymi, wzrostem, różnicowaniem i taksjami komórek potomnych; jest immunomodulatorem; wzmacnia proces włóknienia tkanek. TGF- β jest zaangażowany także w procesy naprawcze i remodeling tkanki [70,71].

W organizmach ssaków zidentyfikowano 3 izoformy TGF- β , oznaczone cyframi 1, 2 i 3. TGF- β 1 jest najbardziej rozpowszechniony i występuje we wszystkich tkankach organizmu, podczas gdy TGF- β 2 i 3 są obecne tylko w niektórych tkankach [71].

Istnieją dwa rodzaje receptorów dla TGF- β 1:

- receptor I dla TGF- β (*TGF- β receptor I* – T β RI), dzielący się na dwa podtypy:
 - *activin receptor-like kinase-1* (ALK1), podlegający ekspresji tylko w komórkach śródbłonna;
 - *activin receptor-like kinase-5* (ALK5), obecny w pozostałych typach komórek;
- receptor II dla TGF- β (*TGF- β receptor II* – T β RII) – receptor konstytutywny, aktywny we wszystkich komórkach; pobudzenie T β RII powoduje także transfosforylację i pobudzenie T β RI [71].

TGF- β 1 stymuluje produkcję i uwalnianie szeregu czynników wpływających na naczynia krwionośne: endoteliny 1, tlenku azotu, peptydu natriuretycznego, prostaglandyny E2, VEGF, zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów, czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego i IL-6 [70]. Jednakże wpływ TGF- β 1 na tworzenie sieci nowych naczyń krwionośnych nie został dostatecznie wyjaśniony, ponieważ badania *in vivo* sugerują jego rolę pro- lub antyangiogenną, zależnie od warunków badania [71].

TGF- β reguluje funkcję limfocytów B, hamując ich proliferację i produkcję immunoglobulin. Oddziałuje także na makrofagi, hamując ich dojrzewanie, zmniejszając produkcję cytokin, chemokin i wolnych rodników tlenowych przez tę populację komórek. TGF- β hamuje także cytotoksyczność komórek NK (*natural killer*). W ten sposób przejawia się ogólnoustrojowe przeciwzapalne działanie TGF- β 1. Jednakże gdy działanie TGF- β 1 jest miejscowo ograniczone, a wzrost ekspresji zapoczątkowany na skutek uszkodzenia tkanki, cytokina ta może mieć wpływ prozapalny, zwiększając chemotaksję granulocytów i wydzielanie przez nie TNF oraz IL-1 i IL-6 [70,71].

TGF- β pobudza proces włóknienia tkanki. Stymuluje różnicowanie fibroblastów i zwiększa syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej, a także zmniejsza jej rozkład poprzez hamowanie metalo-

proteinaz. Nadmierna aktywność TGF- β w sercu jest w tym ujęciu niekorzystna, ponieważ wiąże się ze zwłóknieniem tkanki i utratą jej funkcji. Ekspresja TGF- β jest pobudzana m.in. przez angiotensynę II, co sugeruje, że u pacjentów z nadciśnieniem stężenie TGF- β będzie wyższe, a proces włóknienia – bardziej nasilony, niż u pacjentów z normalnym ciśnieniem tętniczym [71].

Rola TGF- β w rozwoju makroangiopatii dotyczących ściany aorty, jest bardziej złożona. Panutsopoulos i wsp. [54] oceniając ekspresję białka TGF- β 1, stwierdzili, że ekspresja ta jest zmniejszona w zmianach miażdżycowych o I-II stopniu zaawansowania wg AHA. Natomiast w zmianach o III-VI stopniu zaawansowania ekspresja TGF- β wzrasta do poziomu wyższego niż w aortach bez zmian miażdżycowych.

Obniżenie ekspresji TGF- β 1 na wczesnych etapach rozwoju blaszek miażdżycowych świadczy o braku ochronnego, przeciwzapalnego i przeciwproliferacyjnego działania TGF- β 1; w tym kontekście, obniżenie ekspresji jest zjawiskiem niepożądanym. Natomiast wzrost ekspresji w zmianach bardziej zaawansowanych może być interpretowany na dwa sposoby: jako zjawisko niekorzystne, prowadzące do nagromadzenia macierzy zewnątrzkomórkowej i wzrostu płytki, albo czynnik korzystny, zwiększający stabilność blaszek poprzez nasilenie zwłóknienia ich pokrywy [54,70].

W wątrobie TGF- β 1 hamuje wzrost i powoduje apoptozę hepatocytów. W warunkach fizjologicznych, apoptoza pod wpływem TGF- β 1 jest niezbędna dla zachowania stałej masy tego organu. Natomiast patologiczne, wysokie stężenia TGF- β 1 powodują nasilone włóknienie oraz spowalniają regenerację wątroby po urazie [70]. Zwiększenie ekspresji TGF- β 1 obserwuje się w zwierzęcym modelu cukrzycy typu 2 z otyłością. Zaburzenia metaboliczne oraz wprowadzenie diety wysokotłuszczowej sprzyja rozwojowi niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby, a insulinooporność nasila włóknienie poprzez zwiększenie ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w wątrobie [72]. Co więcej, Yadav i wsp. [73] w badaniu na myszach wykazali, że ogólnoustrojowa neutralizacja TGF- β 1 przez zastosowanie specyficznego przeciwciała przeciwdziała rozwojowi otyłości, cukrzycy i stłuszczenia wątroby.

W mięśniach szkieletowych, negatywny wpływ nasilonej ekspresji TGF- β 1 jest wyrażony poprzez zwiększenie stężeń markerów zapalenia. Aktywacja szlaków molekularnych TGF- β 1 powoduje supresję koaktywatora 1 α dla receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksydomów, mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A i enzymów mitochondrialnych, a także kinazy α 2 aktywowanej adenozylo-5'-monofosforanem (*5'adenosine monophosphate activated protein kinase* – AMPK). Skutkuje to zaburzeniem procesu oksydacji mitochondrialnej i uniemożliwia poprawę insulinowrażliwości mięśni szkieletowych, jaka powinna zachodzić pod wpływem wysiłku fizycznego [74].

I.7.3. WYBRANE REGULATORY EPIGENETYCZNE ZWIĄZANE Z ROZWOJEM MIAŻDŻYCY I INSULINOOPORNOŚCI OBWODOWEJ

U ssaków rodzina regulatorów informacji epigenetycznej (*silent information regulator 2* – Sir2) obejmuje 7 deacetylaz zależnych od dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (*nicotinamide adenine dinucleotide* – NAD⁺). Najlepiej poznanym enzymem z rodziny Sir2 jest sirtuina 1, obecna m.in. w wątrobie, mięśniach szkieletowych, trzustce, tkance tłuszczowej i mózgu, gdzie odpowiada za regulację przemian glukozy i lipidów w celu pozyskania energii [75,76].

Aktywność deacetylaz powoduje uwolnienie reszt alkilowych związanych z lizyną w białkach, m.in. białkach histonów, co uniemożliwia transkrypcję DNA. Sirtuina 1 ma także zdolność deacetylacji czynników transkrypcyjnych i białek enzymatycznych obecnych w jądrze komórkowym i cytoplazmie, powodując ich aktywację bądź dezaktywację [76,77].

Zmniejszoną ekspresję sirtuiny 1 obserwuje się w przypadku otyłości, diety bogatej w tłuszcz lub fruktozę. Zmniejszenie ekspresji w komórkach śródbłonna naczyniowego postępuje wraz z wiekiem i wiąże się ze zmniejszoną odpowiedzią angiogenną na VEGF. Prawidłowa ekspresja jest przywracana przez restrykcję kaloryczną, wzbogacenie diety w antyoksydanty i prekursorzy NAD⁺ lub podanie metforminy [75,78].

Wiele badań eksperymentalnych wskazuje na ochronną funkcję sirtuiny 1 w chorobach metabolicznych, takich jak cukrzyca typu 2 oraz w prawidłowym funkcjonowaniu układu sercowo-naczyniowego. Całkowita delecja genu dla sirtuiny 1 (*knock-out*) powoduje obumarcie mysich zarodków [78].

W sercu, niedobór sirtuiny 1 powoduje dysfunkcję rozkurczową, która pogłębia się z wiekiem, oraz zmniejszenie angiogenezy, co może nasilać niedokrwienie mięśnia sercowego i objawy choroby wieńcowej [78]. Natomiast w skrawkach ścian naczyń pobranych z różnych lokalizacji anatomicznych stwierdzono zmniejszenie ekspresji sirtuiny 1 w płytkach miażdżycowych, a szczególnie w warstwie mięśni gładkich pokrywających zaawansowaną zmianę miażdżycową. Niskiej ekspresji sirtuiny 1 towarzyszyło nasilenie wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego [55].

W ścianie naczyń krwionośnych, sirtuina 1 zwiększa syntezę tlenu azotu o działaniu wazodylatacyjnym. Wpływając na kaskadę NFκβ, sirtuina 1 wywiera działanie przeciwzapalne przez zmniejszenie produkcji prozapalnych cytokin. Zwiększenie ekspresji sirtuiny 1 wywiera działanie ochronne, opóźniając rozwój zmian miażdżycowych, hamując proliferację komórek mięśni gładkich na wczesnych etapach rozwoju płytki miażdżycowej, hamując przemianę makrofagów w komórki piankowate i promując zwrotny transport cholesterolu do wątroby. Sirtuina 1 spowalnia także zwap-

nienie komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a w zaawansowanych zmianach miażdżycowych zapobiega apoptozie komórek mięśni gładkich, przez co przyczynia się do zwiększenia stabilności płytki [55].

Oprócz tego, sirtuina 1 może mieć znaczenie dla regulacji ciśnienia tętniczego krwi, prawdopodobnie poprzez zmniejszenie ekspresji receptora AT1 dla angiotensyny II, wazodylatacyjny wpływ tlenu azotu i zmniejszenie zależnej od aldosteronu reabsorpcji sodu w nabłonku nerkowym poprzez zmniejszenie ekspresji białka kanałów sodowych [76]. Ponadto, poprzez hipermetylację histonu H3K79, sirtuina zmniejsza syntezę białka dla nabłonkowych kanałów sodowych, regulowanych przez aldosteron i odpowiedzialnych za resorpcję zwrotną sodu w moczu. W rezultacie, aktywacja sirtuiny 1 zmniejsza aktywację układu renina-angiotensyna-aldosteron i obniża ciśnienie tętnicze [76].

W populacji chińskiej wykazano występowanie 3 mutacji genu kodującego sirtuinę 1, różniących się jednym nukleotydem. U pacjentów z wariantem genowym rs2273773/CT+CC stwierdzono znacząco niższe wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego w całodobowych pomiarach ambulatoryjnych [76].

U myszy, brak ekspresji sirtuiny 1 w komórkach śródbłonka na podłożu genetycznym (*knock-out*) powoduje, że naczynia są mniej odporne na stres związany z nadciśnieniem, a sieć naczyń kapilarnych jest przerzedzona, prawdopodobnie w związku ze zmniejszeniem ekspresji receptorów VEGF-R2. W grupie *knock-out* większy procent komórek śródbłonka wykazuje cechy starzenia lub apoptozy niż w grupie o dzikim genotypie [55]. U myszy pozbawionych sirtuiny 1 stwierdzono także dysfunkcję rozkurczową serca [78].

Zmniejszona aktywność sirtuiny w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych powoduje uszkodzenie DNA i upośledzenie procesów naprawczych, przez co sprzyja apoptozie [55].

Nadekspresja sirtuiny 1 w makrofagach zmniejsza ekspresję i powoduje deacetylację NFκβ, a także zmniejsza ekspresję receptora zmiatającego Lox-1, rozpoznającego utlenione cząsteczki LDL. Sirtuina 1 zmniejsza ekspresję NFκβ również w śródbłonku. Sirtuina nasila też aktywność receptora wątrobowego X (*liver X receptor* – LXR), który promuje resorpcję cholesterolu z nacieków tłuszczowych z powrotem do krwioobiegu. W ten sposób sirtuina 1 opóźnia rozwój procesów miażdżycowych [55,76].

W wątrobie, sirtuina 1 hamuje glikogenezę i lipolizę, zmniejsza produkcję LDL, a nasila β-oksydację kwasów tłuszczowych. Sirtuina 1 reguluje także biosyntezę cholesterolu poprzez deacetylację białek jądrowych LXR-α i LXR-β, które aktywując transporter ABCA1 powodują zwiększenie produkcji lipoprotein frakcji HDL [75,76,78].

Metformina oraz resweratrol zwiększają aktywność sirtuiny 1 w hepatocytach, przez co zmniejsza się ekspresja wybranych genów dla enzymów zaangażowanych w glukoneogenezę (FOXO 1, FOXO3a i FOXO4) i poprawia się insulinowrażliwość wątroby. Jednakże wyniki badań dotyczących wpływu sirtuiny 1 na glukoneogenezę często są niespójne, co tłumaczy się istnieniem sprzężenia zwrotnego między kluczowymi regulatorami glukoneogenezy [75,76].

Niedobór sirtuiny 1 powiązано z insulinoopornością wątrobową i niealkoholowym stłuszczeniem wątroby, a także insulinoopornością obwodową mięśni szkieletowych i tkanki tłuszczowej [75,78,79].

Sirtuina 1 to białko o różnorodnych funkcjach, zdolne do deacetylacji nie tylko histonów, ale także czynników transkrypcyjnych i koregulatorów transkrypcji. W związku z tym, może zarówno zwiększać, jak i zmniejszać ekspresję genów docelowych. Sirtuina 1 może nie tylko modyfikować przebieg cukrzycy *ad hoc*, ale ma także znaczenie dla zjawiska tzw. pamięci metabolicznej, czyli sytuacji, w której nawet epizodyczna hiperglikemia, po której następuje długotrwały okres prawidłowej kompensacji cukrzycy, skutkuje progresją powikłań dotyczących serca, nerwów obwodowych i naczyń krwionośnych [80–82].

Procesy modyfikowane przez aktywność sirtuiny 1 obejmują odpowiedź na stres komórkowy i stan zapalny, metabolizm i homeostazę energetyczną komórki, a także procesy starzenia, rozumiane jako zdolność komórki do podziałów bądź jej skierowanie na drogę apoptozy. W konsekwencji, szlaki regulowane przez sirtuinę 1 mogą wzajemnie oddziaływać ze szlakami regulowanymi przez leki stosowane w terapii cukrzycy typu 2 [80,83].

Zheng i wsp. [80] wykazali, że metformina, doustny lek przeciwhiperglikemiczny, aktywując AMPK, zmniejsza stan zapalny i apoptozę w obrębie naczyń kapilarnych siatkówki poprzez szlak LKB1/AMPK/ROS/PARP *in vivo*. Potwierdzili także, że w warunkach hiperglikemii, metformina bezpośrednio zwiększa ekspresję bądź aktywność sirtuiny 1, przeciwdziałając negatywnym skutkom pamięci metabolicznej.

Zhao i wsp. [83] zbadali wpływ fenofibratu, leku przeciw hiperlipidemii będącego agonistą receptora α aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (*peroxisome proliferator-activated receptor α* – PPAR α). Stwierdzili, że fenofibrat działa podobnie do metforminy, zmniejszając stan zapalny i apoptozę, ale jego mechanizm działania dotyczy szlaku PPAR α /SIRT1/NF κ B.

I.7.4. ODSETEK KRAŻĄCYCH KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA I KRAŻĄCYCH PROGENITOROWYCH KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA JAKO WYKŁADNIK STANU ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO

Uszkodzenie śródbłonka naczyń krwionośnych ma istotny udział w rozwoju miażdżycy, zakrzepicy i nadciśnienia [84]. W cukrzycy typu 2 dysfunkcja śródbłonka pogłębia się na skutek ekspozycji na hiperglikemię i związaną z nią nadmierną produkcję wolnych rodników oraz niespecyficzną glikację białek. Komórki śródbłonka w warunkach hiperglikemii są bardzo podatne na nagromadzenie uszkodzeń DNA oraz nasiloną apoptozę indukowaną przez dysregulację szlaków NFκB/c-Jun/kaspazy i kinazy 3-fosfatydyloinozytolu. Znaczenie dla pogorszenia funkcjonowania śródbłonka w przebiegu cukrzycy ma także nasilona synteza prozapalnych cytokin [85].

O stopniu uszkodzenia śródbłonka naczyń można wnioskować pośrednio na podstawie liczby krążących złuszczonych komórek śródbłonka (*circulating endothelial cells* – cEC). U osób zdrowych są niewykrywalne lub wykrywa się je w niewielkiej liczbie; ich odsetek rośnie natomiast w przebiegu infekcji, podczas wstrząsu, w chorobach immunologicznych, ale przede wszystkim w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego – przy czym stany ostre zwykle cechuje większa liczba cEC w stosunku do stanów przewlekłych. Wzrost liczby cEC obserwuje się także w cukrzycy, co świadczy o toksycznym wpływie hiperglikemii na śródbłonek naczyniowy [86].

Wykładnikiem regeneracji śródbłonka są krążące komórki progenitorowe śródbłonka (*circulating endothelial progenitor cells* – cEPC). Jest to populacja komórek pochodząca ze szpiku kostnego, która ulega mobilizacji do krwi obwodowej w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek. Populacja ta uczestniczy również w utrzymaniu homeostazy naczyniowej [87]. Komórki cEPC biorą udział zarówno w powstawaniu nowych naczyń, jak też w naprawie już istniejących, ale uszkodzonych struktur. Są zdolne do inkorporacji w miejscu uszkodzenia, gdzie wydzielają czynniki wzrostowe, pobudzając sąsiednie komórki [85]. Wykazano, że uczestnicząc w procesie angiogenezy i procesach naprawczych śródbłonka naczyń, cEPC stymulują wytwarzanie nowych naczyń z już istniejących, a także wpływają bezpośrednio na proces dojrzewania komórek śródbłonka [87].

Obserwuje się zmniejszenie liczby cEPC wraz z wiekiem, a także w przebiegu cukrzycy, otyłości, hiperlipidemii, nadciśnienia, niewydolności nerek i chorób zapalnych. Spadek ilości i funkcji cEPC prowadzi do przyspieszonego rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego [88]. Liczba cEPC zwiększa się natomiast pod wpływem aktywności fizycznej, może być też korzystnie modyfikowana przez leki (m.in. insulinę, glitazony, statyny, sartany, erytropoetynę) [84,85].

Wykazano, że liczebność cEPC może być modyfikowana w przebiegu cukrzycy zarówno na etapie różnicowania się EPC w szpiku kostnym, mobilizacji ze szpiku do krwi obwodowej, dystrybucji we krwi obwodowej i czasu ich przeżycia na obwodzie, jak też penetracji do ściany naczyniowej [89]. Nie ulega wątpliwości, że podstawowym czynnikiem indukującym te zmiany jest hiperglikemia [90].

Uszkodzenie śródbłonna pod wpływem stresu oksydacyjnego i sił ścinających stanowi wczesny etap dysfunkcji naczyń i rozwoju miażdżycy. cEC są dojrzałymi komórkami śródbłonna pochodzącymi z uszkodzonej błony wewnętrznej naczyń. Liczebność EC we krwi obwodowej wzrasta nawet kilkunastokrotnie w warunkach prowadzących do uszkodzenia ściany naczyń [87].

Dlatego też, ocena liczebności cEPC i cEC może stanowić wskaźnik stopnia dysfunkcji śródbłonna naczyń w przebiegu cukrzycy, a także może być użyteczna dla monitorowania ewentualnego korzystnego wpływu na śródbłonek.

II. CEL

Jednym z najistotniejszych problemów współczesnej farmakoterapii cukrzycy jest zagadnienie pośredniego i bezpośredniego oddziaływania leków stosowanych w leczeniu tego schorzenia na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy, zwłaszcza powstających na podłożu makroangiopatii, stanowiących jakże częstą przyczynę zgonów wśród chorych na cukrzycę.

Dapagliflozyna jest lekiem przeciwcukrzycowym stosunkowo niedawno wprowadzonym do leczenia. Jej wpływ, zarówno bezpośredni na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy, jak i na progresję insulinoporności obwodowej czy też dysfunkcji komórek β wysp trzustki nie został jeszcze jednoznacznie wyjaśniony. Dane epidemiologiczne i wyniki badań klinicznych sugerują, że stosowanie tego leku może korzystnie oddziaływać zmieniając istotnie przebieg choroby.

Z tego powodu głównym celem badań, których wyniki przedstawiono w niniejszej dysertacji była ocena bezpośredniego i pośredniego potencjalnego działania dapagliflozyny na wczesne fazy rozwoju powikłań w układzie sercowo-naczyniowym, na podstawie rezultatów eksperymentu na zwierzętach laboratoryjnych.

Dla przeprowadzenia analizy wybrano zarówno czynniki charakteryzujące wczesne etapy zmian zachodzących w ścianach naczyń tętniczych oraz w mięśniu sercowym pod wpływem cukrzycy typu 2, a także czynniki związane z ryzykiem rozwoju insulinoporności obwodowej – wątrobowej i w mięśniach szkieletowych. Oceniono:

- ekspresję czynników związanych ze śródbłonkowym czynnikiem wzrostu naczyń (VEGF): jego stężenie w surowicy oraz ekspresję mRNA dla VEGF w poszczególnych tkankach, a także ekspresję mRNA dla podtypów 1 i 2 receptora dla VEGF;
- dystrybucję progenitorowych komórek śródbłonka oraz komórek śródbłonka we krwi;
- ekspresję czynników związanych z transformującym czynnikiem wzrostu β (TGF- β 1): jego stężenie w surowicy oraz ekspresję mRNA dla TGF- β 1 w poszczególnych tkankach;
- ekspresję sirtuiny 1 w poszczególnych tkankach.

Uzupełniającym celem badań była próba wskazania mechanizmu działania dapagliflozyny w mięśniu sercowym, w ścianie aorty, w wątrobie oraz w mięśniach szkieletowych, a dla jego realizacji przeprowadzono analizę dystrybucji kontransportera sodowo-glukozowego 2 w tych tkankach.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

III.1. PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH

III.1.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE

Doświadczenie prowadzono na 39 szczurach, samcach rasy Wistar. Zastosowano odwrócony cykl dobowy. Zwierzęta po okresie aklimatyzacji przydzielono losowo do jednej z trzech grup:

D – 12 zwierząt, u których wyindukowano cukrzycę typu 2 i podawano dapagliflozynę;

C – 12 zwierząt, u których wyindukowano cukrzycę typu 2 i podawano *placebo*;

K – 15 zwierząt stanowiących grupę kontrolną bez cukrzycy, którym podawano *placebo*.

Eksperyment przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania na zwierzętach wykonano zgodnie z Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015 poz. 266) na podstawie zezwolenia udzielonego uchwałą nr 43/2015 oraz 1/2016 Lokalnej Komisji Etycznej w Poznaniu.

III.1.2. INDUKCJA MODELU CUKRZYCY TYPU 2

Badanie przeprowadzono na modelu zwierzęcym, w którym zaburzenia metaboliczne odpowiadające cukrzycy typu 2 u ludzi uzyskano poprzez chemiczne uszkodzenie trzustki – celem wywołania defektu sekrecji insuliny, w połączeniu z podawaniem wysokotłuszczowej paszy – w celu wywołania insulinooporności obwodowej. Trzustkę uszkodzono poprzez wstrzyknięcie dootrzewnowe streptozotocyny rozpuszczonej w buforze cytrynianowym. Zastosowano dawkę 30 mg/kg m.c.. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymały analogiczną objętość buforu cytrynianowego [91–93].

Przez kolejnych 7 dni zwierzęta otrzymywały karmę standardową *ad libitum*, a od 8. dnia u zwierząt z grup badanych rozpoczęto stosowanie diety wysokotłuszczowej *ad libitum* z użyciem paszy doświadczalnej Labofeed B 61% tłuszczu. Dietę wysokotłuszczową stosowano przez 4 tygodnie w grupach C i D, podczas gdy zwierzęta z grupy K otrzymywały karmę standardową.

Następnie przeprowadzono test dożołądkowego obciążenia glukozą w dawce 1 g/kg m.c.. Zmierzono glikemię na czczo oraz po upływie 1 godziny od podania glukozy (jako odpowiednik glikemii poposiłkowej). Przyjęto, że wartości glikemii ≥ 126 mg/dl na czczo i/lub ≥ 140 mg/dl po obciążeniu glukozą były podstawą do rozpoznania cukrzycy typu 2 u zwierząt.

III.1.3. EKSPERYMENT GŁÓWNY

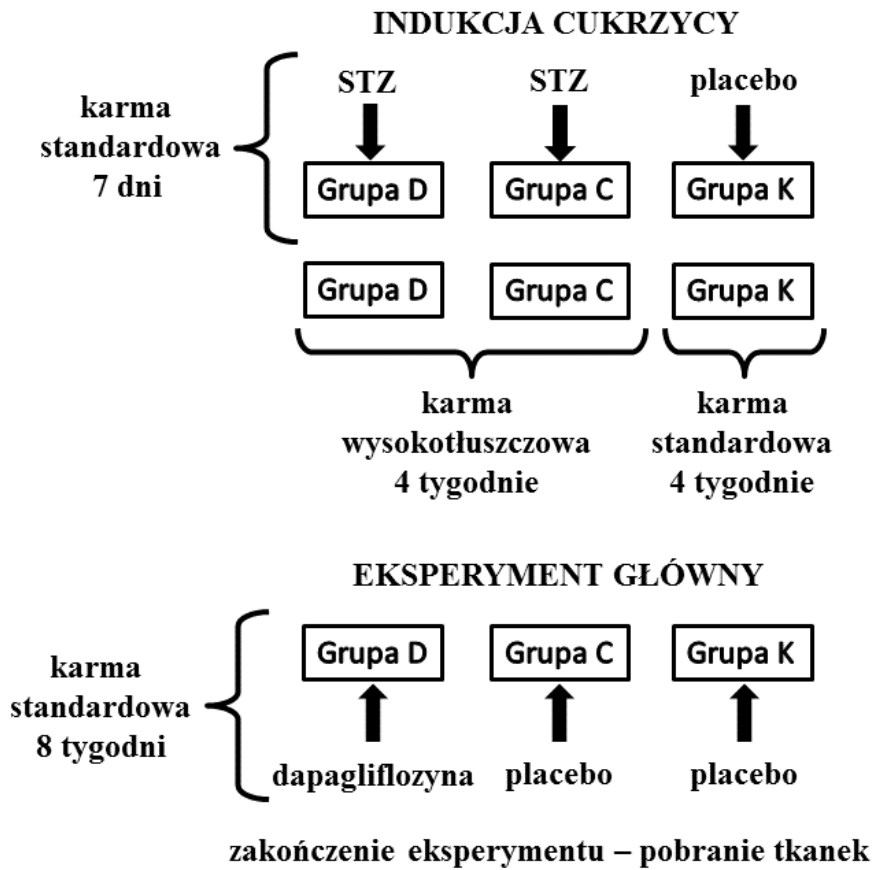
Eksperyment główny trwał 8 tygodni. W tym czasie wszystkie zwierzęta otrzymywały karmę standardową *ad libitum*. Zwierzętom z grupy D codziennie w godzinach porannych podawano dożołądkowo dapagliflozynę w dawce 1 mg/kg m.c. w postaci zawiesiny o stężeniu 1 mg/3 ml w 1% kleiku z metylocelulozy. Zwierzętom z grupy C (z indukowaną cukrzycą) i K (bez cukrzycy) podawano *placebo* – metylocelulozę.

Na dzień przed rozpoczęciem podawania dożołądkowo zawiesiny leku bądź *placebo*, a także na dzień przed zakończeniem eksperymentu, przeprowadzono test dożołądkowego obciążenia glukozą. W dniu zakończenia eksperymentu zmierzono glikemię na czczo. Następnie zastosowano znieczulenie ogólne poprzez podanie dootrzewnowe soli sodowej pentobarbitalu w dawce 50 mg/kg m.c. i uśmiercono zwierzęta przez dekapitację.

Krew z tętnic szyjnych pobrano na skrzep w celu pozyskania surowicy, a także na EDTA w celu pozyskania krwi pełnej.

Surowicę przechowywano w temperaturze -70°C do dalszych badań, natomiast z krwi pełnej oznaczono *in extenso* hemoglobinę glikowaną.

Niezwłocznie po dekapitacji pobrano wybrane tkanki do dalszych analiz. Tkanki przeznaczone do badań metodami biologii molekularnej mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -70°C . Część pobranego materiału konserwowano w formalinie buforowanej dla badań histopatologicznych i immunohistochemicznych.



Rycina 4. Schemat przebiegu doświadczenia na zwierzętach

III. 2. METODYKA BADAŃ

III.2.1. OZNACZANIE GLIKEMII

Pomiar glikemii u szczurów prowadzono z użyciem glukometru Diagnostic Gold (Diagnosis) i odpowiednich pasków testowych. Krew włośniczkową do pomiaru pozyskiwano przez nacięcie koniuszka ogona szczurzego.

Zasada metody: biosensoryczna, związana z aktywnością oksydazy glukozy. W kontakcie z kroplą krwi następuje zaciągnięcie niewielkiej ilości krwi włośniczkowej (0,9 μ l) przez kapilarę paska testowego do komory reakcyjnej. Gdy komora jest pełna, glukoza w próbce krwi łączy się z odczynnikami obecnymi na pasku testowym. Wywołuje to powstanie prądu elektrycznego o natężeniu zależnym od stężenia glukozy we krwi. Glukometr wyświetla wynik (stężenie glukozy wyrażone w mg/dl) w ciągu 5 sekund.

III.2.2. OZNACZANIE STĘŻENIA HEMOGLOBINY GLIKOWANEJ HbA_{1c} W KRWI PEŁNEJ

Stężenie HbA_{1c} w krwi pełnej oznaczono w zewnętrznym laboratorium metodą immunoturbidymetryczną (COBAS Integra 400/700/800) standaryzowaną zgodnie z IFCC [94].

Zasada metody: reakcja antygen-przeciwciała, zachodząca w warunkach nadmiaru przeciwciał. Powstały kompleks powoduje zmętnienie roztworu i rozproszenie wiązki światła przechodzącego przez badany roztwór proporcjonalnie do stężenia antygeny (HbA_{1c}). Odczytu dokonuje się w oparciu o krzywą wzorcową. Oznaczenie przeprowadzono w laboratorium analitycznym MEDIC-LAB s.c., Szamotuły.

III.2.3. OZNACZANIE STĘŻENIA INSULINY W SUROWICY

W celu oznaczenia stężenia insuliny w surowicy zastosowano komercyjny test immunoenzymatyczny Insulin rat ELISA (Demeditec Diagnostics), który pozwala oznaczyć ilościowo dwie, różniące się 7 aminokwasami, formy insuliny, jakie produkowane są w trzustce szczurów i uwalniane do surowicy (formy I i II).

Ogólna zasada metody immunoenzymatycznej opiera się na reakcji przeciwciała immobilizowanego na powierzchni płytki z tworzywa sztucznego (zwykle wykorzystuje się 96-dołkowe płytki mikrotitracyjne), ze specyficznym antygenem znajdującym się w surowicy lub innym płynie. Po inkubacji, na powierzchni płytki znajduje się immobilizowany kompleks przeciwciała-antygen, natomiast inne białka obecne w surowicy można usunąć przez aspirację i płukanie. Następnie na płytkę nanosi się przeciwciała wtórne, znakowane enzymem – na tym etapie powstaje kompleks typu

sandwich. Ostatnim etapem oznaczenia jest dodanie substratu dla enzymu związanego z przeciwciałem wtórnym. Absorbancję roztworu barwnego produktu reakcji oznacza się metodą spektrofotometryczną. Stężenie badanego czynnika w surowicy wylicza się, korzystając z krzywej wzorcowej sporządzonej na podstawie pomiarów absorbancji dla roztworów kontrolnych o znanych stężeniach.

Zasada metody

Metoda immunoenzymatyczna oznaczania stężenia insuliny opiera się na utworzeniu złożonych kompleksów zawierających:

- specyficzne monoklonalne przeciwciała pierwotne znakowane biotyną (immobilizowane na wewnętrznej powierzchni dołków/studzienek płytki powleczonej streptawidyną), skierowane przeciwko insulinie szczurzej;
- insulinę (znajdującą się w surowicy);
- przeciwciała wtórne, znakowane peroksydazą chrzanową (*horseradish peroxidase* – HRP).

Następnie wykonywany jest pomiar absorbancji barwnego produktu reakcji, której wartości są proporcjonalne do stężenia insuliny w badanych próbkach. Reakcję schematycznie przedstawiono na rycinie 5.

Przebieg oznaczenia

1. Utworzenie kompleksu: swoiste przeciwciało pierwotne – insulina.

Do kolejnych dołków płytki powlekanych streptawidyną, naniesiono po 20 μ l roztworów wzorcowych (o stężeniach insuliny: 0,0; 0,15; 0,40; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00 ng/ml) oraz badanych surowic.

Następnie, do każdej studzienki dodano po 100 μ l antyserum, zawierającego przeciwciała skierowane przeciw insulinie szczurzej znakowane biotyną. Na skutek reakcji biotyny ze streptawidyną dochodzi do unieruchomienia przeciwciał na powierzchni płytki. Domeny zmienne przeciwciała reagują z komponentą antygenową insuliny szczurzej I i II.

Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 20°C na wytrząsarce poziomej, wytrząsając z prędkością 300 ruchów/min. Po tym czasie dołki płukano czterokrotnie objętością 300 μ l buforu.

2. Przyłączenie przeciwciała wtórnego znakowanego HRP.

Do każdego dołka płytki dodano 125 μ l koniugatu zawierającego przeciwciała wtórne skierowane przeciwko szczurzej insulinie, znakowane HRP.

Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 20°C na wytrząsarce poziomej, wytrząsając z prędkością 300 ruchów/min. Po tym czasie dołki płukano czterokrotnie objętością 300 µl buforu.

3. Utworzenie barwnego produktu reakcji enzymatycznej.

Do każdego dołka dodano 200 µl roztworu tetrametylobenzydyny (TMB), będącej substratem dla HRP. Płytki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 20°C, bez dostępu światła. Po tym czasie, dodano 50 µl 1 M roztworu H₂SO₄ w celu zatrzymania reakcji.

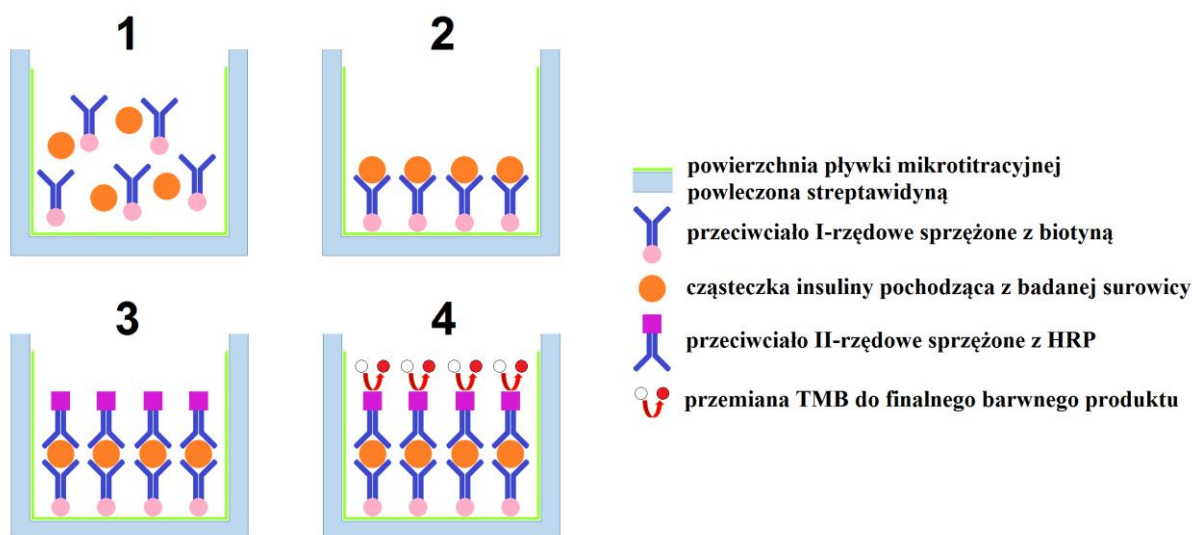
Pomiar absorbancji

Pomiaru dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy $\lambda = 405$ i 450 nm.

Stężenia insuliny odczytano na podstawie krzywej wzorcowej.

Charakterystyka testu

- Czulość (*sensitivity*): 0,1 ng/ml
- Współczynnik zmienności w obrębie oznaczenia (*intra-assay*): 1,89 – 5,86 %
- Współczynnik zmienności dla różnych oznaczeń (*inter-assay*): 4,35 – 9,29 %



Rycina 5. Uproszczony schemat oznaczania stężenia insuliny metodą immunoenzymatyczną ELISA

III.2.4. OZNACZANIE STĘŻENIA PEPTYDU C W SUROWICY

Podobnie jak w przypadku insuliny, w surowicy szczurzej można zidentyfikować dwie formy peptydu C (I i II), różniące się od siebie dwoma aminokwasami.

W celu oznaczenia stężenia peptydu C w surowicy zastosowano komercyjne testy immunoenzymatyczne C-peptide rat ELISA (Demeditec Diagnostics). Do przeprowadzenia oznaczenia wykorzystywano 96-dółkowe płytki mikrotitracyjne.

Zasada metody

Metoda opiera się na utworzeniu przez substraty złożonych kompleksów zawierających:

- specyficzne monoklonalne przeciwciała pierwotne (opłaszczające dołki płytki, skierowane przeciwko szczurzemu peptydowi C w obydwu formach);
- peptyd C (znajdujący się w surowicy);
- przeciwciała wtórne, znakowane HRP.

Następnie wykonywany jest pomiar absorbancji barwnego produktu reakcji, której wartości są proporcjonalne do stężeń peptydu C w badanych próbkach.

Przebieg oznaczenia

1. Utworzenie kompleksu: swoiste przeciwciała pierwotne – peptyd C.

Do kolejnych dołków mikropłytki, opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko szczurzemu peptydowi C I i II, nanoszono po 10 μ l roztworów wzorcowych (o stężeniach: 0; 108; 334; 1260; 2460; 3930 pmol/l) lub badanych surowic. Wzorce i próbki rozcieńczono już w studzienkach płytki, dodając do każdej studzienki po 50 μ l buforu do analizy.

Następnie płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 20°C, wytrząsając na wytrząsarce poziomej z prędkością 700 ruchów/min. Po tym czasie płytkę płukano sześciokrotnie 700 μ l buforu.

2. Przyłączenie przeciwciała wtórnego znakowanego HRP.

Do każdego dołka dodano 100 μ l koniugatu mysiego przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko szczurzemu peptydowi C sprzężonego z HRP.

Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 20°C, wytrząsając z prędkością 700 ruchów/min. Po tym czasie płytkę płukano sześciokrotnie 700 μ l buforu.

3. Utworzenie barwnego produktu reakcji enzymatycznej.

Do każdej studzienki dodano 200 µl roztworu TMB. Inkubowano przez 15 minut w temperaturze 20°C, bez dostępu światła.

Dodano 50 µl 0,5 M roztworu H₂SO₄ w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej prowadzącej do powstania barwnego produktu.

Pomiar absorbancji

Pomiaru dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy $\lambda = 450$ nm.

Stężenia peptydu C odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej.

Charakterystyka testu

- Czułość (*sensitivity*): 0,064 ng/ml
- Współczynnik zmienności w obrębie oznaczenia (*intra-assay*): 2,0 – 4,2 %
- Współczynnik zmienności dla różnych oznaczeń (*inter-assay*): 2,2 – 7,2 %

III.2.5. OZNACZANIE STĘŻENIA VEGF W SUROWICY

W celu oznaczenia stężenia VEGF krążącego w surowicy zastosowano komercyjne testy immunoenzymatyczne Rat VEGF Quantikine ELISA (R&D Systems). Do przeprowadzenia oznaczenia wykorzystywano 96-dółkowe płytki mikrotitracyjne.

Zasada metody

Metoda opiera się na utworzeniu przez substraty złożonych kompleksów zawierających:

- specyficzne monoklonalne przeciwciała pierwotne (opłaszczające dołki płytki, skierowane przeciwko szczurczemu VEGF);
- VEGF (znajdujący się w surowicy);
- przeciwciała wtórne, znakowane HRP.

Następnie wykonywany jest pomiar absorbancji barwnego produktu reakcji, której wartości są proporcjonalne do stężeń VEGF w badanych próbkach.

Przebieg oznaczenia

1. Utworzenie kompleksu: swoiste przeciwciała pierwotne – VEGF.

Do kolejnych dołków mikropłytki, opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko szczurczemu VEGF, наносono po 50 µl roztworu białek przeznaczonego do

rozcieńczenia, a następnie po 50 µl roztworów wzorcowych (o stężeniach: 0,0; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00; 500,00; 1000,00; 2000,00 pg/ml), kontrolnych lub badanych surowic.

Następnie płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 20°C, wytrząsając na wytrząsarce poziomej z prędkością 500 ruchów/min. Po tym czasie płytkę płukano pięciokrotnie 400 µl buforu.

2. Przyłączenie przeciwciała wtórnego znakowanego HRP.

Do każdego dołka dodano 100 µl koniugatu przeciwciała poliklonalnego skierowanego przeciwko szczurczemu VEGF sprzężonego z HRP.

Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 20°C, wytrząsając z prędkością 500 ruchów/min. Po tym czasie płytkę płukano pięciokrotnie 400 µl buforu.

3. Utworzenie barwnego produktu reakcji enzymatycznej.

Do każdej studzienki dodano 100 µl roztworu TMB, zmieszanej z roztworem nadtlenu wodoru na 15 minut przed dodaniem.

Inkubowano przez 30 minut w temperaturze 20°C, bez dostępu światła.

Dodano 100 µl roztworu rozcieńczonego HCl w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej prowadzącej do powstania barwnego produktu.

Pomiar absorbancji

Pomiaru dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy $\lambda = 450$ nm.

Stężenia VEGF odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej.

Charakterystyka testu

- Czulość (*sensitivity*): 3,9 – 25,0 pg/ml (średnio 8,4 pg/ml)
- Współczynnik zmienności w obrębie oznaczenia (*intra-assay*): 2,2 – 5,6 %
- Współczynnik zmienności dla różnych oznaczeń (*inter-assay*): 4,6 – 10,0 %

III.2.6. OZNACZANIE STĘŻENIA TGF- β 1 W SUROWICY

TGF- β 1 może być obecny w surowicy zarówno w postaci wolnej, jak również związanej w postaci białkowego kompleksu z propeptydem LAP (*latency-associated protein*) bądź kompleksu TGF- β 1-LAP-LTBP (*latent TGF- β 1 binding protein*) [70].

W toku oznaczenia uzyskano wynik będący sumą stężeń wolnego TGF- β 1 i jego formy latentnej. W celu oznaczenia stężenia TGF- β 1 w surowicy zastosowano komercyjny test immunoenzymatyczny Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- β 1 Quantikine ELISA (R&D Systems).

Zasada metody

Metoda opiera się na utworzeniu przez substraty złożonych kompleksów zawierających:

- specyficzne monoklonalne przeciwciała pierwotne (opłaszczające dołki płytki, skierowane przeciwko szczurczemu TGF- β 1);
- TGF- β 1 (znajdujący się w surowicy);
- przeciwciała wtórne, znakowane HRP.

Następnie wykonywany jest pomiar absorbancji barwnego produktu reakcji, której wartości są proporcjonalne do stężeń TGF- β 1 w badanych próbkach.

Przebieg oznaczenia

1. Aktywacja i rozcieńczanie surowic.

Aby uwolnić TGF- β 1 z formy latentnej, która nie wykazuje immunoreaktywności, surowicę należy zakwasić. W tym celu, do 40 μ l surowicy należy dodać 10 μ l 1 N roztworu HCl i inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu, surowicę należy doprowadzić do pH 7,2 – 7,6 używając rozcieńczonego roztworu NaOH. Do wyrównania pH surowic zużyto po 80 μ l dostępnego roztworu NaOH.

Z tak przygotowanych, aktywowanych próbek o objętości 130 μ l każda, pobierano po 20 μ l i łączono z 580 μ l buforu, wchodzącego w skład zestawu. Uzyskano w ten sposób po 600 μ l aktywowanych i rozcieńczonych surowic, dla których współczynnik rozcieńczenia wynosi 94,25.

2. Utworzenie kompleksu: swoiste przeciwciała pierwotne – TGF- β 1.

Do kolejnych dołków mikropłytki, opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko TGF- β 1, nanoszono po 50 μ l roztworów wzorcowych (o stężeniach: 0,0; 0,0313; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 ng/ml), kontrolnych lub aktywowanych i rozcieńczonych surowic. Następnie płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 20°C. Po tym czasie płytkę płukano czterokrotnie 400 μ l buforu.

3. Przyłączenie przeciwciała wtórnego znakowanego HRP.

Do każdego dołka dodano 100 μ l koniugatu przeciwciała poliklonalnego skierowanego przeciwko szczurczemu TGF- β 1 sprzężonego z HRP. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 20°C. Po tym czasie płytkę płukano czterokrotnie 400 μ l buforu.

4. Utworzenie barwnego produktu reakcji enzymatycznej.

Do każdej studzienki dodano 100 µl roztworu TMB. Roztwór sporządzono na 30 minut przed zużyciem. Płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 20°C, bez dostępu światła. Po tym czasie dodano 100 µl roztworu rozcieńczonego HCl w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej prowadzącej do powstania barwnego produktu.

Pomiar absorbancji

Pomiaru dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy $\lambda = 450$ nm.

Stężenia TGF- β 1 odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej.

Charakterystyka testu

- Czułość (*sensitivity*): 1,7 – 15,4 pg/ml (średnio 4,6 pg/ml)
- Współczynnik zmienności w obrębie oznaczenia: 1,9 – 2,9 %
- Współczynnik zmienności dla różnych oznaczeń: 6,4 – 9,1 %

III.2.7. OZNACZANIE WZGLĘDNEJ EKSPRESJI mRNA DLA VEGF, VEGF-R1 I VEGF-R2 ORAZ TGF- β 1 W TKANKACH

Do oznaczenia ekspresji mRNA wykorzystano skrawki tkankowe zamrożone bezpośrednio w ciekłym azocie. Skrawki mikronizowano ręcznie w ciekłym azocie. Niewielką ilość zhomogenizowanej tkanki zawieszono w Renozolu (Genoplast Biochemicals) i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu izolacji mRNA.

Z homogenatami tkankowymi postępowano w sposób wskazany przez Chomczyńskiego i Sacchi [29].

Ilość wyizolowanego RNA oceniono z wykorzystaniem spektrofotometru Nano Drop One (Thermo Scientific). Integralność RNA oceniono za pomocą elektroforezy na żelu.

Reakcję odwrotnej transkrypcji do cDNA przeprowadzono wg metodyki producenta (Invitrogen Thermo Fisher Scientific). Reakcję łańcuchową polimerazy DNA z detekcją fluorescencji w czasie rzeczywistym (*real-time quantitative polymerase chain reaction* – RT-qPCR) prowadzono na urządzeniu Light Cycler 480 II Real-Time PCR (Roche Diagnostics) z użyciem SYBR Green I jako barwnika fluorescencyjnego.

Poziom cDNA receptorów VEGF-R1 i VEGF-R2 określono, używając metody względnej kwantyfikacji z wykorzystaniem kalibratora. Kalibrator uzyskano mieszając cDNA ze wszystkich prób. Do reakcji amplifikacji używano 1 µl roztworu badanego cDNA oraz 9 µl gotowej mieszaniny

reakcyjnej LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics) i pary starterów. Sekwencje par starterów przedstawiono poniżej.

Liczbę transkryptów VEGF oraz jego receptorów VEGF-R1 i VEGF-R2 wystandaryzowano względem średniej geometrycznej liczby transkryptów dla trzech genów referencyjnych:

- β -aktyna (ACT β);
- fosforybozylotransferaza hipoksantynowa 1 (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* – HPRT1);
- podjednostka A dehydrogenazy bursztynianowej (*succinate dehydrogenase complex, subunit A* – SDHA).

Rozcieńczenia kalibratora posłużyły do wyznaczenia krzywej wzorcowej i oszacowania wydajności reakcji dla poszczególnych genów.

Oznaczenia przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Sekwencje par starterów dla poszczególnych genów poddanych analizie metodą RT-qPCR.

Gen	Sekwencje par starterów 5' - 3'
VEGF	CTCCACCATGCCAAGTGGTC
	AATAGCTGCGCTGGTAGACG
VEGF-R1	GCAGAGCCAGGAACATATAC
	GAGGTTTTGAAGCAGGAGTG
VEGF-R2	CGCGTTTTTCAGAGTTGGTGG
	TGAGGTAGGCAGGGAGAGTC
TGF- β 1	AGAAGTCACCCGCGTGCTAAT
	CACTGCTTCCCGAATGTCTGA
ACT β	CACCACACTTTCTACAATGAG
	CAGAGGCATACAGGGACAAC
HPRT1	CGTCGTGATTAGTGATGATG
	GCAAGTCTTTCAGTCCTGTC
SDHA	CTAACTACAAGGGACAGGTG
	AGGCGTACAGACCAGGCACA

III.2.8. OZNACZANIE EKSPRESJI BIAŁEK SIRTUINY 1 I KOTRANSPORTERA SODOWO-GLUKOZOWEGO W TKANKACH

Wybrane tkanki homogenizowano w ciekłym azocie, a następnie zawieszono niewielką ilość w buforze RIPA (Sigma Life Science). Zawiesinę inkubowano w lodzie przez 1 godzinę, następnie wirowano. Supernatant, zawierający lizat tkankowy, przeniesiono do nowej próbówki i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszej analizy.

Rozdział białek prowadzono metodą elektroforezy na 10% żelu poliakrylamidowym (Bio-Rad Laboratories). Następnie białka transferowano na membranę z nitrocelulozy (Bio-Rad). Zastosowano metodę elektrotransferu półsuchego z wykorzystaniem urządzenia Pierce G2 Fast Blotter Thermo Scientific. Następnie membranę barwiono w temperaturze pokojowej, z wykorzystaniem buforu Ponceau S (Sigma Aldrich).

W kolejnym etapie membranę zabezpieczono przed niespecyficznym wiązaniem przeciwciał, zanurzając ją w buforze blokującym TBST-B, zawierającym odtłuszczone mleko w proszku (SM Gostyń).

Tak przygotowaną membranę inkubowano ze specyficznym przeciwciałem – dla identyfikacji sirtuiny 1 z Anti-Sirt1 (Merck Millipore), a dla SGLT2 – z SGLT2 (ABCAM).

Charakterystykę przeciwciał i zastosowane rozcieńczenie zestawiono w tabelach 1 i 2.

Membranę inkubowano kolejno z przeciwciałami I- i II- rzędowymi dla detekcji sirtuiny i SGLT2, a następnie z przeciwciałem dla β -aktyny (Santa Cruz Biotechnology), za każdym razem płucząc ją 3-krotnie przed nałożeniem kolejnego odczynnika.

Po ostatnim płukaniu, membranę osuszono, umieszczono na sztywnej folii, podano 1 ml substratu dla HRP i przykryto drugą warstwą cienkiej przejrzystej folii. Znakowanie przeciwciał HRP umożliwia detekcję produktów reakcji barwnej. W celu detekcji chemoluminescencji wykorzystano aparat UVP (Ultraviolet Products Limited). Odczyt prowadzono w czasie 20 minut, wykonując serię 10 zdjęć – co 2 minuty każde. Do analizy gęstości optycznej zdjęć wykorzystano oprogramowanie Image J.

Oznaczenia przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Tabela 1. Charakterystyka przeciwciał użytych do detekcji białek metodą *Western blot*

Przeciwciało	Pochodzenie
Anti-Sirt1 I-rzędowe	królicze przeciwciało poliklonalne IgG
IGG, DNK X RB, HRP-500UL II-rzędowe	ośle przeciwciało poliklonalne IgG skoniugowane z HRP
SGLT2 I-rzędowe	królicze przeciwciało poliklonalne IgG
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) II-rzędowe	kozie przeciwciało poliklonalne IgG skoniugowane z HRP
β-Actin Antibody (C4) HRP	mysie przeciwciało monoklonalne IgG _{1K} skoniugowane z HRP

Tabela 2. Rozcieńczenia przeciwciał użytych do detekcji białek metodą *Western blot*

Białko badane	Rozcieńczenie przeciwciała	Objętość buforu TBST-M
Sirtuina 1	1:1200	10 ml
SGLT2	1:857	10 ml
ACTβ	1:3000	10 ml

III.2.9. OCENA DYSTRYBUCJI KRAŻĄCYCH KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA I KRAŻĄCYCH KOMÓREK PROGENITOROWYCH ŚRÓDBŁONKA

Odsetek cEC oraz cEPC zmierzono metodą cytometrii przepływowej. Komórki identyfikowano dzięki obecności charakterystycznych markerów powierzchniowych: cEC – jako komórki CD45⁻CD31⁺CD34⁺CD133⁻; natomiast cEPC jako komórki CD45⁻CD34⁺CD133⁺CD309⁺ [87,95].

Komórki pobrane od każdego ze zwierząt zawieszano w roztworze soli zrównoważonym roztworem Hanka (HBSS, Invitrogen), zawierającym także odpowiednie przeciwciała:

- poliklonalne królicze przeciwciało przeciwko CD34 (Bioss Antibodies) sprzężone z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC);
- poliklonalne królicze przeciwciało przeciwko CD31/PECAM (Bioss Antibodies) sprzężone z fikoerytryną (PE);

- monoklonalne przeciwciało przeciwko CD133 (Prominin-1) (Bioss Antibodies) znakowane allofikocyjaniną (APC);
- monoklonalne mysie przeciwciało przeciwko VEGF-R2/KDR (Novus Biologicals) sprzężone z kompleksem perydynina-chlorofil- białko.

Komórki inkubowano w roztworze przeciwciał przez godzinę, następnie przemyto dwukrotnie roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami i utrwalono 2% roztworem formaldehydu.

Odsetek komórek cEC i cEPC oceniano z użyciem aparatu do cytometrii przepływowej FACS Canto (Beckton Dickinson), po uzyskaniu 200 tysięcy cykli poddając wstępne wyniki analizie z użyciem oprogramowania Diva (Beckton Dickinson). Cały proces powtórzono z użyciem kontrolnych przeciwciał (Santa Cruz).

Oznaczenie przeprowadzono w Katedrze Immunologii Klinicznej i Zakład Immunologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

III.3. MATERIAŁY

III.3.1. ODCZYNNIKI ZASTOSOWANE W DOŚWIADCZENIU GŁÓWNYM

Streptozotocyna (streptozocyna, N-[metylonitrozokarbamoilo]- α -D-glukozamina).

Producent: Sigma-Aldrich, Niemcy.

Kwas cytrynowy. Producent: Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska.

Cytrynian sodu. Producent: Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska.

Woda do wstrzykiwań. Producent: Baxter, Polska.

Glukoza. Producent: Prolab, Polska.

Dapagliflozyna. Tabletki powlekane Forxiga 10 mg.

Producent: Bristol-Myers Squibb/AstraZeneca, Wielka Brytania.

Metyloceluloza. Producent: Sigma-Aldrich, Japonia.

Sól sodowa pentobarbitalu. Roztwór do wstrzykiwań Euthasol Vet, 400 mg/ml.

Producent: Fatro, Polska.

Formalina buforowana obojętna 10%. Producent: Aqua-Med, Polska.

III.3.2. PASZE

Skład pasz przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie wartości odżywczych w 1 kg paszy standardowej i doświadczalnej.

Wartości odżywcze	Zawartość w 1 kg paszy Labofeed B standard	Zawartość w 1 kg paszy Labofeed B 61% tłuszczu
Zawartość energii metabolicznej	11,5 MJ	26,4 MJ
Energia pochodząca z:	Węglowodanów – 67 % Białek – 25% Tłuszczów – 8 %	Nie podano Nie podano Nie podano
Białko surowe	175,0 g	165,0 g
Tłuszcz surowy	35,0 g	627,0 g
Włókno surowe	70,0 g	15,4 g
Skrobia	330,0 g	12,8 g
Popiół	32,0 g	32,7 g
Skład aminokwasowy:	Lizyna – 9,0 g; metionina + cysteina – 6,3 g; tryptofan – 2,0 g; treonina – 6,0 g; izoleucyna – 6,0 g; leucyna – 12,0 g; walina – 8,0 g; histydyna – 4,0 g; arginina – 10,0 g; fenyloalanina + tyrozyna – 12,5 g; betaina – 17,0 g	Lizyna – 12,5 g; metionina + cysteina – 6,13 g; tryptofan – 2,07 g; treonina – 7,54 g; izoleucyna – 3,68 g; leucyna – 13,4 g; walina – 8,29 g; histydyna – 5,10 g; arginina – 9,33 g; fenyloalanina + tyrozyna – 6,74 g; betaina – nie podano
Kwas linolowy	nie podano	50,8 mg

Pasza Labofeed B (LSM) – pasza bytowa (standardowa), granulowana, przeznaczona dla dorosłych szczurów laboratoryjnych, zgodna z zaleceniami National Research Council w zakresie Nutrient Requirements of Laboratory Animals.

Pasza Labofeed B 61% tłuszczu – pasza doświadczalna, w postaci półstałej, o zwiększonej zawartości tłuszczu i kaloryczności.

Producent: Wytwórnia Pasz i Koncentratów „Morawski”, Polska.

III.4. STATYSTYCZNA OCENA WYNIKÓW

Obliczenia statystyczne przeprowadzono z zastosowaniem programu STATISTICA (wersja 12) na licencji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Wartości zmiennych podane w rozdziale IV. wyrażono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe z podaniem mediany.

Normalność rozkładu badano testem Shapiro-Wilka.

Dane, które spełniały założenia normalności rozkładu i jednorodności wariancji w obrębie grup porównywano wykorzystując testy parametryczne (ANOVA), natomiast pozostałe dane porównywano wykorzystując testy nieparametryczne (ANOVA Kruskala-Wallis).

Porównanie dwu grup zmiennych przeprowadzono odpowiednio testem t-Studenta lub testem Manna-Whitneya.

Przeprowadzono także analizę kowariancji (ANCOVA) w celu potwierdzenia/wykluczenia, że podawany lek wywiera niezależny wpływ na obserwowane różnice między badanymi grupami.

Oceniono także korelacje pomiędzy wybranymi parametrami wyrównania metabolicznego cukrzycy, parametrami odzwierciedlającymi czynność komórek β wysp trzustki i wskaźnikiem insulinooporności obwodowej, a ekspresją wybranych czynników związanych z patomechanizmem przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2 wykorzystując nieparametryczny test Spearmana.

Za znamienne statystycznie przyjęto wartości dla $p \leq 0,05$. Przedział ufności dla pozyskanych wyników wynosi zatem 95%.

IV. WYNIKI

IV.1. CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA BADANYCH GRUP

Masy ciała zwierząt, zarówno masa ciała mierzona przed rozpoczęciem eksperymentu oraz mierzona po zakończeniu podawania karmy wysokotłuszczowej, nie różniły się istotnie pomiędzy grupami (tabela 4).

Wartości glikemii na czczo oraz glikemii mierzonej po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą (odpowiednik glikemii poposiłkowej) spełniały założone w metodyce pracy kryteria, a mianowicie: wyniki testu dożołądkowego obciążenia glukozą wykonanego przed rozpoczęciem eksperymentu wskazywały na brak zaburzeń w zakresie gospodarki węglowodanowej we wszystkich badanych grupach; natomiast wyniki testu przeprowadzonego po zakończeniu wstępnej fazy eksperymentu (indukcja cukrzycy w dwu grupach) ujawniły średnią glikemię na czczo > 126 mg/dl i/lub glikemię mierzoną po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą > 140 mg/dl w grupach D i C (tabela 5).

Stężenie HbA_{1c} w grupie zwierząt otrzymujących dapagliflozynę było zbliżone do stężenia u zwierząt w grupie kontrolnej, natomiast u zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo* stężenie HbA_{1c} było znamienne wyższe niż w grupie kontrolnej. Glikemia na czczo oceniana na zakończenie eksperymentu była wyższa w grupie C w porównaniu do grupy otrzymującej dapagliflozynę i w porównaniu do grupy K. Natomiast glikemia mierzona po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą na zakończenie eksperymentu była zbliżona w grupach D i K, a w grupie C istotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (tabela 4).

Nie stwierdzono różnic w zakresie stężenia peptydu C w surowicy pomiędzy grupami badanych zwierząt, natomiast wskaźnik HOMA_{IR} przyjmował najwyższe wartości w grupie C i różniły się one znamienne od wskaźników wyliczonych dla grup D i K. Wskaźnik HOMA_{IR} był zbliżony w tych grupach (tabela 4).

Tabela 4. Charakterystyka ogólna badanych grup

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
Masa ciała przed rozpoczęciem podawania karmy wysokotłuszczowej w grupach D i C [g]	226,67 ± 28,07 (230,00)	238,33 ± 13,37 (235,00)	238,67 ± 22,64 (250,00)
Masa ciała po zakończeniu podawania karmy wysokotłuszczowej w grupach D i C [g]	560,00 ± 66,06 (580,00)	568,33 ± 44,48 (555,00)	564,67 ± 36,23 (570,00)
Stężenie HbA _{1c} [%]	4,02 ± 0,47 (3,90)	4,83 ± 1,53 ^Z (4,35)	3,80 ± 0,20 (3,80)
Glikemia na czczo oceniana na zakończenie eksperymentu [mg/dl]	100,58 ± 30,39 (106,50)	165,75 ± 15,12 ^X (163,00)	77,00 ± 19,24 (67,50)
Glikemia mierzona po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą na zakończenie eksperymentu [mg/dl]	125,17 ± 23,77 (119,50)	185,25 ± 87,18 ^Z (160,00)	113,79 ± 13,06 (112,50)
Stężenie peptydu C w surowicy [ng/ml]	1,25 ± 0,49 (1,29)	1,36 ± 0,52 (1,28)	1,72 ± 0,70 (1,62)
Wskaźnik HOMA _{IR}	1,98 ± 1,04 (1,85)	3,11 ± 0,75 ^X (2,97)	1,27 ± 0,33 (1,25)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallisa

^X – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

^Z – różnica znamionna względem grupy K ($p \leq 0,05$)

Tabela 5. Wyniki testu dozoładowego obciążenia glukozą w badanych grupach

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
Przed rozpoczęciem eksperymentu			
Glikemia na czczo [mg/dl]	116,58 ± 16,51 (114,50)	117,25 ± 7,10 (118,50)	114,87 ± 8,57 (117,00)
Glikemia mierzona po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą [mg/dl]	105,42 ± 10,56 (101,00)	121,17 ± 16,74 (123,50)	106,60 ± 12,59 (107,00)
Po indukcji cukrzycy typu 2 w grupach D i C			
Glikemia na czczo [mg/dl]	157,67 ± 55,71 (143,00)	185,83 ± 95,24 (159,50)	96,47 ± 9,58 (97,00)
Glikemia mierzona po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą [mg/dl]	253,08 ± 119,03 (212,50)	286,08 ± 98,13 (279,50)	114,80 ± 22,06 (113,00)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

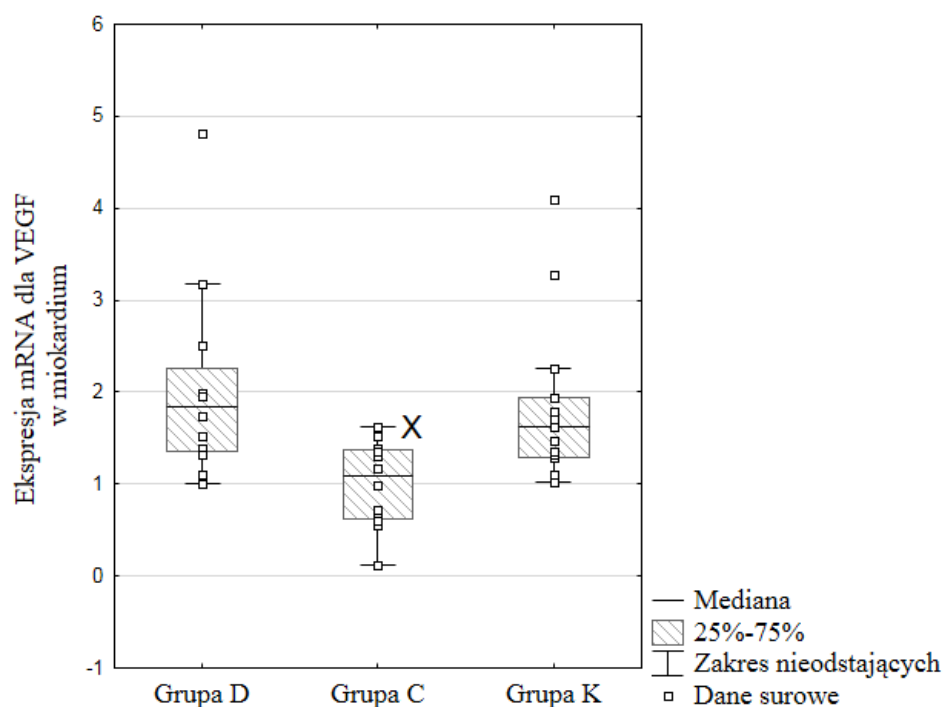
Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

IV.2. STĘŻENIE VEGF W SUROWICY ORAZ EKSPRESJA mRNA DLA CZYNNIKÓW ANGIOGENNYCH ZWIĄZANYCH Z VEGF W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH

Stężenie VEGF w surowicy nie różniło się pomiędzy poszczególnymi grupami (tabela 6a).

Ekspresja mRNA dla VEGF w **mięśniu sercowym** w grupie otrzymującej dapagliflozynę była podobna do obserwowanej w grupie bez cukrzycy. Jednocześnie ekspresja mRNA dla VEGF w miokardium u zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo* była znacząco niższa w porównaniu zarówno do grupy D, jak i do K (tabela 6b, rycina 6).



Rycina 6. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF w miokardium w badanych grupach

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

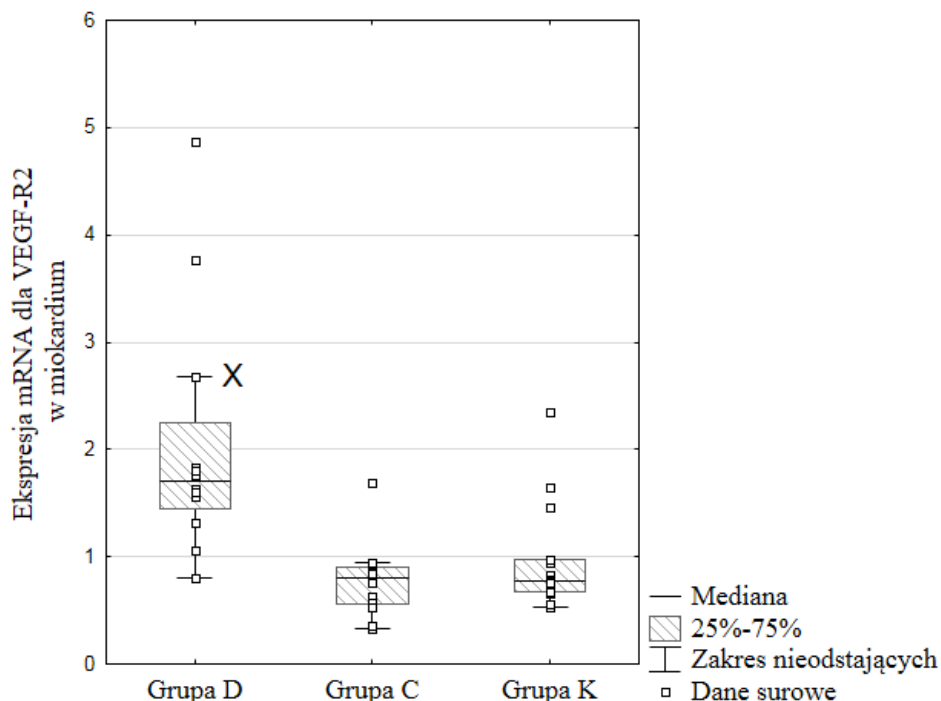
Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa

^x – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

Stosując test ANCOVA, w którym zmienną zależną była ekspresja VEGF w mięśniu sercowym, a zmiennymi niezależnymi były HbA_{1c}, HOMA_{IR} i stężenie peptydu C w surowicy, wykazano, że jedynym czynnikiem determinującym obserwowane różnice w ekspresji mRNA dla VEGF w tej tkance były substancje, którą otrzymywały zwierzęta z poszczególnych grup (tabela 10a).

Nie występowały różnice pomiędzy grupami w zakresie ekspresji mRNA dla receptora 1 dla VEGF w mięśniu sercowym. Natomiast ekspresja mRNA dla receptora 2 dla VEGF w tej samej tkance była znacznie wyższa w grupie otrzymującej dapagliflozynę, zarówno w odniesieniu do grupy z cukrzycą otrzymującej *placebo*, jak też w porównaniu do grupy bez cukrzycy (tabela 6b, rycina 7).



Rycina 7. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF-R2 w miokardium w badanych grupach

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

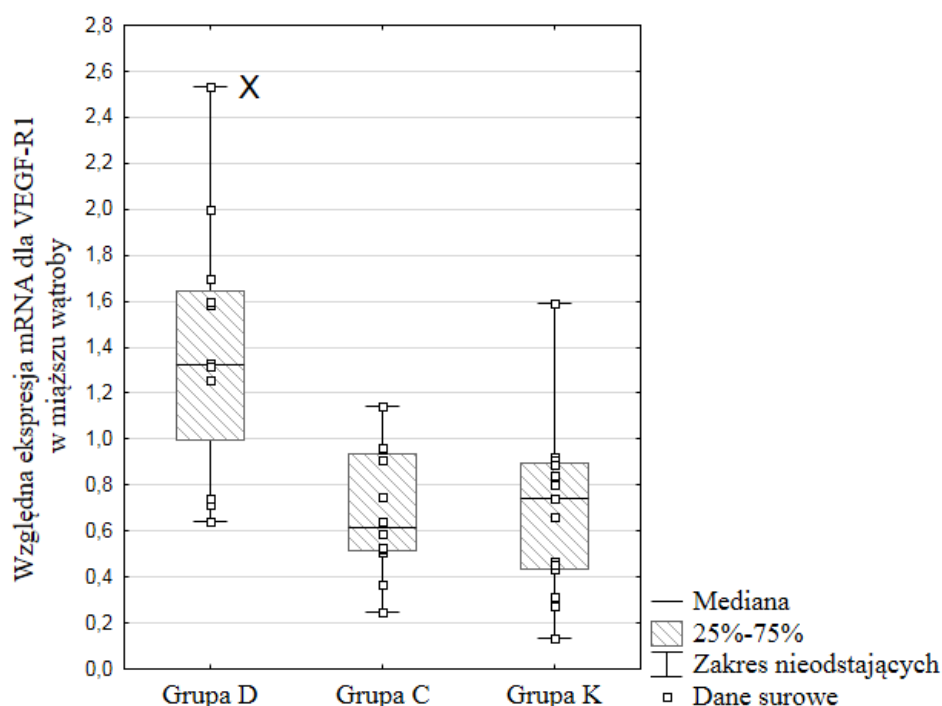
Stosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa

^x – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

Test ANCOVA z zastosowaniem modelu, w którym zmiennymi niezależnymi były HbA_{1c}, HOMA_{IR} i stężenie peptydu C lub modelu uwzględniającego glikemię na czczo, glikemię ocenianą po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą, HOMA_{IR} i stężenie peptydu C jako zmienne niezależne, potwierdził, że czynnikiem decydującym o wystąpieniu obserwowanych różnic w zakresie ekspresji mRNA dla VEGF-R2 w miokardium była przede wszystkim podawana substancja, jak też stężenie peptydu C w surowicy (tabela 10b).

W grupie otrzymującej dapagliflozynę zanotowano wyższą ekspresję mRNA dla VEGF oraz dla VEGF-R2 w **ścianie aorty** w porównaniu do grupy bez cukrzycy, natomiast ekspresja mRNA dla VEGF-R1 w tej strukturze w grupie D była niższa niż w grupie K. Jednocześnie ekspresja wszystkich wspomnianych wyżej czynników w ścianie aorty w grupie zwierząt otrzymujących dapagliflozynę kształtowała się podobnie jak w grupie zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo* (tabela 6c).

Ekspresja mRNA dla VEGF oraz ekspresja mRNA dla VEGF-R2 w **wątrobie** były porównywalne we wszystkich badanych grupach. Natomiast ekspresja mRNA dla VEGF-R1 w wątrobie w grupie otrzymującej dapagliflozynę była znacząco wyższa w porównaniu do grupy C, jak i do K (tabela 6d, rycina 8).



Rycina 8. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF-R1 w mięszu wątroby w badanych grupach

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

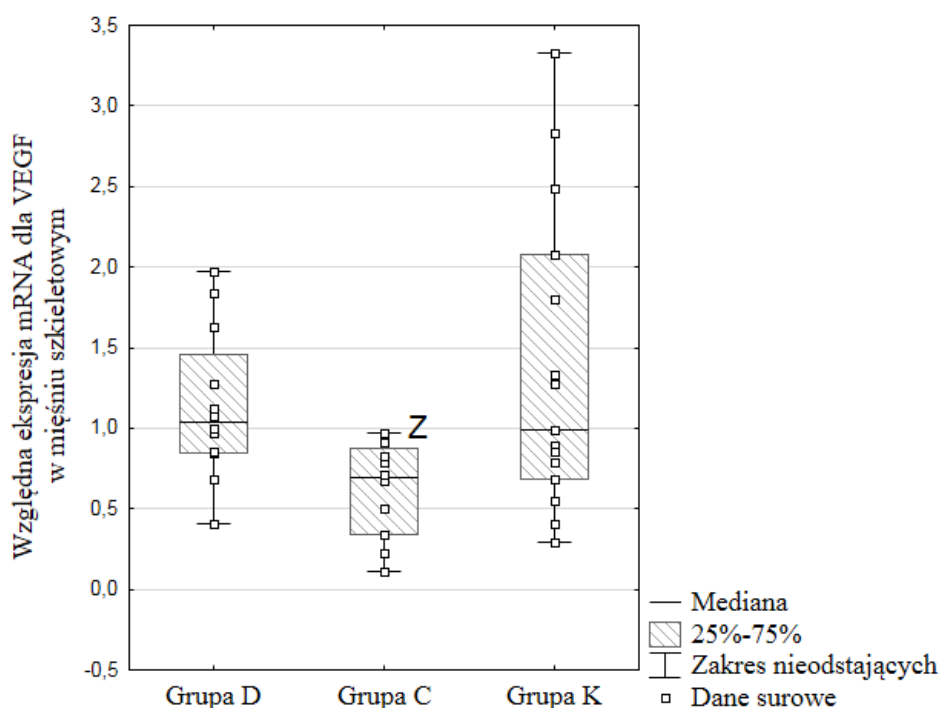
Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test Scheffégo (ANOVA)

^x – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

Testy ANCOVA uwzględniające jako zmienne niezależne HbA_{1c}, HOMA_{IR} i stężenie peptydu C lub glikemię na czczo, glikemię ocenianą po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą, HOMA_{IR} i stężenie peptydu C potwierdziły, że stosowanie dapagliflozyny w grupie D było jedynym czynnikiem determinującym ekspresję mRNA dla VEGF-R1 w wątrobie (tabela 10c).

W **mięśniach szkieletowych** zaobserwowano obniżoną ekspresję mRNA dla VEGF w grupie zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo*. Grupy D i K nie różniły się pod tym względem między sobą (tabela 6e, rycina 9).



Rycina 9. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF w mięśniu szkieletowym w badanych grupach

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test Scheffégo (ANOVA)

^Z – różnica znamionna względem grupy K ($p \leq 0,05$)

Analiza kowariancji nie potwierdziła jednak znaczenia podawanej substancji dla istnienia różnic pomiędzy grupami.

Ekspresja mRNA dla receptorów 1 i 2 dla VEGF w mięśniach szkieletowych nie różniła się znamionnie pomiędzy grupami (tabela 6e).

Tabela 6a-e. Stężenie VEGF w surowicy oraz ekspresja czynników angiogennych związanych z VEGF w wybranych tkankach w poszczególnych grupach

Tabela 6a. Stężenie VEGF w surowicy

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
Stężenie VEGF w surowicy [pg/ml]	42,78 ± 5,16 (42,22)	44,04 ± 4,73 (43,63)	46,41 ± 5,09 (46,29)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test ANOVA

Tabela 6b. Względna ekspresja mRNA dla VEGF, dla VEGF-R1 i dla VEGF-R2 w miokardium

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
mRNA dla VEGF	2,04 ± 1,07 (1,84)	1,00 ± 0,47 ^x (1,08)	1,80 ± 0,85 (1,63)
mRNA dla VEGF-R1	2,57 ± 2,54 (1,44)	2,33 ± 2,77 (1,08)	1,44 ± 1,43 (0,94)
mRNA dla VEGF-R2	2,06 ± 1,17 ^x (1,70)	0,78 ± 0,36 (0,80)	0,96 ± 0,49 (0,78)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallis

^x – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

Tabela 6c. Względna ekspresja mRNA dla VEGF, dla VEGF-R1 i dla VEGF-R2 w ścianie aorty

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
mRNA dla VEGF	0,89 ± 0,86 ^Z (0,45)	1,57 ± 1,45 ^Z (1,25)	0,13 ± 0,07 (0,13)
mRNA dla VEGF-R1	0,58 ± 0,43 ^Z (0,55)	0,06 ± 0,07 ^Z (0,04)	2,11 ± 0,34 (2,00)
mRNA dla VEGF-R2	3,33 ± 1,18 ^Z (3,16)	4,00 ± 1,98 ^Z (4,44)	1,40 ± 0,78 (1,35)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallisa

^Z – różnica znamionna względem grupy K ($p \leq 0,05$)

Tabela 6d. Względna ekspresja mRNA dla VEGF, dla VEGF-R1 i dla VEGF-R2 w miększu wątroby

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
mRNA dla VEGF	1,97 ± 0,65 (1,89)	2,24 ± 0,65 (2,06)	1,88 ± 0,55 (1,90)
mRNA dla VEGF-R1	1,39 ± 0,55 ^X (1,33)	0,68 ± 0,27 (0,61)	0,69 ± 0,36 (0,74)
mRNA dla VEGF-R2	2,21 ± 0,81 (2,11)	2,10 ± 0,67 (1,94)	2,42 ± 1,06 (2,03)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallisa

^X – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

Tabela 6e. Względna ekspresja mRNA dla VEGF, dla VEGF-R1 i dla VEGF-R2 w mięśniu szkieletowym

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
mRNA dla VEGF	1,14 ± 0,47 (1,04)	0,61 ± 0,30 ^Z (0,69)	1,37 ± 0,93 (0,99)
mRNA dla VEGF-R1	1,66 ± 1,27 (1,19)	1,05 ± 0,76 (0,85)	1,03 ± 0,79 (0,55)
mRNA dla VEGF-R2	0,44 ± 0,32 (0,35)	0,46 ± 0,39 (0,31)	0,48 ± 0,22 (0,46)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

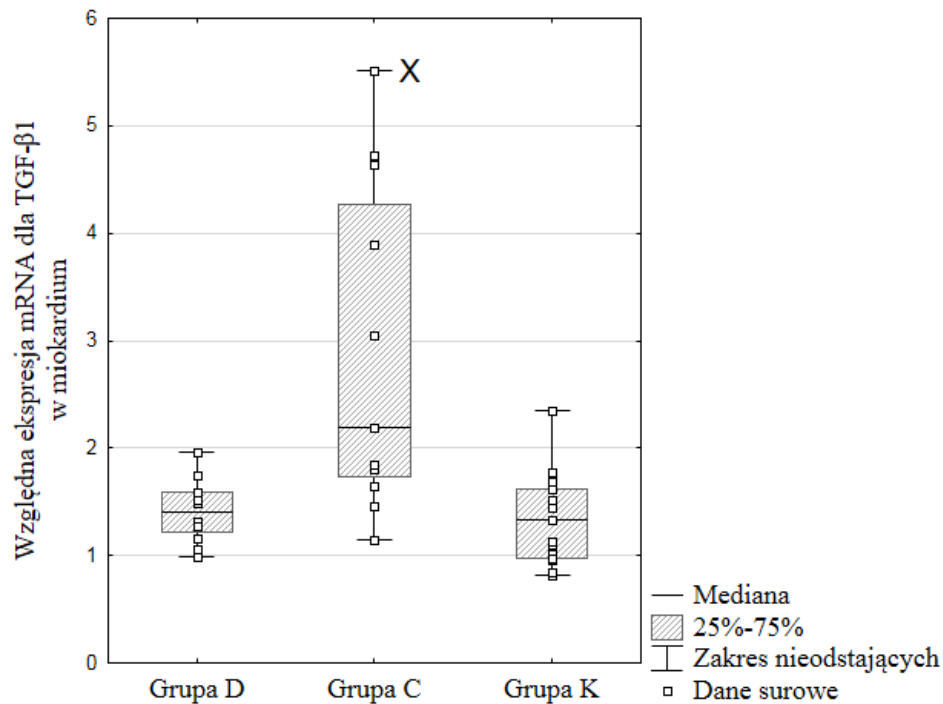
Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallisa

^Z – różnica znamienna względem grupy K ($p \leq 0,05$)

IV.3. STĘŻENIE TGF- β 1 W SUROWICY ORAZ EKSPRESJA mRNA DLA TGF- β 1 W TKANKACH W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH

Stężenie TGF- β 1 we krwi nie różniło się pomiędzy poszczególnymi grupami (tabela 7).

Ekspresja mRNA dla TGF- β 1 w **mięśniu sercowym** oraz w **wątrobie** była zbliżona w grupach D i K i znacznie niższa w obu tych grupach niż w grupie C (tabela 7, rycina 10 i 11).



Rycina 10. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w miokardium w badanych grupach

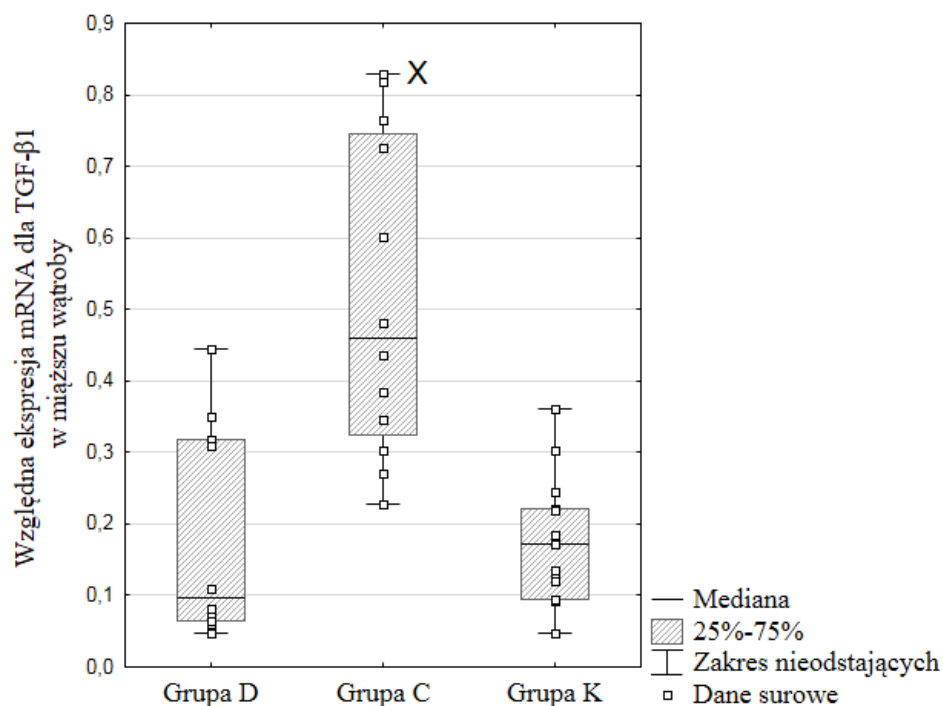
Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test Scheffégo (ANOVA)

^x – różnica znamienna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)



Rycina 11. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w mięszu wątroby w badanych grupach

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa

^x – różnica znamienna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

Test ANCOVA z zastosowaniem modelu, w którym zmiennymi niezależnymi były HbA_{1c}, HOMA_{IR} i stężenie peptydu C potwierdził znaczenie stosowania dapagliflozyny dla wystąpienia wspomnianych różnic w zakresie ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w wątrobie (tabela 10e). W odniesieniu do różnic ekspresji TGF- β 1 zaobserwowanych w mięśniu sercowym, wyniki testu ANCOVA także pozwoliły wskazać podawaną substancję, jako czynnik determinujący różnice pomiędzy grupami. Jednakże na pojawienie się tych różnic miały też wpływ wartości HbA_{1c} i stężenie peptydu C w surowicy (tabela 10d).

Nie stwierdzono różnic w odniesieniu do ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w **ścianie aorty** oraz w **mięśniach szkieletowych** (tabela 7).

Tabela 7. Stężenie TGF-β1 w surowicy oraz ekspresja mRNA dla TGF-β1 w wybranych tkankach w poszczególnych grupach

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
Stężenie TGF-β1 w surowicy [ng/ml]	76,40 ± 25,62 (79,82)	70,75 ± 22,89 (70,56)	91,96 ± 33,43 (89,13)
Względna ekspresja mRNA dla TGF-β1 w miokardium	1,42 ± 0,28 (1,41)	2,84 ± 1,48 ^x (2,19)	1,34 ± 0,42 (1,33)
Względna ekspresja mRNA dla TGF-β1 w ścianie aorty	0,93 ± 0,33 (0,89)	0,90 ± 0,33 (0,90)	1,01 ± 0,41 (1,02)
Względna ekspresja mRNA dla TGF-β1 w mięszu wątroby	0,19 ± 0,15 (0,10)	0,52 ± 0,22 ^x (0,46)	0,17 ± 0,09 (0,17)
Względna ekspresja mRNA dla TGF-β1 w mięśniu szkieletowym	0,84 ± 0,23 (0,80)	0,78 ± 0,44 (0,58)	0,79 ± 0,30 (0,74)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

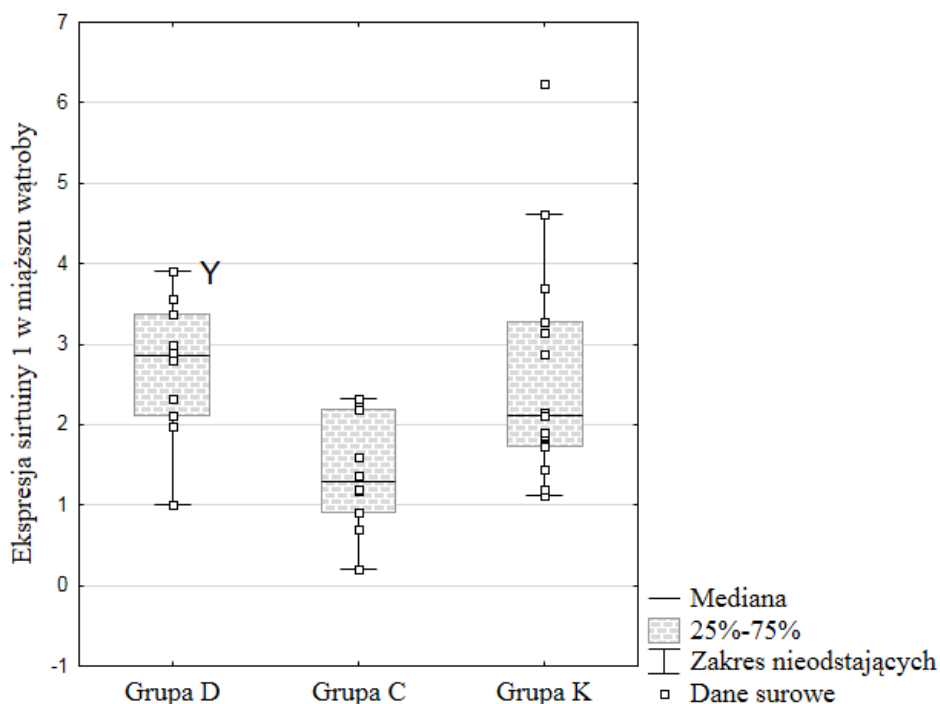
Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallis

^x – różnica znamienna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

IV.4. EKSPRESJA SIRTUINY 1 W TKANKACH W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH

Ekspresja sirtuiny 1 oceniana w **mięśniu sercowym**, w **aorcie** oraz w **mięśniach szkieletowych** nie wykazywała różnic pomiędzy badanymi grupami. W **wątrobie** ekspresja sirtuiny 1 w grupie otrzymującej dapagliflozynę była porównywalna z grupą bez cukrzycy, a w grupie z cukrzycą otrzymującej *placebo* była ona **znamiennie niższa** (tabela 8, rycina 12).



Rycina 12. Porównanie względnej ekspresji sirtuiny 1 w mięszu wątroby w badanych grupach

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa

^Y – różnica znamienna względem grupy C ($p \leq 0,05$)

Stosując analizę kowariancji uwzględniającą model, w którym zmiennymi niezależnymi były HbA_{1c}, HOMA_{IR} i stężenie peptydu C udowodniono, że podawanie dapagliflozyny miało najistotniejszy i niezależny od pozostałych czynników wpływ na pojawienie się różnic w ekspresji sirtuiny 1 w wątrobie (tabela 10f).

Tabela 8. Ekspresja sirtuiny 1 w poszczególnych grupach

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
Względna ekspresja białka sirtuiny 1 w miokardium	0,43 ± 0,25 (0,43)	0,38 ± 0,26 (0,37)	0,36 ± 0,29 (0,32)
Względna ekspresja białka sirtuiny 1 w aorcie	0,05 ± 0,04 (0,04)	0,24 ± 0,27 (0,09)	0,06 ± 0,03 (0,07)
Względna ekspresja białka sirtuiny 1 w miększu wątroby	2,70 ± 0,86 ^Y (2,85)	1,40 ± 0,71 (1,29)	2,61 ± 1,41 (2,12)
Względna ekspresja białka sirtuiny 1 w mięksniu szkieletowym	0,10 ± 0,12 (0,04)	0,13 ± 0,16 (0,06)	0,06 ± 0,03 (0,07)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

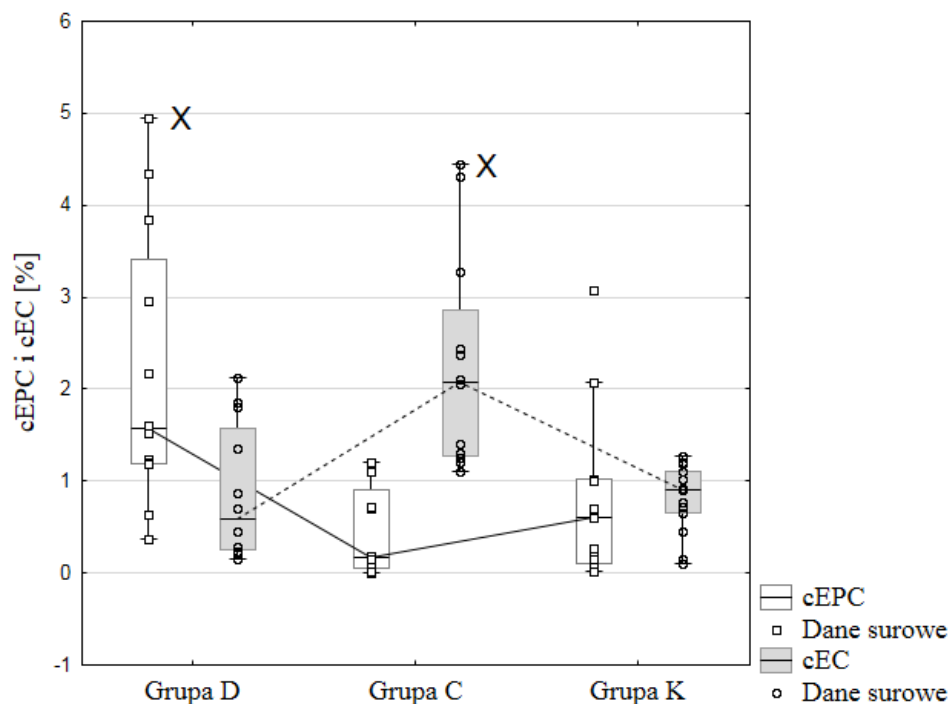
Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallisa

^Y – różnica znamienna względem grupy C ($p \leq 0,05$)

IV.5. DYSTRYBUCJA KRAŻĄCYCH KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA I KRAŻĄCYCH PROGENITOROWYCH KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA WE KRWI W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH

Odsetek **cEPC** we krwi w grupie D był znacząco wyższy w porównaniu do grupy C, jak również w porównaniu do grupy K. Liczebność **cEC** we krwi w grupie otrzymującej dapagliflozynę była niższa niż w grupie z cukrzycą otrzymującej *placebo* i porównywalna z obserwowaną w grupie bez cukrzycy (tabela 9, rycina 13).



Rycina 13. Porównanie odsetka krążących komórek śródbłonna i progenitorowych komórek śródbłonna pomiędzy grupami

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa

^x – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

Tabela 9. Wybrane markery stanu śródbłónka w poszczególnych grupach

Grupa badana	Grupa D średnia ± SD (mediana)	Grupa C średnia ± SD (mediana)	Grupa K średnia ± SD (mediana)
Odsetek progenitorowych komórek śródbłónka we krwi [%]	2,17 ± 1,51 ^x (1,57)	0,46 ± 0,49 (0,18)	0,81 ± 0,92 (0,60)
Odsetek komórek śródbłónka we krwi [%]	0,88 ± 0,72 (0,58)	2,27 ± 1,18 ^x (2,08)	0,81 ± 0,35 (0,91)

Grupa D – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące dapagliflozynę

Grupa C – zwierzęta z wyindukowaną cukrzycą otrzymujące *placebo*

Grupa K – zwierzęta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej otrzymujące *placebo*

Stosowano odpowiednio testy ANOVA lub ANOVA Kruskala-Wallisa

^x – różnica znamionna względem pozostałych grup ($p \leq 0,05$)

W odniesieniu do odsetka cEPC analiza kowariancji wykazała, że tylko stosowanie określonej substancji, a nie czynniki takie jak glikemia na czczo, glikemia oceniania po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą, HbA_{1c}, HOMA_{IR} czy też stężenie peptydu C, miało wpływ na obserwowane zmiany dystrybucji tych komórek we krwi (tabela 10g). Natomiast różnice odsetkowe cEC pomiędzy poszczególnymi grupami nie zostały potwierdzone testem ANCOVA.

Tabela 10a-g. Wyniki analizy kowariancji, w której zmiennymi zależnymi były badane wykładniki wczesnej aterogenezy i makroangiopatii, a zmienne niezależne stanowiły: 1) HbA_{1c} HOMA_{IR}, stężenie peptydu C; lub 2) glikemia oceniana na czczo i po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą, HOMA_{IR}, stężenie peptydu C

Tabela 10a.		Zmienna zależna: ekspresja mRNA dla VEGF w miokardium			
Zmienne niezależne	F	p	Zmienne niezależne	F	p
HbA _{1c}	1,50	0,23	Glikemia 0h	0,19	0,66
HOMA _{IR}	0,20	0,66	Glikemia 1h	0,07	0,80
Stężenie peptydu C	0,81	0,38	HOMA _{IR}	0,02	0,89
Podawana substancja	3,55	0,04 *	Stężenie peptydu C	0,80	0,38
			Podawana substancja	2,31	0,12

Glikemia 0h – glikemia oceniana na czczo

Glikemia 1h – glikemia oceniana po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą

* Wartość znamiennej statystycznie ($p \leq 0,05$)

Tabela 10b.		Zmienna zależna: ekspresja mRNA dla VEGF-R2 w miokardium			
Zmienne niezależne	F	p	Zmienne niezależne	F	p
HbA _{1c}	2,97	0,09	Glikemia 0h	3,83	0,06
HOMA _{IR}	2,63	0,11	Glikemia 1h	0,09	0,77
Stężenie peptydu C	4,20	0,05 *	HOMA _{IR}	0,13	0,72
Podawana substancja	8,98	0,001 *	Stężenie peptydu C	2,56	0,12
			Podawana substancja	7,40	0,002 *

Glikemia 0h – glikemia oceniana na czczo

Glikemia 1h – glikemia oceniana po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą

* Wartość znamiennej statystycznie ($p \leq 0,05$)

Tabela 10c.	Zmienna zależna: ekspresja mRNA dla VEGF-R1 w wątrobie				
Zmienne niezależne	F	p	Zmienne niezależne	F	p
HbA _{1c}	0,72	0,40	Glikemia 0h	1,32	0,26
HOMA _{IR}	0,59	0,45	Glikemia 1h	0,86	0,36
Stężenie peptydu C	0,03	0,87	HOMA _{IR}	0,37	0,54
Podawana substancja	10,58	0,0003 *	Stężenie peptydu C	0,13	0,72
			Podawana substancja	9,31	0,001 *

Glikemia 0h – glikemia oceniana na czczo

Glikemia 1h – glikemia oceniana po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą

* Wartość znamiennej statystycznie ($p \leq 0,05$)

Tabela 10d.	Zmienna zależna: ekspresja mRNA dla TGF- β 1 w miokardium				
Zmienne niezależne	F	p	Zmienne niezależne	F	p
HbA _{1c}	11,83	0,002 *	Glikemia 0h	0,10	0,76
HOMA _{IR}	1,83	0,19	Glikemia 1h	0,82	0,37
Stężenie peptydu C	8,60	0,01 *	HOMA _{IR}	0,18	0,67
Podawana substancja	11,54	0,0002 *	Stężenie peptydu C	6,48	0,02 *
			Podawana substancja	4,07	0,03 *

Glikemia 0h – glikemia oceniana na czczo

Glikemia 1h – glikemia oceniana po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą

* Wartość znamiennej statystycznie ($p \leq 0,05$)

Tabela 10e.	Zmienna zależna: ekspresja mRNA dla TGF- β 1 w mięszu wątroby				
Zmienne niezależne	F	p	Zmienne niezależne	F	p
HbA _{1c}	3,07	0,09	Glikemia 0h	0,62	0,44
HOMA _{IR}	0,63	0,43	Glikemia 1h	6,31	0,02 *
Stężenie peptydu C	1,42	0,24	HOMA _{IR}	0,00	0,96
Podawana substancja	9,44	0,001 *	Stężenie peptydu C	1,21	0,28
			Podawana substancja	1,39	0,27

Glikemia 0h – glikemia oceniana na czczo

Glikemia 1h – glikemia oceniana po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą

* Wartość znamienna statystycznie ($p \leq 0,05$)

Tabela 10f.	Zmienna zależna: ekspresja białka sirtuiny 1 w mięszu wątroby				
Zmienne niezależne	F	p	Zmienne niezależne	F	p
HbA _{1c}	0,05	0,83	Glikemia 0h	4,39	0,05 *
HOMA _{IR}	0,15	0,70	Glikemia 1h	0,26	0,62
Stężenie peptydu C	0,07	0,80	HOMA _{IR}	1,19	0,28
Podawana substancja	3,46	0,05 *	Stężenie peptydu C	0,46	0,50
			Podawana substancja	0,32	0,73

Glikemia 0h – glikemia oceniana na czczo

Glikemia 1h – glikemia oceniana po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą

* Wartość znamienna statystycznie ($p \leq 0,05$)

Tabela 10g.

		Zmienna zależna: odsetek cEPC			
Zmienne niezależne	F	p	Zmienne niezależne	F	p
HbA _{1c}	0,28	0,60	Glikemia 0h	0,00	0,99
HOMA _{IR}	0,02	0,88	Glikemia 1h	0,34	0,57
Stężenie peptydu C	0,01	0,93	HOMA _{IR}	0,00	0,95
Podawana substancja	6,91	0,003 *	Stężenie peptydu C	0,01	0,93
			Podawana substancja	3,67	0,04 *

Glikemia 0h – glikemia oceniana na czczo

Glikemia 1h – glikemia oceniana po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą

* Wartość znamiennej statystycznie ($p \leq 0,05$)

IV.6. ZWIĄZEK POMIĘDZY WYRÓWNANIEM METABOLICZNYM CUKRZYCY, CZYNNIĄ KOMÓREK β WYSP TRZUSTKI I NASILENIEM INSULINOPORNOŚCI OBWODOWEJ A EKSPRESJĄ BADANYCH CZYNNIKÓW ZWIĄZANYCH Z PATOGENEZĄ PRZEWLEKŁYCH POWIKŁAŃ CUKRZYCY

Zbadano czy istnieją jakiegokolwiek korelacje pomiędzy wykładnikami wyrównania cukrzycy i parametrami charakteryzującymi jej przebieg a czynnikami związanymi z VEGF, TGF- β 1, sirtuiną 1, cEPC, cEC.

Wykazano ujemną korelację pomiędzy glikemią na czczo a ekspresją mRNA dla VEGF w miokardium [$r = (-0,45)$] oraz ujemną korelację pomiędzy stężeniem peptydu C w surowicy a ekspresją mRNA dla VEGF-R1 w miokardium [$r = (-0,44)$].

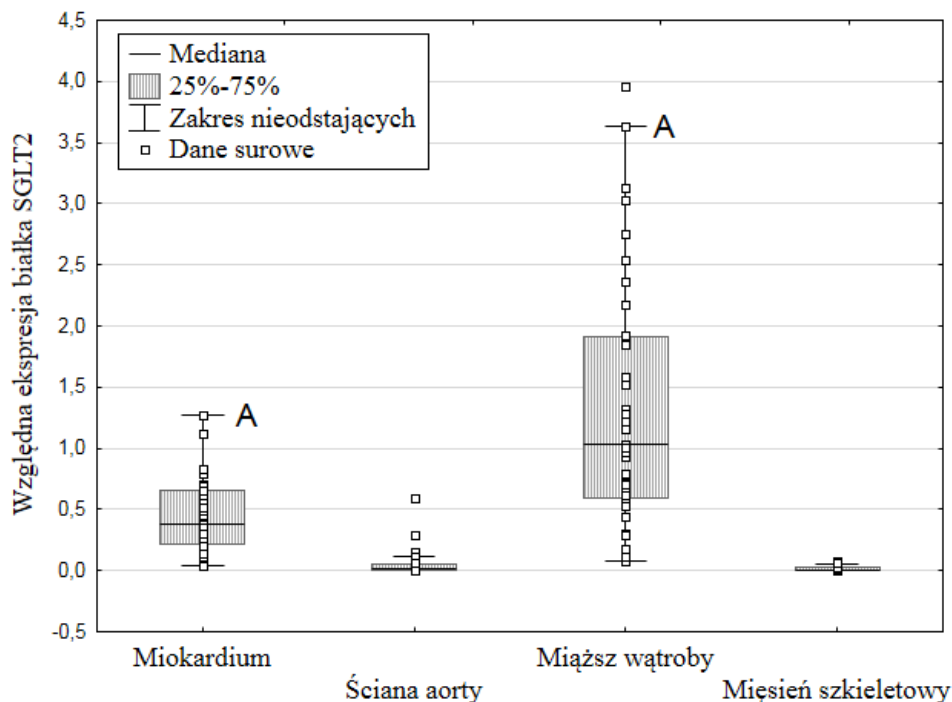
Ponadto stwierdzono, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy glikemią na czczo a ekspresją mRNA dla TGF- β 1 w miokardium ($r=0,42$); pomiędzy glikemią na czczo ($r=0,69$), glikemią oznaczaną po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą ($r=0,56$), HbA_{1c} ($r=0,49$) i wskaźnikiem HOMA_{IR} ($r=0,43$), a ekspresją TGF- β 1 w wątrobie.

Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem HbA_{1c} a ekspresją sirtuiny 1 w ścianie aorty ($r=0,42$) i ujemną korelację pomiędzy glikemią na czczo a ekspresją białka sirtuiny 1 w miększu wątroby ($r=(-0,51)$).

Stwierdzono również, że wyższe wartości wskaźnika HOMA_{IR} ($r=0,52$) oraz glikemii oznaczonej po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą ($r=0,49$) współlistnieją ze wzrostem odsetka cEC.

IV.7. EKSPRESJA KOTRANSPORTERA SGLT2 W RÓŻNYCH TKANKACH

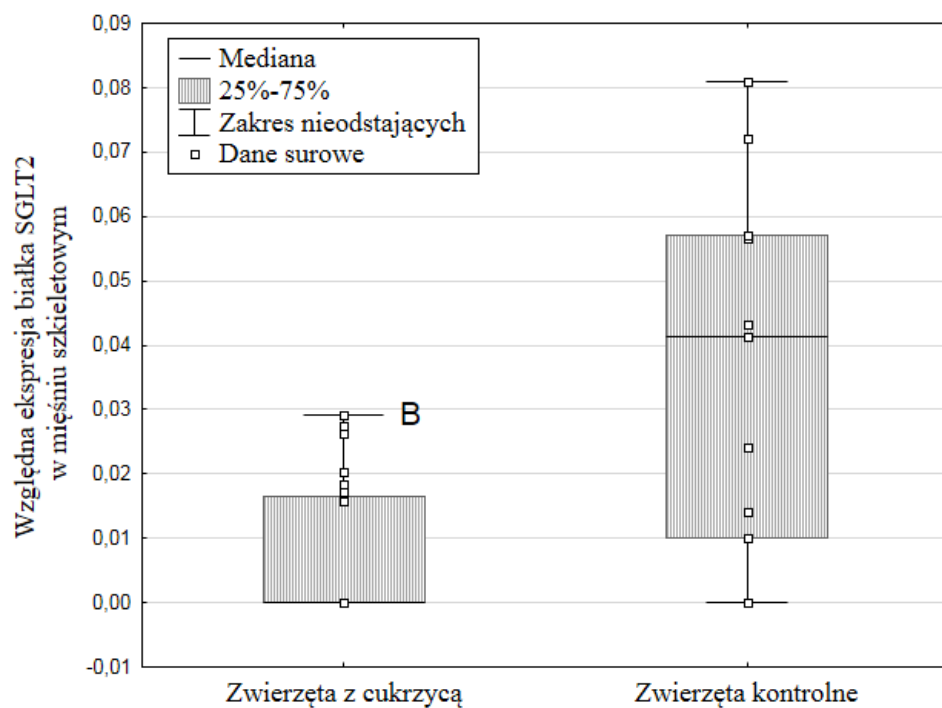
Biorąc pod uwagę wszystkie zwierzęta łącznie zaobserwowano różnice w zakresie dystrybucji kotransportera SGLT2 pomiędzy tkankami. Ekspresja SGLT2 w miokardium i w wątrobie była znacznie wyższa w porównaniu do ekspresji SGLT2 w aorcie, jak też w mięśni szkieletowym (rycina 14).



Rycina 14. Porównanie względnej ekspresji SGLT2 pomiędzy różnymi tkankami dla wszystkich grup traktowanych łącznie

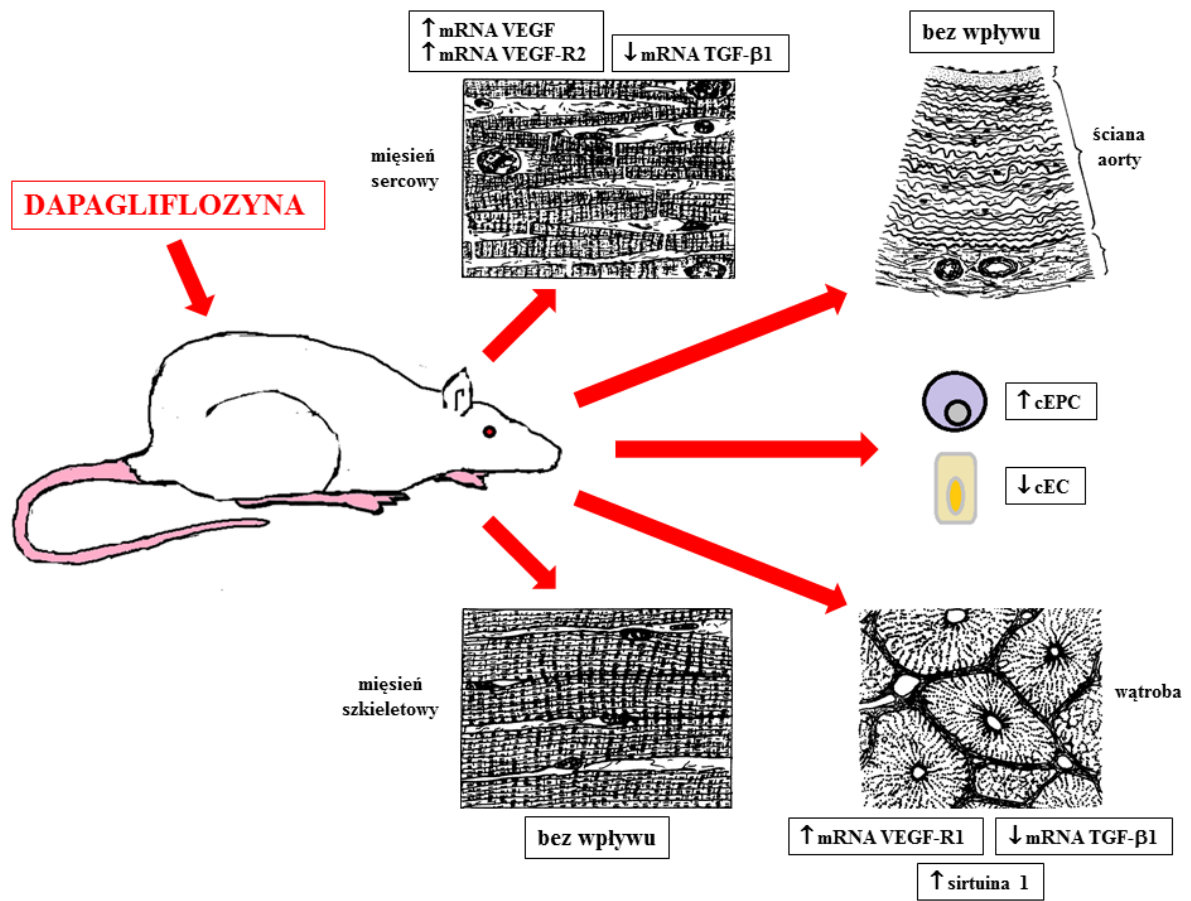
^A Różnica znamionna statystycznie wobec ekspresji obserwowanej w ścianie aorty i w mięśniach szkieletowych dla $p \leq 0,05$ (ANOVA Kruskala-Wallis)

W wyniku porównania ekspresji SGLT2 u zwierząt z cukrzycą (traktowanych jako jedna wspólna grupa) z grupą zwierząt bez cukrzycy stwierdzono, że współistnienie cukrzycy nie wpływa istotnie na ekspresję SGLT2 we wszystkich badanych tkankach z wyjątkiem mięśni szkieletowych. Wykazano, że ekspresja SGLT2 w tej tkance jest znacznie mniejsza u zwierząt z cukrzycą (rycina 15).



Rycina 15. Ekspresja SGLT2 w mięśniu szkieletowym w badanych grupach zwierząt z wyindukowaną cukrzycą typu 2 (traktowanych łącznie) w porównaniu do grupy kontrolnej

^B Różnica znamionna statystycznie (test U Manna-Whitneya)



Rycina 16. Graficzne streszczenie wyników (schematy tkanek [96])

V. Dyskusja i omówienie wyników

Farmakoterapia cukrzycy stanowi jedną z podstawowych metod leczenia tego schorzenia. W świetle współczesnej wiedzy istotne jest, aby leki stosowane w leczeniu cukrzycy, poza zapewnianiem wyrównania metabolicznego, zmniejszenia nasilenia insulinooporności obwodowej i dysfunkcji komórek β wysp trzustki, jednocześnie zmniejszały ryzyko rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy i ograniczały progresję schorzenia. Inhibitory SGLT2, do których należy dapagliflozyna, znane są jako dobrze tolerowane leki, stosunkowo niedawno wprowadzone do powszechnego stosowania, które pozwalają osiągnąć pożądaną kontrolę cukrzycy niezależnie od stopnia zaburzenia czynności komórek β [23–27,40,42,43]. Progresja cukrzycy typu 2 związana w dużej mierze ze wzrostem insulinooporności obwodowej i rozwojem miażdżycy, stanowi główną przyczynę zgonów i zwiększonej chorobowości wśród pacjentów [4,5,8]. Wykazano dotychczas, że inhibitory SGLT2 mogą stanowić pomocne narzędzie w dążeniu do ograniczenia progresji cukrzycy i jej powikłań. Na podstawie badań epidemiologicznych i klinicznych stwierdzono m.in., że inhibitory SGLT2 obniżają ciśnienie tętnicze, zmniejszają masę ciała, otyłość brzuszna, hiperinsulinemię, albuminurię i stres oksydacyjny [26,28,30,40,43,47]. Aby potwierdzić użyteczność dapagliflozyny pod względem jej korzystnego oddziaływania na przebieg cukrzycy typu 2 niezbędne są jednoznaczne wyniki badań kliniczno-epidemiologicznych, obecnie w toku [3]. Konieczne jest także, a może przede wszystkim, uzyskanie wyników badań podstawowych wyjaśniających na jakiej drodze leki z tej grupy mogą wywierać wpływ na przebieg powikłań cukrzycy i ich rozwój. Patomechanizm przewlekłych powikłań cukrzycy jest bowiem bardzo złożony, szczególnie w zakresie powikłań w obrębie układu sercowo-naczyniowego rozwijających się na podłożu makroangiopatii – odpowiednika zaawansowanej i postępującej miażdżycy.

W niniejszej dysertacji oceniono niektóre z czynników związanych z przebiegiem cukrzycy, jak też czynniki związane z mechanizmem rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych z zastosowaniem zwierzęcego modelu cukrzycy typu 2 oraz zbadano, czy stosowanie dapagliflozyny w jakikolwiek sposób modyfikuje ekspresję tych czynników.

Stężenie VEGF w surowicy i ekspresja czynników związanych z VEGF

Badania na zwierzętach oraz z udziałem ludzi wykazały, że cukrzyca typu 2 zaburza proces angiogenezy w sercu, czyniąc mięsień sercowy podatnym na niedotlenienie i stwarzając warunki dla rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Zwracano uwagę przede wszystkim na zmniejszenie ekspresji mRNA dla VEGF i VEGF-R2 w mięśniu sercowym szczurów, u których wywołano eksperymen-

talny model cukrzycy [63,97]. Mniejsza ekspresja VEGF i jego receptora VEGF-R2 w mięśniu sercowym może stanowić bezpośrednią przyczynę upośledzenia wytwarzania krążenia obocznego w warunkach niedotlenienia i prowadzić do progresji choroby niedokrwiennej serca [97].

Jako zjawisko niekorzystne w tym aspekcie należy postrzegać wzrost ekspresji VEGF-R1 w miokardium. Nieprawidłowy stosunek ekspresji VEGF-R1 do VEGF-R2 może być przyczyną tzw. oporności tkanki na VEGF [61]. VEGF-R1, receptor o silniejszym niż VEGF-R2 powinowactwie do VEGF może znacząco związać ligand dla VEGF-R2, zwłaszcza jeżeli ekspresja VEGF-R1 w mięśniu sercowym się zwiększa, podczas gdy ekspresja VEGF-R2 ulega zmniejszeniu. Wykazano bowiem, że istnieje sprzężenie zwrotne pomiędzy ekspresją VEGF-R1 i VEGF-R2 w tkankach, szczególnie w warunkach niedotlenienia [98]. Należy przy tym podkreślić, że stymulacja VEGF-R1 nie prowadzi do nasilenia angiogenezy, a raczej do jej ograniczenia [59,99].

Na podstawie wyników badań własnych stwierdzono, że u zwierząt z cukrzycą typu 2 ekspresja mRNA dla VEGF w mięśniu sercowym jest obniżona w stosunku do grupy kontrolnej, a podanie dapagliflozyny normalizuje ekspresję mRNA dla VEGF do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej. To oddziaływanie dapagliflozyny jest niezależne od jej wpływu na wyrównanie metaboliczne cukrzycy, insulinooporność obwodową i funkcjonowanie komórek β wysp trzustki.

Co ciekawe, zaobserwowano też, że ekspresję mRNA dla VEGF-R2 zwiększa się pod wpływem dapagliflozyny i jest wyższa nie tylko w porównaniu do zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo*, ale również u zwierząt, u których nie wyindukowano cukrzycy. Stosowanie dapagliflozyny było niewątpliwie czynnikiem determinującym zmiany ekspresji mRNA dla VEGF-R2 w miokardium, niemniej pewne znaczenie należy również przypisać wpływowi czynności komórek β wysp trzustki, ocenianej na podstawie stężenia peptydu C. Warto podkreślić, że stężenie peptydu C u zwierząt z wszystkich badanych grup wskazywało na zachowaną podstawową czynność komórek β wysp trzustki i w związku z tym można przypuszczać, że nie występował znaczący deficyt działania insuliny w tkankach obwodowych. Biorąc pod uwagę fakt, że insulina w odpowiednim, prawidłowym stężeniu jest stymulatorem procesu angiogenezy w sercu [63,100] nie można wykluczyć związku pomiędzy jej wydzielaniem i stężeniem na obwodzie a wykazanim przez nas wpływem stężenia peptydu C na ekspresję mRNA dla VEGF-R2 w mięśniu sercowym.

Badania będące częścią niniejszej dysertacji stanowią jedno z nielicznych źródeł informacji na temat związku między stosowaniem dapagliflozyny, a ekspresją mRNA dla VEGF i VEGF-R1 i R2 w mięśniu sercowym. Wyniki, uzyskane wcześniej przez innych autorów, dotyczą głównie ekspresji mRNA dla VEGF i jego receptorów w sercu w przebiegu cukrzycy i nie są spójne. Sasso i wsp. [101] wykazali wzrost ekspresji mRNA dla VEGF w miokardium zwierząt, u których wywołano cukrzycę typu 2. Jednakże, autorzy ci nie zaobserwowali różnicy w ekspresji mRNA dla

receptorów R1 i R2. Tymczasem Chou i wsp. [63] wykazali zmniejszenie ekspresji mRNA zarówno dla VEGF jak i jego receptorów R1 i R2 w sercu zwierząt z cukrzycą lub z insulinoopornością. Z kolei Ashoff i wsp. [102] badali zjawisko przerzedzenia sieci naczyń kapilarnych w miokardium szczurów, u których wywołano cukrzycę, a następnie poprawę w zakresie unaczynienia mięśnia sercowego po podaniu pioglitazonu. Podobnie, Shida i wsp. [103] zaobserwowali, że w przebiegu cukrzycy zmniejsza się ekspresja mRNA dla VEGF i następuje przerzedzenie sieci naczyń kapilarnych w miokardium szczurzym, natomiast parametry te są korzystnie modyfikowane przez podanie fluwastatyny.

Wyniki uzyskanych badań stanowią być może częściowe wyjaśnienie obserwacji wynikających z dużych badań klinicznych i wskazujących na korzystne działania inhibitorów SGLT2 w zaostrzeniach choroby niedokrwiennej serca [104].

Dla oceny progresji przewlekłych powikłań cukrzycy prowadzących do uszkodzenia układu sercowo-naczyniowego, a przede wszystkim do rozwoju choroby niedokrwiennej serca, istotna może być ocena ekspresji czynników związanych z VEGF nie tylko w mięśniu sercowym, ale również w ścianie naczyń tętniczych.

VEGF obecny w ścianie naczyń tętniczych z zaawansowanymi zmianami miażdżycowymi jest zwykle związany ze wzrostem ryzyka progresji zmian miażdżycowych [54]. Lokalna stymulacja angiogenezy odpowiada bowiem za wzrost blaszki miażdżycowej, a przede wszystkim zwiększa jej podatność na pęknięcie, co jest bezpośrednią przyczyną zaostrzenia przebiegu choroby niedokrwiennej serca pod postacią ostrych zespołów wieńcowych [58,105]. Uważa się, że niestabilność blaszki miażdżycowej wynika w dużej mierze z oddziaływania VEGF na jego receptor R1 [106]. Wrastanie naczyń w obręb blaszki miażdżycowej jest nie tylko przyczyną jej pęknięcia i w konsekwencji zaostrzenia choroby niedokrwiennej serca [107], ale także nowo powstałe naczynia stanowią magistralę transportującą komórki zapalne do ogniska miażdżycowego [108]. Jin i wsp. [109] wykazali także, że ekspresja VEGF-R1 wzrasta po mechanicznym uszkodzeniu naczynia krwionośnego i przyczynia się do remodelingu w obrębie aorty, a Desouza i wsp. [110] zaobserwowali zwiększoną ekspresję VEGF i związane z nią zgrubienie ścian naczyń krwionośnych u zwierząt otyłych lub z cukrzycą w następstwie mechanicznego uszkodzenia tętnicy szyjnej. W świetle tych wyników pożądane byłoby zmniejszenie ekspresji mRNA dla VEGF i jego receptorów w ścianie aorty.

Niestety, wyniki badań własnych jasno pokazały, że stosowanie dapagliflozyny pozostaje bez wpływu na ekspresję zarówno mRNA dla VEGF i VEGF-R2 jak i dla VEGF-R1 w ścianie aorty u zwierząt z cukrzycą.

Niemniej, obserwacje dotyczące wpływu innych leków stosowanych dość powszechnie w leczeniu powikłań cukrzycy, jak na przykład kwasu alfa-liponowego zalecanego w leczeniu neuropatii cukrzycowej, lecz wykazującego też pewne działanie proangiogenne u ludzi [111], nie są zbyt

optymistyczne. Badania przeprowadzone na zwierzętach w podobnych warunkach wykazały niepokojące zwiększenie ekspresji VEGF-R1 i VEGF-R2 w ścianie aorty pod wpływem kwasu alfa-liponowego [112]. Pewien wpływ, niekoniecznie pożądanym, na ekspresję mRNA dla VEGF w ścianie aorty może mieć natomiast insulina, nawet po stosunkowo niedługim okresie stosowania. Kobayashi i wsp. [113] wykazali, że już po tygodniu stosowania, insulina przywraca ekspresję mRNA dla VEGF w aorcie, obniżoną w zwierzęcym modelu cukrzycy. Interesujące, że autorzy tej pracy tłumaczą wzrost ekspresji mRNA dla VEGF jako zjawisko pozytywne, zapobiegające miażdżycy zarostowej tętnic.

Insulinooporność obwodowa jako zjawisko związane z przebiegiem cukrzycy w dużej mierze wpływa na progresję przewlekłych powikłań cukrzycy – zwłaszcza tych o charakterze sercowo-naczyniowym. Nasilenie insulinooporności obwodowej stanowiące integralny element przebiegu cukrzycy typu 2 jest jednym z czynników spustowych dla rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych [14,15].

Wiele uwagi poświęca się w ostatnich latach roli insulinooporności wątrobowej w przebiegu cukrzycy typu 2 i w rozwoju przewlekłych powikłań. Związana z insulinoopornością wątrobową dysfunkcja tego narządu obejmuje m.in. zaburzenia procesu glukoneogenezy oraz przemiany lipidów. Uważa się, że zaburzenia te mogą mieć wpływ na postępujące uszkodzenie miększu wątroby – jej stłuszczenie i/lub zwłóknienie [114]. Nie ulega wątpliwości, że stłuszczenie wątroby, tak powszechne u otyłych pacjentów chorych na cukrzycę typu 2, jest bezpośrednią przyczyną insulinooporności wątrobowej i wszystkich jej konsekwencji [115]. Warto podkreślić, że wśród licznych czynników prowadzących do rozwoju tego zjawiska wymienia się czynniki związane z VEGF. Wcześniej przeprowadzone badania wykazały, że stłuszczenie wątroby współistnieje ze zmianami ekspresji VEGF, VEGF-R1 i VEGF-R2 w tym narządzie. Nie ma jednak zgodności, co do kierunku tych zmian [65].

W badaniach własnych wykazano, że stosowanie dapagliflozyny nie wpływa na zmiany ekspresji mRNA dla VEGF i dla VEGF-R2 w miększu wątroby. Co więcej, nie wykazano różnic w tym zakresie pomiędzy zwierzętami z cukrzycą otrzymującymi *placebo*, a grupą zwierząt bez cukrzycy. Wyniki te są nieco zaskakujące, dlatego że obserwacje innych autorów dotyczące stłuszczenia wątroby, a także niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby, ujawniły zwiększenie stężeń VEGF i jego receptora R2 i związaną z tym nasiloną neowaskularyzację [65]. Sugerowano, że związany ze stłuszczeniem stan zapalny w obrębie narządu, zwiększona produkcja cytokin, jak również fizyczne zwiększenie objętości hepatocytów obciążonych lipidami, stwarza konieczność powstania nowej sieci naczyń krwionośnych, a to związane jest ze zwiększoną ekspresją VEGF i jego receptora R2 [65].

W badaniach własnych wprawdzie nie zaobserwowano wpływu dapagliflozyny na ekspresję VEGF i jego receptora R2, natomiast wykazano zwiększenie ekspresji mRNA dla VEGF-R1 w mięszu wątroby. Pobudzenie VEGF-R1 w mięszu wątroby można postrzegać jako pożądane w przebiegu cukrzycy, ponieważ jest to działanie promujące procesy naprawcze w wątrobie. Wykazano bowiem, że sygnalizacja zachodząca przy udziale VEGF-R1 jest niezbędna do przywrócenia prawidłowego funkcjonowania hepatocytów po ich uszkodzeniu zarówno przez czynnik chemiczny, jak i przez niedotlenienie/reperfuzję [116]. Wyniki zaprezentowane w niniejszej dysertacji dotyczące zmian ekspresji VEGF-R1 w wątrobie pod wpływem podawania dapagliflozyny stanowią jedne z pierwszych obserwacji w tym zakresie.

Zmniejszenie angiogenezy związanej z VEGF w mięśniach szkieletowych prowadzi do przerzedzenia sieci naczyń krwionośnych i rozwoju insulinooporności mięśni szkieletowych [69]. W badaniach własnych zaobserwowano obniżenie ekspresji mRNA dla VEGF w mięśniach szkieletowych w grupie zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo* w stosunku do grupy kontrolnej, podczas gdy grupa otrzymująca dapagliflozynę i grupa kontrolna nie różniły się pod tym względem. Pośrednio świadczyć to może o zwiększeniu insulinowrażliwości mięśni szkieletowych pod wpływem dapagliflozyny na drodze zwiększenia ekspresji mRNA dla VEGF, a zatem o korzystnym wpływie dapagliflozyny także w tym zakresie.

Nieco zaskakujący był też fakt, że w badaniach własnych stężenie VEGF w surowicy nie różniło pomiędzy poszczególnymi grupami. Wcześniej opublikowane obserwacje innych autorów wskazują raczej na zwiększenie stężenia VEGF w surowicy w schorzeniach metabolicznych związanych z insulinoopornością, hiperglikemią, hipercholesterolemią lub nadciśnieniem [117]. Jednakże nie można pominąć doniesień o przeciwstawnych obserwacjach, zbliżonych do prezentowanych w ramach badań własnych – np. Gui i wsp. [118] nie stwierdzili istnienia różnicy w stężeniu VEGF w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 w porównaniu do pacjentów zdrowych.

Stężenie TGF- β 1 w surowicy i jego ekspresja w tkankach

Wzmożenie ekspresji TGF- β 1 w miokardium jest uważane za czynnik inicjujący proces włóknienia, a w konsekwencji – utratę funkcji skurczowej mięśnia sercowego [71]. Z drugiej strony jednak, TGF- β 1 jest postrzegany jako czynnik o działaniu przeciwzapalnym i z tego punktu widzenia wzrost ekspresji TGF- β 1 w miokardium wydaje się być pożądany [70,71].

W badaniach własnych wprawdzie nie stwierdzono różnic w zakresie stężeń TGF- β 1 we krwi pomiędzy badanymi grupami, ale zaobserwowano, że stosowanie dapagliflozyny zmniejsza związaną z cukrzycą nadmierną ekspresję TGF- β 1 w mięśniu sercowym do poziomu obserwowanego u zwierząt bez cukrzycy. Obserwowane różnice w zakresie ekspresji TGF- β 1 w miokardium uwarunkowane były bezpośrednio stosowaniem dapagliflozyny. Wydaje się, że działanie dapagliflozyny, obniżające

ekspresję mRNA dla TGF- β 1 w mięśniu sercowym może być w jakiś sposób związane z jej działaniem hipotensyjnym. Wiadomo bowiem, że ekspresja TGF- β jest pobudzana m.in. przez angiotensynę II. Uważa się, że nasilony proces włóknienia mięśnia sercowego obserwowany w przebiegu nadciśnienia tętniczego jest powiązany właśnie ze zwiększeniem ekspresji TGF- β w tej tkance za pośrednictwem angiotensyny II. Co więcej, normalizacja ciśnienia tętniczego pozostaje w związku z obniżeniem ekspresji TGF- β 1 w sercu [71]. Dlatego też łagodne hipotensyjne działanie dapagliflozyny może stanowić pośrednio o zmniejszeniu ekspresji TGF- β 1 w miokardium w grupie otrzymującej dapagliflozynę w stosunku do grupy zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo*. Wyniki badań własnych w zakresie ekspresji TGF- β 1 w mięśniu sercowym są zbieżne z uzyskanymi przez Jesmin i wsp. [119]. Autorzy ci wykazali zwiększenie ekspresji TGF- β 1 w mięśniu sercowym w zwierzęcym modelu cukrzycy typu 2, oraz potwierdzili, że niekorzystnym zmianom ekspresji można zapobiegać farmakologicznie – w tym przypadku, zastosowanym lekiem była benodypina, bloker kanału wapniowego. Podobnie, Liu i wsp. [120] stwierdzili wzrost ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w mięśniu sercowym w przebiegu cukrzycy i złagodzenie niekorzystnego profilu ekspresji w sercu przez inny lek przeciwcukrzycowy – pioglitazon.

W przebiegu makroangiopatii obserwuje się początkowe obniżenie ekspresji TGF- β 1 w obrębie zmian miażdżycowych, a następnie wzrost do znacznie wyższych poziomów [54]. Wzrost stężenia TGF- β 1 w ścianie naczyń tętniczych w późniejszych etapach rozwoju miażdżycy można rozpatrywać dwojako. Jako czynnik związany z progresją zmian miażdżycowych, z uwagi na jego przejawiające się lokalnie w miejscu powstałego uszkodzenia tkanki działanie prozapalne, związane z pobudzeniem wydzielania przez granulocyty TNF oraz IL-1 i IL-6 [70,71]; ale także jako czynnik zwiększający stabilność blaszek, gdyż wytwarzanie i włóknienie czapeczki włóknistej uwarunkowane ekspresją TGF- β 1 w ścianie naczynia jest czynnikiem niezbędnym dla zachowania stabilności blaszki miażdżycowej [54,70].

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji dotyczyły zwierząt z cukrzycą typu 2 w jej bardzo wczesnej fazie i bez klinicznie jawnych powikłań w obrębie układu sercowo-naczyniowego i być może dlatego nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w zakresie ekspresji TGF- β 1 w ścianie aorty pomiędzy badanymi grupami.

Proces zwłóknienia zależny od ekspresji TGF- β 1 dotyczyć może również wątroby i jest związany z utrudnieniem regeneracji jej miększu, a w rezultacie z rozwojem insulinooporności obwodowej [70,72]. TGF- β 1 ogranicza także wzrost hepatocytów i indukuje ich apoptozę [70]. Stosowanie dapagliflozyny, jak wykazano w badaniach własnych, prowadzi do zmniejszenia ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w wątrobie, podczas gdy cukrzyca jest związana z istotnym zwiększeniem ekspresji

mRNA dla TGF w obrębie tego narządu. Zmiany ekspresji TGF- β 1 w mięszu wątroby są w znacznym stopniu niezależne od wyrównania metabolicznego, nasilenia insulinooporności, jak też dysfunkcji komórek β wysp trzustki, a uwarunkowane są głównie stosowaniem dapagliflozyny. To działanie farmakologiczne dapagliflozyny może być przyczyną jej korzystnych wpływów na zmniejszenie nasilenia glukoneogenezy w wątrobie a co za tym idzie – zmniejszenia insulinooporności wątrobowej [121]. W konsekwencji zaś, może przyczyniać się do ograniczenia progresji cukrzycy i rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych.

Wyniki badań własnych są spójne z uzyskanymi wcześniej przez Tang i wsp. [122] oraz Nishimura i wsp. [123]. Obydwie wspomniane grupy badaczy wykazały, że dapagliflozyna oraz ipragliflozyna zmniejszają zwłóknienie wątroby m.in. poprzez wpływ na ekspresję TGF- β 1. Obserwacje te pozwalają sądzić, że korzystny, zmniejszający ryzyko zwłóknienia wątroby wpływ jest wspólny dla całej klasy inhibitorów SGLT2, a nie jest ograniczony do pojedynczej substancji.

Podobnie jak w wątrobie, zwiększenie ekspresji dla TGF- β 1 w mięśniach szkieletowych jest związane z nasileniem insulinooporności obwodowej [74], a zatem pożądane byłoby obniżenie ekspresji i działania tego czynnika w mięśniach szkieletowych w przebiegu cukrzycy. Niestety, w badaniach własnych nie zaobserwowano żadnego istotnego wpływu dapagliflozyny na nasilenie insulinooporności obwodowej wyrażonej przez ekspresję TGF- β 1 w mięśniach szkieletowych.

Ekspresja sirtuiny 1 w tkankach

W świetle dotychczasowych danych, sirtuina 1 może wywierać ochronny wpływ na mięsień sercowy. Korzystne dla układu sercowo-naczyniowego są zależne od sirtuiny 1: zwiększenie syntezy tlenku azotu, efekt przeciwzapalny oraz antyoksydacyjny [55]. Istotny jest także wpływ sirtuiny 1 niwelujący pamięć metaboliczną, tj. niekorzystny wpływ zaburzeń metabolicznych występujących u chorego w odległej przeszłości na ryzyko rozwoju i nasilenie przewlekłych powikłań, zwłaszcza o charakterze makroangiopatii [80–82]. Udowodniono także, że niedobór sirtuiny 1 w mięśniu sercowym powoduje dysfunkcję rozkurczową serca oraz zaburzenia angiogenezy [78]. Z drugiej strony, niekorzystna jest także nadmierna ekspresja sirtuiny, ze względu na możliwość rozwoju dysfunkcji mitochondrialnej w miokardium i w konsekwencji, wzrost ryzyka wystąpienia zastoinowej niewydolności serca [124].

Natomiast w ścianie naczyń krwionośnych, sirtuina 1 wpływając na kaskadę NF κ β , wywiera działanie przeciwzapalne przez zmniejszenie produkcji prozapalnych cytokin. Zwiększenie ekspresji sirtuiny 1 zwiększa syntezę tlenku azotu o działaniu wazodylatacyjnym, hamuje proliferację komórek mięśni gładkich na wczesnych etapach rozwoju płytki miażdżycowej, hamuje przemianę makrofagów w komórki piankowate i promuje zwrotny transport cholesterolu do wątroby. Sirtuina 1 spowal-

nia także zwapnienie komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a w zaawansowanych zmianach miażdżycowych zapobiega apoptozie komórek mięśni gładkich, przez co przyczynia się do zwiększenia stabilności płytki. Wszystkie te działania są korzystne i świadczą o ochronnym wpływie sirtuiny 1 w ścianach naczyń krwionośnych [55]. Ponadto, sirtuina 1 wywiera efekt hipotensyjny, a także hamuje niekorzystny remodeling ściany naczyń krwionośnych indukowany przez angiotensynę II i związany z nadmierną ekspresją TGF- β 1 [125]. W mięśniach szkieletowych niedobór sirtuiny 1 wiąże się z nasiloną insulinoopornością obwodową [75,78].

W piśmiennictwie dostępne są dość liczne dane o korzystnym oddziaływaniu różnych leków na ekspresję sirtuiny 1 w warunkach cukrzycy. Zhang i wsp. [126] wykazali zmniejszenie ekspresji mRNA dla sirtuiny 1 w sercu zwierząt z cukrzycą typu 1 i wpływ farmakologicznej interwencji na poziom ekspresji sirtuiny w tym narządzie. Zastosowany w doświadczeniu fenofibrat wykazał zdolność zwiększenia ekspresji sirtuiny 1 w sercu zarówno zwierząt z cukrzycą, jak i zdrowych. Analogicznie, Yar i wsp. [127] zaobserwowali zmniejszenie ekspresji mRNA dla sirtuiny 1 w sercu w zwierzęcym modelu cukrzycy, a także nasilenie ekspresji pod wpływem podawanej substancji – resweratrolu. Kawai i wsp. [128] natomiast wykazali wzrost ekspresji mRNA dla sirtuiny 1 w tętnicach szyjnych szczurów z zespołem metabolicznym, u których stosowano amlodypinę i/lub atorwastatynę, w stosunku do ekspresji zaobserwowanej w grupie otrzymującej *placebo*. W badaniach własnych nie udało się potwierdzić korzystnego oddziaływania dapagliflozyny na ekspresję sirtuiny 1 w mięśniu sercowym, ścianie aorty oraz w mięśniach szkieletowych.

Zaobserwowano natomiast, że ekspozycja na dapagliflozynę u zwierząt z cukrzycą powoduje zwiększenie ekspresji sirtuiny 1 w wątrobie. Niedobór sirtuiny 1 w wątrobie wiąże się z insulinoopornością wątrobową i stłuszczeniem tego narządu [76,79]. Wzrost aktywności sirtuiny 1 w hepatocytach zmniejsza glukoneogenezę, hamuje glikogenolizę i lipolizę, zmniejsza produkcję LDL, a nasila β -oksydację kwasów tłuszczowych [76,77,79]. Wpływa zatem korzystnie na procesy związane z ograniczeniem oporności na insulinę w wątrobie. Przegląd piśmiennictwa pozwolił poczynić spostrzeżenie, że nie prowadzono dotychczas badań wpływu dapagliflozyny lub innych inhibitorów SGLT2 na ekspresję sirtuiny 1 w wątrobie. Wiadomo natomiast, że wzrost ekspresji sirtuiny 1 może być spowodowany stosowaniem innych leków przeciwcukrzycowych, jak np. metforminy [132,133], rozyglitazonu [134], lub eksenatyny [135].

Dystrybucja krążących komórek śródbłonka i krążących progenitorowych komórek śródbłonka we krwi

Funkcjonowanie śródbłonka naczyń krwionośnych często jest zaburzone w przebiegu cukrzycy typu 2, na skutek jednoczesnego narażenia na hiperglikemię, nieenzymatyczną glikację białek

i zwiększone wytwarzanie wolnych rodników oraz prozapalnych cytokin prowadzące do nagromadzenia uszkodzeń DNA, a w konsekwencji, do apoptozy [85].

Liczba krążących złuszczonych komórek śródbłonka obrazuje nasilenie dysfunkcji układu sercowo-naczyniowego i świadczy m.in. o toksycznym wpływie hiperglikemii na śródbłonek naczyniowy [86]. Natomiast krążące komórki progenitorowe śródbłonka są wykładnikiem regeneracji śródbłonka naczyń krwionośnych [84,85,87,88]. Zatem, zwiększenie odsetka cEPC i zmniejszenie odsetka cEC byłoby jak najbardziej pożądane w przebiegu cukrzycy dla zapobiegania zaburzeniu funkcjonowania śródbłonka naczyniowego, a w konsekwencji dla pohamowania progresji wczesnych faz rozwoju miażdżycy. Wyniki badań własnych potwierdziły wcześniej obserwowane zwiększenie odsetka cEC w przebiegu cukrzycy, a jednocześnie wykazały ochronny wpływ dapagliflozyny na stan śródbłonka. Co więcej, wpływ dapagliflozyny na odsetek cEPC sprowadza się nie tylko do normalizacji ich liczby; ale powoduje wzrost odsetka krążących komórek progenitorowych do wartości przewyższających te obserwowane w grupie kontrolnej. Oznacza to, że dapagliflozyna nie tylko niweluje negatywny wpływ cukrzycy na śródbłonek, ale także znacznie nasila procesy regeneracyjne, co w dłuższej perspektywie może się przyczynić do korzystnego, plejotropowego przeciwmiażdżycowego działania dapagliflozyny. W tym kontekście, uzasadnione wydaje się także przypomnienie znaczenia zjawiska pamięci metabolicznej dla rozwoju makroangiopatii. Nasilenie regeneracji śródbłonka przez dapagliflozynę może się przyczyniać do zniwelowania negatywnego znaczenia pamięci metabolicznej dla stanu śródbłonka.

Inni autorzy także poczynili doniesienia dotyczące wpływu inhibitorów SGLT2 na populację krążących komórek śródbłonka i nie są one spójne z obserwacjami poczynionymi w badaniach własnych. Bonora i wsp. [126], oceniając wpływ dapagliflozyny, empagliflozyny bądź *placebo* na cEPC stwierdzili zwiększenie odsetka krążących komórek progenitorowych śródbłonka u ludzi, ale jedynie po około 1,5-rocznym czasie obserwacji, a w dodatku autorzy ci sugerują, że wzrost odsetka cEPC był spowodowany jedynie redukcją stężenia HbA_{1c} zależną od stosowania inhibitorów SGLT2.

Związek pomiędzy wyrównaniem metabolicznym cukrzycy, czynnością komórek β wysp trzustki i nasileniem insulinoporności obwodowej, a ekspresją czynników związanych z patogenezą przewlekłych powikłań cukrzycy

Częstość występowania przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2 jest silnie powiązana z wykładnikami wyrównania metabolicznego cukrzycy, jak np. odsetkiem HbA_{1c} [127], zmiennością dobowej glikemii, spowodowaną różnicą między glikemią na czczo i poposiłkową [128], a także insulinopornością tkanek obwodowych [129]. Progresja cukrzycy typu 2 jest spowodowana także stopniowym pogłębieniem dysfunkcji komórek β wysp trzustki, której przejawem jest utrata funkcji wydzielniczej ocenianej na podstawie stężenia peptydu C, a sam niedobór peptydu C także może

bezpośrednio przyczyniać się do zaburzeń metabolicznych i występowania powikłań cukrzycy [130]. W nawiązaniu do tych obserwacji nie dziwi wykazany w ramach badań własnych związek pomiędzy wzrostem glikemii na czczo a osłabieniem angiogenezy oraz pomiędzy wzrostem glikemii na czczo a nasileniem procesów włóknienia w mięśniu sercowym. Badania korelacji pomiędzy wykładnikami kontroli cukrzycy i insulinooporności obwodowej wykazały także, iż proces włóknienia wątroby zależny od TGF- β 1 jest w dużej mierze związany z pogorszeniem się wyrównania metabolicznego i nasileniem insulinooporności. Natomiast dysfunkcja śródbłonna, której wyrazem jest wzrost liczebności cEC pozostaje w związku z nasileniem oporności na insulinę w mięśniach szkieletowych i poposiłkowym (poobciążeniowymi) zwyczajami glikemii.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, jak też rezultaty analizy kowariancji przeprowadzonej jako uzupełnienie statystycznej oceny porównania ekspresji badanych czynników pomiędzy grupami, można przypuszczać, że korzystne działanie dapagliflozyny ma charakter zarówno bezpośredni, jak i pośredni. Glikemia na czczo oraz wskaźnik HOMA_{IR} były bowiem niższe w grupie otrzymującej dapagliflozynę niż w grupie z cukrzycą otrzymującej placebo, a stężenie HbA_{1c} i glikemia mierzona po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą były w grupie z dapagliflozyną zbliżone do obserwowanych w grupie zwierząt bez cukrzycy. Jednocześnie zastosowanie testów ANCOVA w przypadku większości badanych czynników związanych z patomechanizmem przewlekłych powikłań cukrzycy ujawniło oddziaływanie na ekspresję tych czynników w sposób niezależny od wyrównania cukrzycy, nasilenia oporności na insulinę czy też zaburzenia czynności komórek β wysp trzustki.

Ekspresja SGLT2 jako próba wyjaśnienia niezależnego mechanizmu działania dapagliflozyny

Badanie mechanizmu działania dapagliflozyny w obrębie wybranych tkanek w zakresie modyfikacji ekspresji czynników związanych z VEGF i TGF- β 1 nie było głównym celem niniejszej dysertacji. Niemniej, z uwagi na dobrze znany mechanizm działania dapagliflozyny w kanalikach nerkowych, sprawdzono prawdopodobieństwo oddziaływania na podobnej drodze także i w innych narządach. Oceniono ekspresję SGLT2 w mięśniu sercowym, ścianie aorty, mięśniach szkieletowych i w wątrobie i zaobserwowano zwiększoną ekspresję kotransporterów SGLT2 w mięśniu sercowym oraz w miąższu wątroby, czyli w tkankach, w których oddziaływanie dapagliflozyny na badane czynniki było najbardziej widoczne. Ta obserwacja nasuwa przypuszczenie, że działanie dapagliflozyny modyfikujące ekspresję mRNA dla VEGF i jego receptorów, dla TGF- β 1 i ekspresję sirtuiny 1 w mięśniu sercowym i w miąższu wątroby może być po części związane z blokowaniem SGLT2 w tych tkankach. Inni badacze nie wykazali podobnych różnic w zakresie dystrybucji SGLT2 w tkankach, a niektórzy [131] nie obserwowali ekspresji SGLT2 w tkankach pozanerkowych.

Zapewne w związku z wyżej cytowanymi, nielicznymi wynikami badań, nie analizowano również dotąd, czy ekspresja kotransporterów SGLT2 w tkankach i narządach poza nerkami może być

związana z warunkami charakterystycznymi dla przebiegu cukrzycy typu 2. Wyniki badań własnych wykluczyły istotny wpływ cukrzycy na ekspresję SGLT2 w poszczególnych tkankach, z wyjątkiem mięśni szkieletowych, w których ekspresja SGLT2 w obu grupach z cukrzycą była niższa niż u zwierząt bez cukrzycy. Niewykluczone zatem, że była to jedna z przyczyn, dla których dapagliflozyna nie wywierała znaczącego wpływu na tę tkankę.

VI. WNIOSKI

1. Dapagliflozyna może wywierać korzystny, proangiogeny wpływ w obrębie mięśnia sercowego u zwierząt z cukrzycą.
2. Dapagliflozyna normalizuje ekspresję mRNA dla TGF- β 1 w mięśniu sercowym, potencjalnie zapobiegając jego zwłóknieniu.
3. Dapagliflozyna koryguje wywołane cukrzycą zaburzenia funkcji śródbłonka oceniane na podstawie liczebności krążących progenitorowych komórek śródbłonka i krążących komórek śródbłonka.
4. W wątrobie, dapagliflozyna zwiększając ekspresję mRNA dla VEGF-R1 może przyczyniać się do zwiększenia zdolności regeneracji hepatocytów.
5. Poprzez modyfikację ekspresji mRNA dla TGF- β 1 oraz ekspresji sirtuiny 1 w wątrobie dapagliflozyna może ograniczać wywołane cukrzycą procesy stłuszczenia i włóknienia wątroby.
6. Dapagliflozyna nie wywiera znaczącego wpływu na podstawową czynność komórek β wysp trzustki, aczkolwiek prawidłowe funkcjonowanie komórek β może mieć znaczenie dla niektórych efektów działania dapagliflozyny w tkankach.
7. Prawdopodobny mechanizm działania dapagliflozyny w obrębie mięśnia sercowego i wątroby jest związany z inhibicją SGLT2 w tych tkankach.
8. Nie zaobserwowano znamionnego wpływu dapagliflozyny na czynniki związane z patomechanizmem przewlekłych powikłań cukrzycy w obrębie ściany naczyń tętniczych i mięśni szkieletowych.

Wniosek końcowy – dapagliflozyna jako lek stosowany w leczeniu cukrzycy przedstawia istotny potencjał w zakresie ograniczenia rozwoju progresji i powikłań cukrzycy.

VII. STRESZCZENIE

Jednym z najistotniejszych problemów współczesnej farmakoterapii cukrzycy jest zagadnienie pośredniego i bezpośredniego oddziaływania leków stosowanych w leczeniu tego schorzenia na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy, zwłaszcza powstających na podłożu makroangiopatii, stanowiących jakże częstą przyczynę zgonów wśród chorych na cukrzycę. Dapagliflozyna jest lekiem przeciwcukrzycowym stosunkowo niedawno wprowadzonym do lecznictwa. Jej wpływ, zarówno bezpośredni na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy, jak i na progresję insulinoporności obwodowej czy też dysfunkcji komórek β wysp trzustki nie został jeszcze jednoznacznie wyjaśniony. Dane epidemiologiczne i wyniki badań klinicznych sugerują, że stosowanie tego leku może korzystnie oddziaływać zmieniając istotnie przebieg choroby.

Z tego powodu głównym celem badań, których wyniki przedstawiono w niniejszej dysertacji była ocena bezpośredniego i pośredniego potencjalnego działania dapagliflozyny na wczesne fazy rozwoju powikłań w układzie sercowo-naczyniowym, na podstawie rezultatów eksperymentu na zwierzętach laboratoryjnych. Dla przeprowadzenia analizy wybrano zarówno czynniki charakteryzujące wczesne etapy zmian zachodzących w ścianach naczyń tętniczych oraz w mięśniu sercowym pod wpływem cukrzycy typu 2, a także czynniki związane z ryzykiem rozwoju insulinoporności obwodowej – wątrobowej i w mięśniach szkieletowych. Oceniano: 1) ekspresję czynników związanych ze śródbłonkowym czynnikiem wzrostu naczyń (VEGF) – jego stężenie w surowicy oraz ekspresję mRNA dla VEGF w poszczególnych tkankach, a także ekspresję mRNA dla podtypów 1 i 2 receptora dla śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń; 2) dystrybucję progenitorowych komórek śródbłonka (c-EPC) oraz komórek śródbłonka (c-EC) we krwi; 3) ekspresję czynników związanych z transformującym czynnikiem wzrostu β (TGF- β) – jego stężenie w surowicy oraz ekspresję mRNA dla TGF- β 1 w poszczególnych tkankach; 4) ekspresję sirtuiny 1 w poszczególnych tkankach. Uzupełniającym celem badań była próba wskazania mechanizmu działania dapagliflozyny w mięśniu sercowym, w ścianie aorty, w wątrobie oraz w mięśniach szkieletowych, a dla jego realizacji przeprowadzono analizę dystrybucji kontrtransportera sodowo-glukozowego 2 w tych tkankach.

Doświadczenie przeprowadzono na 39 szczurach rasy Wistar, przydzielonych losowo do jednej z trzech grup: D – zwierząt, u których wyindukowano cukrzycę typu 2 i podawano dapagliflozynę; C – zwierząt, u których wyindukowano cukrzycę typu 2 i podawano *placebo*; K – zwierząt stanowiących grupę kontrolną bez cukrzycy, którym podawano *placebo*. Eksperyment główny trwał 8 tygodni. W tym czasie zwierzętom z grupy D podawano dożołądkowo dapagliflozynę (1 mg/kg m.c.), a pozostałym zwierzętom równoważną objętość *placebo*. W dniu zakończenia eksperymentu pobrano krew i tkanki: mięsień sercowy, ścianę aorty, miąższ wątroby, mięsień szkieletowy. Pomiaru glikemii u

szczurów dokonano z użyciem glukometru. Stężenie HbA_{1c} oznaczono metodą immunoturbidymetryczną, Stężenie insuliny, peptydu C, VEGF, TGF-β1 w surowicy oznaczono metodą immunoenzymatyczną. Względą ekspresję mRNA dla VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 oraz dla TGF-β1 w tkankach oznaczono stosując reakcję łańcuchową polimerazy DNA z detekcją fluorescencji w czasie rzeczywistym. Oznaczanie ekspresji białek sirtuiny 1 i kotransportera sodowo-glukozowego 2 (SGLT2) w tkankach przeprowadzono metodą *Western blot*. Oznaczenia odsetka krążących komórek śródbłónka i krążących komórek progenitorowych śródbłónka dokonano metodą cytometrii przepływowej.

Ekspresja mRNA dla VEGF w mięśniu sercowym w grupie otrzymującej dapagliflozynę była podobna do obserwowanej w grupie bez cukrzycy, a u zwierząt z cukrzycą otrzymujących *placebo* była znacząco niższa w porównaniu do pozostałych grup. Ekspresja mRNA dla VEGFR-2 w tej samej tkance była znacznie wyższa w grupie otrzymującej dapagliflozynę w porównaniu do pozostałych grup. W wątrobie, ekspresja mRNA dla VEGF-R1 w grupie otrzymującej dapagliflozynę była znacząco wyższa w porównaniu do grupy C, jak i do K. Ekspresja mRNA dla TGF-β1 w mięśniu sercowym oraz w wątrobie była zbliżona w grupach D i K i znacząco niższa w obu tych grupach niż w grupie C. W wątrobie ekspresja sirtuiny 1 w grupie otrzymującej dapagliflozynę była porównywalna z grupą bez cukrzycy, a w grupie z cukrzycą otrzymującej *placebo* była ona znacząco niższa. Odsetek cEPC w grupie D był znacząco wyższy w porównaniu do grupy C, jak również w porównaniu do grupy K. Liczebność cEC w grupie otrzymującej dapagliflozynę była niższa niż w grupie z cukrzycą otrzymującej *placebo* i porównywalna z obserwowaną w grupie bez cukrzycy. Ekspresja SGLT2 w miokardium i w wątrobie była znacząco wyższa w porównaniu do ekspresji SGLT2 w aorcii, jak też w mięśniu szkieletowym.

Wnioski: 1) dapagliflozyna może wywierać korzystny, proangiogeny wpływ w obrębie mięśnia sercowego u zwierząt z cukrzycą; 2) dapagliflozyna normalizuje ekspresję mRNA dla TGF-β1 w mięśniu sercowym, potencjalnie zapobiegając jego zwłóknieniu; 3) dapagliflozyna koryguje wywołane cukrzycą zaburzenia funkcji śródbłónka oceniane na podstawie liczebności krążących progenitorowych komórek śródbłónka i krążących komórek śródbłónka; 4) w wątrobie, dapagliflozyna zwiększając ekspresję mRNA dla VEGF-R1 może przyczyniać się do zwiększenia zdolności regeneracji hepatocytów; 5) poprzez modyfikację ekspresji mRNA dla TGF-β1 oraz ekspresji sirtuiny 1 w wątrobie dapagliflozyna może ograniczać wywołane cukrzycą procesy stłuszczenia i włóknienia wątroby; 6) dapagliflozyna nie wywiera znaczącego wpływu na podstawową czynność komórek β wysp trzustki, aczkolwiek prawidłowe funkcjonowanie komórek β może mieć znaczenie dla niektórych efektów działania dapagliflozyny w tkankach; 7) prawdopodobny mechanizm działania dapagliflozyny w obrębie mięśnia sercowego i wątroby jest związany z inhibicją SGLT2 w tych tkankach;

8) nie zaobserwowano znamionnego wpływu dapagliflozyny na czynniki związane z patomechanizmem przewlekłych powikłań cukrzycy w obrębie ściany naczyń tętniczych i mięśni szkieletowych.

VIII. SUMMARY

The impact of dapagliflozin on the selected aspects of chronic diabetic complications

One of the most important problems of the current pharmacotherapy of diabetes are direct and indirect effects of antidiabetic agents on chronic diabetic complications, especially those caused by macroangiopathy, which are also a very common cause of death among patients with diabetes. Dapagliflozin is a relatively recently marketed antidiabetic drug. Its impact, both – the direct on the development of long-term diabetic complications, as well as on the peripheral insulin resistance progression and pancreatic β -cells dysfunction has not yet been clearly explained. Epidemiological data and the results of clinical trials suggest that this drug may have a beneficial effect, significantly affecting the course of the disease.

For this reason the main aim of this study was the evaluation of direct and indirect potential effects of dapagliflozin on early phases of cardiovascular system complications development, based on the results of laboratory animal experiment. To perform the analysis, factors which characterize the early stages of diabetes type 2 in the arterial wall, as well as in the myocardium, were selected. Moreover some factors associated with the risk of peripheral insulin resistance development in the liver and skeletal muscles were chosen. Under evaluation were: 1) the expression of factors associated with vascular endothelial growth factor (VEGF) – its serum concentration, mRNA expression for VEGF in individual tissues and mRNA expression for subtypes 1 and 2 of the VEGF receptor; 2) the distribution of endothelial progenitor cells (cEPC) and circulating endothelial cells (cEC); 3) the expression of factors associated with transforming growth factor β (TGF- β) – its serum level and mRNA expression for TGF- β in individual tissues; 4) the expression of sirtuin 1 in individual cells. A complementary aim of the study was to identify the dapagliflozin mechanism of action in the myocardium, the aortic wall, the liver, skeletal muscles. It was performed by the analysis of glucose cotransporter 2 (SGLT2) distribution in these tissues.

The experiment was carried out on 39 male Wistar rats, randomly assigned to one of three groups: D – dapagliflozin-treated animals with type 2 diabetes mellitus model, C – placebo-treated animals with type 2 diabetes mellitus model; K – placebo-treated control group of animals without diabetes. The main experiment lasted for 8 weeks. During this time, animals from group D were administered intragastrically with dapagliflozin (1 mg / kg bw) and the remaining animals with equivalent volume of placebo. At the end of the experiment, general anesthesia was used and the animals were euthanized by decapitation. Blood and selected tissues: heart muscle, aortal wall, liver and skeletal muscle were collected and stored for further analyses.

Glycemia in rats was measured using the glucometer. HbA1c was determined by immunoturbidimetry. Insulin, C-peptide, VEGF, TGF- β serum levels were determined by immunoenzymatic method. The relative mRNA expression for VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 and TGF- β 1 in tissues was determined using a real time DNA polymerase chain reaction. The expression of sirtuin 1 and SGLT2 in tissues were performed by Western blot. The percentage of cEC and cEPC was measured by flow cytometry.

VEGF mRNA expression in cardiac muscle in the dapagliflozin-treated group was similar to that observed in the non-diabetic group and was significantly lower in placebo-treated animals with diabetes in comparison to other groups. The mRNA expression for VEGF-R2 in the same tissue was significantly higher in the dapagliflozin-treated group in comparison to other groups. In the liver, the expression of mRNA for VEGF-R1 in the dapagliflozin-treated group was significantly higher in comparison to C and K groups. The expression of mRNA for TGF- β 1 in the myocardium and in the liver was similar in groups D and K and significantly lower in both groups than in group C. In the liver, the expression of sirtuin 1 in the dapagliflozin-treated group was comparable to the non-diabetic group and it was significantly lower in the placebo-treated group with diabetes. The concentration of cEPC in group D was significantly higher in comparison to group C, as well as in comparison to group K. The cEC count in the dapagliflozin-treated group was lower than in the placebo-treated group with diabetes and comparable to the non-diabetic group. SGLT2 expression in the myocardium and in the liver was significantly higher in comparison to the SGLT2 expression in the aorta as well as skeletal muscles.

Conclusions: 1) dapagliflozin may have a beneficial, proangiogenic effect on the heart muscle in animals with diabetes; 2) dapagliflozin normalizes the expression of mRNA for TGF- β 1 in the myocardium, potentially preventing its fibrosis; 3) dapagliflozin improves endothelial dysfunction in the course of diabetes evaluated on the circulating endothelial progenitor cells count and circulating endothelial cells count; 4) in the liver, dapagliflozin-related increased expression mRNA for VEGF-R1 may contribute to the increased hepatocyte regeneration capacity; 5) dapagliflozin may limit diabetes-induced liver steatosis and fibrosis modifying the expression of mRNA for TGF- β 1 and the expression of sirtuin 1 in the liver; 6) dapagliflozin does not influence on the basic pancreatic β -cells function, however the proper function of β -cells may be significant for some effects of dapagliflozin in tissues; 7) the possible mechanism of action of dapagliflozin in the myocardium and in the liver is associated with SGLT2 blockade in these tissues; 8) there was no significant effect of dapagliflozin on the factors related to the pathomechanism of long-term diabetic complications in the arterial walls and skeletal muscles.

BIBLIOGRAFIA

1. Szmit S., Opolski G. **Mikroangiopatia cukrzycowa – współczesne spojrzenie na patogenezę i znaczenie w chorobach układu sercowo-naczyniowego.** Przegl Kardiodiabetol. 2006;1(1):27–34.
2. Jankowiak B., Krystoń-Serafin M., Krajewska-Kułak E., Popławska E. **Powikłania cukrzycy jako choroby przewlekłej.** Now Lek. 2007;76(6):482–4.
3. ClinicalTrials.gov. **Multicenter Trial to Evaluate the Effect of Dapagliflozin on the Incidence of Cardiovascular Events - Full Text View - ClinicalTrials.gov** [Internet]. 2017. p. 6–8. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01730534>
4. Koalicja na rzecz walki z cukrzycą. **Niebieska księga cukrzycy.** 2013.
5. WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014** [Internet]. World Health Organization. 2014. p. 1–260. Available from: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>
6. Narodowy Fundusz Zdrowia, Ministerstwo Zdrowia. **Cukrzyca** [Internet]. [cited 2017 Apr 15]. Available from: <http://nfz.gov.pl/nfz-blizej-pacjenta/cukrzyca/>
7. Zdrojewski T., Topór-Mądry R., Strojek K., Wojtyniak B., Wysocki M. **Raport na temat cukrzycy w Polsce.** Polska Akademia Nauk. 2016.
8. Główny Urząd Statystyczny. **Rocznik demograficzny 2017.** 2017.
9. WHO. **Global Report on Diabetes** [Internet]. World Health Organization. 2016. p. 1–88. Available from: <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>
10. Suh S., Kim J.H. **Glycemic variability: how do we measure it and why is it important?** Diabetes Metab J. 2015;39:273–82.
11. Gumprecht J. **Insulina a śródbłonek naczyniowy.** Przew Lek. 2004;7(1):58–61.
12. Manrique C., Lastra G., Sowers J.R. **New insights into insulin action and resistance in the vasculature.** Ann N Y Acad Sci. 2014;1311(1):138–50.
13. Bajkowska-Fiedziukiewicz A., Mikołajczyk-Swatko A., Cypryk K. **Przewlekłe powikłania w populacji chorych na cukrzycę typu 2.** Przegląd Menopauzalny. 2009;13(3):170–4.
14. Rewers M., Zaccaro D., D’Agostino R., Haffner S., Saad M.F., Selby J. V., Bergman R., Savage P. **Insulin sensitivity, insulinemia, and coronary artery disease. The insulin resistance atherosclerosis study.** Diabetes Care. 2004;27(3):781–7.

15. Newman J.D., Rockman C.B., Kosiborod M., Guo Y. **Diabetes mellitus is a coronary heart disease risk equivalent for peripheral vascular disease.** *Am Heart J.* 2016;184:114–20.
16. Undas A. **Patogeneza aterotrombozy.** *Forum Med Rodz.* 2009;3(5):396–401.
17. Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W. **A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis.** *Circulation.* 1995;92:1355–74.
18. Beckman J., Creager M.A., Libby P. **Diabetes and atherosclerosis.** *J Am Med Assoc.* 2002;287(19):2570–81.
19. Cai W., Jiang L., Xie Y., Liu Y., Liu W., Zhao G. **Design of SGLT2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: a history driven by biology to chemistry.** *Med Chem (Los Angeles).* 2015;11(4):317–28.
20. Pommerenke A. (Representative). **European Patent Application - Dapagliflozin.** Vol. 1. 2013. p. 1–18.
21. **Charakterystyka produktu leczniczego Forxiga 5 mg, 10 mg.** 2017.
22. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne. **Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę.** *Diabetol Klin.* 2018;4(1):1–81.
23. Bailey C.J., Gross J.L., Pieters A., Bastien A., List J.F. **Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *Lancet.* 2010;375(9733):2223–33.
24. Bailey C.J., Gross J.L., Hennicken D., Iqbal N., Mansfield T.A., List J.F. **Dapagliflozin add-on to metformin in type 2 diabetes inadequately controlled with metformin: a randomized, double-blind, placebo-controlled 102-week trial.** *BMC Med.* 2013;11(43):1–10.
25. Cefalu W.T., Leiter L.A., Bruin T.W.A. de, Gause-Nilsson I., Sugg J., Parikh S.J. **Dapagliflozin's effects on glycemia and cardiovascular risk factors in high-risk patients with type 2 diabetes: a 24-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study with a 28-week extension.** *Diabetes Care.* 2015;38(7):1218–27.
26. Merovci A., Mari A., Solis C., Xiong J., Daniele G., Velazquez A.C., Tripathy D. **Dapagliflozin lowers plasma glucose concentration and improves β -cell function.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(5):1927–32.
27. Strojek K., Yoon K.H., Hrubá V., Elze M., Langkilde A.M., Parikh S. **Effect of dapagliflozin**

- in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with glimepiride: a randomized, 24-week, double-blind, placebo-controlled trial.** *Diabetes, Obes Metab.* 2011;13(10):928–38.
28. Heerspink H.J.L., Johnsson E., Gause-Nilsson I., Cain V.A., Sjöström C.D. **Dapagliflozin reduces albuminuria in patients with diabetes and hypertension receiving renin-angiotensin blockers.** *Diabetes, Obes Metab.* 2016;18(6):590–7.
29. Halimi S., Vergès B. **Adverse effects and safety of SGLT-2 inhibitors.** *Diabetes Metab.* 2014;40(6):S28–34.
30. Leng W., Ouyang X., Lei X., Wu M., Chen L., Wu Q., Deng W., Liang Z. **The SGLT-2 inhibitor dapagliflozin has a therapeutic effect on atherosclerosis in diabetic ApoE^{-/-} mice.** *Mediators Inflamm.* 2016;(Article ID 6305735):1–13.
31. Terami N., Ogawa D., Tachibana H., Hatanaka T., Wada J., Nakatsuka A., Eguchi J., Sato Horiguchi C., Nishii N., Yamada H., Takei K., Makino H. **Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice.** *PLoS One.* 2014;9(6):1–13.
32. European Medicines Agency. **Assessment report - Forxiga.** 2012.
33. Tahara A., Takasu T., Yokono M., Imamura M., Kurosaki E. **Characterization and comparison of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacologic effects.** *J Pharmacol Sci.* 2016;130(3):159–69.
34. Hummel C.S., Lu C., Loo D.D.F., Hirayama B. a, Voss A. a, Wright E.M. **Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2.** *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2011;300(1):C14–21.
35. Yue X., Wang J. **Characteristics and impact factors of renal threshold for glucose excretion in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Endocrinol Nutr Metab.* 2017;32:621–7.
36. Ojima A., Matsui T., Nishino Y., Nakamura N., Yamagishi S. **Empagliflozin, an inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2 exerts anti-inflammatory and antifibrotic effects on experimental diabetic Nephropathy Partly by suppressing AGEs-receptor axis.** *Horm Metab Res.* 2015;47(9):686–92.
37. Gallo L.A., Wright E.M., Vallon V. **Probing SGLT2 as a therapeutic target for diabetes: basic physiology and consequences.** *Diabetes Vasc Dis Res.* 2015;12(2):78–89.
38. Turk E., Wright E.M. **Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family.** *J Membr Biol.* 1997;159:1–20.

39. Sabino-Silva R., Mori R.C., David-Silva A., Okamoto M.M., Freitas H.S., MacHado U.F. **The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy.** Brazilian J Med Biol Res. 2010;43(11):1019–26.
40. Vivian E.M. **Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: a growing class of antidiabetic agents.** Drugs Context. 2014;3(212264):1–19.
41. Maliha G., Townsend R.R. **SGLT2 inhibitors: their potential reduction in blood pressure.** J Am Soc Hypertens. 2015;9(1):48–53.
42. Bolinder J., Ljunggren Ö., Johansson L., Wilding J., Langkilde A.M., Sjöström C.D., Sugg J., Parikh S. **Dapagliflozin maintains glycaemic control while reducing weight and body fat mass over 2 years in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin.** Diabetes, Obes Metab. 2014;16(2):159–69.
43. Singh J.S.S., Fathi A., Vickneson K., Mordi I., Mohan M., Houston J.G., Pearson E.R., Struthers A.D., Lang C.C. **Research into the effect of SGLT2 inhibition on left ventricular remodelling in patients with heart failure and diabetes mellitus (REFORM) trial rationale and design.** Cardiovasc Diabetol. 2016;15(97):1–11.
44. Fitchett D., Zinman B., Wanner C., Lachin J.M., Hantel S., Salsali A., Johansen O.E., Woerle H.J., Broedl U.C., Inzucchi S.E. **Heart failure outcomes with empagliflozin in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk: results of the EMPA-REG OUTCOME® trial.** Eur Heart J. 2016;37(19):1526–34.
45. Neal B., Perkovic V., Mahaffey K.W., Zeeuw D. de, Fulcher G., Erondou N., Shaw W., Law G., Desai M., Matthews D.R. **Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes.** N Engl J Med. 2017;377(7):644–57.
46. Kosiborod M., Cavender M.A., Fu A.Z., Wilding J.P., Khunti K., Holl R.W., Norhammar A., Birkeland K.I., Jørgensen M.E., Thuresson M., Arya N., Bodegård J., Hammar N., Fenici P. **Lower risk of heart failure and death in patients initiated on sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors versus other glucose-lowering drugs. The CVD-REAL study.** Circulation. 2017;136(3):249–59.
47. Santos Cavaiola T., Pettus J. **Cardiovascular effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors.** Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther. 2018;11:133–48.
48. Xu W., Zhu Y., Yang X., Deng H., Yan J., Lin S., Yang H., Chen H., Weng J. **Glycemic variability is an important risk factor for cardiovascular autonomic neuropathy in newly diagnosed type 2 diabetic patients.** Int J Cardiol. 2016;215:263–8.
49. Vinik A.I., Freeman R., Erbas T. **Diabetic autonomic neuropathy.** Semin Neurol.

2003;23(4):365–72.

50. Yoon J.-E., Sunwoo J.-S., Kim J.S., Roh H., Ahn M.-Y., Woo H.-Y., Lee K.B. **Poststroke glycemic variability increased recurrent cardiovascular events in diabetic patients.** *J Diabetes Complications.* 2017;31(2):390–4.
51. Timmons J.G., Cunningham S.G., Sainsbury C.A.R., Jones G.C. **Inpatient Glycemic Variability and Long-term Mortality in Hospitalized Patients with Type 2 Diabetes.** *J Diabetes Complications.* 2016;31(2):479–82.
52. Wesołowski P., Wańkiewicz Z. **Insulinooporność - metody rozpoznawania i następstwa kliniczne.** *Nefrol i Dializoterapia Pol.* 2011;15(4):243–6.
53. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C. **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.** *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
54. Panutsopoulos D., Papalambros E., Sigala F., Zafiroopoulos A., Arvanitis D.L., Spandidos D.A. **Protein and mRNA expression levels of VEGF-A and TGF-beta1 in different types of human coronary atherosclerotic lesions.** *Int J Mol Med.* 2005;15:603–10.
55. Gorenne I., Kumar S., Gray K., Figg N., Yu H., Mercer J., Bennett M. **Vascular smooth muscle cell sirtuin 1 protects against DNA damage and inhibits atherosclerosis.** *Circulation.* 2013;127(3):386–96.
56. Barańska P., Jerczyńska H., Zofia P. **Czynnik wzrostu śródbłonka naczyń - budowa i funkcje.** *Postepy Biochem.* 2005;51(1):12–21.
57. Maharaj A.S.R., Saint-Geniez M., Maldonado A.E., D'Amore P.A. **Vascular endothelial growth factor localization in the adult.** *Am J Pathol.* 2006;168(2):639–48.
58. Nezhad M.A. **Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology.** *Reports Biochem Mol Biol.* 2016;2(2):1–10.
59. Shibuya M. **VEGF-VEGFR signals in health and disease.** *Biomol Ther.* 2014;22(1):1–9.
60. He J., Wang H., Liu Y., Li W., Kim D., Huang H. **Blockade of vascular endothelial growth factor receptor 1 prevents inflammation and vascular leakage in diabetic retinopathy.** *J Ophthalmol.* 2015;Article ID:1–11.
61. Waltenberger J. **VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus.** *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 6):1167–70.
62. Kaza E., Ablasser K., Poutias D., Griffiths E.R., Saad F.A., Hofstaetter J.G., Nido P.J. Del, Friehs I. **Up-regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 prevents**

- angiogenesis in hypertrophied myocardium.** *Cardiovasc Res.* 2011;89(2):410–8.
63. Chou E., Suzuma I., Way K.J., Opland D., Clermont A.C., Naruse K., Suzuma K., Bowling N.L., Vlahos C.J., Aiello L.P., King G.L. **Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic states. A possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue.** *Circulation.* 2002;105:373–80.
64. Bry M., Kivelä R., Leppänen V.-M., Alitalo K. **Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease.** *Physiol Rev.* 2014;94(3):779–94.
65. Coulon S., Francque S., Colle I., Verrijken A., Blomme B., Heindryckx F., Munter S. De, Prawitt J., Caron S., Staels B., Vlierberghe H. Van, Gaal L. Van, Geerts A. **Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease.** *Cytokine.* 2012;59(2):442–9.
66. Papageorgiou M.-V., Hadziyannis E., Tiniakos D., Georgiou A., Margariti A., Kostas A., Papatheodoridis G. V. **Serum levels of vascular endothelial growth factor in non-alcoholic fatty liver disease.** *Ann Gastroenterol.* 2017;30(2):209–16.
67. Wu L.E., Meoli C.C., Mangiafico S.P., Fazakerley D.J., Cogger V.C., Mohamad M., Pant H., K M.J. **Systemic VEGF-A neutralization ameliorates diet-induced metabolic dysfunction.** *Diabetes.* 2014;63(8):2656–67.
68. Wagner H., Fischer H., Degerblad M., Alvarsson M., Gustafsson T. **Improvement of insulin sensitivity in response to exercise training in type 2 diabetes mellitus is associated with vascular endothelial growth factor A expression.** *Diabetes Vasc Dis Res.* 2016;13(5):361–6.
69. Bonner J.S., Lantier L., Hasenour C.M., James F.D., Bracy D.P., Wasserman D.H. **Muscle-specific vascular endothelial growth factor deletion induces muscle capillary rarefaction creating muscle insulin resistance.** *Diabetes.* 2013;62(2):572–80.
70. Kajdaniuk D., Marek B., Borgiel-Marek H., Kos-Kudła B. **Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology.** *Endokrynol Pol.* 2013;64(5):384–96.
71. Dobaczewski M., Chen W., Frangogiannis N.G. **Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling.** *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(4):600–6.
72. Ota T., Takamura T., Kurita S., Matsuzawa N., Kita Y., Uno M., Akahori H., Misu H., Sakurai M., Zen Y., Nakanuma Y., Kaneko S. **Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis.** *Gastroenterology.* 2007;132(1):282–93.

73. Yadav H., Quijano C., Kamaraju A.K., Gavrilova O., Malek R., Chen W., Zervas P., Zhigang D., Wright E.C., Stuelten C., Sun P., Lonning S., Skarulis M., Sumner A.E., Finkel T. **Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling.** *Cell Metab.* 2011;14(1):67–79.
74. Böhm A., Hoffmann C., Irmeler M., Schneeweiss P., Schnauder G., Sailer C., Schmid V., Hudemann J., Machann J., Schick F., Beckers J., Angelis M.H. De, Staiger H., Fritsche A., Stefan N., Nieß A.M., Häring H.U., Weigert C. **TGF- β contributes to impaired exercise response by suppression of mitochondrial key regulators in skeletal muscle.** *Diabetes.* 2016;65(10):2849–61.
75. Cao Y., Jiang X., Ma H., Wang Y., Xue P., Liu Y. **SIRT1 and insulin resistance.** *J Diabetes Complications.* 2016;30(1):178–83.
76. Guclu A., Erdur F.M.M., Turkmen K., Clin E., Diabetes E. **The emerging role of sirtuin 1 in cellular metabolism, diabetes mellitus, diabetic kidney disease and hypertension.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2015;124(3):131–9.
77. Mortuza R., Feng B., Chakrabarti S. **SIRT1 reduction causes renal and retinal injury in diabetes through endothelin 1 and transforming growth factor β 1.** *J Cell Mol Med.* 2015;19(8):1857–67.
78. Maizel J., Xavier S., Chen J., Lin C.H.S., Vasko R., Goligorsky M.S. **Sirtuin 1 ablation in endothelial cells is associated with impaired angiogenesis and diastolic dysfunction.** *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2014;307(12):H1691–704.
79. Colak Y., Ozturk O., Senates E., Tuncer I., Yorulmaz E., Adali G., Doganay L., Enc F.Y. **SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease.** *Med Sci Monit.* 2011;17(5):HY5–HY9.
80. Zheng Z., Chen H., Li J., Li T., Zheng B., Zheng Y., Jin H., He Y., Gu Q., Xu X. **Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin.** *Diabetes.* 2012;61:217–28.
81. Berezin A. **Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: achieving and perspectives.** *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2016;10S:S176–83.
82. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. **Characterization of extracellular circulating microRNA.** *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):7223–33.
83. Zhao S., Li J.U.N., Wang N.A., Zheng B. **Fenofibrate suppresses cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy via a sirtuin 1-dependent signalling pathway.** *Mol Med Rep.* 2015;12:6112–8.

84. Głowińska-Olszewska B., Luczyński W., Bossowski A. **Komórki progenitorowe śródbłonna jako nowy marker funkcji endotelium w ocenie ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego.** Postępy Hig Med Dosw. 2011;65:8–15.
85. Kotlinowski J., Kozakowska M., Grochot-Przęczek A., Kotlinowska B., Józkwicz A., Dulak J. **Cukrzyca a komórki progenitorowe śródbłonna.** Postępy Biol Komórki. 2010;1(1):153–65.
86. Dec M., Bartoszek E., Mosiewicz J. **Krążące komórki śródbłonna jako marker uszkodzenia śródbłonna naczyń.** Med Ogólna i Nauk o Zdrowiu. 2015;21(2):113–5.
87. Erdbruegger U., Haubitz M., Woywodt A. **Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage.** Clin Chim Acta. 2006;373(1–2):17–26.
88. Li H., Zhang X., Guan X., Cui X., Wang Y., Chu H., Cheng M. **Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells.** Cardiovasc Diabetol. 2012;11:1–10.
89. Lombardo M.F., Iacopino P., Cuzzola M., Spiniello E., Garreffa C., Ferrelli F., Coppola A., Saccardi R., Piaggese A., Piro R., Mannino D., Grossi G., Lauro D., Irrera G. **Type 2 diabetes mellitus impairs the maturation of endothelial progenitor cells and increases the number of circulating endothelial cells in peripheral blood.** Cytom Part A. 2012;81 A(10):856–64.
90. Doronzo G., Viretto M., Russo I., Mattiello L., Anfossi G., Trovati M. **Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor synthesis and secretion in aortic vascular smooth muscle cells from obese and lean Zucker rats.** Int J Mol Sci. 2012;13(8):9478–88.
91. Srinivasan K., Viswanad B., Asrat L., Kaul C.L., Ramarao P. **Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening.** Pharmacol Res. 2005;52(4):313–20.
92. Logan J.L. **Studies on the impact of dietary fat composition on proteinuria in diabetic rats.** Diabetes Res Clin Pract. 1996;33(1):21–9.
93. Sugano M., Yamato H., Hayashi T., Ochiai H., Kakuchi J., Goto S., Nishijima F., Iino N., Kazama J.J., Takeuchi T., Mokuda O., Ishikawa T., Okazaki R. **High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: a new rat model of diabetic nephropathy.** Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006;16(7):477–84.
94. Weykamp C., John W.G., Mosca A., Hoshino T., Little R., Jeppsson J.O., Goodall I., Miedema K., Myers G., Reinauer H., Sacks D.B., Slingerland R., Siebelder C. **The IFCC reference measurement system for HbA1c: a 6-year progress report.** Clin Chem. 2008;54(2):240–8.

95. Sen S., McDonald S.P., Coates P.T.H., Bonder C.S. **Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease.** Clin Sci. 2011;120(7):263–83.
96. Wysocka T., Jagoda E., Podhorska-Okolów M., Dzięgiel P., Zabel M., Ciesielska U. **Histology. Exercise notebook for medicine and dentistry student.** 2010.
97. Howangyin K.Y., Silvestre J.S. **Diabetes mellitus and ischemic diseases: Molecular mechanisms of vascular repair dysfunction.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34(6):1126–35.
98. Ulyatt C., Walker J., Ponnambalam S. **Hypoxia differentially regulates VEGFR1 and VEGFR2 levels and alters intracellular signaling and cell migration in endothelial cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2011;404(3):774–9.
99. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. **VEGF receptor signalling - in control of vascular function.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(5):359–71.
100. Iliadis F., Kadoglou N., Didangelos T. **Insulin and the heart.** Diabetes Res Clin Pract. 2011;93(SUPPL. 1):S86-z91.
101. Sasso F.C., Carbonara O., Persico E., D'Ambrosio R., Coppola L., Nasti R., Campana B., Moschella S., Torella R., Cozzolino D. **Increased vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats.** Metabolism. 2003;52(6):675–8.
102. Ashoff A., Qadri F., Eggers R., Jöhren O., Raasch W., Dendorfer A. **Pioglitazone prevents capillary rarefaction in streptozotocin-diabetic rats independently of glucose control and vascular endothelial growth factor expression.** J Vasc Res. 2012;49(3):260–6.
103. Shida T., Nozawa T., Sobajima M., Ihori H., Matsuki A., Inoue H. **Fluvastatin-induced reduction of oxidative stress ameliorates diabetic cardiomyopathy in association with improving coronary microvasculature.** Heart Vessels. 2014;29(4):532–41.
104. Wu J.H.Y., Foote C., Blomster J., Toyama T., Perkovic V., Sundström J., Neal B. **Effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors on cardiovascular events, death, and major safety outcomes in adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.** Lancet Diabetes Endocrinol. 2016;4(5):411–9.
105. Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y. V. **Contribution of neovascularization and intraplaque haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability.** Acta Physiol. 2015;213(3):539–53.

106. Holm P.W., Slart R.H.J.A., Zeebregts C.J., Hillebrands J.L., Tio R.A. **Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF**. *Ann Med*. 2009;41(4):257–64.
107. Virmani R., Kolodgie F.D., Burke A.P., Finn A. V., Gold H.K., Tulenko T.N., Wrenn S.P., Narula J. **Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2054–61.
108. Xu X., Lu H., Lin H., Li X., Ni M., Sun H., Li C., Jiang H., Li F., Zhang M., Zhao Y., Zhang Y. **Aortic adventitial angiogenesis and lymphangiogenesis promote intimal inflammation and hyperplasia**. *Cardiovasc Pathol*. 2009;18(5):269–78.
109. Jin X., Ge X., Zhu D. liang, Yan C., Chu Y.F., Chen W. dong, Liu J., Gao P. jin. **Expression and function of vascular endothelial growth factor receptors (Flt-1 and Flk-1) in vascular adventitial fibroblasts**. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(3):292–300.
110. Desouza C. V., Gerety M., Hamel F.G. **Neointimal hyperplasia and vascular endothelial growth factor expression are increased in normoglycemic, insulin resistant, obese fatty rats**. *Atherosclerosis*. 2006;184(2):283–9.
111. Dworacka M., Iskakova S., Krzyżagórska E., Wesołowska A., Kurmambayev Y., Dworacki G. **Alpha-lipoic acid modifies circulating angiogenic factors in patients with type 2 diabetes mellitus**. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015;107(2):273–9.
112. Dworacka M., Chukanova G., Iskakova S., Kurmambayev Y., Wesołowska A., Frycz B.A., Jagodziński P.P., Dworacki G. **New arguments for beneficial effects of alpha-lipoic acid on the cardiovascular system in the course of type 2 diabetes**. *Eur J Pharm Sci*. 2018;117(February):41–7.
113. Kobayashi T., Kamata K. **Short-term insulin treatment and aortic expressions of IGF-1 receptor and VEGF mRNA in diabetic rats**. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2002;283(5):H1761–8.
114. Delgado J.S. **Evolving trends in nonalcoholic fatty liver disease**. *Eur J Intern Med*. 2008;19(2):75–82.
115. Bugianesi E., Moscatiello S., Ciaravella M.F., Marchesini G. **Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease**. *Curr Pharm Des*. 2010;16(17):1941–51.
116. Ohkubo H., Ito Y., Minamino T., Eshima K., Kojo K., Okizaki S.I., Hirata M., Shibuya M., Watanabe M., Majima M. **VEGFR1-positive macrophages facilitate liver repair and sinusoidal reconstruction after hepatic ischemia/reperfusion injury**. *PLoS One*. 2014;9(8):1–14.

117. Smith G.A., Fearnley G.W., Harrison M.A., Tomlinson D.C., Wheatcroft S.B., Ponnambalam S. **Vascular endothelial growth factors: multitasking functionality in metabolism, health and disease.** *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(4):753–63.
118. Gui C., Li S., Nong Q., Du F., Zhu L., Zeng Z. **Changes of serum angiogenic factors concentrations in patients with diabetes and unstable angina pectoris.** *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12(1):34.
119. Jesmin S., Sakuma I., Hattori Y., Fujii S., Kitabatake A. **Long-acting calcium channel blocker benidipine suppresses expression of angiogenic growth factors and prevents cardiac remodelling in a type II diabetic rat model.** *Diabetologia.* 2002;45:402–15.
120. Liu C., Liu R., Fu H., Li J., Wang X., Cheng L., Korantzopoulos P., Tse G., Li G., Liu T. **Pioglitazone attenuates atrial remodeling and vulnerability to atrial fibrillation in alloxan-induced diabetic rabbits.** *Cardiovasc Ther.* 2017;35(5):3218–21.
121. Kim O.-K., Jun W., Lee J. **Mechanism of ER stress and inflammation for hepatic insulin resistance in obesity.** *Ann Nutr Metab.* 2015;67(4):218–27.
122. Tang L., Wu Y., Tian M., Sjöstrom C.D., Johansson U., Peng X.-R., Smith D.M., Huang Y. **Dapagliflozin slows the progression of the renal and liver fibrosis associated with type 2 diabetes.** *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2017;313(5):E563–76.
123. Nishimura N., Kitade M., Noguchi R., Namisaki T., Moriya K., Takeda K., Okura Y., Aihara Y., Douhara A., Kawaratani H., Asada K., Yoshiji H. **Ipragliflozin, a sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor, ameliorates the development of liver fibrosis in diabetic Otsuka Long–Evans Tokushima fatty rats.** *J Gastroenterol.* 2016;51(12):1141–9.
124. Kawashima T., Inuzuka Y., Okuda J., Kato T., Niizuma S., Tamaki Y., Iwanaga Y., Kawamoto A., Narazaki M., Matsuda T., Adachi S., Takemura G., Kita T., Kimura T., Shioi T. **Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice.** *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(6):1026–36.
125. Gao P., Xu T.T., Lu J., Li L., Xu J., Hao D.L., Chen H.Z., Liu D.P. **Overexpression of SIRT1 in vascular smooth muscle cells attenuates angiotensin II-induced vascular remodeling and hypertension in mice.** *J Mol Med.* 2014;92(4):347–57.
126. Bonora B.M., Cappellari R., Albiero M., Avogaro A., Fadini G.P. **Effects of SGLT-2 inhibitors on circulating stem and progenitor cells in patients with type 2 diabetes.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(3):1048–55.
127. Stratton I.M. **Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study.** *Br Med J.*

2000;321:405–12.

128. Nalysnyk L., Hernandez-Medina M., Krishnarajah G. **Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: Evidence from a systematic review of the literature.** *Diabetes, Obes Metab.* 2010;12(4):288–98.
129. King G.L., Park K., Li Q. **Selective insulin resistance and the development of cardiovascular diseases in diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture.** *Diabetes.* 2016;65(6):1462–71.
130. Ghorbani A., Shafiee-Nick R. **Pathological consequences of C-peptide deficiency in insulin-dependent diabetes mellitus.** *World J Diabetes.* 2015;6(1):145–50.
131. Sabolić I., Vrhovac I., Eror D.B., Gerasimova M., Rose M., Breljak D., Ljubojević M., Brzica H., Sebastiani A., Thal S.C., Sauvant C., Kipp H., Vallon V., Koepsell H. **Expression of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences.** *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2012;302(8):C1174–88.

WYKAZ SKRÓTÓW

ACT β – β -aktyna

AHA – Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. *American Heart Association*)

AMPK – kinaza aktywowana adenozy-5'-monofosforanem (ang. *5'adenosine monophosphate activated protein kinase*)

cEC – krążące komórki śródbłónka (ang. *circulating endothelial cells*)

cEPC – krążące komórki progenitorowe śródbłónka (ang. *circulating endothelial progenitor cells*)

HbA_{1c} – hemoglobina glikowana

HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)

LXR – receptor wątrobowy X (ang. *liver X receptor*)

NF κ β – czynnik jądrowy kappa beta (ang. *nuclear factor kappa beta*)

PPAR α – receptor α aktywowany przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor α*)

RT-qPCR – reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z detekcją fluorescencji w czasie rzeczywistym (ang. *real-time quantitative polymerase chain reaction*)

SDHA – podjednostka A dehydrogenazy bursztynianowej (ang. *succinate dehydrogenase complex, subunit A*)

SGLT1 – kontrporter sodowo-glukozowy 1 (ang. *sodium-glucose cotransporter 1*)

SGLT2 – kontrporter sodowo-glukozowy 2 (ang. *sodium-glucose cotransporter 2*)

Sir2 – rodzina regulatorów informacji epigenetycznej (ang. *silent information regulator 2*)

SLC – rodzina białek transportowych (ang. *solute carrier*)

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor β*)

TMB – tetrametylobenzydyna

TNF α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*)

VEGF-R1 – receptor 1 dla VEGF (ang. *VEGF receptor 1*)

VEGF-R2 – receptor 2 dla VEGF (ang. *VEGF receptor 2*)

WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Mikrofotografia przekroju blaszki miażdżycowej typu IV, zlokalizowanej w tętnicy wieńcowej [17]	5
Rycina 2. Mikrofotografia przekroju zmiany miażdżycowej typu VI, zlokalizowanej w tętnicy wieńcowej [17]	6
Rycina 3. Wzór strukturalny dapagliflozyny [20]	8
Rycina 4. Schemat przebiegu doświadczenia na zwierzętach	29
Rycina 5. Uproszczony schemat oznaczania stężenia insuliny metodą immunoenzymatyczną ELISA	32
Rycina 6. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF w miokardium w badanych grupach	47
Rycina 7. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF-R2 w miokardium w badanych grupach	48
Rycina 8. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF-R1 w mięszu wątroby w badanych grupach	49
Rycina 9. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla VEGF w mięśni szkieletowym w badanych grupach	50
Rycina 10. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w miokardium w badanych grupach	54
Rycina 11. Porównanie względnej ekspresji mRNA dla TGF- β 1 w mięszu wątroby w badanych grupach	55
Rycina 12. Porównanie względnej ekspresji sirtuiny 1 w mięszu wątroby w badanych grupach	57
Rycina 13. Porównanie odsetka krążących komórek śródbłnka i progenitorowych komórek śródbłnka pomiędzy grupami	59
Rycina 14. Porównanie względnej ekspresji SGLT2 pomiędzy różnymi tkankami dla wszystkich grup traktowanych łącznie	66
Rycina 15. Ekspresja SGLT2 w mięśni szkieletowym w badanych grupach zwierząt z wyindukowaną cukrzycą typu 2 (traktowanych łącznie) w porównaniu do grupy kontrolnej	67
Rycina 16. Graficzne streszczenie wyników (schematy tkanek [96])	68

WYKAZ TABEL

Tabela 1. Charakterystyka przeciwciał użytych do detekcji białek metodą <i>Western blot</i>	40
Tabela 2. Rozcieńczenia przeciwciał użytych do detekcji białek metodą <i>Western blot</i>	40
Tabela 3. Porównanie wartości odżywczych w 1 kg paszy standardowej i doświadczalnej.	42
Tabela 4. Charakterystyka ogólna badanych grup.....	45
Tabela 5. Wyniki testu dożołądkowego obciążenia glukozą w badanych grupach.....	46
Tabela 6a-e. Stężenie VEGF w surowicy oraz ekspresja czynników angiogennych związanych z VEGF w wybranych tkankach w poszczególnych grupach	51
Tabela 7. Stężenie TGF- β 1 w surowicy oraz ekspresja mRNA dla TGF- β 1 w wybranych tkankach w poszczególnych grupach.....	56
Tabela 8. Ekspresja sirtuiny 1 w poszczególnych grupach.....	58
Tabela 9. Wybrane markery stanu śródbłónka w poszczególnych grupach	60
Tabela 10a-g. Wyniki analizy kowariancji, w której zmiennymi zależnymi były badane wykładniki wczesnej aterosclerozy i makroangiopatii, a zmienne niezależne stanowiły: 1) HbA _{1c} HOMA _{IR} , stężenie peptydu C; lub 2) glikemia oceniana na czczo i po upływie 1 godziny od obciążenia glukozą, HOMA _{IR} , stężenie peptydu C.....	61

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Zgody Komisji Bioetycznej.

Załącznik 2. Oświadczenie autora: praca została przygotowana i napisana samodzielnie.

Załącznik 3. Oświadczenie autora: drukowana wersja pracy jest identyczna z wersją elektroniczną.

Załącznik 1. Zgody Komisji Bioetycznej.

UCHWAŁA NR 43/2015

z dnia 12.6.2015r.

Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku, pt.: „**WPLYW DAPAGLIFLOZYN NA WYSTĘPOWANIE WCZESNYCH OBJAWÓW MIAŻDŻYCY INDUKOWANYCH DOBOWYMI WAHANIAMI GLIKEMII**” z dnia 15.05.2015, złożonego przez Panią dr hab. n. med. Marzenę Dworacką z Katedry i Zakładu Farmakologii UM w Poznaniu, lokalna komisja etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

Badania naukowe na zwierzętach

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości 3

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach: **Szczury szczepu Wistar – 42 osobników**

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez:

Dr hab. med. Marzena Dworacka, Katedra i Zakład Farmakologii UM Poznań

Dr hab. n. med. Hanna Winiarska, Katedra i Zakład Farmakologii UM Poznań

Dr n. farm. Anna Wesołowska, Katedra i Zakład Farmakologii UM Poznań

Dr n. farm. Magdalena Borowska, Katedra i Zakład Farmakologii UM Poznań

Mgr farm. Agnieszka Stelmaszyk, Katedra i Zakład Farmakologii UM Poznań

5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskiwanych od zwierząt w ramach:

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 061 8487198; fax 061 8487197

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej biorących udział w głosowaniu:

1. dr Dorota Bukowska, Przewodniczący LKE
2. dr Magdalena Janyszek, Wiceprzewodniczący LKE
3. prof. dr hab. Anna Jabłecka
4. prof. dr hab. Piotr Krutki
5. dr hab. Katarzyna Szkudeńska
6. dr hab. Mirosław Jurczyszyn
7. dr Justyna Mikula – Pietrasik
8. dr Hanna Piotrowska
9. mgr inż. Zbigniew Szrajber

Otrzymują:

1. Wnioskodawca,
2. a/a

Pouczenie

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 30 dni od dnia otrzymania uchwały.
Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).

**Uzasadnienie uchwały 43/2015
z dnia 12.6.2015 roku
Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu**

Cukrzyca wraz z chorobą niedokrwioną serca zajmuje jedno z kluczowych miejsc wśród zagrożeń zdrowotnych współczesnych społeczeństw. Biorąc pod uwagę dynamicznie zwiększającą się zapadalność na cukrzycę typu 2 i chorobę niedokrwioną serca i związany z tym wzrost kosztów, nie tylko ekonomicznych, ale także społecznych, nie sposób nie spostrzec palącej potrzeby zapobiegania temu zjawisku. Zważywszy, że patomechanizm zarówno cukrzycy typu 2 jak i choroby niedokrwiennej serca jest ściśle związany z rozwojem miażdżycy, zapobieganie temu procesowi na wczesnych etapach jego rozwoju stanowi niezaprzeczalną konieczność. Wyniki badań stanowiąc mogące uzasadnienie dla konieczności modyfikacji wskazań do stosowania dapagliflozyny u chorych na cukrzycę typu 2 – będą wskazywać na potrzebę ograniczenia stosowania lub też potwierdzą bezpieczeństwo terapii dapagliflozyną dla przebiegu cukrzycy.

Najwyższy stopień inwazyjności procedury wynosi: **3**.

Doświadczenie będzie wykonywane na: **Szczury szczepu Wistar – 42 osobników**

Czas trwania projektu: **12 m-cy**.

Uprzejmie informuję, że na posiedzeniu Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w dniu 12 czerwca 2015 r. Komisja jednomyślnie uznała za dopuszczalny wniosek

pt.:

**„WPŁYW DAPAGLIFLOZINY NA WYSTĘPOWANIE WCZESNYCH
OBJAWÓW MIAŻDŻYCY INDUKOWANYCH DOBOWYMI WAHANAMI
GLIKEMII”.**

PRZEWODNICZĄCY
Lokalnej Komisji Etycznej
ds. Spraw Doświadczeń na Zwierzętach

dr n. wet. Dorota Bukowska



UCHWAŁA NR 1/2016

z dnia 15.01.2016

Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) po rozpatrzeniu wniosku pt.: **WPLYW WYBRANYCH ŚRODKÓW FARMAKOLOGICZNYCH O DZIAŁANIU PRZECIWHIPERGLIKEMICZNYM NA ROZWÓJ PRZEWLEKŁYCH POWIKŁAŃ O CHARAKTERZE MAKROANGIOPATII** z dnia 17.12.2015, złożonego przez Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu adres ul. Fredry 10, 61-701 Poznań, zaplanowanego przez Panią Dr hab. Marzeną Dworacką lokalna komisja etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **Badania naukowe na zwierzętach**
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **umiarkowany**
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków: **szczur szczepu Wistar – 80 osobników w wieku 6-7 tygodni**
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **dr hab. Dworacką Marzenę, dr hab. Winiarską Hannę, dr Wesołowską Annę, dr Borowską Magdalenę, mgr Stelmaszyk Agnieszkę**
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie od **1.02.2016 do 31.12.2017**
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku¹: **nie dotyczy**
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w : **nie dotyczy**
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez , w sposób: **nie dotyczy**
9. Doświadczenie nie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie:

1

Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

§ 3

Uzasadnienie:

Celem doświadczenia jest wykazanie wpływu wybranych środków farmakologicznych o działaniu przecihiperglikemicznym (dapagliflozyny, metforminy oraz wyciągu z *P. caerulea*) na rozwój powikłań cukrzycy o charakterze makroangiopatii, m.in. miażdżycy naczyń krwionośnych. Większość dotychczas prowadzonych badań dotyczących przebiegu miażdżycy prowadzono u szczurów zarówno z uwagi na znaczące podobieństwo tego procesu u tych zwierząt i u ludzi oraz z uwagi na dostępność narzędzi badawczych (przeciwciała monoklonalne do badań cytofluorymetrycznych, immunohistochemicznych).

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 537 537 264

Podpis Przewodniczącego komisji

PRZEWODNICZĄCY
Lokalne Komisji Etycznej
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
Budonka
dr inż. Andrzej Budonka

Otrzymuje Użytkownik

Pouczenie:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

Załącznik 2. Oświadczenie autora: praca została przygotowana i napisana samodzielnie.

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.: „Wpływ dapagliflozyny na wybrane aspekty patomechanizmu przewlekłych powikłań cukrzycy”.

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

21 września 2018 r.

.....

Imię i nazwisko, podpis

Załącznik 3. Oświadczenie autora: drukowana wersja pracy jest identyczna z wersją elektroniczną.

Niniejszym oświadczam, że drukowana wersja pracy doktorskiej pt.: „Wpływ dapagliflozyny na wybrane aspekty patomechanizmu przewlekłych powikłań cukrzycy” jest identyczna z wersją elektroniczną.

21 września 2018 r.

.....

Imię i nazwisko, podpis