

Magdalena Bartuś

**Badania nad mechanizmem działania
1-metylo-nikotynamidu (MNA⁺) w doświadczalnych
modelach dysfunkcji śródbłonna**

COLLEGIUM MEDICUM UNIwersytetu Jagiellońskiego
Wydział Lekarski

Magdalena Bartuś

**Badania nad mechanizmem działania
1-metylo-nikotynamidu (MNA⁺) w doświadczalnych
modelach dysfunkcji śródbłonna**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Pracę wykonano w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej
Katedry Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Ryszard Korbut

*Praca finansowana przez MNiSW
Projekt promotorski nr 2PO5A03730*

Kraków 2007

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	6
KWAS NIKOTYNOWY	6
NIKOTYNAMID	8
1-METYLO-NIKOTYNAMID (MNA ⁺)	10
II. CEL PRACY	14
III. MATERIAŁY I METODY	15
III.1. ZWIERZĘCE MODELE DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA	15
III.1.1. MODEL HIPERTRIGLICERYDEMII	15
III.1.1.1. Opis doświadczenia	16
III.1.1.2. Analiza stężenia endogennego MNA⁺ i jego metabolitów	16
III.1.1.3. Analiza biochemiczna rozwoju hipertriglicerydemii	17
III.1.2. MODEL CUKRZYCY	17
III.1.2.1. Opis doświadczenia	17
III.1.2.2. Analiza stężenia endogennego MNA⁺ i jego metabolitów	18
III.1.2.3. Analiza biochemiczna rozwoju cukrzycy	18
III. 2. BADANIE CZYNNOSCI ŚRÓDBŁONKA W IZOLOWANEJ AORCIE	19
III.2.1. CZYNNOSCIOWE OZNACZENIE DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA EX VIVO W IZOLOWANEJ AORCIE SZCZURZEJ.....	19
III.2.1.1. Opis aparatury do badania czynności izolowanych naczyń krwionośnych	19
III.2.1.2. Opis protokołu doświadczeń	20
III.2.1.2.1. Izolacja aorty szczurzej.....	20
III.2.1.2.2. Ocena aktywności naczyniorozszerzającej śródbłonkowego NO.....	20
III.2.1.2.3. Zasada obliczania wielkości skurczu i rozkurczu naczyń	21
III. 2.2. BADANIE PODSTAWOWEJ PRODUKCJI NO W AORCIE SZCZURZEJ Z UŻYCIEM ZNACZNIKA FLUORESCENCYJNEGO - DAF-FM	22
III.2.2.1. Opis właściwości stosowanego znacznika	22
III.2.2.2. Opis protokołu doświadczenia	22
III.2.3. BADANIE PODSTAWOWEGO WYTWARZANIA PGI₂ PRZEZ KRĄŻKI AORTY (POMIAR 6-KETO-PGF _{1α})	23
III.2.3.1. Podstawowe wytwarzanie PGI₂ w krążkach aorty stymulowanych naciągiem	23
III.2.3.2. Podstawowe wytwarzanie PGI₂ w krążkach aorty niestymulowanych naciągiem	23
III.2.3.3. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu	24
III.3. MODELE USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA IN VITRO	24
III.3.1. MODEL WOLNORODNIKOWEGO USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA PRZEZ PYROGALLOL.....	24

III.3.1.1. Opis protokołu doświadczenia	24
III.3.2. MODEL USZKODZENIA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA W HODOWLI KOMÓRKOWEJ PRZEZ NADTLENEK WODORU (H₂O₂)	24
III.3.2.1. Opis protokołu doświadczenia	25
III.3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA	25
I V. W Y N I K I	26
IV. 1. BADANIE ŚRÓDBŁONKOWEGO DZIAŁANIA MNA⁺ W ZWIERZĘCYCH MODELACH DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA	26
IV.1.1. WPŁYW MNA⁺ NA ROZWÓJ DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA W HIPERTIGLICERYDEMII U SZCZURÓW	26
IV.1.1.1. Analiza biochemiczna rozwoju hipertriglicerydemii	26
IV.1.1.2. Rozwój dysfunkcji śródbłonka w modelu hipertriglicerydemii	28
IV.1.1.2.1. Zmiany aktywności naczyniorozszerzającej śródbłonkowego NO.....	28
IV.1.1.2.2. Zmiany aktywności śródbłonkowej PGI ₂	29
IV.1.1.2.2.1. Podstawowy poziom PGI ₂ w krążkach aorty stymulowanych naciągiem	29
IV.1.1.3. Wybór dawki terapeutycznej MNA⁺ do badań <i>in vivo</i>	32
IV.1.1.4. Wpływ MNA⁺ na rozwój hipertriglicerydemii	35
IV.1.1.5. Wpływ MNA⁺ na poziom peptydu C	37
IV.1.1.6. Wpływ MNA⁺ na rozwój dysfunkcji śródbłonka w modelu hipertriglicerydemii	38
IV.1.1.6.1. Wpływ MNA ⁺ na aktywności naczyniorozszerzającą śródbłonkowego NO.....	38
IV.1.1.6.2. Wpływ MNA ⁺ na podstawowe wydzielenie NO mierzone znacznikiem fluorescencyjnym DAF- FM w izolowanych krążkach aorty	41
IV.1.1.6.3. Wpływ MNA ⁺ na aktywności śródbłonkowej PGI ₂	43
IV.1.1.6.3.1. Podstawowy poziom PGI ₂ w krążkach aorty stymulowanych naciągiem	43
IV.1.1.6.3.2. Poziom PGI ₂ w krążkach aorty niestymulowanych przez naciąg	43
IV.1.1.6.3.3. Poziom PGI ₂ w osoczu	43
IV.1.1.7. Udział PGI₂ w ochronnym działaniu MNA⁺ na rozwój dysfunkcji śródbłonka u szczurów z hipertriglicerydemią	43
IV.1.1.8. Brak naczyniorozszerzającego działanie egzogenne MNA⁺ <i>in vitro</i> na aortę szczura	47
IV.1.2. WPŁYW MNA⁺ NA ROZWÓJ DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA U SZCZURÓW Z CUKRZYCĄ	48
IV.1.2.1. Poziom metabolitów MNA⁺ w osoczu szczurów z cukrzycą	48
IV.1.2.2. Analiza biochemiczna rozwoju cukrzycy	48
IV.1.2.3. Wpływ MNA⁺ na parametry biochemiczne cukrzycy	50
IV.1.2.4. Rozwój dysfunkcji śródbłonka w cukrzycy	52
IV.1.2.4.1. Zmiany aktywności naczyniorozszerzającej śródbłonkowego NO	52
IV.1.2.4.2. Wpływ MNA ⁺ na aktywność naczyniorozszerzającą śródbłonkowego NO.....	54

VI. 1.2.4.3. Wpływ MNA ⁺ na aktywność śródbłonkowej P ₂ GI.....	54
IV.1.2.4.3.1. Podstawowy poziom PGI ₂ w krążkach aorty stymulowanych naciągiem	54
IV.1.2.4.3.2. Podstawowy poziom PGI ₂ w krążkach aorty niestymulowanych naciągiem.....	55
IV.1.2.4.3.3. Poziom PGI ₂ w osoczu	56
IV.125. Wpływ indometacyny podanej in vitro na wielkość odpowiedzi naczyń rozszerzającej wywołanej przez acetylocholinę i histaminę w aorcie u szczurów z cukrzycą traktowanych lub nie MNA⁺.....	56
IV.2. BADANIE ŚRÓDBŁONKOWEGO DZIAŁANIA MNA⁺ W MODELACH DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA IN VITRO	58
IV. 2.1. DZIAŁANIE MNA ⁺ W MODELU DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA W AORCIE IN VITRO (PYROGALLOL)	58
IV.2.1.1. Wolnorodnikowe uszkodzenie śródbłonka naczyń w aorcie szczura in vitro przez pyrogallol.....	58
IV.2.1.2. Wpływ egzogenego MNA ⁺ na uszkodzenie śródbłonka naczyń przez pyrogallol.....	59
IV.2.2. DZIAŁANIE MNA ⁺ W MODELU USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA PRZEZ NADTLENEK WODORU W LINII KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA EA. HY926	60
IV. 2.2.1. Uszkodzenie linii komórek śródbłonka EA. hy926 przez nadtlenek wodoru.....	60
IV.2.2.2. Wpływ egzogenego MNA ⁺ na uszkodzenie komórek śródbłonka wywołane przez nadtlenek wodoru	61
V. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	62
VI. DYSKUSJA	64
DYSFUNKCJA ŚRÓDBŁONKA A ROZWÓJ ATHEROTROMBOSIS	64
ZWIERZECY MODEL DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA	65
MODEL HIPERTRIGLICERYDEMII	65
ZWIERZECY MODEL DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA	67
MODEL CUKRZYCY	67
DZIAŁANIE MNA ⁺ W SZCZURZYM MODELU	69
HIPERTRIGLICERYDEMII I CUKRZYCY	69
DZIAŁANIE MNA ⁺ W MODELACH IN VITRO	71
USZKODZENIE ŚRÓDBŁONKA PRZEZ ANION PONADTLENOWY INADTLENEK WODORU	71
VII. WNIOSKI	73
VIII. STRESZCZENIE	74
IX. SUMMERY.....	76
X. PIŚMIENNICTWO	78

I. WSTĘP

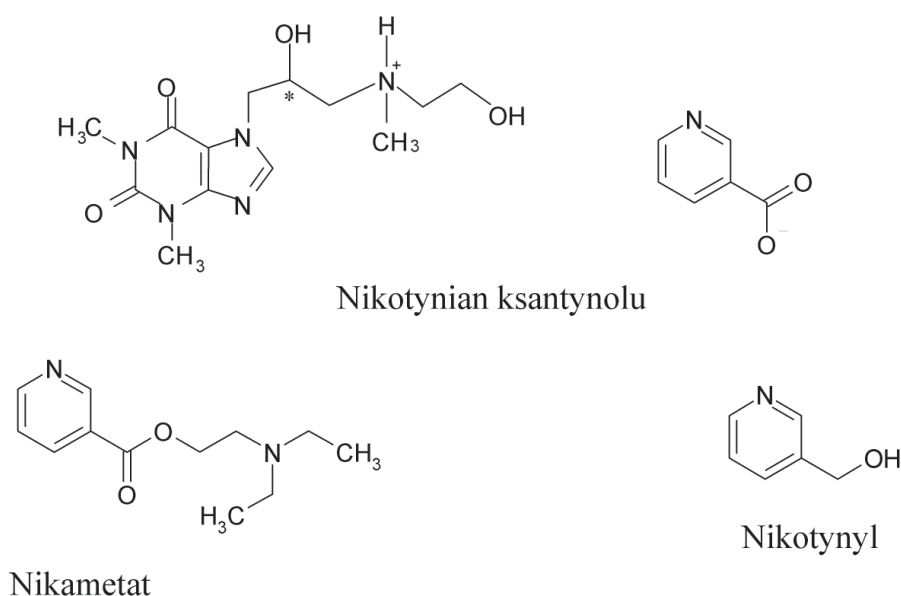
Obszerna jest wiedza opisująca farmakologiczne właściwości kwasu nikotynowego i nikotynamidu. Jednak na temat biologicznych właściwości 1-metylonikotynamidu (MNA⁺), głównego metabolitu nikotynamidu, wiadomo niewiele. Do niedawna był, bowiem uważany za nieaktywny metabolit nikotynamidu. Struktura kwasu nikotynowego, nikotynamidu i MNA⁺ jest bardzo zbliżona, jednak tylko kwas nikotynowy ma działanie obniżające trójglicerydy, natomiast nikotynamid a nie kwas nikotynowy jest głównym prekursorem NAD⁺. Niniejsza praca doktorska w całości poświęcona jest śródbłonkowemu działaniu MNA⁺, które wydaje się wyróżniać ten endogenne metabolit od jego prekursora, nikotynamidu, jak również od kwasu nikotynowego. Poniżej przedstawiono krótko działanie biologiczne wyżej wymienionych związków.

KWAS NIKOTYNOWY

Pierwsze doniesienia na temat korzystnego wpływu kwasu nikotynowego na profil lipidowy u ludzi pojawiły się w latach 50-tych ubiegłego wieku [25]. Tak, więc, już od ponad pięćdziesięciu lat kwas nikotynowy jest stosowany w leczeniu dyslipidemii. Kwas nikotynowy podnosi we krwi stężenie lipoprotein HDL i obniża stężenie lipoprotein bogatych w trójglicerydy takich jak VLDL, chylomikrony i lipoproteiny resztkowe. W próbach klinicznych wykazano, że długotrwałe podawanie kwasu nikotynowego u pacjentów z czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego zmniejsza śmiertelność sercowo-naczyniową [39;97; 81;105;112;124;126].

Działanie hipolipemizujące i naczynioprotekcyjne kwasu nikotynowego wymaga jednak stosowania wysokich gramowych dawek tego leku. Stosowanie tak wysokich dawek kwasu nikotynowego niesie za sobą ryzyko pojawienia się charakterystycznych działań ubocznych ze strony naczyń krwionośnych skóry, które ujawniają się jako zaczerwienie twarzy i górnej części tułowia. Choć efekt ten nie jest groźny i zwykle mija przy długotrwałym stosowaniu kwasu nikotynowego, to ogranicza jego stosowanie wśród pacjentów

[81;97;124]. Ten profil działań ubocznych kwasu nikotynowego wynika stąd, że obok działania na profil lipidowy kwas nikotynowy, w przeciwieństwie do nikotynamidu ma również bezpośrednie działanie naczyniorozszerzające zależne od cyklooksygenazy i śródbłonkowej prostacykliny [48] lub innych prostanoidów. Ciekawe i nie końca jest jasne, dlaczego rozszerzeniu ulegają przede wszystkim naczynia krwionośne twarzy i klatki piersiowej. Działanie naczyniorozszerzające kwasu nikotynowego dotyczy również krążenia obwodowego kończyn dolnych i stąd zastosowanie kwasu nikotynowego jak również jego pochodnych (Ryc. A) w leczeniu zaburzeń krążenia obwodowego [47;48]. Istotnie, przez wiele lat w leczeniu miażdżycy naczyń obwodowych kończyn dolnych stosowano Nikotynian ksantynolu (Sadamina) będący połączeniem kwasu nikotynowego i teofiliny. Badania prowadzone w Zakładzie Farmakologii Klinicznej Katedry Farmakologii CMUJ udowodniły, że stosowanie Nikotynianu ksantynolu u pacjentów z chorobami naczyń obwodowych związane jest nie tylko z działaniem na profil lipidowy, ale także z pobudzeniem procesu fibrynolizy [16]. Obok Nikotynianu ksantynolu stosowano również Nikametat (Provasan), który jest połączeniem kwasu nikotynowego z dwuetyloaminoetanolem oraz Nikotynyl (Ronicol), który jest alkoholem – β –pirydynowym (β -pirydylkarbinol). Oba te leki wykazują działanie naczyniorozszerzające małych tętniczek, przeciwwakrzepowe, profibrynolityczne [16;35;48] a stosowane były w stanach chorobowych przebiegających ze zwężeniem naczyń tętniczych kończyn dolnych [47] i górnych, w miażdżycy naczyń mózgowych i wieńcowych [35],



Ryc. A. Struktury pochodnych kwasu nikotynowego stosowanych w chorobach układu krążenia (szczegóły w tekście).

w zespole Meniere'a, w naczyniopochodnych schorzeniach okulistycznych. Podobnie jednak jak sam kwas nikotynowy również i jego połączenia w wyżej opisanych preparatach posiadały działania uboczne objawiające się zaczerwienieniem i uczuciem gorąca w obrębie górnej połowy ciała a nawet osłabieniem i zawrotami głowy [13;14].

Nowy rozdział w zrozumieniu farmakologii kwasu nikotynowego otworzyło odkrycie receptorów dla kwasu nikotynowego GPR109A (znany także pod nazwą HM74A będący receptorem o wysokiej specyficzności dla kwasu nikotynowego), GPR81 oraz GPR109B (zwany także jako HM74 receptory o niskiej specyficzności dla kwasu nikotynowego) [89;97;124].

Odkryte niedawno receptory GPR109A i GPR81 należące do rodziny białek G (G_i) występują zarówno u ludzi jak i u gryzoni głównie w adipocytach i komórkach układu odpornościowego. Receptor GPR109B został natomiast opisany tylko u ludzi. Odkryto, że działanie obniżające trójglicerydy kwasu nikotynowego odbywa się przy udziale receptora GPR109A występującego w komórkach adipocytów przez zahamowanie cykazy adenylowej w adipocytach, skutkiem czego, zmniejsza się hydroliza triacylglicerolu do wolnych kwasów tłuszczowych w tych komórkach. Działanie naczyniorozszerzające na naczynia skóry związane jest natomiast z zależną od receptora nikotynowego GPR109A stymulacją cyklooksygenazy 1 (COX-1) i produkcją prostaglandyny D_2 , (PGD_2) przez makrofagi tkanki podskórnej lub przez komórki Langerhansa [13;14;97]. Ostatnio sugerowano także, że mechanizm naczynioprotekcyjnego efektu działania kwasu nikotynowego może być niezależny od jego wpływu na profil lipidowy, a może być związany z aktywacją jądrowego receptora aktywującego proliferację peroksysomów ($PPAR_\gamma$) przez PGD_2 lub jej metabolit 15-deoxy- $\gamma^{12,14}$ - PGJ_2 w makrofagach [69;89]. Tak więc, choć minęło niedawno pół wieku klinicznego zastosowania kwasu nikotynowego [25] dopiero od niedawna zaczynamy rozumieć molekularne mechanizmy jego działania.

NIKOTYNAMID

Nikotynamid (niacyna, witamina PP, witamina B_3) jest prekursorem koenzymu dinukleotydu nikotynoamido adeninowego (NAD^+), który bierze udział w wytwarzaniu ATP w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów. Odkrycie nikotynamidu jako substratu do syntezy NAD^+ i $NADP^+$ datuje się na rok 1930, a kilka lat później pojawiły się pierwsze doniesienia na temat zastosowania nikotynamidu w leczeniu pelagry [54;56;60;126]. Obecnie występowanie pelagry jest bardzo rzadkie i ograniczone do krajów biednych,

ludzi nadużywających alkoholu lub ludzi starszych. Kliniczne symptomy pelagry pojawiają się, gdy niedobór nikotynamidu jest już bardzo zaawansowany, i występują w postaci zmian skórnych (zapalenie skóry), dolegliwości jelitowo-żołądkowych (biegunka) oraz dolegliwości ze strony systemu nerwowego (demencja) [54;56;60]. W związku z nieczęstym występowaniem pelagry nikotynamid nie ma szerokiego zastosowania klinicznego. Jest natomiast stosowany w badaniach doświadczalnych, co ciekawe, nie jako substrat dla NAD^+ czy NADP^+ , ale jako inhibitor PARP – polimerazy poli(ADP-rybozy). Istotnie w wielu układach doświadczalnych wykazano, że nikotynamid ma działanie cytoprotekcyjne i to działanie związane z zahamowaniem PARP przez ten związek [126]. Przykład może stanowić zwiększona rekrutacja neutrofilów do potencjalnego miejsca zapalenia wywołana przez zahamowanie PARP w neutrofilach i innych komórkach. Warto wspomnieć, że nikotynamid był rekomendowanym lekiem w leczeniu pacjentów z zapaleniem stawów już w latach 40-tych zeszłego wieku [126].

Nikotynamid był też szeroko badany pod względem jego skuteczności w neuroprotekcji w ostrych i przewlekłych uszkodzeniach tkanki mózgowej [76]. Liczne badania wykazały, iż nikotynamid wykazuje działania ochronne przed skutkami stresu oksydacyjnego, jak również w niedokrwieniu/niedotlenieniu mózgu zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Nikotynamid przez zahamowanie fragmentacji DNA czy też zahamowanie procesu naprawczego po fragmentacji DNA hamuje apoptozę i martwicę tkanki mózgowej [126]. Działania ochronne nikotynamidu wykazano również w komórkach fotoreceptorów, co zdaje się sugerować, że nikotynamid mógłby znaleźć zastosowanie w farmakologicznej neuroprotekcji uszkodzeń siatkówki [67].

Nikotynamid był także opisywany jako związek przeciwdrgawkowy i przeciwzkrzepowy, inhibitor peroksydacji lipidów. Wszystkie te efekty nikotynamidu mogą mieć udział w ochronnym działaniu nikotynamidu w uszkodzeniach centralnego układu nerwowego wywołanego niedokrwieniem [126]. Warto dodać, że pojawiają się również doniesienia, które sugerują, że endogenne nikotynamid spełnia kilka ważnych komórkowych funkcji w ośrodkowym układzie nerwowym: podnosi stężenie cholicy i jest endogennym ligandem benzodiazepinowych receptorów [76]. Nie dziwi więc fakt, że tak wiele prac poświęcono działaniu nikotynamidu jak również analogów nikotynamidu i NAD^+ w neurodegeneracyjnych chorobach ośrodkowego układu nerwowego takich jak: choroba Parkinsona [38;94], choroba Alzheimera, zespoły otępienia i inne schorzenia gerontopsychiatrii [126].

Nikotynamid chroni również komórki śródbłonna przed uszkodzeniem. Wydaje się, że mechanizm tego działania ześrodkowany jest w mitochondriach [68]. W niektórych naczyniach naczyńnikowych nikotynamid wywołuje rozkurcz naczyń. Wydaje się jednak, że działa-

nie naczyńiorozszerzające nikotynamidu dotyczy tylko niektórych łożysk naczyniowych. Jest np. wyraźne w naczyniach penetrujących nowotwór [76] ale słabo zaznaczone w innych naczyniach krwionośnych [41].

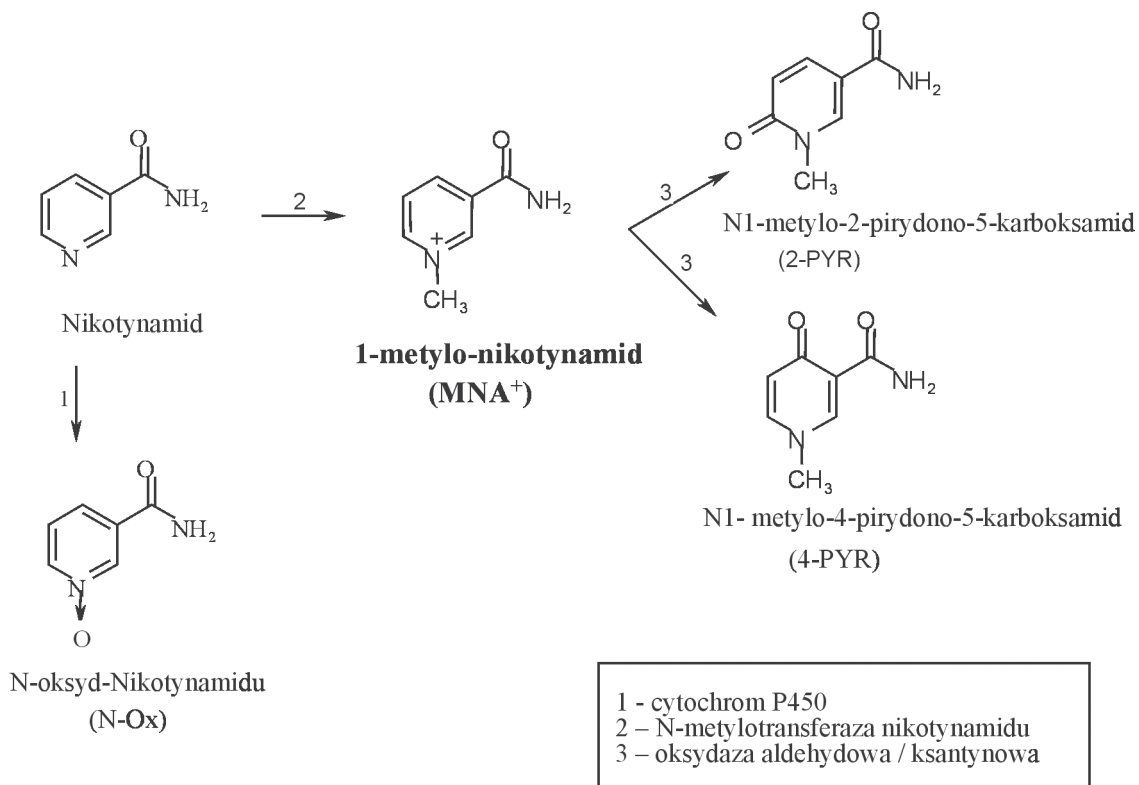
Istnieje szereg doniesień dotyczących przeciwcukrzycowego działania nikotynamidu co spowodowało iż podejmowano liczne próby leczenia insulinozależnej cukrzycy za pomocą nikotynamidu [12;113]. W badaniach doświadczalnych wykazano, że nikotynamid może zapobiegać apoptozie i nekrozie komórek β -trzustki przez zahamowanie produkcji NO i fragmentacji DNA, które są zaangażowane w destrukcję komórek β . Badania doświadczalne wykazały również, iż nikotynamid zapobiega rozwojowi cukrzycy indukowanej streptozotocyną u szczurów [82] jak również spontanicznej cukrzycy u nie otyłych cukrzycowych myszy [102]. Pomimo tego, że w wielu badaniach doświadczalnych wykazano, iż nikotynamid ma działanie przeciwcukrzycowe, zwłaszcza w cukrzycy typu I, szeroko zakrojone badania kliniczne nie przyniosły oczekiwanych wyników i wykreśliły nikotynamid z leków o potencjale przeciw cukrzycowym [102].

Podsumowując, nikotynamid ma szerokie spektrum działania farmakologicznego, jednak jak na razie, poza leczeniem pelagry, nie ma wyraźnych i dobrze udokumentowanych wskazań do jego zastosowania klinicznego.

1-METYLO-NIKOTYNAMID (MNA⁺)

1-metylo-nikotynamid (MNA⁺) jest endogennym kationowym metabolitem nikotynamidu (niacyny, witaminy PP, witaminy B₃) powstającym w wątrobie w reakcji katalizowanej przez N-metylotransferazę nikotynamidu [40;85;114]. Enzym ten katalizuje przemiany nikotynamidu także w mózgu [94] oraz być może w śródbłonku naczyń. W toku dalszych przemian MNA⁺ jest dalej przekształcany przy udziale oksygenazy aldehydowej do N1-metylo-4-pirydono-5-karboksamidu (4-PYR) lub N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamidu (2-PYR) [2;40;99]. Sugerowano również udział oksydazy ksantynowej w metabolizmie MNA⁺ (Ryc.B). MNA⁺ i jego produkty metabolizmu są wydalane z moczem.

Dotychczas MNA⁺ uważany był za nieaktywny metabolit nikotynamidu i stąd prace poświęcone MNA⁺ w literaturze, dotyczą głównie sposobów jego pomiarów. Istotnie opracowano kilka metod do mierzenia endogennego poziomu MNA⁺ w biologicznych płynach. Jedną z najczęściej stosowanych jest wysoko-sprawna chromatografia cieczowa – metoda HPLC [85;114]. Inne często stosowane metody to chromatografia jonowymienna z detekcją UV. Do ilościowej analizy MNA⁺ opracowano również metodę fluorescencyjną w której MNA⁺



Ryc. B. Szlaki przemian nikotynamidu (szczegóły w tekście).

jest upochniony w reakcji z ketonami w warunkach alkalicznych dając fluorescencyjny produkt, który jest oznaczany ilościowo [30;106].

Stosując różne metody oznaczania endogennego MNA⁺ wykryto zmiany jego stężenia w przebiegu kilku jednostek chorobowych. Podniesione stężenie MNA⁺ w osoczu lub moczu stwierdzono w oparzeniach [9] lub też w toksycznym uszkodzeniu wątroby [90;99]. W tych ostatnich badaniach sugerowano, że poziom MNA⁺ może stanowić wskaźnik uszkodzenia wątroby a jednocześnie przemiany nikotynamidu do MNA⁺ i 2-PYR mogą odgrywać rolę w ochronie przed toksycznym efektem wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się nikotynamidu, powstającego w czasie katabolizmu uszkodzenia wątroby [99].

W pelagrze zaobserwowano znacznie obniżone poziomy obu metabolitów: MNA⁺ i 2-PYR w moczu, co spowodowało, iż poziom tych metabolitów był wielokrotnie stosowany do określenia niedoborów żywieniowych [9]. W cukrzycy natomiast zanotowano wyraźny spadek w wydalaniu metabolitów pirydonów MNA⁺, natomiast niewielkie zmiany w wydalaniu samego MNA⁺ [9]. Wzrost w wydzielaniu obu metabolitów obserwowany był natomiast u kobiet w ciąży [9] i u szczurów leczonych fibratami [34]. Sugerowano nawet,

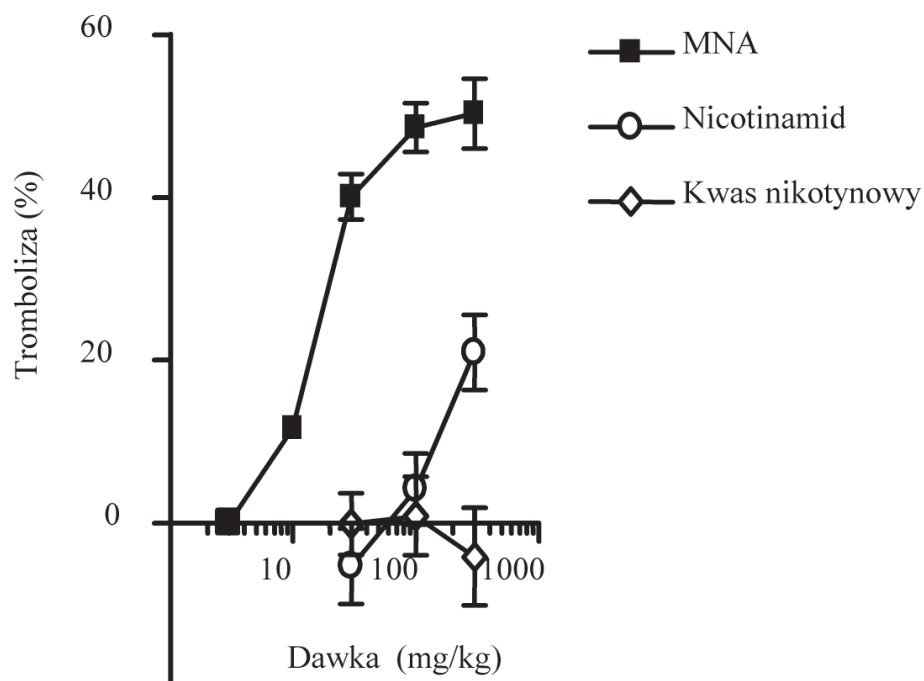
że MNA⁺ jak i jego metabolit 4-PYR mogą stanowić biomarkery proliferacji peroksyosomów [34;103]. Pomiary MNA⁺ w moczu stosowano również jako parametr oceny zdolności systemu kanalików nerkowych do wydzielenia organicznych kationów lub parametr przepływu nerkowego [77; 87].

Choć wyniki bezwzględne wyżej przytoczonych pomiarów są bardzo zmienne stężenie MNA⁺ w osoczu i moczu wynoszą odpowiednio około 1-117 ng ml⁻¹ i 0.5-25 µg ml⁻¹ u zdrowych ludzi i mogą spadać z wiekiem oraz rosnąć w przebiegu chorób nerek lub wątroby [85;90;99].

Pomimo tego, że MNA⁺ uważano za nieaktywny metabolit pojawiały się doniesienia, że nadmierna aktywność N-metylotransferazy i zwiększone wytwarzanie MNA⁺ w mózgu może przyczyniać się do uszkodzenia dopaminergicznych neuronów nigro-striatalnych i do patogenezy choroby Parkinsona. Proponowano nawet wyjaśnienie etiologii choroby Parkinsona w oparciu o zwiększoną produkcję wolnorodnikowych anionów ponadtlennokowych tworzących się przy udziale MNA⁺ i mitochondriów [38]. Istotnie, pacjenci dotknięci chorobą Parkinsona mieli wyższy poziom aktywności N-metylotransferazy w tkankach mózgu w porównaniu z osobami zdrowymi a ekspresja N-metylotransferazy nikotynamidu zwiększała się wraz z postępem degeneracji neuronów w chorobie Parkinsona [94].

Biologiczną aktywność MNA⁺ po raz pierwszy wykazy pionierskie badania prowadzone w zespole Profesora Jerzego Gębickiego z Łodzi. Okazało się, że MNA⁺ podawany miejscowo jest skuteczny w leczeniu niektórych chorób skórnych [40;125] i wykazuje działanie przeciwzapalne. Te badania otworzyły nowy rozdział w historii badań nad MNA⁺. Z nieaktywnego metabolitu nikotynamidu stał się związkiem o działaniu przeciwzapalnym. Choć mechanizm przeciwzapalnego działania MNA⁺ nie był znany, pojawiły się przypuszczenia, że jest związany ze śródbłonkiem naczyniowym.

W ślad za badaniami Profesora Jerzego Gębickiego w Łodzi, badania prowadzone przez Profesora Stefana Chłopickiego w Krakowie po raz pierwszy ujawniły, że MNA⁺ w dawce 3-100 mg/kg ma działanie trombolityczne w modelu *in vivo* [26] i jest związane z uwolnieniem endogennej prostacykliny zależnej do COX-2. W przeciwieństwie do MNA⁺, kwas nikotynowy i nikotynamid w tym samym zakresie dawek nie posiadały działania trombolitycznego (Ryc. C). Co ciekawe, śródbłonkowe działanie MNA⁺ odróżniało ten związek nie tylko od nikotynamidu i kwasu nikotynowego, ale także od wielu innych zbliżonych do niego strukturalnie związków takich jak np. trygonelina czy metabolity MNA⁺ (N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamid (2-PYR) i N1-metylo-4-pyridono-5-karboksamid (4-PYR)).



Ryc. C. Działanie trombolityczne MNA⁺ *in vivo* u szczurów Wistar z krążeniem pozaustrojowym w porównaniu z działaniem nikotynamidu i kwasu nikotynowego. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M z n=4-6 doświadczeń. Przedstawiono odpowiedź mierzoną po jednej godzinie od podania badanego związku *i.v.* Widoczne działanie MNA⁺, niewielkie działanie nikotynamidu i brak trombolitycznego działania kwasu nikotynowego. Na podstawie (Chłopicki *et al.*, 2007).

Poza wiedzą o działaniu przeciwzakrzepowym MNA⁺ *in vivo*, jak dotąd, nie ma żadnych innych prac opisujących działanie MNA⁺ na śródbłonek. Dlatego też celem tej pracy było zbadanie śródbłonkowego działania MNA⁺ w kilku wybranych modelach zwierzęcych patologii układu krążenia *in vivo* jaki i w modelach *in vitro*.

II. CELPRACY

Liczne badania kliniczne i doświadczalne wykazały, że dysfunkcja śródbłonna odgrywa kluczową rolę w wielu chorobach układu krążenia. Dysfunkcja śródbłonna, definiowana jako upośledzenie czynności rozkurczowej naczyń krwionośnych zależnej od śródbłonkowego NO, jest czynnikiem prognostycznym rozwoju *atherothrombosis*, a farmakologiczne przywrócenie prawidłowej czynności śródbłonna, związane jest ze zmniejszeniem częstości występowania zawału serca czy udaru mózgu. Ważnym celem współczesnej farmakologii układu krążenia jest więc, poszukiwanie leków śródbłonkowych, które mogłyby przywrócić prawidłową czynność śródbłonna.

Głównym celem tej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie, śródbłonkowego działania MNA⁺ *in vivo* w modelach zwierzęcych dysfunkcji śródbłonna wywołanej przez hipertriglicydemię lub cukrzycę u szczurów. Ponadto zbadano działanie MNA⁺ *in vitro* w modelu uszkodzenia śródbłonna przez pyrogallol w izolowanej aorcie szczura i w modelu uszkodzenia śródbłonna przez nadtlenek wodoru w linii komórek śródbłonna EA. hy926.

Przedstawione w tej rozprawie badania pozwoliły na opisanie śródbłonkowych właściwości MNA⁺, głównego metabolitu nikotynamidu, który dotychczas uznawany był za związek nieaktywny biologicznie. Być może śródbłonkowy profil działania MNA⁺ będzie mógł kiedyś być wykorzystany w klinicznym leczeniu chorób związanych z dysfunkcją śródbłonna.

III. MATERIAŁY I METODY

III.1. ZWIERZĘCE MODELE DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA

III.1.1 MODEL HIPERTRIGLICERYDEMII

W celu wywołania hipertriglicerydemii szczury płci męskiej, rasy Wistar (n=40) o wadze 250 g były karmione dietą AIN93G bogatą we fruktozę (60%). Grupę kontrolną stanowiły szczury rasy Wistar karmione dietą kontrolną – AIN93G bez dodatku fruktozy. Obie diety były podawane szczurom przez okres 4 lub 8 tygodni. Końcowy skład diety podany jest w Tabeli 1.

Tab.1. Skład standardowej diety AIN-93G i diety wzbogaconej we fruktozę.

Składniki	Dieta standardowa (na 1000g paszy)	Dieta wysokofruktozowa (na 1000g paszy)
Skrobia kukurydziana	532.5	-
Kazeina	200.0	200.0
Sacharoza	100.0	-
Olej sojowy	70.0	70.0
Celuloza	50.0	50.0
Mieszanka mineralna	35.0	35.0
Mieszanka witaminowa	10.0	10.0
Dwuwinian choliny	2.5	2.5
Tert-butylohydronium	0.02	0.02
Fruktoza	-	632.5

III.1.1.1. Opis doświadczenia

Grupy doświadczalne

Grupa licząca 40 szczurów została podzielona na pięć grup doświadczalnych:

Grupa I: Kontrola – (szczury karmione dietą AIN93G),

Grupa II: Hipertriglicerydemia – (szczury karmione przez okres 4 lub 8 tygodni dietą AIN93G zawierającą dodatkowo 60% fruktozy),

Grupa III: Hipertriglicerydemia + MNA⁺ (100 mg/kg) podawany przez okres czterech tygodni (od czwartego do ósmego tygodnia trwania doświadczenia)

Grupa IV: Hipertriglicerydemia + MNA⁺ (100 mg/kg) podawany przez okres ośmiu tygodni (od pierwszego do ósmego tygodnia trwania doświadczenia)

Dodatkowa grupa – Grupa V: Hipertriglicerydemia + MNA⁺ (10 mg/kg) podawany przez okres czterech tygodni (od czwartego do ósmego tygodnia trwania doświadczenia). Ta grupa doświadczalna dodana do wstępnych doświadczeń miała na celu ustalenie optymalnej dawki MNA⁺.

W każdej z powyższych grup doświadczalnych badano czynność śródbłonna w izolowanej aorcie *ex vivo* według protokołu opisanego poniżej (Rozdział III.2.).

III.1.1.2. Analiza stężenia endogennego MNA⁺ i jego metabolitów

W celu wyboru optymalnej dawki terapeutycznej MNA⁺, poziom MNA⁺ i jego metabolitów N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamidu (2-PYR) i N1-metylo-4-pirydono-5-karboksamidu (4-PYR) w osoczu mierzono przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS). Zbadano poziomy metabolitów w osoczu krwi u szczurów niegłodzonych (odstawienie pokarmu na dwie godziny przed pobraniem krwi) i głodzonych (odstawienie pokarmu na dwanaście godzin przed pobraniem krwi), karmionych lub nie egzogennym MNA⁺ (10 lub 100 mg/kg w wodzie do picia). Osocze otrzymano z krwi pobranej na cytrynian (v/v 9:1) po odwirowaniu w wirówce (3000 x g) w temperaturze pokojowej przez 15 min. Osocze zamrożone w -80°C było przechowywane do czasu oznaczeń. Oznaczenia przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS) były możliwe dzięki uprzejmości Prof. Tomasza Smoleńskiego i Dr Ewy Słomińskiej

z Akademii Medycznej w Gdańsku i zostały przeprowadzone według opracowanej przez ten zespół metody [111].

III.1.1.3. Analiza biochemiczna rozwoju hipertriglicydemii

Rozwój hipertriglicydemii u szczurów był monitorowany przez oznaczenia biochemiczne. Próbkki krwi były pobierane po 2 i 12 godzinnym głodzeniu zwierząt z lewej komory serca. Do analizy stosowano osocze uzyskane po pobraniu krwi na cytrynian (v/v 9:1) i odwirowaniu w temperaturze pokojowej przez 15 minut (3000 x g). Dokonano następujących pomiarów: profil lipidowy z uwzględnieniem poziomu całkowitego cholesterol, LDL-, HDL- cholesterolu i trójglicerydów. Pomiary wykonano przed oraz po 4 i 8 tygodniach podawania diety bogatej we fruktozę. Do oznaczenia parametrów biochemicznych zastosowano standardowe kity dla pomiaru trójglicerydów i całkowitego cholesterolu z firmy COR-MAY (Lublin, Polska). Dla pomiaru LDL i HDL cholesterolu stosowano odczynniki firmy Olympus Diagnostica GmbH (Hamburg, Niemcy). Wartości w/w parametrów biochemicznych przedstawiono w mmol/l.

III.1.2. MODEL CUKRZYCY

Cukrzyca była wywoływana przez pojedyncze, dootrzewnowe wstrzyknięcie streptozytocyny (STZ) w dawce 70 mg/kg. Ze względu na większą wrażliwość na STZ stosowano szczury rasy Sprague-Dawley (SPD: 200-250 g), a nie szczury rasy Wistar.

III.1.2.1. Opis doświadczenia

Grupy doświadczalne

Grupa 24 szczurów została podzielona na trzy grupy doświadczalne:

Grupa I: Kontrola – szczury Sprague-Dawley (SPD), którym podana została sól fizjologiczna dootrzewnowo (i.p.)

Grupa II: SPD-STZ – szczury Sprague-Dawley, którym podana była streptozytocyna (70 mg/kg, i.p.)

Grupa III: SPD-STZ + MNA – szczury Sprague-Dawley, którym podana była streptozytocyna (70 mg/kg, i.p.), a następnie po ostrej fazie cukrzycy (po tygodniu po

nastrzyknięciu STZ) podawany był MNA⁺ (100 mg/kg) wraz z wodą do picia przez okres 7 tygodni.

W każdej z powyższych grup doświadczalnych, badano czynność śródbłonka w izolowanej aortalii *ex vivo*, według protokołu opisanego poniżej (Rozdział III.2.)

III.1.2.2. Analiza stężenia endogennego MNA⁺ i jego metabolitów

Analiza stężenia endogennego MNA⁺ oraz poziomu jego metabolitów (2-PYR i 4-PYR) w osoczu pochodzącym od szczurów z cukrzycą dokonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS), w analogiczny sposób jak to opisano powyżej (Rozdział III.1.1.3).

III.1.2.3. Analiza biochemiczna rozwoju cukrzycy

Dla kontroli rozwijającej się cukrzycy stosowano pełną krew lub osocze uzyskane po pobraniu krwi na cytrynian (v/v 9:1) i odwirowaniu w temperaturze pokojowej przez 15 minut (3000 x g). Dokonano następujących pomiarów obrazujących rozwijającą się cukrzycę: poziom glukozy we krwi (przed nastrzyknięciem szczurów streptozytocyją, po tygodniu i po 8 tygodniach), poziomy HbA1C (pełna krew, po 8 tygodniach) oraz peptydu C i fruktozaminy (osocze, po 8 tygodniach). Ponadto analizowano ilość spożywanej wody (codzienne pomiary), zmiany masy ciała (co tydzień). Profil lipidowy z uwzględnieniem całkowitego cholesterolu, LDL, HDL i trójglicerydów wykonywany był przed wywołaniem cukrzycy i po 8 tygodniach po wstrzyknięciu STZ. Do oznaczenia parametrów biochemicznych zastosowano standardowe kity dla pomiaru trójglicerydów i całkowitego cholesterolu z firmy CORMAY (Lublin, Polska) oraz dla pomiaru LDL i HDL cholesterolu odczynnik firmy Olympus Diagnostica GmbH (Hamburg, Niemcy). Wartości parametrów biochemicznych obrazujących poziom lipidów w osoczu przedstawiono w mmol/l. Poziom glukozy we krwi był oznaczany za pomocą glukometru (One-Touch). Frakcję glikozylowanej hemoglobiny (HbA1C) oznaczano w próbkach pełnej krwi (20 μ l) w automatycznym analizatorze DS5 (Drew Scientific, Cumbria, Wielka Brytania) z wykorzystaniem testu do oznaczeń HbA1C (Pink 300 Test reagent Kit, Drew Scientific). Peptyd C oznaczano metodą radioimmunologiczną używając gotowego zestawu firmy DRG International, USA (C peptide RIA (rat); RIA 1254). Natomiast stężenie fruktozaminy oznaczano zgodnie z metodą opisaną przez

Baker'a i wsp. [7]. Niektóre z tych oznaczeń (fruktozamina, peptyd C) wykonano dzięki uprzejmości Profesora Cezarego Watały w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

III. 2. BADANIE CZYNNOŚCI ŚRODBŁONKA W IZOLOWANEJ AORCIE

III.2.1. CZYNNOŚCIOWE OZNACZENIE DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA *EX VIVO* W IZOLOWANEJ AORCIE SZCZURZEJ

Poniżej przedstawiono metodykę badania pierścieni naczyń aorty pochodzących od szczurów, u których wywołana została hipertriglicydemia lub cukrzyca. Naczynia aorty były badane *ex vivo* w klasycznym układzie izolowanych naczyń.

III.2.1.1. Opis aparatury do badania czynności izolowanych naczyń krwionośnych

Metoda „organ bath”, wykorzystywana do badań na izolowanych naczyniach, opiera się na pomiarze zmian izometrycznego napięcia pierścieni naczyń krwionośnych, najczęściej aorty. Krążki aorty umieszczone są w szklanych naczyniach (łaźniach naczyniowych) wypełnionych buforem Kresa- Hansleita o składzie podanym poniżej (III.2.1.2.1) i rozpięte na stalowych drucikach połączonych z czujnikiem rejestrującym zmiany napięcia wywołane podawaniem różnych środków farmakologicznych. Sygnał zmiany napięcia jest rejestrowany na taśmie rejestratora w postaci krzywej, której ramię wznoszące obrazuje skurcz naczynia natomiast ramię opadające rozkurcz naczynia.

Stosowano sześciokanałowy model łaźni naczyniowej umożliwiający w czasie jednego doświadczenia równoczesne badanie sześciu krążków aorty. Każda z sześciu łaźni naczyniowych o pojemności 5 ml była wyposażona w oddzielny płaszcz wodny, umożliwiający zachowanie stałej temperatury buforu (37°C) wypełniającego szklany cylinder, jak również posiadała samodzielny układ odprowadzający zużyty bufor jak i doprowadzający świeży bufor z dwóch zbiorników będących rezerwuarem świeżego, napowietrzanego mieszanką 5% CO₂ i 95% O₂ buforu. Dzięki tak sprzężonym układom w całym układzie łaźni naczyniowej panowały identyczne warunki doświadczenia. Krążki aorty rozpięte były pomiędzy dwoma stalowymi pręcikami, z których jeden połączony był z czujnikiem izometrycznym napięcia (tensometry Biegstab K30, typ 351, Hugo Sachs Elektronik, Germany), a drugi,

umocowany w dolnej części łaźni. Zapis wszystkich reakcji naczyniowych po przetworzeniu i wzmocnieniu przez specjalny wzmacniacz (Transducer Coupler, Londyn, England), odbywał się w ciągły sposób na papierze milimetrowym rejestratora Graphtec Linearorder W 3310. We wszystkich doświadczeniach prędkość przesuwu papieru wynosiła 1 mm/min, a czułość rejestratora 25 mV/cm. Czas trwania eksperymentu wynosił od 5 do 7 godzin.

III.2.1.2. Opis protokołu doświadczeń

III.2.1.2.1. Izolacja aorty szczurzej

Po zważeniu i oznaczeniu, szczury płci męskiej Wistar lub Sprague-Dawley znieczulano przez dootrzewne podanie tiopentalu w dawce 120-150 mg/kg. Po otworzeniu klatki piersiowej i przecięciu rdzenia kręgowego, piersiowa część aorty była wycinana i ostrożnie oczyszczona z przylegających tkanek i tłuszczu. Oczyszczanie z tkanki okołonaczyniowej, przeprowadzono w buforze Krebsa – Henseleita (K-H: skład buforu: 118,0 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,25 mM CaCl₂; 1,64 mM MgSO₄; 1,18 mM KH₂PO₄; 24,88 mM NaHCO₃; 10,0 mM glukoza; 2,2 mM C₃H₃O₃Na i 0,05 mM EDTA) ze szczególną ostrożnością tak by nie uszkodzić śródbłonna. Oczyszczoną aortę następnie podzielono na krążki o szerokości 3-4 mm, które zawieszono w łaźniach wodnych wypełnionych 5ml buforu K-H, pomiędzy dwoma stalowymi pręcikami.

III.2.1.2.2. Ocena aktywności naczyniorozszerzającej śródbłonkowego NO

Krążki aorty początkowo były stabilizowane przez okres około 30 minut, a następnie były stabilizowane przy spoczynkowym napięciu 4g przez około 90 minut. Zmiany w napięciu izometrycznym były cały czas zapisywane przez sześciokanałowy rejestrator. Krążki aorty były przykurczane przez KCl w stężeniach 60 i 90 mM. Po każdorazowym podaniu KCl każde z naczyń trzykrotnie przepłukiwano a następnie przykurczano fenylefryną w stężeniu 0,01-1 μM tak, aby osiągnąć około 60-80% submaksymalnego przykurczu wywołanego przez KCl.

W tak przykurczonych przez fenylefrynę krążkach aorty, wywoływano rozkurcz naczyń zależny i niezależny od śródbłonna, odpowiednio przez acetylocholinę (Ach, 0,01-10 μM), histaminę (Hist, 0,0001-30 μM), lub przez S⁻ nitrozo · N-acetyl · D,L- penicylaminę

(SNAP 0,0001-10 μ M), nitroprusydek sodu (NaNP 0,0001-1 μ M). Udział NO w odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez Ach lub Hist był badany za pomocą inhibitora NOS – L-NAME (300 μ M). Naczynia inkubowano z L-NAME przez 15 minut, a następnie powtarzano odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez Ach lub Hist. We wszystkich doświadczeniach L-NAME powodował zahamowanie naczyniorozszerzających odpowiedzi na acetylocholinę i histaminę w około 90-100%. Odpowiedź wywołana przez acetylocholinę lub histaminę była, więc miarą aktywność naczyniorozszerzającej NO.

W doświadczeniach, których celem było sprawdzenie udziału PGI₂ w działaniu śródbłonkowym MNA⁺ stosowano nie selektywny inhibitor COX – indometacynę, którą przez okres trzech dni podawano wraz z wodą do picia szczurom (5 mg/kg), lub też przeprowadzano doświadczenia w obecności indometacyny w buforze (5 μ M).

Badano również działanie naczyniorozszerzające samego MNA⁺ (0,03-10 mM) i niktynamidu (NA 0,03-10mM) na naczynia ze śródbłonkiem jak i na naczynia pozbawione śródbłonka. Dla potwierdzenie skuteczności zabiegu usunięcia śródbłonka, naczynie przykurczano fenylefryną a następnie sprawdzano odpowiedzi na acetylocholinę we wzrastających stężeniach (0,01-10 μ M).

Rozpuszczalnikiem dla podawanych związków był bufor KH lub w przypadku indometacyny Na₂HCO₃ (5%).

III.2.1.2.3. Zasada obliczania wielkości skurczu i rozkurczu naczyń

Aktywność krążków aorty na działanie związków była rejestrowana podczas trwania eksperymentu na papierze milimetrym. Skurcz aorty był obrazowany jako ramię wznoszące natomiast, odpowiedź rozkurczowa była widoczna jako ramię opadające. Długość poszczególnych odcinków była mierzona przy użyciu linijki i wyrażana w milimetrach i tak np. dla maksymalnej odpowiedzi skurczowej wywołanej przez jedno ze stężeń KCl mierzono długość ramienia wznoszącego od podstawy do punktu plateau wyrażoną w milimetrach określano jako 100%. Podobnie mierzono wielkość przykurczu wywołanego przez fenylefrynę, który stanowić powinien od 60 do 80%, przykurczu wywołanego przez KCl. Wielkość rozkurczu wywołanego przez acetylocholinę, histaminę, SNAP, MNA⁺ i niktynamid wyliczana była jako procent odpowiedzi skurczowej wywołanego przez fenylefrynę.

III. 2.2. BADANIE PODSTAWOWEJ PRODUKCJI NO W AORCIE SZCZURZEJ Z UŻYCIEM ZNACZNIKA FLUORESCENCYJNEGO - DAF-FM

III.2.2.1. Opis właściwości stosowanego znacznika

DAF-FM reprezentuje nowy związek służący do ilościowej oceny niskich stężeń NO. Związek ten w zasadzie nie emituje światła do czasu aż nie zareaguje z NO tworząc fluorescencyjny benzotriazol. DAF-FM w porównaniu z innymi znacznikami fluorescencyjnymi starszej generacji (np. DAF-2) odznacza się większą czułością oraz większą trwałością tworzących się adduktów w połączeniu z NO (NO-DAF-FM). Dla potrzeb moich badań opracowałam protokół badań mający na celu oznaczenie podstawowej produkcji NO w aortach pochodzących od szczurów z hipertriglicydemią.

III.2.2.2. Opis protokołu doświadczenia

Aorty pochodzące od szczurów, u których wywołano hipertriglicydemię były izolowane w sposób opisany powyżej (Rozdział III.2.1.2). Oczyszczony z przylegających tkanek krążek o szerokości około 3 milimetrów (mm) był inkubowany przez okres 15 min w ependorfce zawierającej sam bufor K-H. Następnie po tej krótkiej inkubacji krążek aorty był przenoszony do ependorfki zawierającej znacznik fluorescencyjny DAF-FM (1 μ M) rozpuszczony w 1 ml buforu K-H. Preinkubacja jak i cała dwugodzinna inkubacja ze znacznikiem DAF-FM odbywała się w warunkach zaciemnienia oraz w stałych warunkach temperatury (37°C), a bufor K-H był napowietrzany mieszanką 5% CO₂ i 95 O₂. Po inkubacji ze znacznikiem krążki aorty były przepłukiwane w buforze K-H z niezwiązanego z komórkami znacznika dwukrotnie (dwa razy po 15 minut). Po odpłukaniu krążki aorty były przenoszone do pojemniczków wypełnionych żelem OCT i całkowicie w nim zatapiane, a następnie zamrażane w temperaturze -80°C. Tak przygotowany materiał był przesyłany do Instytutu Nenckiego w Warszawie, gdzie dzięki uprzejmości dr Antoniego Wrzoska została dokonana ocena ilościowa podstawowego poziomu NO z wykorzystaniem opisanej ostatnio metodyki [61] opartej na pomiarze fluorescencji w mikroskopie konfokalnym. Stężenie jak i czas inkubacji krążków aorty ze znacznikiem został ustalony jako optymalny na podstawie wstępnych doświadczeń.

Pomiar intensywności świecenia aorty na przekroju poprzecznym w całej aorcie, wewnątrz jak i na zewnątrz aorty umożliwił ocenę podstawowego poziomu wytwarzania NO

w następujących grupach szczurów: kontrolnej, hipertriglicerydemicznej oraz w grupie hipertriglicerydemicznej traktowanej MNA⁺ (100 mg/kg).

III.2.3. BADANIE PODSTAWOWEGO WYTWARZANIA PGI₂ PRZEZ KRAŻKI AORTY (pomiar 6-keto-PGF_{1α})

III.2.3.1. Podstawowe wytwarzanie PGI₂ w krążkach aorty stymulowanych naciągiem

Wytwarzanie prostacykliny (PGI₂), uwalnianej przez krążki aorty było oceniane na podstawie stężenia stabilnego metabolitu PGI₂ - 6-keto-PGF_{1α} w efluencie. W tym celu wykorzystano standardowe kity (Cayman Chemical Company, MI, USA oraz R&D Systems, Inc., MN, USA) do oznaczeń 6-keto-PGF_{1α} metodą ELISA.

Podczas każdego eksperymentu opisanego w rozdziałach III.2.1. został pobrany efluent (200 μl) z każdego krążka aorty do oznaczeń 6-keto-PGF_{1α} (bufor K-H po 30 minutowej inkubacji, naciąg naczyń 4g). Po zakończonym doświadczeniu krążki aorty szczurzej zostały oznaczone i wysuszone w celu oznaczenia ich wagi. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w buforze wyrażono w pg/ml/mg suchej masy aorty.

III.2.3.2. Podstawowe wytwarzanie PGI₂ w krążkach aorty niestymulowanych naciągiem

Krażki aorty o długości 3 mm pochodzące od szczurów były początkowo poddawane wstępnej inkubacji (15 min, 37°C) w 1 ml ependorfkach wypełnionych buforem KH napowietrzanym karbogenem wraz z odpowiednimi stężeniami indometacyny. Następnie po wstępnej inkubacji przeniesione zostały do nowych ependorfek zawierających odpowiednie stężenie związków i poddane 30 min inkubacji w analogicznych warunkach bez naciągu. Po zakończeniu inkubacji efluent został natychmiast zamrożony do oznaczenia stężenia 6-keto-PGF_{1α} (ELISA) natomiast krążki aorty były suszone i ważone. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} było wyrażone w pg/ml/mg suchej masy aorty.

W celu ustalenia źródła enzymatycznego wytwarzania PGI₂, krążki aorty, z wszystkich grup doświadczalnych zostały poddane inkubacji w obecności indometacyny (5 μM). W niektórych doświadczeniach podawano egzogennie MNA⁺ (300 μM).

III.2.3.3. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu

W badanych grupach doświadczalnych szczurów mierzono także stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu używając opisanej powyżej metodyki pomiarów. Osocze otrzymano po pobraniu krwi na cytrynian (v/v 9:1) i odwirowaniu w temperaturze pokojowej (3000 x g). Osocze było przechowywane w temperaturze -80°C. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} wyrażono w pg/ml.

III.3. MODELE USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA *IN VITRO*

III.3.1. MODEL WOLNORODNIKOWEGO USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA PRZEZ PYROGALLOL

W modelu eksperymentalnym „organ bath” badano wpływ MNA⁺ *in vitro* na uszkodzenie śródbłonna aorty wywołane przez generator wolnych rodników jakim jest pyrogallol.

III.3.1.1. Opis protokołu doświadczenia

Izolację aort ze szczurów rasy Wistar przeprowadzano w sposób opisany powyżej (Rozdział III.2.1.2). Przebieg doświadczenia był następujący: w przykurczonych submaksymalnie fenylefryną naczyniach, został oceniony czynnościowy stan śródbłonna aorty, na podstawie zależnego od NO rozkurczu naczyń wywołanego przez acetylocholinę (0,01-10 μM). Dla porównania testowany był również rozkurcz niezależny od śródbłonna przy użyciu nitroprusydku sodu (0,0001-1 μM).

Następnie krążki aorty zostały poddane działaniu generatora wolnych rodników pyrogallolu (30, 50 i 100 μM). Sprawdzony został stopień uszkodzenia komórek śródbłonna po 30 minutowej inkubacji krążków aorty z pyrogallem.

MNA⁺ (300 μM) był inkubowany przez godzinę przed podaniem pyrogallolu (30, 50 i 100 μM).

III.3.2. MODEL USZKODZENIA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA W HODOWLI KOMÓRKOWEJ PRZEZ NADTLENEK WODORU (H₂O₂)

Wykorzystując hodowle komórkowe linii EA. hy926 zostały przeprowadzone doświadczenia, sprawdzające wpływ MNA⁺ i nikotynamidu (0,03; 0,3; 1; 3; 10 mM) na uszkodzenie komórek śródbłonna wywołane przez nadtlenek wodoru (H₂O₂) (0,3; 1; 3; 10 mM).

III.3.2.1. Opis protokołu doświadczenia

Komórki linii EA. hy926 były wysiewane na 96 dołkową płytkę w liczbie 2×10^4 . Doświadczenie wykonano na komórkach, które uprzednio były inkubowane przez 24 godziny w medium DMEM (Sigma) zawierającym 10% surowicy, z dodatkiem HAT (suplement zawierający hipoksyntezę, aminopterynę i tymidynę stosowany do selekcji i hodowli komórek typu hybridoma) oraz 1% albuminy.

Eksperyment polegał na wstępnej inkubacji komórek przez 2 godziny z badanymi związkami (MNA⁺ i nikotynamidem) a następnie na podaniu czynnika uszkadzającego (H₂O₂) na okres od 6 do 24 godzin. Po zakończeniu eksperymentu i odwirowaniu płytki tak by w supernatancie nie było zawieszonych komórek, nadsącz był zbierany i zamrażany (100 µl). Po rozmrożeniu supernatant był wykorzystywany do oznaczenia aktywności enzymu LDH w uszkodzonych komórkach. Supernatant przez okres 30 minut był inkubowany w warunkach zaciemnienia z mieszkanką reakcyjną dołączoną do standardowego kitu oznaczającego aktywność LDH (Cytotoxicity Detection Kit, TakaRa, Bio Inc), który mierzy aktywność LDH na podstawie ilości tworzącego się barwnego formazonu, wykazującego maksimum absorpcji przy około 500 nm. Po inkubacji dokonywano odczytu absorpcji próbek w 492 nm używając czytnika płytkowego ELISA. Referencyjna długość wynosiła 600 nm. Uzyskane wyniki zwyczajowo przedstawiane są jako procent uszkodzenia komórek w stosunku do uszkodzenia powodowanego przez 1% TRYTON X-100. Wartości uszkodzenia wywołanego przez TRITON X - 100 w stężeniu 1% były jednak porównywalne z uszkodzeniem, jakie powodowała 3 mM H₂O₂, stad wyniki przedstawiono jako % uszkodzenia wywołanego przez H₂O₂ (3 mM).

III.3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

Dane z doświadczeń przedstawione są w postaci średniej arytmetycznej ± błąd standardowy średniej. Dla porównywania tylko dwu grup użyto odpowiednio testu t-Studenta (rozkład normalny) lub Wilcoxon (rozkład nienormalny), natomiast dla trzech i więcej grup odpowiednio ANOVA z testem Scheffego albo dla rozkładu nienormalnego test Kruskala-Wallisa. We wszystkich porównaniach $p < 0.05$ uznawano za statystycznie znamienne.

IV. WYNIKI

IV. 1. BADANIE ŚRÓDBŁONKOWEGO DZIAŁANIA MNA⁺ W ZWIERZĘCYCH MODELACH DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA

IV.1.1. WPŁYW MNA⁺ NA ROZWÓJ DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA W HIPERTRIGLICERYDEMII U SZCZURÓW

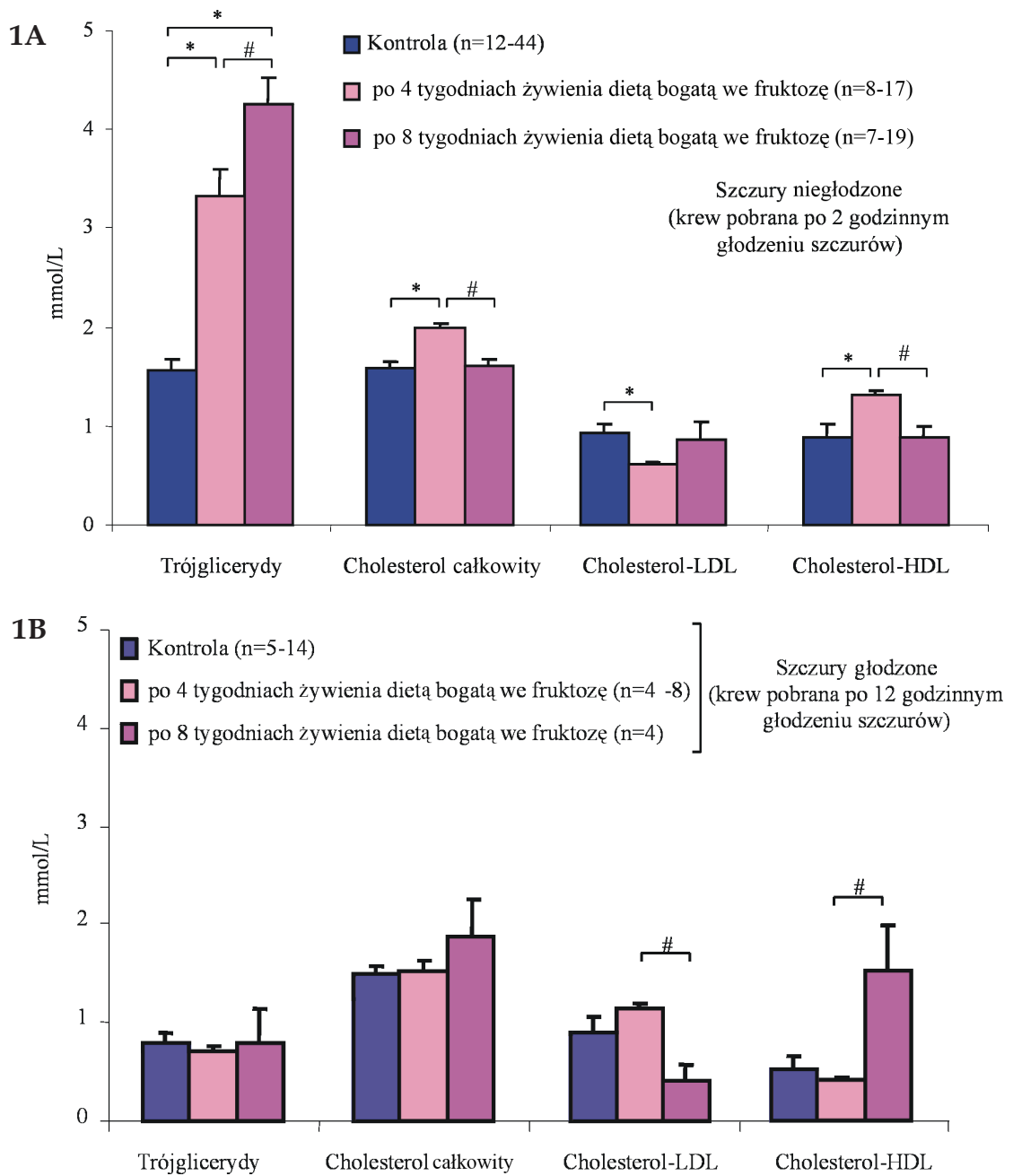
IV.1.1.1. Analiza biochemiczna rozwoju hipertriglicerydemii

Dla oceny rozwoju hipertriglicerydemii u szczurów karmionych dietą wysokofruktozową wykonano oznaczenia profilu lipidowego w czwartym i ósmym tygodniu czasu trwania doświadczenia. Analizy dokonano w drugiej (szczury niegłodzone) albo dwunastej (szczury głodzone) godzinie po odstawieniu karmy szczurom.

U szczurów niegłodzonych, zarówno w czwartym jak i ósmym tygodniu żywienia dietą bogatą we fruktozę stężenie trójglicerydów było znacznie podwyższone, po 4 tygodniach diety hipertriglicerydemicznej około dwa razy (od $1,55 \pm 0,12$ do $3,32 \pm 0,28$ mmol/L), a po 8 tygodniach około trzykrotnie (do $4,25 \pm 0,27$ mmol/L).

Zmiany innych parametrów profilu lipidowego były niewielkie. Po 4 tygodniach żywienia zaznaczył się niewielki wzrost stężenia cholesterolu całkowitego (od $1,56 \pm 0,07$ do $1,99 \pm 0,05$ mmol/L) i cholesterolu HDL (od $0,88 \pm 0,15$ do $1,31$ mmol/L) oraz niewielki spadek cholesterolu LDL (od $0,92 \pm 0,08$ do $0,60$ mmol/L). Natomiast po 8 tygodniach żywienia nastąpił niewielki spadek stężenia poziomu cholesterolu całkowitego i cholesterolu HDL (Ryc. 1A).

W przeciwieństwie do wyników uzyskanych u szczurów niegłodzonych, gdy szczury poddano 12 godzinnemu głodzeniu stężenie trójglicerydów we krwi u szczurów karmionych dietą wysokofruktozową i kontrolną były podobne (Ryc. 1B). Tak więc efekt diety bogatej we fruktozę na poziom trójglicerydów był widoczny tylko wtedy, gdy szczurom



Ryc. 1. Wpływ diety bogatej we fruktozę na profil lipidowy u szczurów: **Ryc. 1A.** Wzrost stężenia trójglicerydów u szczurów niegłodzonych karmionych dietą bogatą we fruktozę przez okres 4 i 8 tygodni. **Ryc. 1B.** Brak widocznego wzrostu stężenia trójglicerydów pod wpływem diety bogatej we fruktozę po takim samym okresie karmienia szczurów (4 i 8 tygodni), gdy szczury głodzone 12 godzin przed pobraniem krwi. W obu przypadkach grupę kontrolną stanowiły szczury karmione dietą standardową pozbawioną fruktozy. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną przez 4 i 8 tygodni, # oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicerydemiczną przez okres 4 i 8 tygodni.

pobrano krew na 2 godziny po odebraniu karmy szczurom. Głodzenie szczurów miało także wpływ na poziom cholesterolu LDL, HDL oraz całkowity poziom cholesterolu, jednak nie były to tak wyraźne zmiany jak w przypadku trójglicerydów. Były jednak widoczne dla poziomów cholesterolu HDL i LDL. Istotnie, stężenie HDL – cholesterolu, u szczurów głodzonych, w 8 tygodniu żywienia dietą bogatą we fruktozę był wyższy w porównaniu z grupą niegłodzoną. Natomiast stężenie LDL – cholesterolu u szczurów głodzonych i żywionych przez 8 tygodni dietą wysokofruktozową był niższy zarówno w porównaniu z kontrolą i z grupą żywioną 4 tygodnie dietą wysokofruktozową (Ryc. 1B).

12 godzinne głodzenie szczurów przed pobraniem krwi spowodowało również znaczny spadek stężenia trójglicerydów u szczurów kontrolnych w stosunku do stężenia trójglicerydów u szczurów niegłodzonych przed pobraniem krwi (z $1,55 \pm 0,12$ do $0,80 \pm 0,09$ mmol/L).

IV.1.1.2. **Rozwój dysfunkcji śródbłonna w modelu hipertriglicydemii**

IV.1.1.2.1. Zmiany aktywności naczyniorozszerzającej śródbłonkowego NO

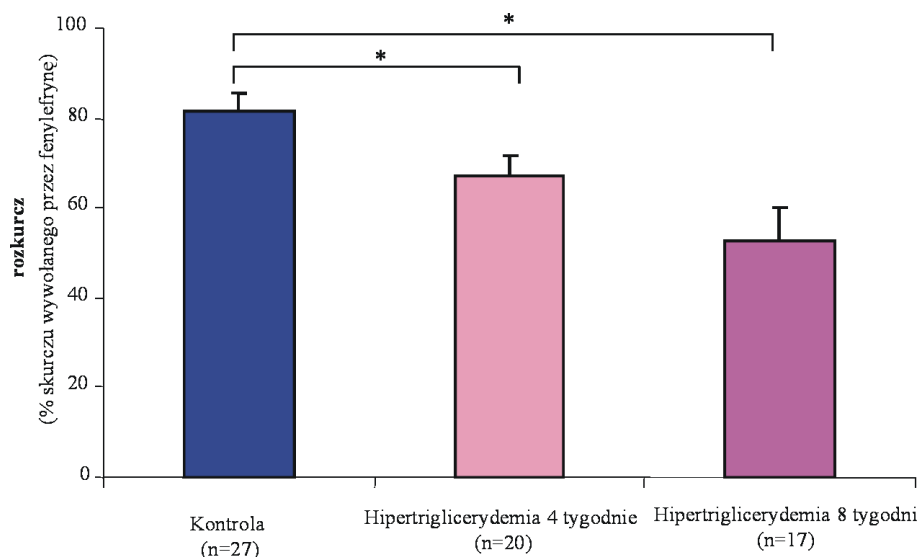
Funkcja śródbłonna naczyń była oceniana jako procent rozkurczu naczyń wywołanego przez acetylocholinę w krążkach aorty *ex vivo*. Analizowano ją zarówno u szczurów niegłodzonych jak i głodzonych.

SZCZURY NIEGŁODZONE – ODSTAWIENIE KARMY 2 GODZINY PRZED POBRANIEM KRWI

Rozkurcz krążków aorty wywołany przez acetylocholinę w stężeniu $1 \mu\text{M}$, był upośledzony w stosunku do kontroli już po 4 tygodniach (od $81,44\% \pm 3,90$ do $66,90\% \pm 4,54$) i to upośledzenie nasiliło się po 8 tygodniach stosowania diety bogatej we fruktozę (do $52,41\% \pm 7,89$) (Ryc. 2).

SZCZURY GŁODZONE – ODSTAWIENIE KARMY 12 GODZIN PRZED POBRANIEM KRWI

Gdy krążki aorty pobierano od szczurów głodzonych karmionych dietą standardową oraz bogatą we fruktozę odpowiedzi na acetylocholinę były upośledzone (odpowiednio dla $1 \mu\text{M}$ Ach: $70,00 \pm 4,76$ i $27,73 \pm 6,90$ %) w porównaniu do analogicznych grup szczurów niegłodzonych (dla $1 \mu\text{M}$ Ach: $81,44 \pm 3,9$ i $52,41 \pm 7,89$ %) (Ryc. 3A i 3B). Jednak dwunastogodzinne głodzenie szczurów przed pobraniem aorty nie wpłynęło na wielkość odpowiedzi naczyniorozkurczającej niezależnej od śródbłonkowego NO wywołanej przez SNAP, zarówno w grupie u szczurów karmionych dietą standardową (Rys. 4A) jak i u szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę (Ryc. 4B).



Ryc. 2. Pogłębiające się, w toku trwania hipertriglicydemii, upośledzenie odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO, wywołanej przez acetylocholinę (1:1) w izolowanej aorcie szczura *ex vivo*. Grupę kontrolną stanowiły szczury karmione dietą standardową pozbawioną fruktozy. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicydemyczną przez 4 i 8 tygodni.

IV.1.1.2.2. Zmiany aktywności śródbłonkowej PGI_2

IV.1.1.2.2.1. Podstawowy poziom PGI_2 w krążkach aorty stymulowanych naciągiem

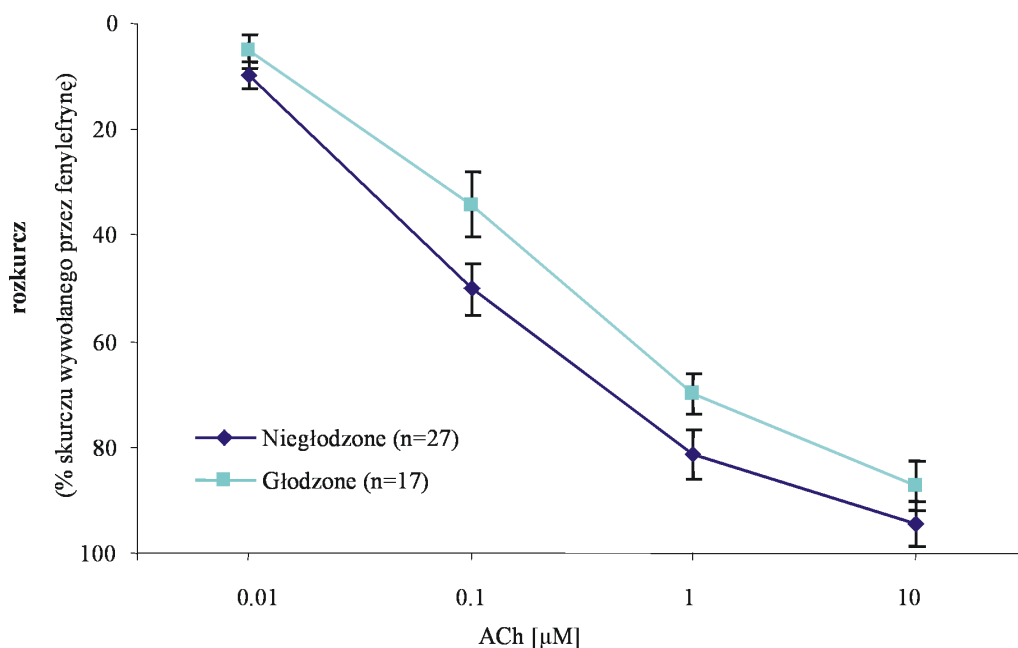
Poziom PGI_2 w efluencie pochodzącym z inkubacji naczyń badano u szczurów głodzonych i niegłodzonych.

SZCZURY NIEGŁODZONE

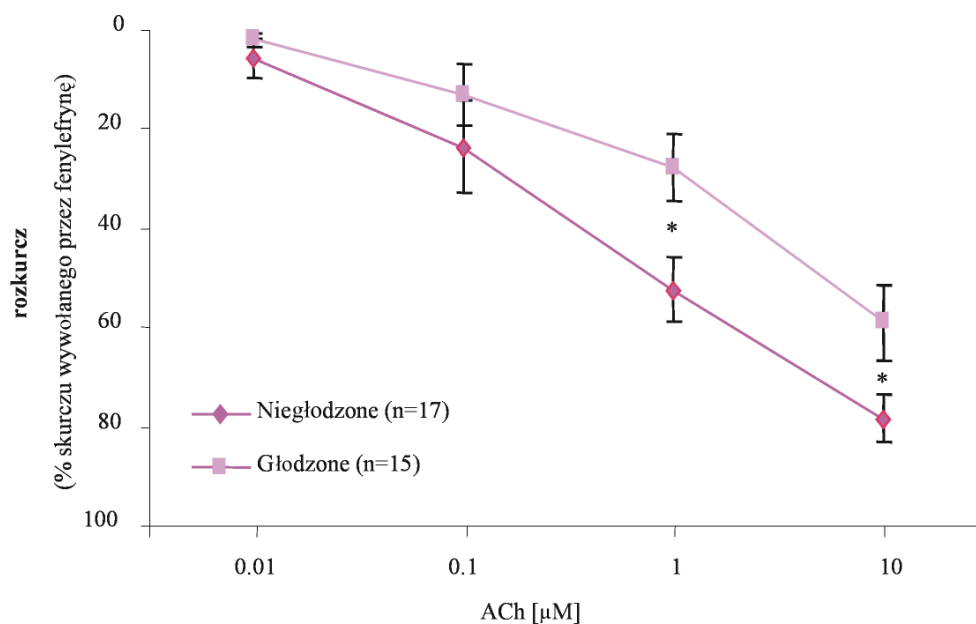
W grupie szczurów niegłodzonych przed pobraniem aorty w krążkach stymulowanych naciągiem widoczny był bardzo niewielki wzrost poziomu podstawowego metabolitu PGI_2 (6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) u szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę w stosunku do szczurów karmionych dietą standardową (z $54,78 \pm 10,10$ do $86,90 \pm 25,39$ pg/ml/mg suchej masy aorty) (Ryc. 5).

SZCZURY GŁODZONE

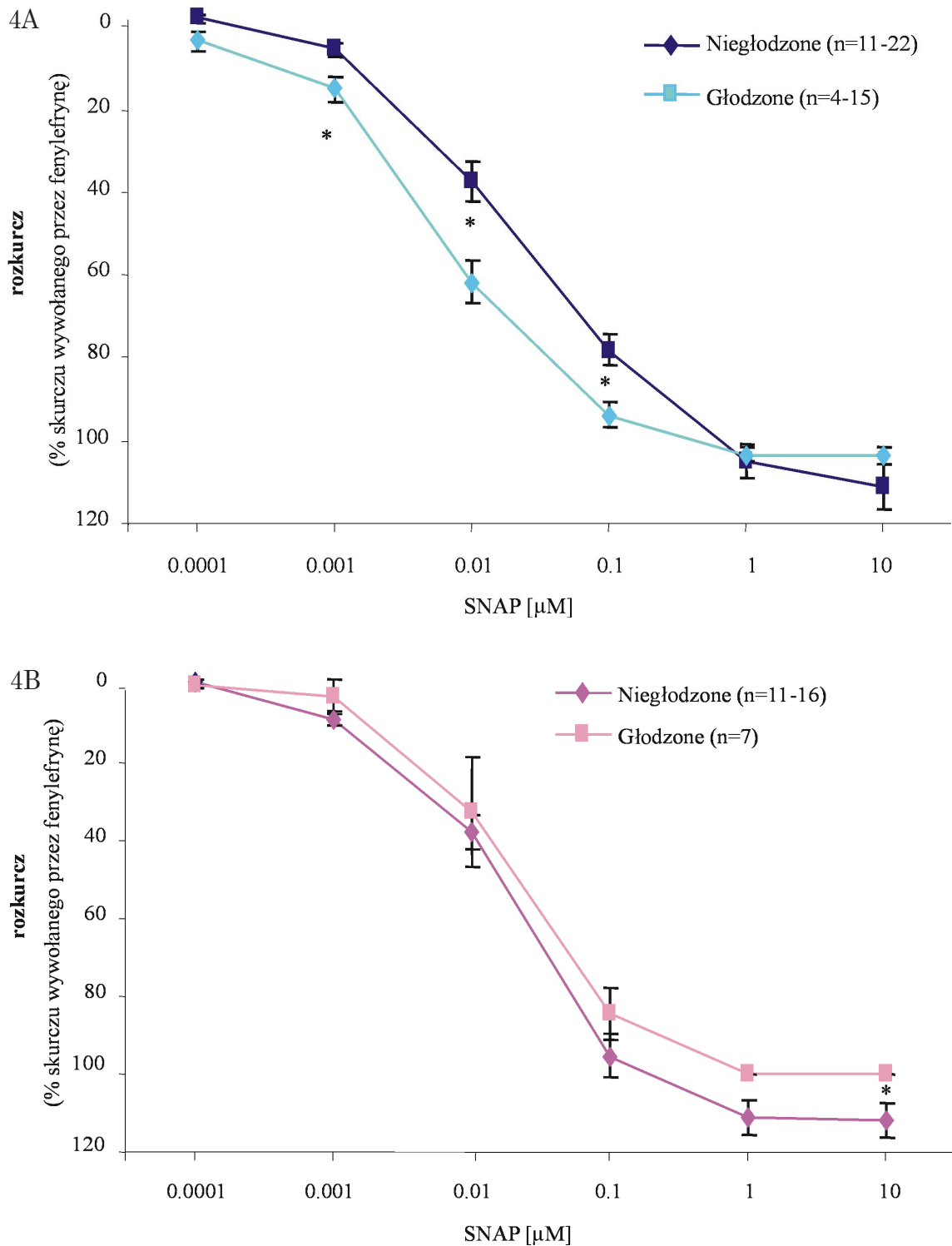
Natomiast u szczurów głodzonych w krążkach aorty stymulowanych naciągiem w grupie szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę widoczny był wzrost podstawowego



Ryc. 3. Wpływ głodzenia szczurów na wielkość odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO wywołanej przez acetylocholinę w aorcie szczura *ex vivo*. **Ryc. 3A.** Upośledzenie odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez acetylocholinę, u szczurów kontrolnych głodzonych przez 12 godzin przed pobraniem aorty. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupami szczurów kontrolnych, niegłodzonych i głodzonych.

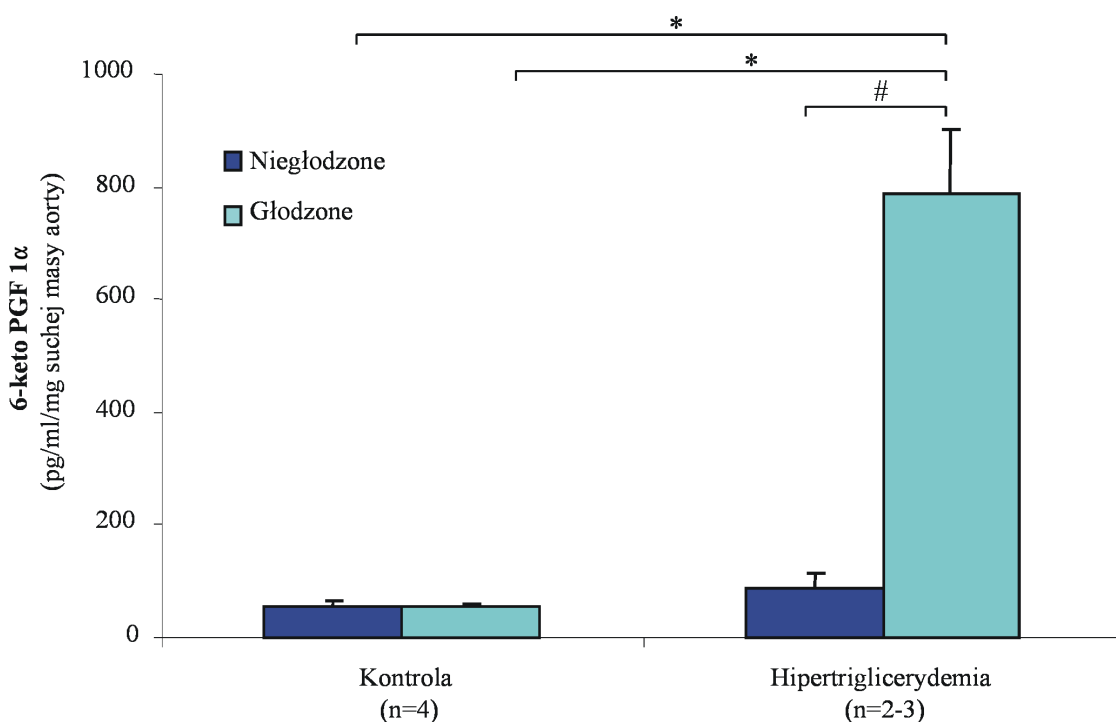


Ryc. 3B. Upośledzenie odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez acetylocholinę, u szczurów z hipertriglicydemią głodzonych przez 12 godzin przed pobraniem aorty. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupami szczurów karmionych dietą hipertriglicydemyczną, niegłodzonych i głodzonych.



Ryc. 4. Brak znaczącego wpływu 12 – godzinnej głodzenia szczurów na wielkość odpowiedzi naczynio-rozszerzającej niezależnej od śródbłonkowego NO wywołanej przez SNAP u szczurów kontrolnych (Ryc. 4A) i u szczurów z hipertriglicerydemią (Ryc. 4B). Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupami szczurów niegłodzonych i głodzonych.

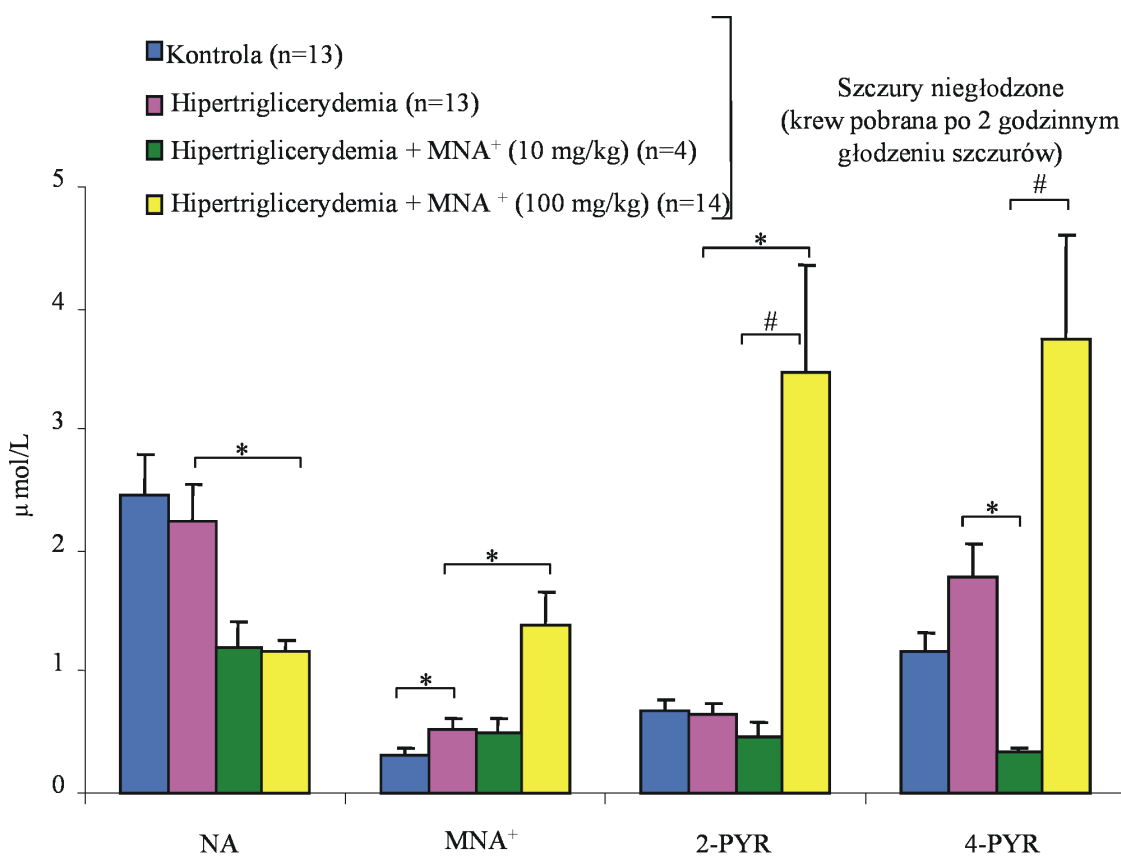
wytwarzania PGI_2 (6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) w stosunku do szczurów karmionych dietą kontrolną (od $57,10 \pm 2,99$ do $784,17 \pm 118,44$ pg/ml/mg suchej masy aorty) (Ryc. 5).



Ryc. 5. Wzrost podstawowego wytwarzania PGI_2 (6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) w krążkach aorty stymulowanych naciąganiem w grupie szczurów z hipertriglicerydemią wywołany przez 12 godzinne głodzenie szczurów przed pobraniem aorty. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów (głodzonych) i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną (głodzonych), # oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów z hipertriglicerydemią niegłodzonych i głodzonych.

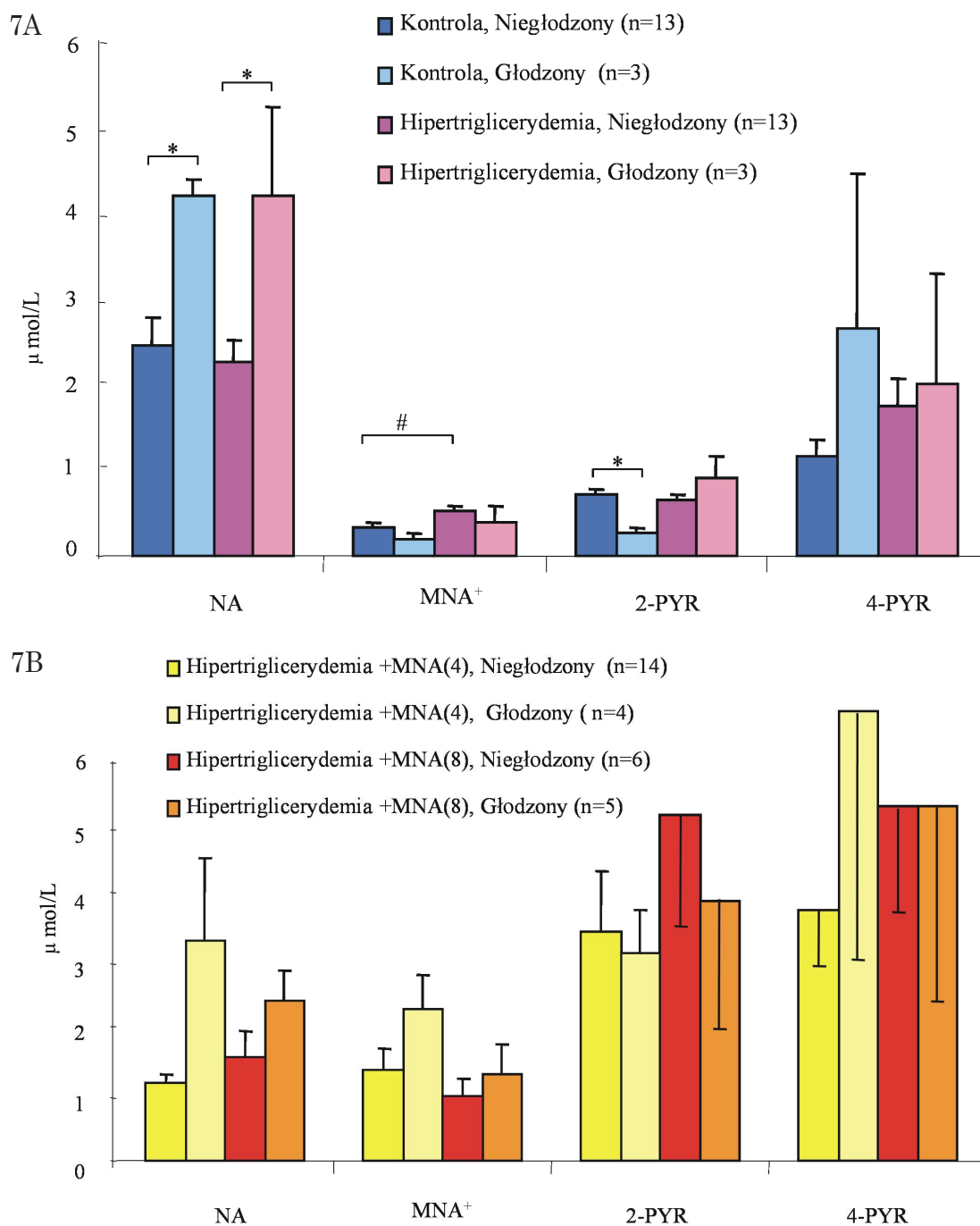
IV.1.13 Wybór dawki terapeutycznej MNA^+ do badań *in vivo*

Analiza poziomu MNA^+ i jego metabolitów w osoczu u szczurów z hipertriglicerydemią, którym podawano MNA^+ wykazała, iż przy dobowej dawce MNA^+ 100 mg/kg zaobserwowano wzrost stężenia MNA^+ w osoczu (od $0,53 \pm 0,08$ do $1,39 \pm 0,27$: mol/L odpowiednio dla hipertriglicydemii i hipertriglicydemii+ MNA^+), jaki i jego metabolitów 2-PYR (od $0,64 \pm 0,09$ do $3,45 \pm 0,90$: mol/L) i 4-PYR (od $1,78 \pm 0,29$ do $3,75 \pm 0,84$: mol/L). Użycie niższej dawki MNA^+ (10 mg/kg masy ciała) nie spowodowało wzrostu poziomu MNA^+ i jego metabolitów (Ryc. 6).



Ryc. 6. Wzrost stężenia MNA⁺ i jego metabolitów 2-PYR (N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamid) i 4-PYR (1-metylo-4-pirydono-5-karboksamid) w osoczu u szczurów z hipertriglicerydemią, którym podawano MNA⁺ w dawce 100 mg/kg/dzień. (NA- nikotynamid). Krew pobierano od szczurów bez uprzedniego ich głodzenia. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupami szczurów z hipertriglicerydemią i grupami z hipertriglicerydemią u których podawano MNA⁺ w dawce 10 lub 100 mg/kg masy ciała oraz pomiędzy grupa kontrolną a grupami z hipertriglicerydemią, # oznacza p<0,05 pomiędzy grupami z hipertriglicerydemią, u których podawano MNA⁺ w dawce 10 i 100 mg/kg masy ciała.

Poziomy metabolitów MNA⁺ w osoczu szczurów w zależności od długości czasu ich głodzenia w zasadzie nie różniły się statystycznie w badanych grupach (Ryc. 7A i 7B).



Ryc. 7. Brak znaczącego wpływu 12- godzinnego głodzenia szczurów na stężenia MNA⁺ i jego metabolitów u szczurów kontrolnych (7A) i szczurów z hipertriglicerydemią (7A) i szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych MNA⁺ przez 4 i 8 tygodni (7B). MNA (4) oznacza 4 tygodniowy okres podawania MNA⁺ tak jak we wszystkich innych rycinach. Dodatkowo przedstawiono wyniki stężenia MNA⁺ i jego metabolitów po 8 tygodniach podawania MNA⁺ - MNA (8). Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupami szczurów głodzonych i niegłodzonych, # oznacza $p < 0,05$ pomiędzy szczurami kontrolnymi i szczurami z hipertriglicerydemią.

IV.114 Wpływ MNA⁺ na rozwój hipertriglicydemii

SZCZURY NIEGŁODZONE

Podawanie MNA⁺ szczurom z hipertriglicydemią przez okres 4 tygodni wywoływało spadek stężenia trójglicerydów (od $4,25 \pm 0,27$ do $2,18 \pm 0,14$ mmol/L). Stężenie całkowitego cholesterolu oraz LDL-cholesterolu nie uległy zmianie pod wpływem przyjmowanego MNA⁺ jedynie stężenie HDL-cholesterolu wzrosło po podawaniu MNA⁺ (od $0,87 \pm 0,17$ do $1,33 \pm 0,06$ mmol/L) (Ryc. 8A).

Indometacyna podawana szczurom przez okres 3 dni (5 mg/kg masy ciała) nie miała wpływu na działanie MNA⁺ obniżające stężenie trójglicerydów bowiem podawanie MNA⁺ szczurom karmionym indometacyną wywołało również obniżenie poziomu trójglicerydów (z $2,58 \pm 0,30$ do $1,64 \pm 0,13$ mmol/L). Zaobserwowano niewielki wzrost poziomu LDL-cholesterolu po podawaniu MNA⁺ szczurom z hipertriglicydemią (od $0,76 \pm 0,02$ do $0,94 \pm 0,02$ mmol/L) (Ryc. 8B).

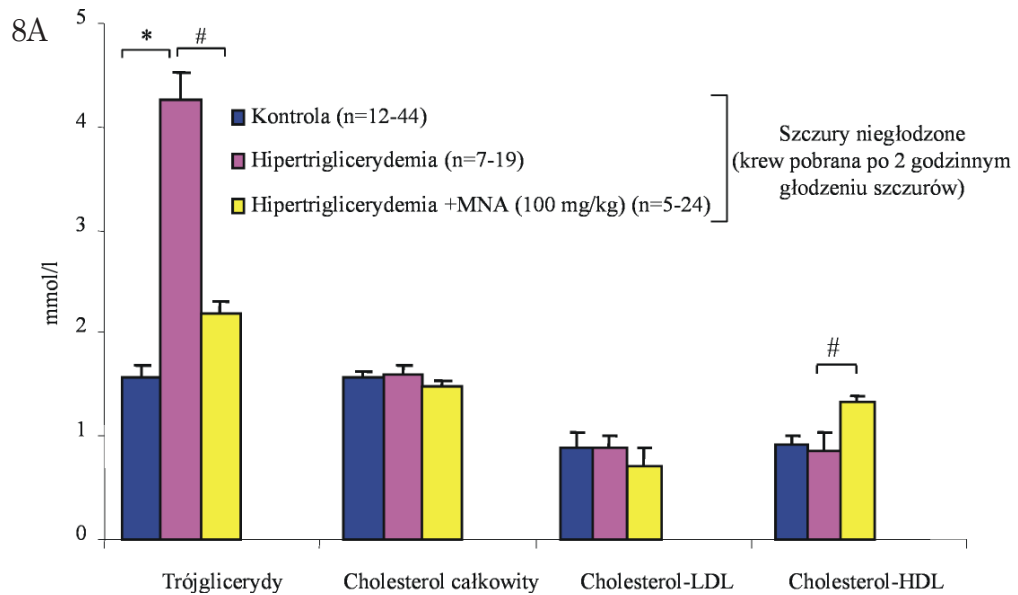
Jak przedstawiono na rycinie 9 w zależności od długości głodzenia szczurów zaobserwowano następujące zmiany w parametrach lipidowych u szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę i traktowanych lub nie MNA⁺:

SZCZURY NIEGŁODZONE

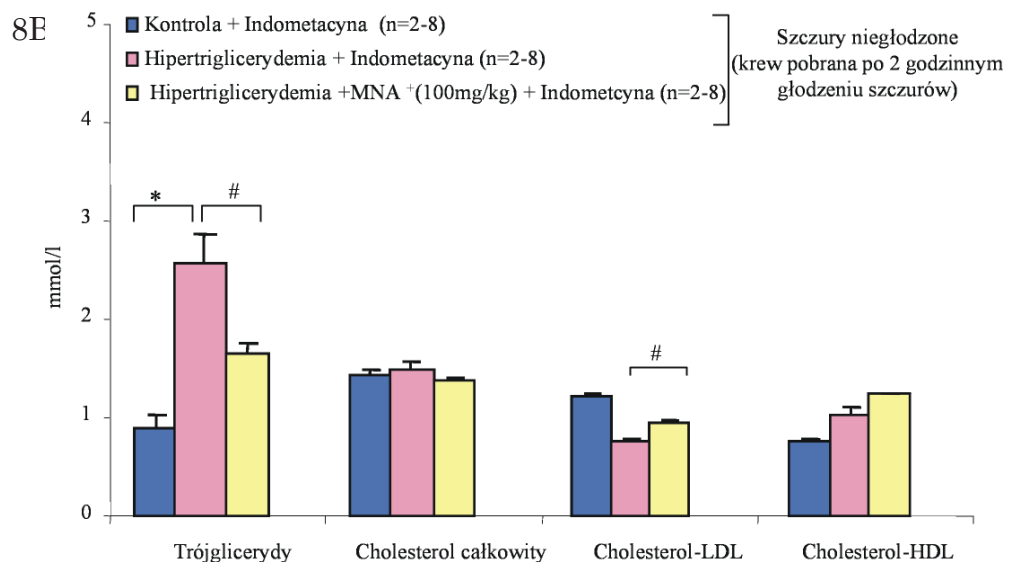
Stężenie trójglicerydów w osoczu szczurów niegłodzonych traktowanych MNA⁺ przez okres 4 i 8 tygodni było niższe w porównaniu ze szczurami, u których nie był podawany MNA⁺ ($1,67 \pm 0,15$ i $2,07 \pm 0,12$ vs $3,32 \pm 0,28$ i $4,25 \pm 0,27$ mmol/L).

SZCZURY GŁODZONE

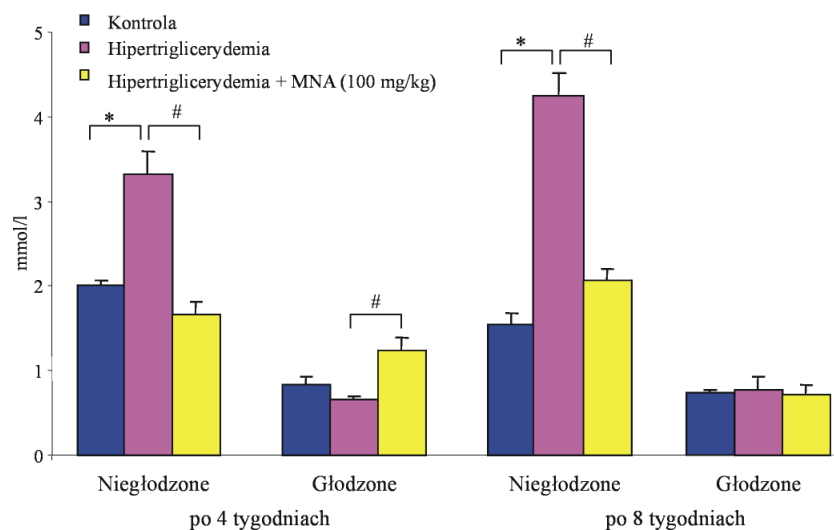
W grupie szczurów głodzonych karmionych dietą bogatą we fruktozę, efekt MNA⁺ obniżający trójglicerydy nie był widoczny bo poziom wyjściowy trójglicerydów był dwukrotnie niższy niż w analogicznej grupie szczurów niegłodzonych (Ryc. 9)



Ryc. 8. Wpływ MNA⁺ na profil lipidowy u szczurów z hipertriglicerydemią. **Ryc. 8A.** Spadek stężenia trójglicerydów u szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych MNA⁺ (100 mg/kg) przez okres 4 tygodni. Grupę odniesienia stanowiły szczury karmione dietą standardową pozbawioną fruktozy. Krew pobierano od szczurów bez ich uprzedniego głodzenia. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną, # oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicerydemiczną i grupą hipertriglicerydemiczną traktowaną MNA⁺ przez okres 4 tygodni.



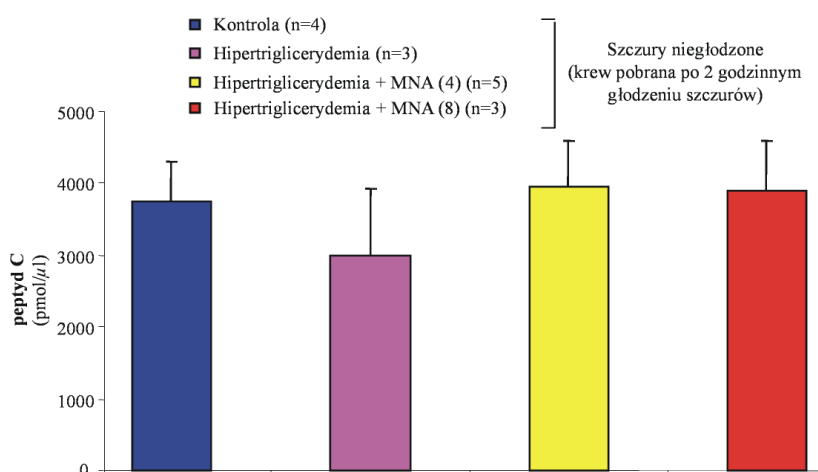
Ryc. 8B. Brak wpływu indometacyny na działanie MNA⁺ obniżające stężenie trójglicerydów u szczurów z hipertriglicerydemią. MNA⁺ (100 mg/kg) podawano przez okres 4 tygodni a indometacynę (5 mg/kg) przez okres 3 ostatnich dni przed pobraniem krwi. Grupę kontrolną stanowiły szczury karmione dietą standardową pozbawioną fruktozy i jednocześnie pojone indometacyną przez okres 3 dni. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną, # oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicerydemiczną i grupą hipertriglicerydemiczną traktowaną MNA⁺ przez okres 4 tygodni.



Ryc. 9. Brak działania obniżającego stężenie trójglicerydów przez MNA⁺ u szczurów głodzonych z hipertriglicerydemią. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p < 0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną, # oznacza p < 0,05 pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicerydemiczną i grupą hipertriglicerydemiczną traktowaną MNA⁺ przez okres 4 tygodni.

IV.15. Wpływ MNA⁺ na poziom peptydu C

Zarówno dieta bogata we fruktozę jak i podawanie MNA⁺ pozostawały bez znaczącego wpływu na stężenie białka C w osoczu krwi u szczurów (Ryc. 10).



Ryc. 10. Brak różnic w stężenia peptydu C w osoczu pomiędzy szczurami kontrolnymi, z hipertriglicerydemią i szczurami z hipertriglicerydemią traktowanych MNA⁺ przez 4 i 8 tygodni - odpowiednio MNA(4) i MNA (8). Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M.

IV.1.1.6. Wpływ MNA⁺ na rozwój dysfunkcji śródbłonka w modelu hipertriglicerydemii

IV.1.1.6.1. Wpływ MNA⁺ na aktywności naczyniorozszerzającą śródbłonkowego NO

SZCZURY NIEGŁODZONE

MNA⁺ podawany przez okres 4 tygodni szczurom z hipertriglicerydemią spowodował odwrócenie upośledzenia odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO. Jak przedstawiono na rycinie 11A rozkurcz aorty w grupie szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych MNA⁺ w odpowiedzi na wzrastające stężenia acetylocholin, był większy w stosunku do rozkurczu naczyń u szczurów z hipertriglicerydemią, którym nie podawano MNA⁺ (Ryc. 11A).

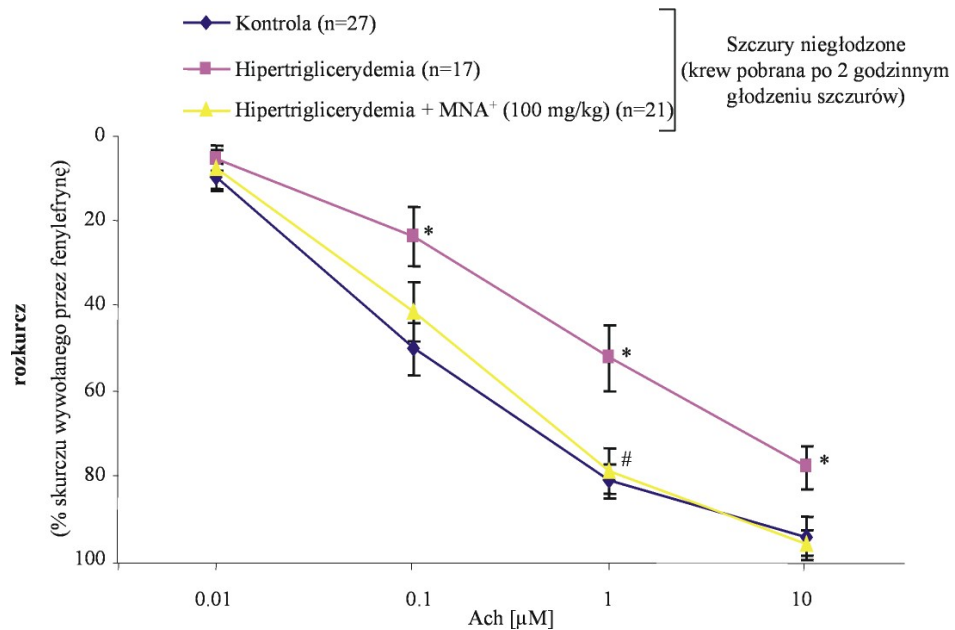
SZCZURY GŁODZONE

Efekt ochronnego działania MNA⁺ i przeciwdziałanie upośledzeniu odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO w aorcie, był widoczny także w grupie szczurów głodzonych 12 godzin przed pobraniem aorty, był więc niezależny od poziomu trójglicerydów i czasu głodzenia szczurów (Ryc. 11B).

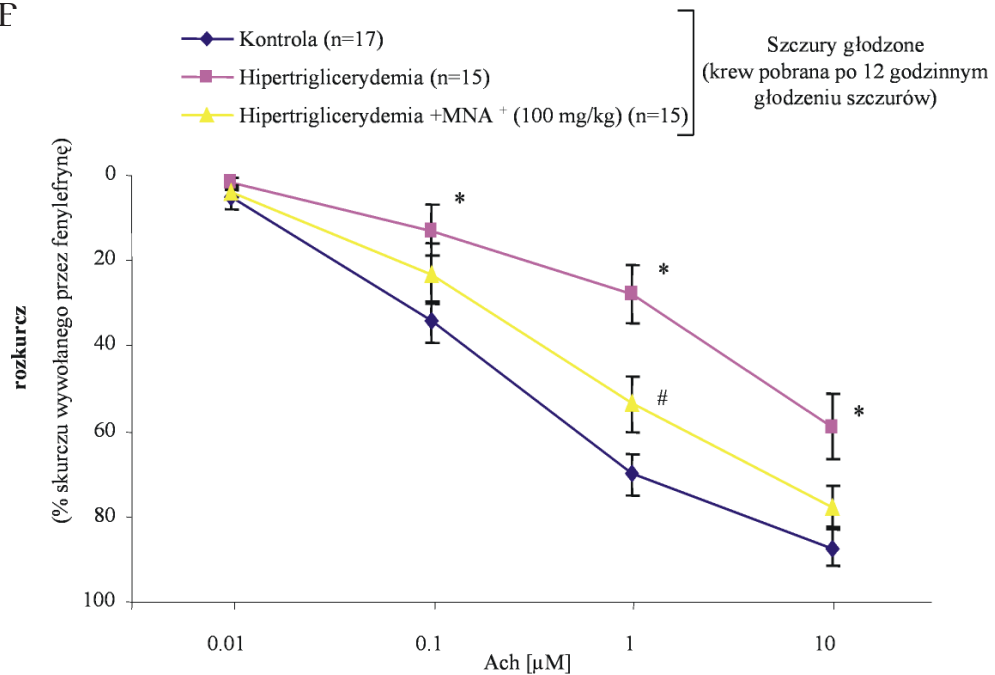
W przeciwieństwie do odpowiedzi zależnych od śródbłonkowego NO, nie zaobserwowano znaczącego wpływu MNA⁺ na wielkość odpowiedzi niezależnych od śródbłonka wywołanych przez SNAP u szczurów niegłodzonych (Ryc. 12A) i głodzonych (Ryc. 12B).

Naczyniorozszerzające działanie acetylocholin w badanych grupach było zależne od śródbłonkowego NO, gdyż rozkurcz naczyń był hamowany przez L-NAME (300 μM). Jedynie w grupie kontrolnej w stężeniu 10 μM zaobserwowano niewielki rozkurcz naczyń (6,95±4,06%). Powyższe wyniki sugerują niewielki udział mechanizmów niezależnych od NO w odpowiedzi naczyniorozszerzającej na Ach we wszystkich grupach doświadczalnych (Ryc. 13).

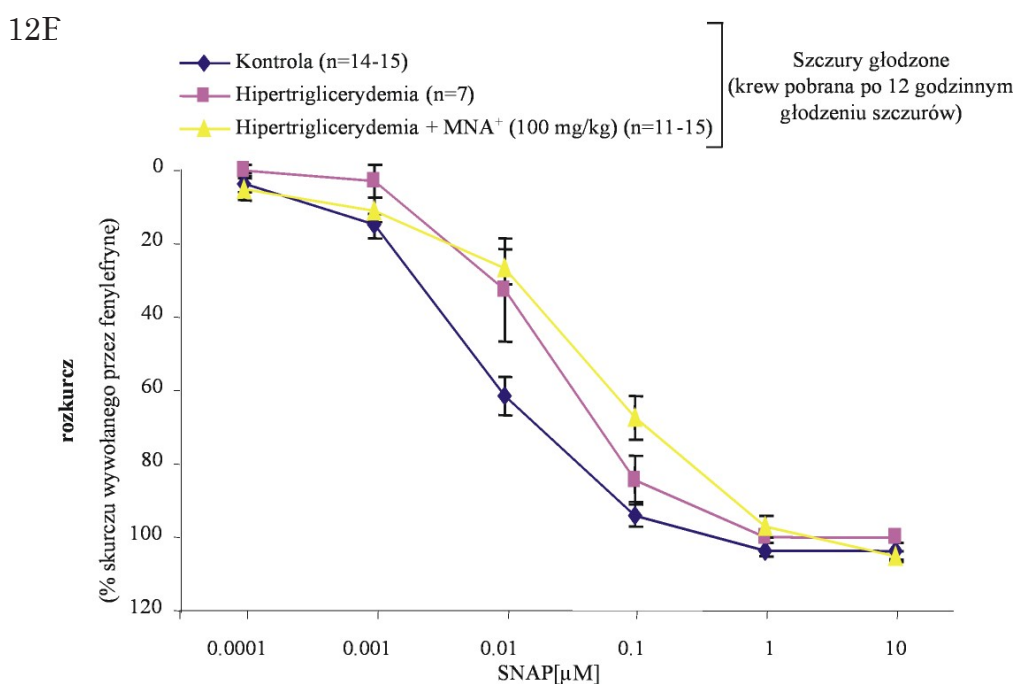
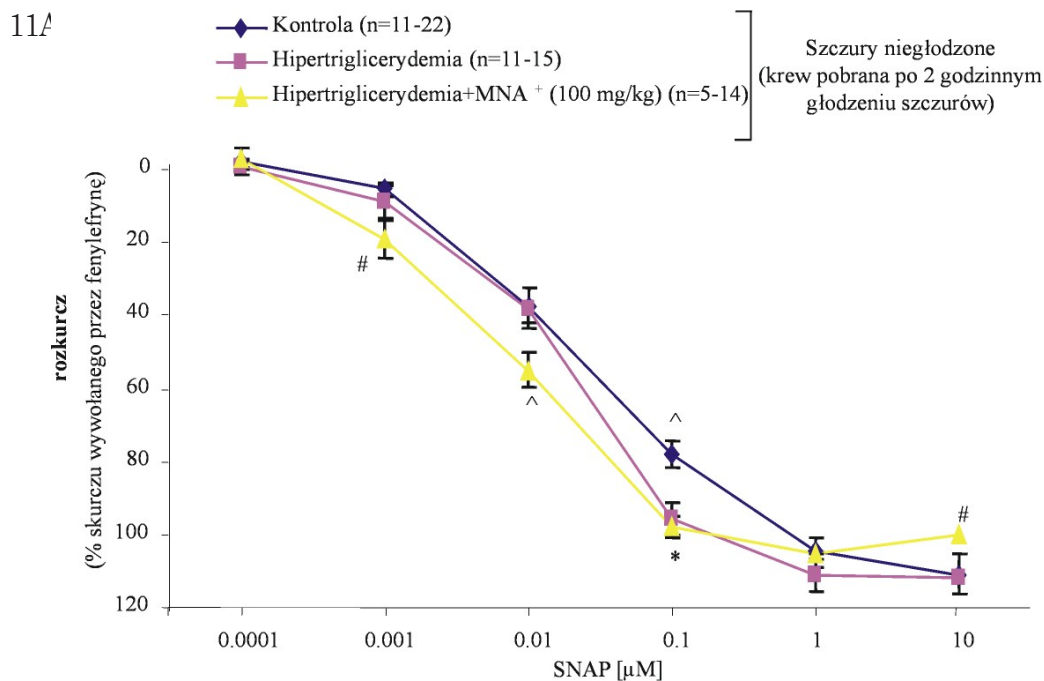
11A



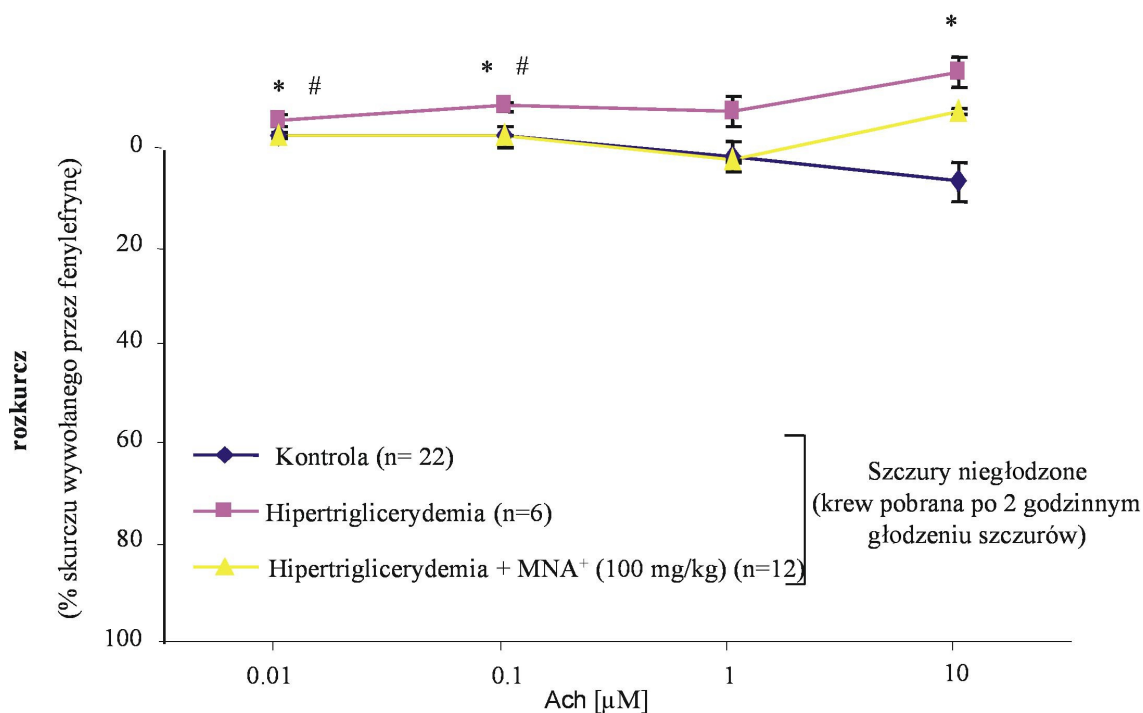
11F



Ryc. 11. Odwrócenie upośledzenia odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO wywołanej przez acetylocholinę w aorcie u szczurów z hipertriglicydemią, którym podawano MNA⁺ (100 mg/kg). **Ryc. 11A.** Przedstawia wyniki dla szczurów, których nie głodzono przed pobraniem aorty, a **Ryc. 11B.** dla szczurów które głodzono przez okres 12 godzin przed pobraniem aorty. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicydemiczną, # oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicydemiczną i grupą hipertriglicydemiczną traktowana MNA⁺ przez okres 4 tygodni.



Ryc. 12. Brak znaczącego wpływu MNA⁺ na rozkurcz aorty wywołany przez SNAP. **Ryc. 12A** przedstawia wyniki dla szczurów, których nie głodzono przed pobraniem aorty, a **Ryc. 12B** dla szczurów, które głodzono przez okres 12 godzin przed pobraniem aorty. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną, # oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicerydemiczną i grupą hipertriglicerydemiczną traktowaną MNA⁺ przez okres 4 tygodni, ^ oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną a grupą przyjmującą MNA⁺.

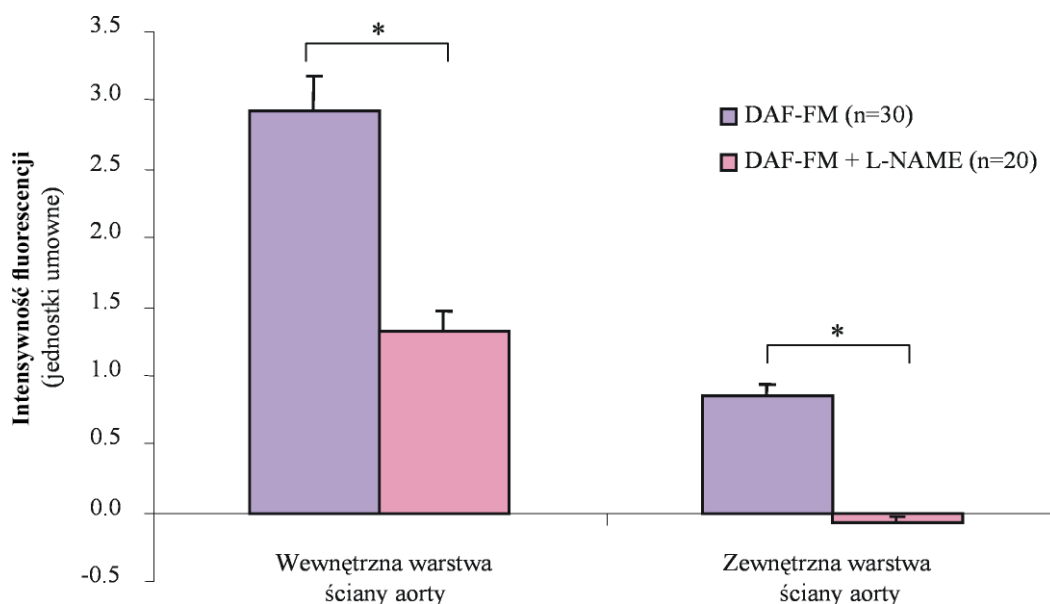


Ryc. 13. Niewielki udział mechanizmów niezależnych od NO w odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez acetylocholinę u szczurów kontrolnych, u szczurów z hipertriglicerydemią oraz u szczurów z hipertriglicerydemią, którym podawano MNA⁺. Jako inhibitor NOS stosowano L-NAME w stężeniu 300 μM. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną, # oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicerydemiczną i grupą hipertriglicerydemiczną traktowaną MNA⁺ przez okres 4 tygodni.

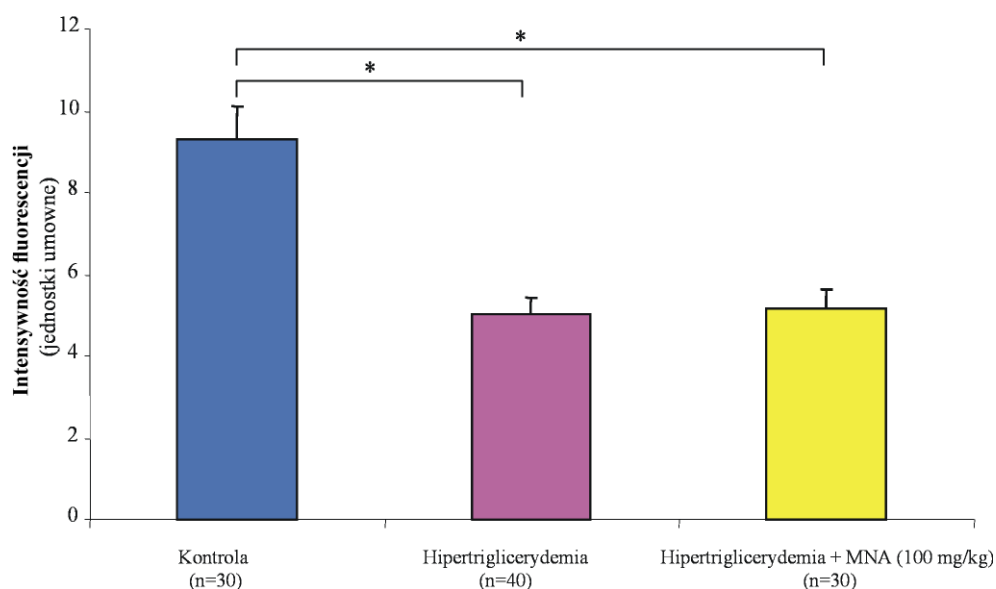
IV.1.1.6.2 Wpływ MNA⁺ na podstawowe wydzielenie NO mierzone znacznikiem fluorescencyjnym DAF-FM w izolowanych krążkach aorty

Wstępne badania z użyciem znacznika fluorescencyjnego DAF-FM wykazały, iż optymalne warunki doświadczenia to: dwugodzinna inkubacja aorty ze znacznikiem w stężeniu 1 μM (wyniki nie przedstawione). Inkubacja krążków aorty w obecności L-NAME (300 μM) zmniejszała intensywność fluorescencji znacznika DAF-FM (Ryc. 14). W toku dalszej analizy wybrano do oceny ilości uwalnianego NO, intensywność świecenia adduktów NO – DAF-FM w wewnętrznej warstwie aorty.

Podawanie MNA⁺ szczurom pozostało bez wpływu na spadek podstawowej produkcji NO wywołany przez hipertriglicerydemię (9,31±0,81, 4,99±0,45 i 5,15±0,49 odpowiednio w grupie kontrolnej, hipertriglicerydemii i hipertriglicerydemii+MNA⁺, Ryc. 15).



Ryc. 14. Podstawowa produkcja NO oznaczana przy użyciu znacznika fluorescencyjnego DAF-FM w wewnętrznej i zewnętrznej warstwie ściany aorty szczura kontrolnego. Jako inhibitor NOS stosowano L-NAME w stężeniu 300 μ M. Wytwarzanie NO było oceniane na podstawie intensywności świecenia adduktów NO-DAF-FM. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów ze znacznikiem DAF-FM i grupą kontrolną ze znacznikiem DAF-FM w obecności L-NAME.



Ryc. 15. Brak wpływu MNA⁺ na spadek podstawowej produkcji NO wywołany przez hipertroglucydemię. Wytwarzanie NO oznaczano przy użyciu znacznika fluorescencyjnego DAF-FM w wewnętrznej ścianie krążków aorty. Wyniki przedstawiają średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertroglucydemiczną traktowanych lub nie MNA⁺.

IV.1.1.6.3 Wpływ MNA⁺ na aktywności śródbłonkowej PGI₂

IV.1.1.6.3.1 Podstawowy poziom PGI₂ w krążkach aorty stymulowanych naciągiem

Stężenie metabolitu PGI₂ (6-keto-PGF_{1α}) w efluencie, z inkubowanych pod naciągiem krążków aorty pochodzących od szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych MNA⁺ było podwyższone, w stosunku do szczurów z hipertriglicerydemią nie leczonych MNA⁺ (odpowiednio 11830,44±2573,41 vs 7296,13±1831,19 pg/mg/ml suchej masy aorty) (Ryc. 16A).

IV.1.1.6.3.2 Poziom PGI₂ w krążkach aorty niestymulowanych przez naciąg

Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w efluencie z krążków aorty inkubowanych bez naciągu był także wyższy w grupie szczurów przyjmującej MNA⁺ (16485,79±2873,07 vs 9727,22±1835,24 pg/ml/mg), (Ryc. 16B), natomiast podanie egzogenne MNA⁺ (300 μM) nie spowodowało dalszego wzrostu stężenia PGI₂ (wyniki nie zamieszczone).

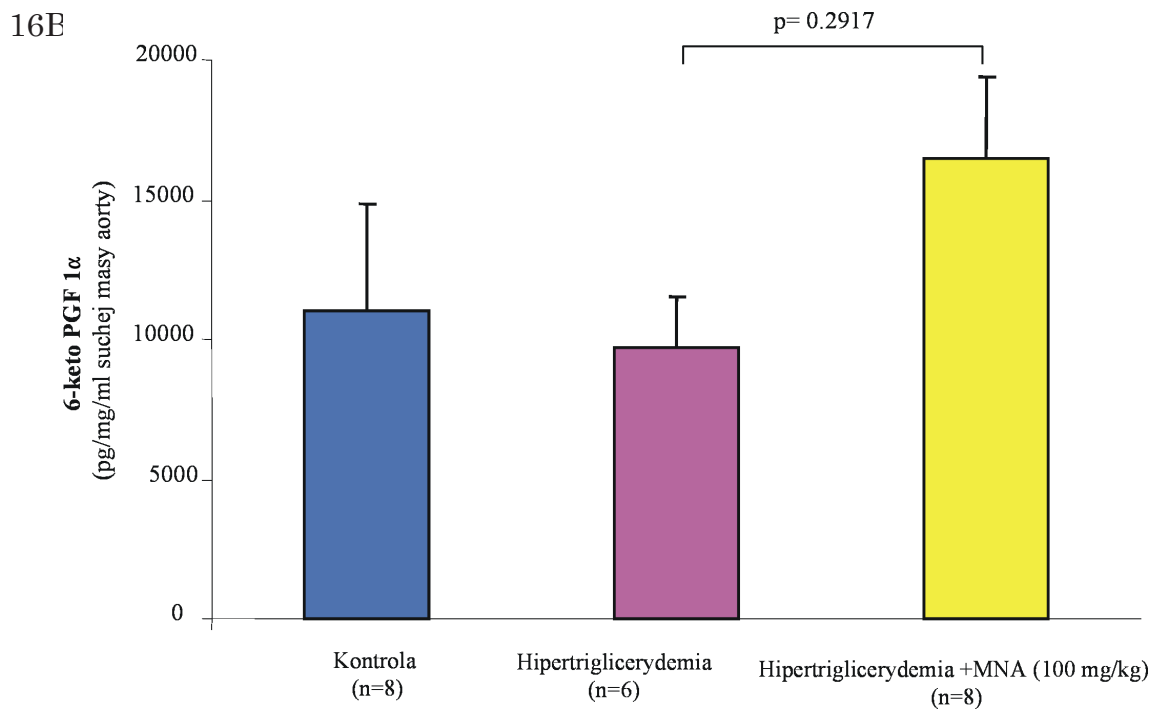
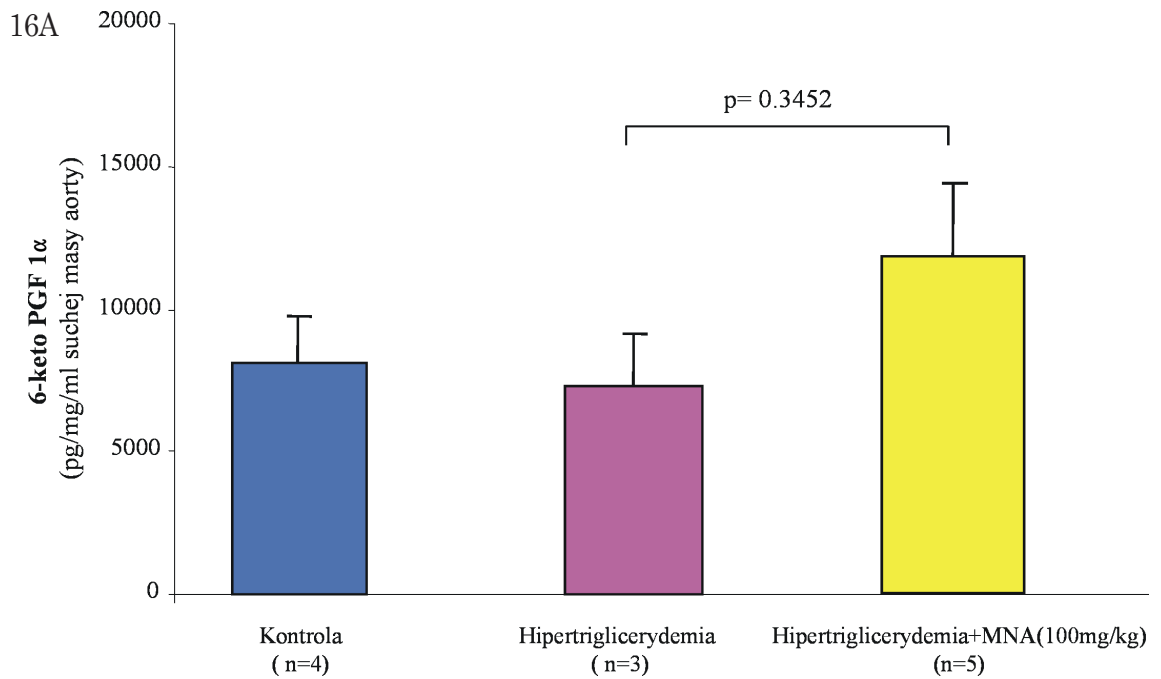
IV.1.1.6.3.3 Poziom PGI₂ w osoczu

Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu szczurów z hipertriglicerydemią, którym podawano MNA⁺ było wyższe (534,33±95,66) niż w osoczu szczurów z hipertriglicerydemią nie leczonych MNA⁺ (179,17±54,42) i szczurów kontrolnych (229,17±27,45) (Ryc. 17).

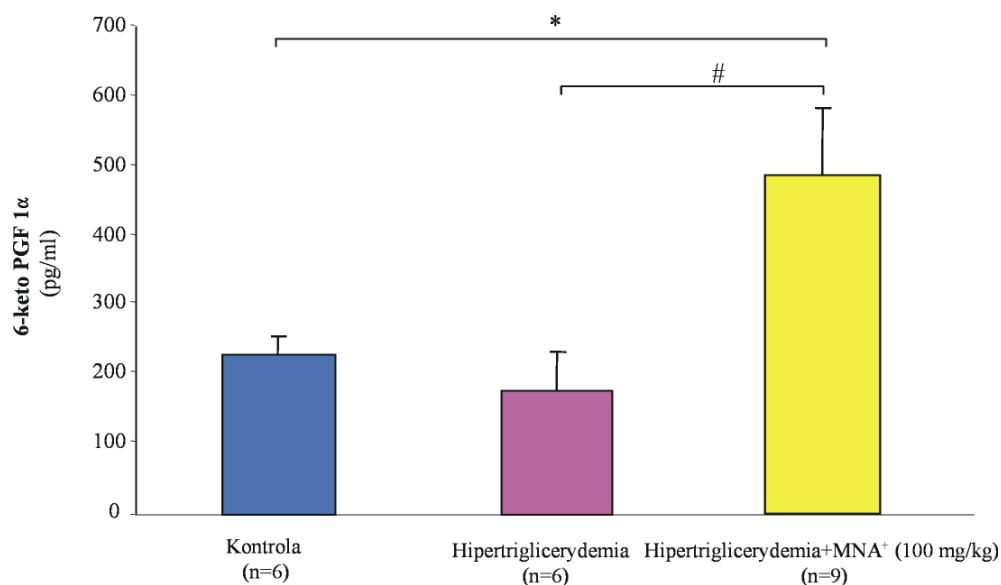
IV.1.1.7. Udział PGI₂ w ochronnym działaniu MNA⁺ na rozwój dysfunkcji śródbłonka u szczurów z hipertriglicerydemią

Nieselektywne zahamowanie COX przez indometacynę (dawka 5mg/kg masy ciała) podawaną szczurom z hipertriglicerydemią przez 3 dni wraz z wodą nie wpływało na ochronne działanie MNA⁺ na rozwój dysfunkcji śródbłonka w tym modelu. Istotnie, w grupie szczurów z hipertriglicerydemią, którym podawano MNA⁺ i indometacynę, także nastąpiła poprawa w odpowiedziach naczyń na acetylocholinę (Ryc. 18). Wielkość odpowiedzi niezależnej od śródbłonkowego NO w aorcie wywołanej przez SNAP były porównywalne z wyjątkiem grupy szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych indometacyną (Ryc. 19).

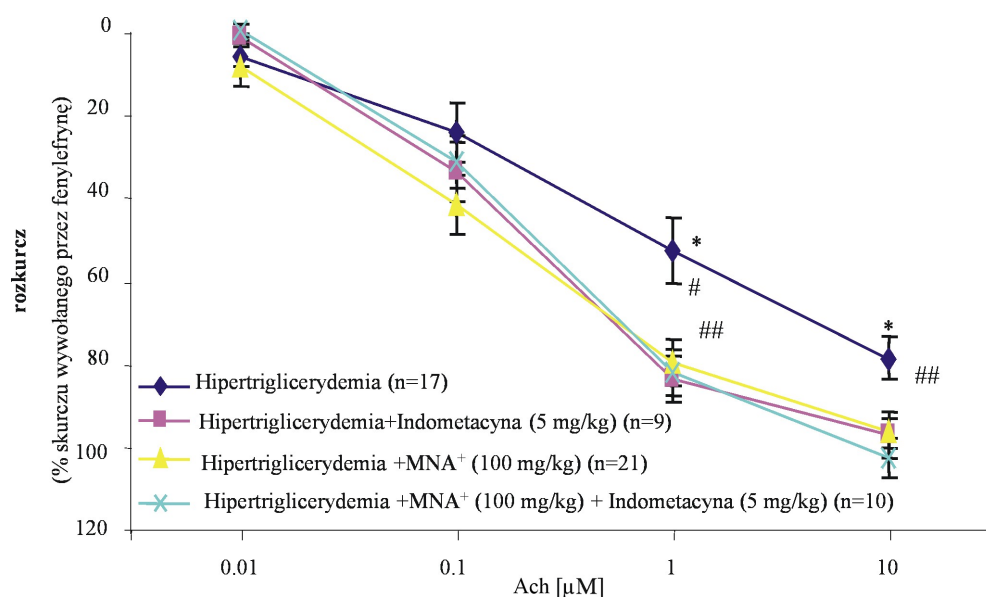
Dla sprawdzenia skuteczności zahamowania COX przez indometacynę, zmierzono poziom 6-keto-PGF_{1α} w efluencie z krążków aorty pochodzących od szczurów z hipertriglicerydemią±MNA⁺ (które przez okres 3 dni pojocono indometacyną). Zaobserwowano jednak tylko niewielki spadek wytwarzania PGI₂ pod wpływem 3 dniowego podawania indometacyny (Ryc. 20).



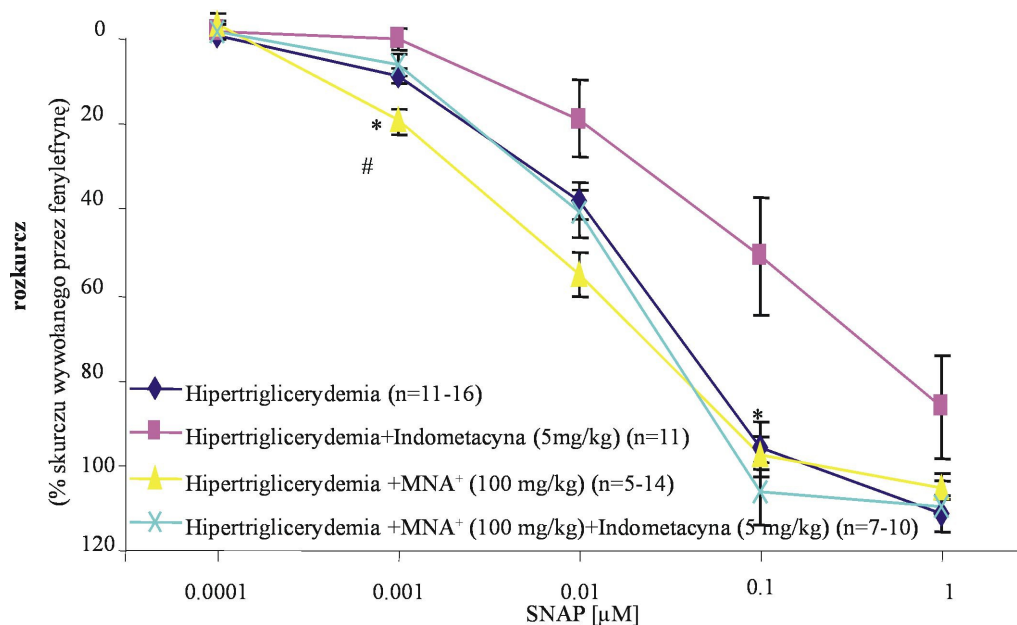
Ryc. 16. Wzrost stężenia metabolitu PGI_2 (6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) w krążkach aorty pochodzących od szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych MNA^+ . Ryc. 16A przedstawia wyniki dla krążków aorty stymulowanych naciągiem a Ryc. 16B dla krążków aorty niestymulowanych naciągiem. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M.



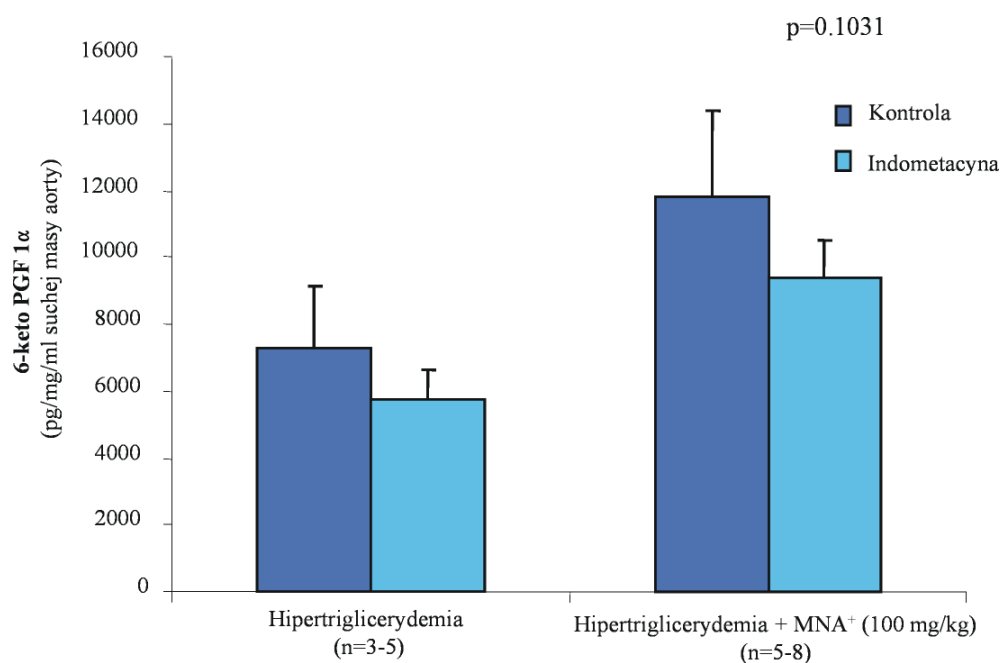
Ryc. 17. Wzrost stężenia metabolitu PGI₂ (6-keto-PGF_{1α}) w osoczu u szczurów z hipertriglicydemią, którym podawano MNA⁺. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów i karmionych dietą hipertriglicydemiczną traktowaną MNA⁺ przez okres 4 tygodni, # oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów karmionych dietą hipertriglicydemiczną i grupą hipertriglicydemiczną traktowaną MNA⁺ przez okres 4 tygodni.



Ryc. 18. Poprawa odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO wywołanej przez acetylocholinę w aorcju u szczurów z hipertriglicydemią, którym podawano MNA⁺ (100 mg/kg) i indometacynę. MNA⁺ (100 mg/kg) był podawany przez 4 tygodnie a indometacyna (5 mg/kg) przez 3 ostatnie dni przed pobraniem aorty. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów z hipertriglicydemią i karmionych dietą hipertriglicydemiczną gdzie podawano szczurom indometacynę, # oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów z hipertriglicydemią i karmionych dietą hipertriglicydemiczną, ## oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów z hipertriglicydemią i karmionych dietą hipertriglicydemiczną gdzie podawano szczurom MNA⁺ i indometacynę.



Ryc. 19. Brak wpływu 3 dniowej terapii indometacyny na wielkość odpowiedzi niezależnej od śródbłonna w aorcie wywołanej przez SNAP u szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych MNA⁺. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów z hipertriglicerydemią i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną gdzie podawano szczurom MNA⁺, # oznacza p<0,05 pomiędzy grupą szczurów z hipertriglicerydemią gdzie podawano szczurom MNA⁺ i karmionych dietą hipertriglicerydemiczną gdzie podawano szczurom MNA⁺ i indometacynę.

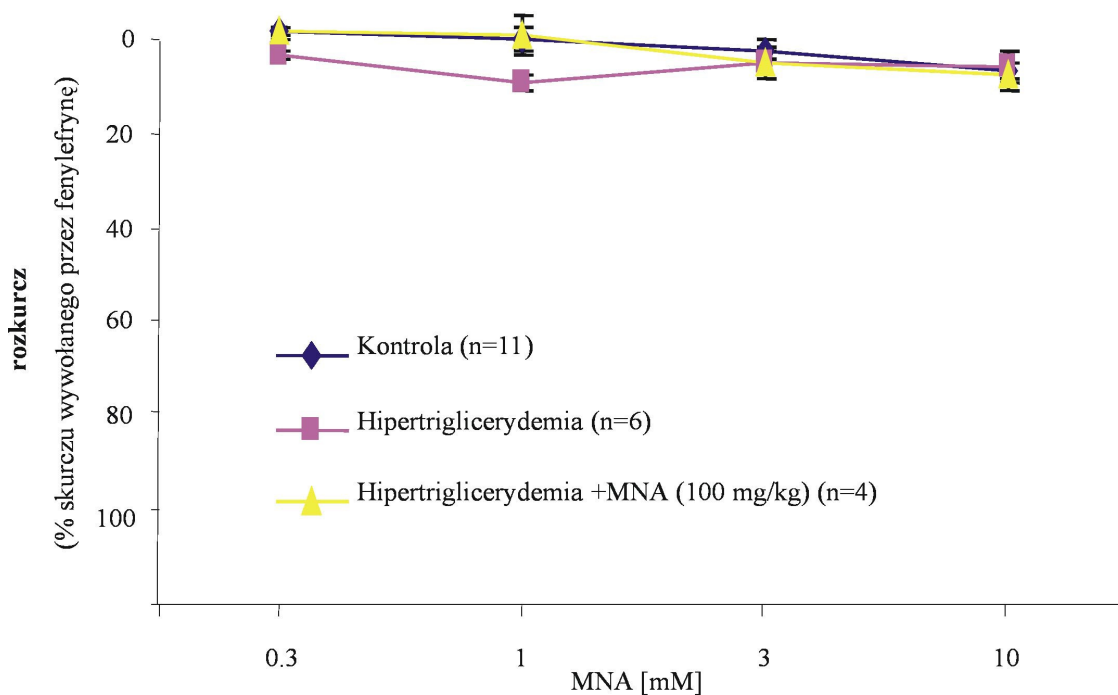


Ryc. 20. Nieznaczny spadek stężenia stabilnego metabolitu PGI₂ (6-keto-PGF_{1α}) w efluencie z krążków aorty stymulowanych naciągami pochodzących od szczurów z hipertriglicerydemią traktowanych lub nie MNA⁺ którym podawano indometacynę przez 3 ostatnie dni przed pobraniem aorty. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M.

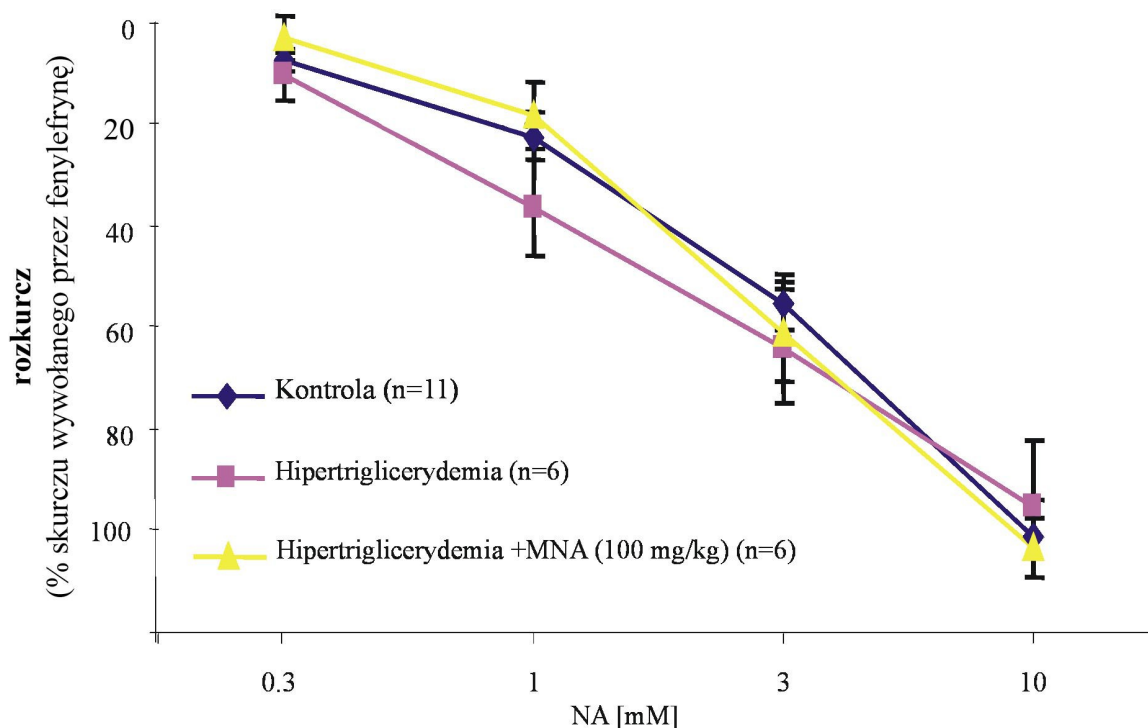
IV.11.8 Brak naczyniorozszerzającego działanie egzogenego MNA⁺ *in vitro* na aortę szczura

We wszystkich grupach doświadczalnych (kontrolna, hipertriglicydemia ± MNA⁺) sprawdzono bezpośrednie działanie MNA⁺ (zakres stężeń: 0,3-10 mM) na krążki aorty. MNA⁺ w stężeniu 1mM wykazywał niewielki rozkurcz (9,33%) naczyń u szczurów z hipertriglicydemią (Ryc. 21). Wyższe stężenia MNA⁺ powodowały we wszystkich grupach rozkurcz w granicach 2 - 8%.

W przeciwieństwie od MNA⁺, nikotynamid (NA) w tym samym zakresie stężeń (0,3-10 mM) wykazywał dawko-zależne działanie naczyniorozszerzające we wszystkich grupach doświadczalnych (Ryc. 22).



Ryc. 21. Brak bezpośredniego działania naczyniorozszerzającego egzogenego MNA⁺ w krążkach aorty *in vitro* niezależnie od grupy doświadczalnej szczurów. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M.



Ryc. 22. Działanie naczyniorozszerzające egzogenego nikotynamidu w krążkach aorty *in vitro* niezależnie od grupy doświadczalnej szczurów. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M.

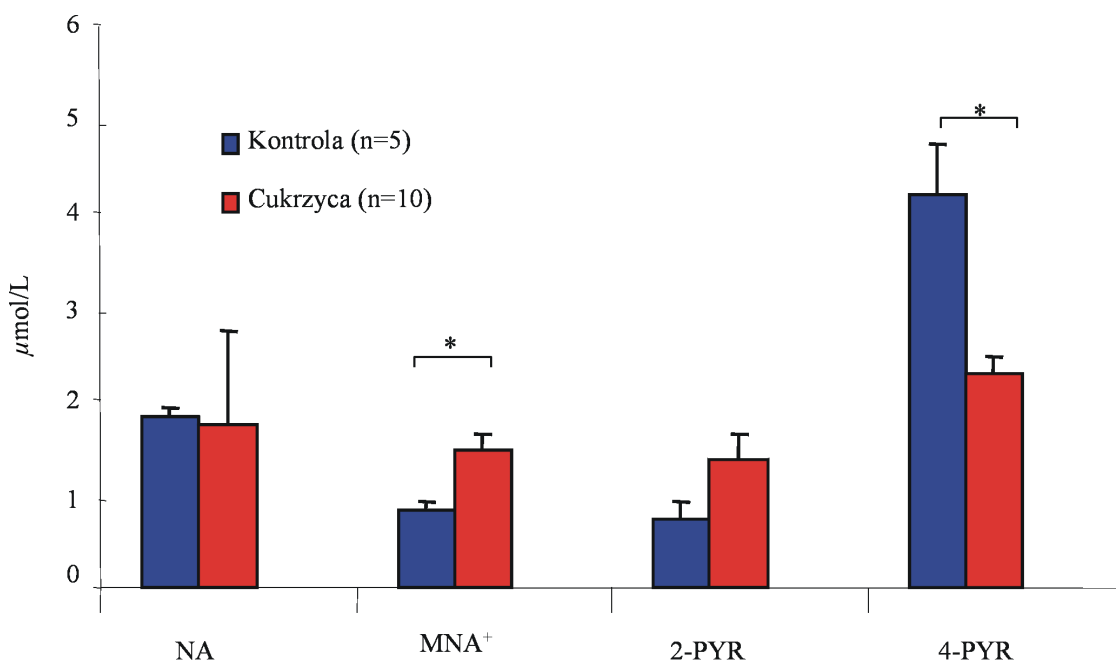
IV.1.2. WPŁYW MNA⁺ NA ROZWÓJ DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA U SZCZURÓW Z CUKRZYCĄ

IV.1.2.1. Poziom metabolitów MNA⁺ w osoczu szczurów z cukrzycą

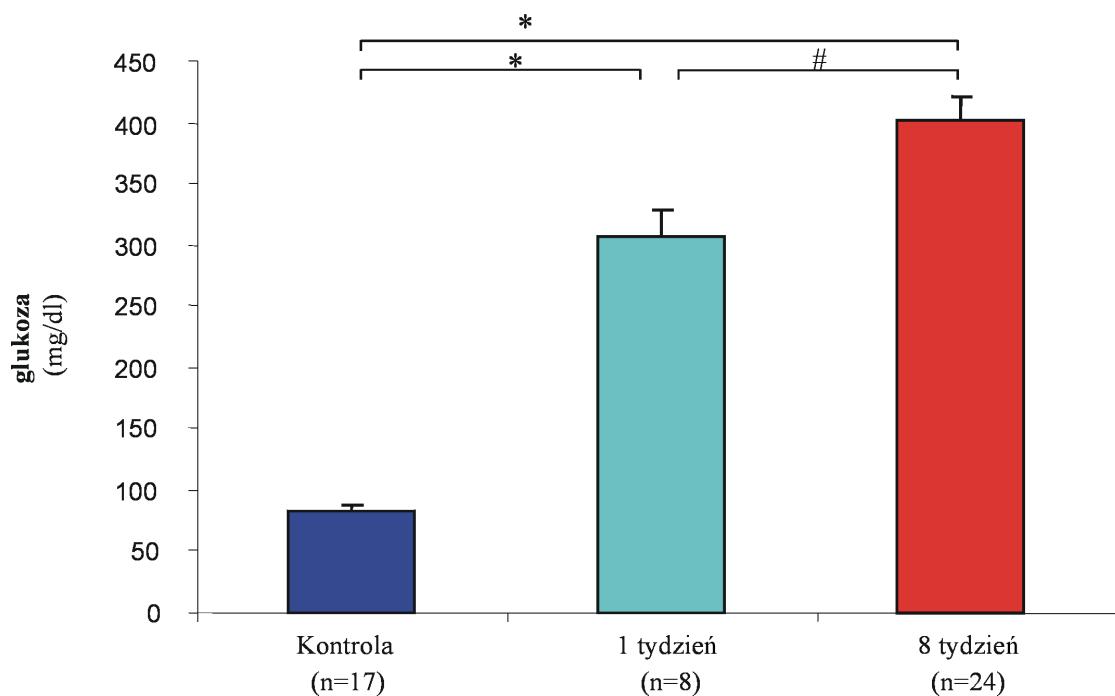
W osoczu szczurów u których wywołano cukrzycę zaobserwowano wzrost stężenia MNA⁺, natomiast stężenia metabolitów 2-PYR były porównywalne, a 4-PYR obniżone (Ryc. 23). Podawanie MNA⁺ p.o. (100 mg/kg) szczurom z cukrzycą prowadziło do podobnego wzrostu stężenia MNA⁺ i jego metabolitów jak to miało miejsce w przypadku szczurów z hipertriglicerydemią karmionych MNA⁺ (100 mg/kg) (wyniki nie przedstawione).

IV.1.2.2. Analiza biochemiczna rozwoju cukrzycy

Już tydzień od nastrzyknięcia szczurów streptozytocyną (STZ) nastąpił wzrost stężenia glukozy we krwi (od $82,06 \pm 5,41$ do $306,86 \pm 20,64$ mg/dl), który pogłębiał się w czasie rozwijającej się cukrzycy (do $402,08 \pm 19,01$ mg/dl) (Ryc. 24).



Ryc. 23. Wzrost stężenia MNA⁺, ale nie jego metabolitów 2-PYR (N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamid) i 4-PYR (1-metylo-4-pyridono-3-karboksamid) w osoczu u szczurów, którym wywołano cukrzycę. (NA- nikotynamid). Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupami szczurów kontrolnych i cukrzycą.



Ryc. 24. Wzrost stężenia glukozy w osoczu u szczurów, którym wywołano cukrzycę. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów i grupą cukrzycową w 1 i 8 tygodniu. # oznacza p<0,05 pomiędzy grupami cukrzycowymi w 1 i 8 tygodniu.

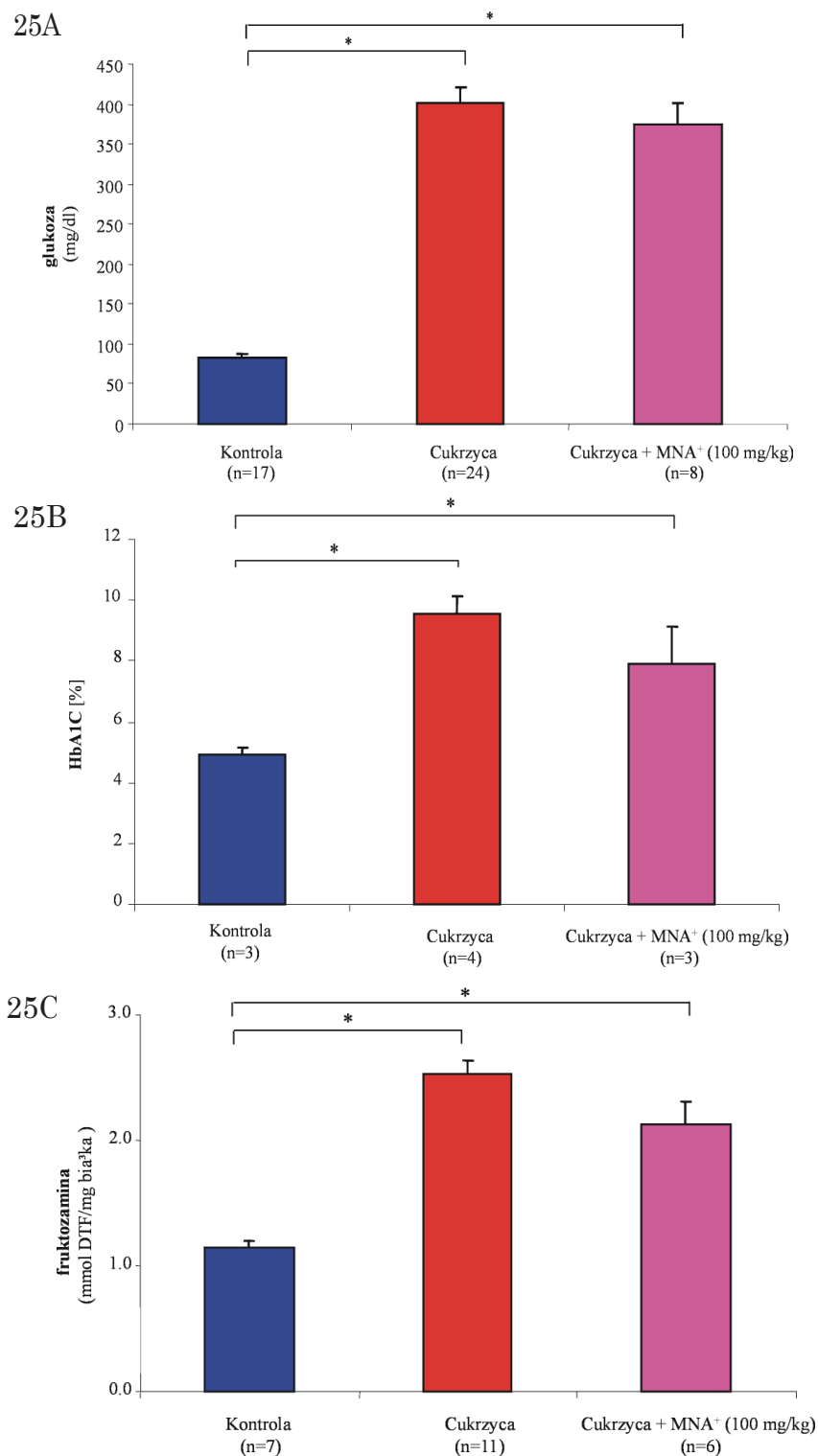
Po 8 tygodniach po podaniu STZ podwyższone było nie tylko stężenie glukozy (od $82,06 \pm 5,41$ do $402,08 \pm 19,01$; Ryc. 25A), ale również stężenie glikozylowanej hemoglobiny HbA1C (od $4,93 \pm 0,24$ do $9,55 \pm 0,56$ %; Ryc. 25B), fruktozaminy (od $1,14 \pm 0,06$ do $2,53 \pm 0,10$ mmol DTF/mg białka; Ryc. 25C), a obniżone było stężenie peptydu C (z $3378,96 \pm 458,0$ do $139,58 \pm 62,48$ pg/100 ul, Ryc. 25D).

U szczurów cukrzycowych obserwowano również niewielki spadek poziomu cholesterolu całkowitego (z $1,51 \pm 0,07$ do $1,28 \pm 0,07$ mmol/L). Pozostałe parametry lipidowe pozostawały jednak bez zmian (Ryc.25E).

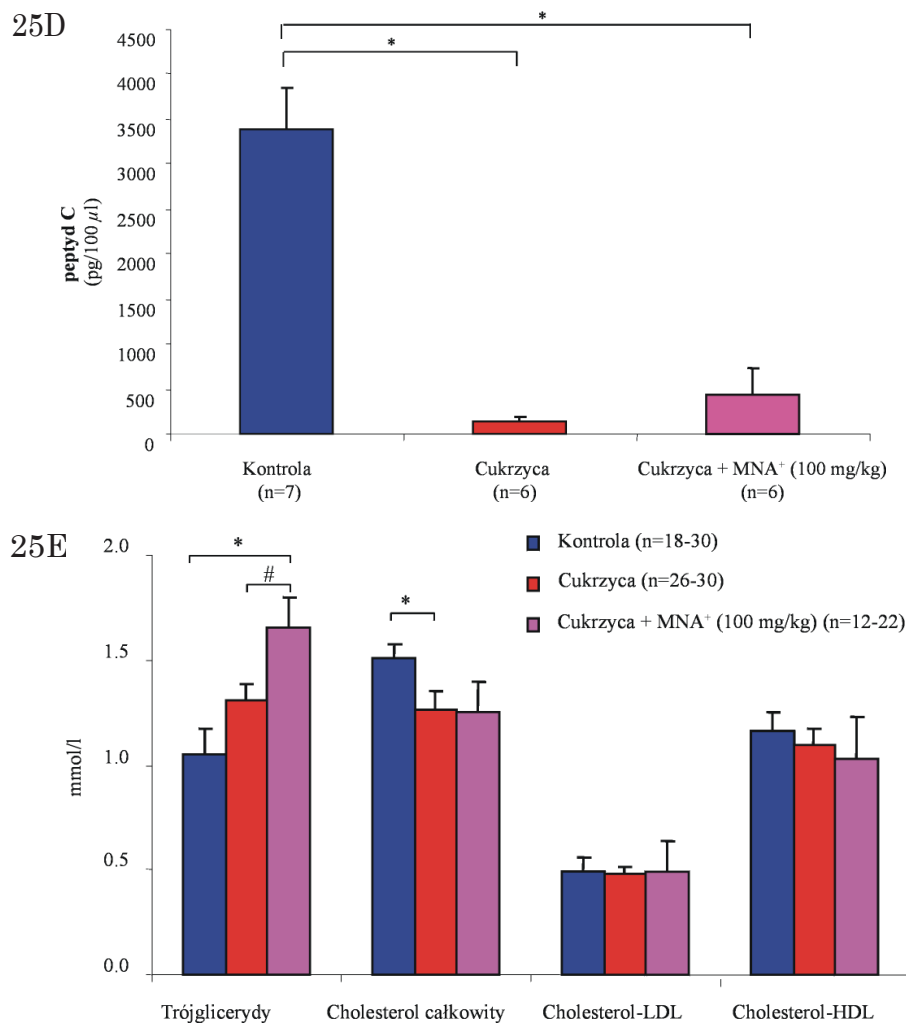
IV.123. Wpływ MNA⁺ na parametry biochemiczne cukrzycy

Podawanie MNA⁺ szczurom z cukrzycą przez okres 7 tygodni (począwszy od 7 dnia po podaniu streptozytocyny) w niewielki sposób obniżyło stężenie glukozy (z $402,08 \pm 19,01$ do $374,75 \pm 26,72$ mg/dl; Ryc. 25A), glikozylowanej hemoglobiny – HbA1C (z $9,55 \pm 0,56$ do $8,80 \pm 1,22$ %; Ryc. 25B) oraz fruktozaminy w osoczu (z $2,53 \pm 0,10$ do $2,13 \pm 0,17$ mmol DTF/mg białka; Ryc. 25C). W grupie szczurów cukrzycowych przyjmujących MNA⁺ stężenie peptydu C było nieco wyższe niż w grupie cukrzycowej (odpowiednio $446,45 \pm 275,11$ vs $139,58 \pm 62,48$ pg/ul; Ryc. 25D).

Stężenie trójglicerydów w osoczu szczurów, którym podawano MNA⁺ było wyższe zarówno w stosunku do grupy kontrolnej jak i grupy z cukrzycą ($1,79 \pm 0,15$ vs $1,05 \pm 0,12$ i $1,29 \pm 0,08$ mmol/l). MNA⁺ nie miał większego wpływu na pozostałe parametry profilu lipidowego takie jak cholesterol całkowity, cholesterol -LDL i cholesterol -HDL (Ryc. 25E).



Ryc. 25. Wpływ MNA⁺ na parametry obrazujące rozwój cukrzycy u szczurów. **Ryc. 25 A, B i C** przedstawiają niewielki spadek stężenia glukozy, HbA1C i fruktozaminy w grupie szczurów z cukrzycą poddanych działaniu MNA⁺ przez okres 7 tygodni. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów a cukrzycową przyjmującą lub nie MNA⁺.



Ryc. 25 D i E przedstawiają wzrost stężenia peptydu C i stężenia trójglicerydów w grupie szczurów z cukrzycą traktowanych MNA⁺. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. * oznacza p<0,05 pomiędzy grupą kontrolną szczurów a cukrzycową przyjmującą lub nie MNA⁺.

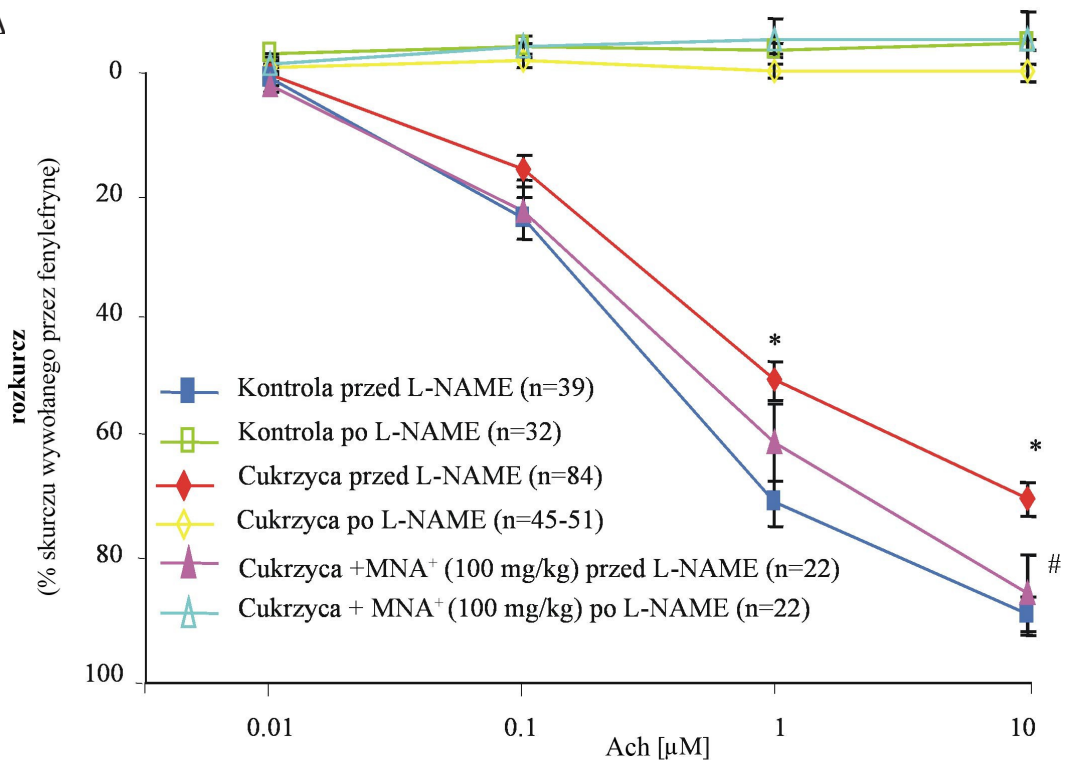
IV.124. Rozwój dysfunkcji śródbłonka w cukrzycy

IV.1.24.1.

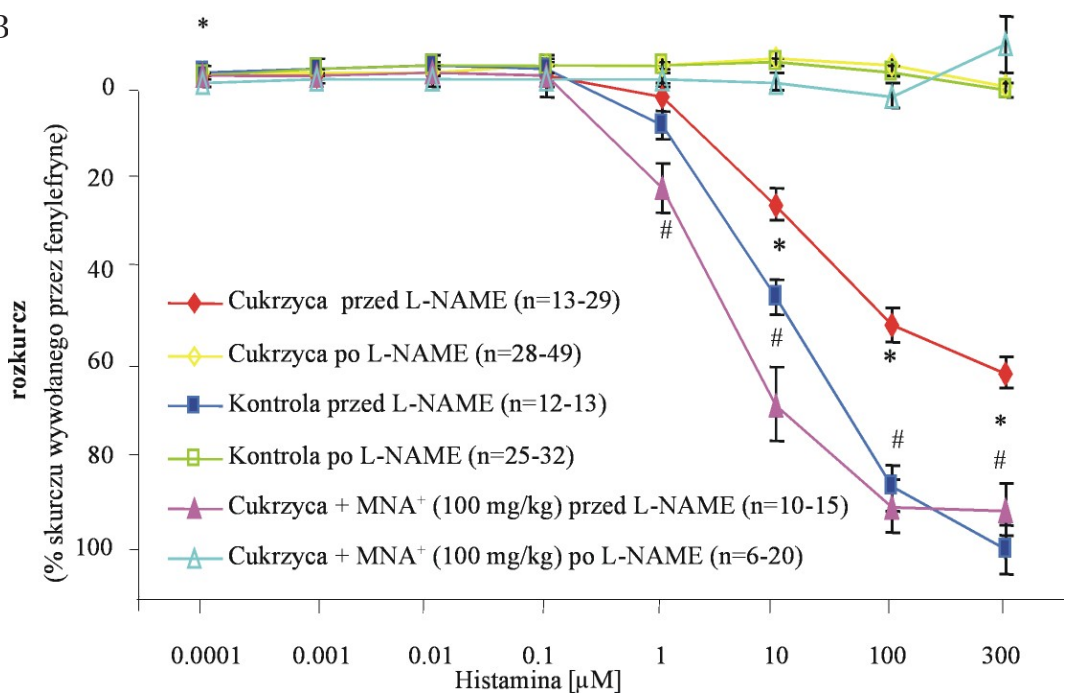
Zmiany aktywności naczyniorozszerzającej śródbłonkowego NO

W krążkach aorty pochodzących od szczurów z cukrzycą odpowiedzi na wzrastające stężenia acetylocholinyl (Ryc.26A) jak i histaminy (Ryc. 26B) były znacznie upośledzone. Odpowiedzi na acetylocholinę i histaminę były zależne od śródbłonkowego NO, gdyż były całkowicie znoszone przez L-NAME (300 μM) (Ryc. 26A i 26B). Natomiast odpowiedź niezależna od śródbłonka wywołana przez SNAP była tylko nieznacznie upośledzona przez cukrzycę (Ryc. 27).

26A



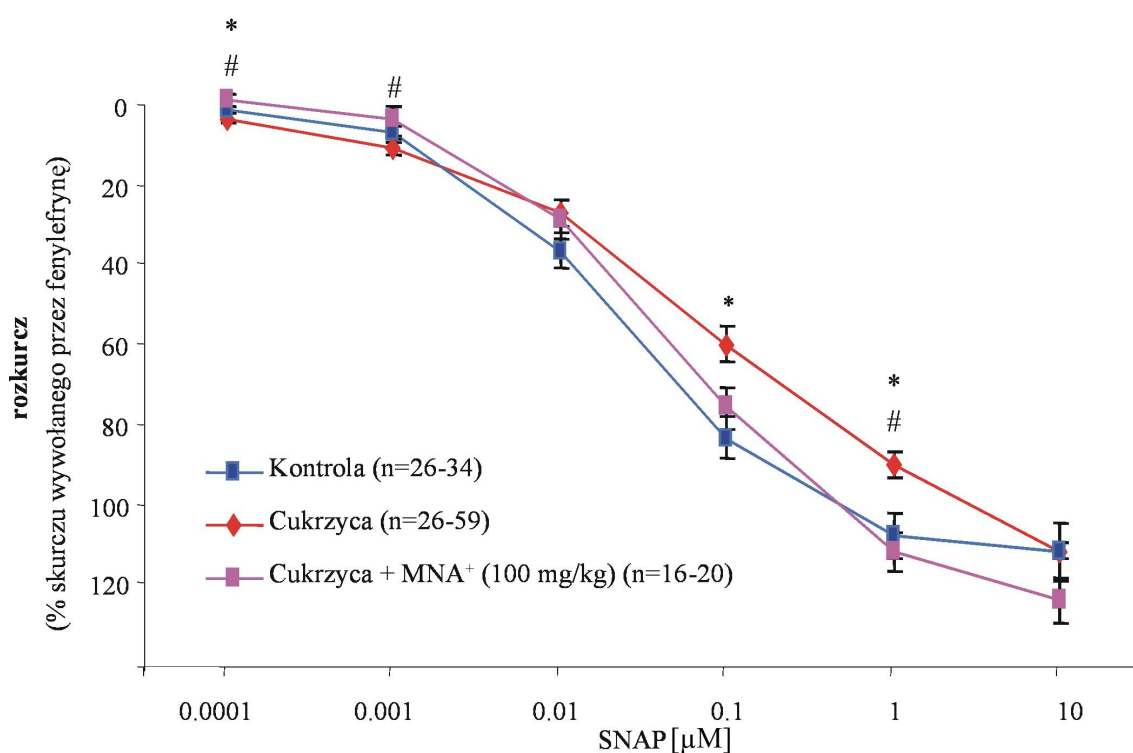
26B



Ryc. 26. Odwrócenie upośledzenia odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od śródbłonkowego NO wywołanych przez acetylocholinę (26 A) i histaminę (26 B) w aorcie u szczurów z cukrzycą, którym podawano MNA⁺ przez 7 tygodni (100 mg/kg). Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i grupą cukrzycową, # oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów cukrzycowych i szczurów cukrzycowych traktowanych MNA⁺.

IV.1.2.4.2. Wpływ MNA^+ na aktywność naczyniorozszerzającą śródbłonkowego NO

Podawanie MNA^+ szczurom z cukrzycą przez okres 7 tygodni skutkowało odwróceniem upośledzenia odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO wywołanej przez acetylocholinę (Ryc. 26A) lub histaminę (Ryc. 26B). Odpowiedzi na acetylocholinę i histaminę były zależne od śródbłonkowego NO, gdyż były całkowicie znoszone przez podanie L-NAME (300 μ M) (Ryc. 26A i 26B). Nie zaobserwowano znaczącego wpływu MNA^+ na wielkość odpowiedzi wywołanej przez SNAP, która jest niezależna od śródbłonkowego NO (Ryc. 27).



Ryc. 27. Brak znaczącego wpływu terapii MNA^+ na rozkurcz aorty wywołany przez SNAP. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i grupą cukrzycową, # oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów cukrzycowych i szczurów cukrzycowych traktowanych MNA^+ .

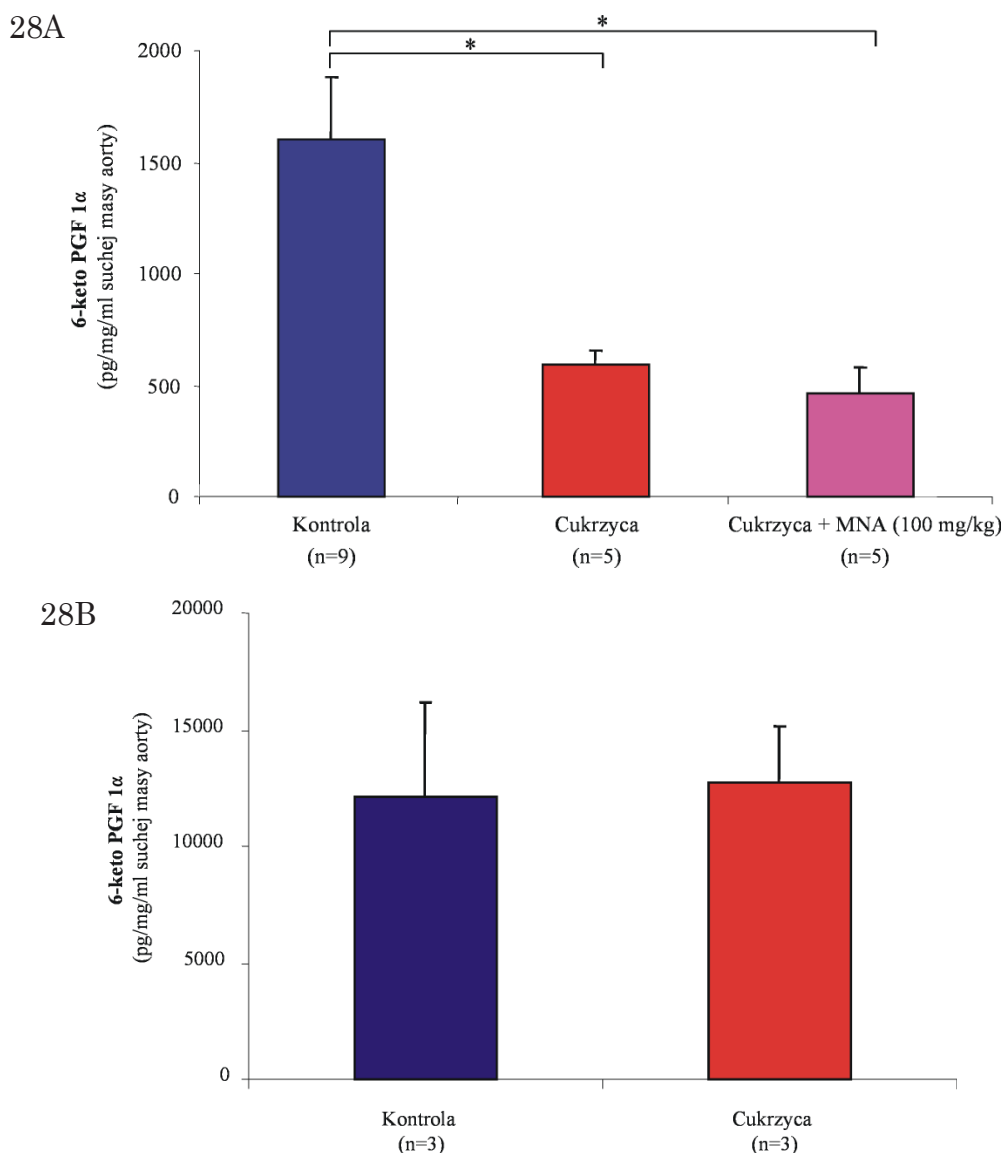
VI. 1.2.4.3. Wpływ MNA^+ na aktywność śródbłonkowej PGI_2 IV.1.2.4.3.1. Podstawowy poziom PGI_2 w krążkach aorty stymulowanych naciągiem

Produkcja PGI_2 przez aortę szczurów z cukrzycą (naczynia stymulowane przez naciąg) była znacznie upośledzona ($588,16 \pm 71,81$ vs $1602,91 \pm 272,23$ pg/ml/mg suchej masy ciała; Ryc. 28A). Nie zaobserwowano korzystnego wpływu MNA^+ na upośledzenie podsta-

wowej produkcji PGI_2 w krążkach aorty pochodzących od szczurów z cukrzycą ($588,16 \pm 71,81$ vs $464,52 \pm 117,21$ pg/ml/mg suchej masy ciała).

IV.1.2.4.3.2 Podstawowy poziom PGI_2 w krążkach aorty niestymulowanych naciągiem

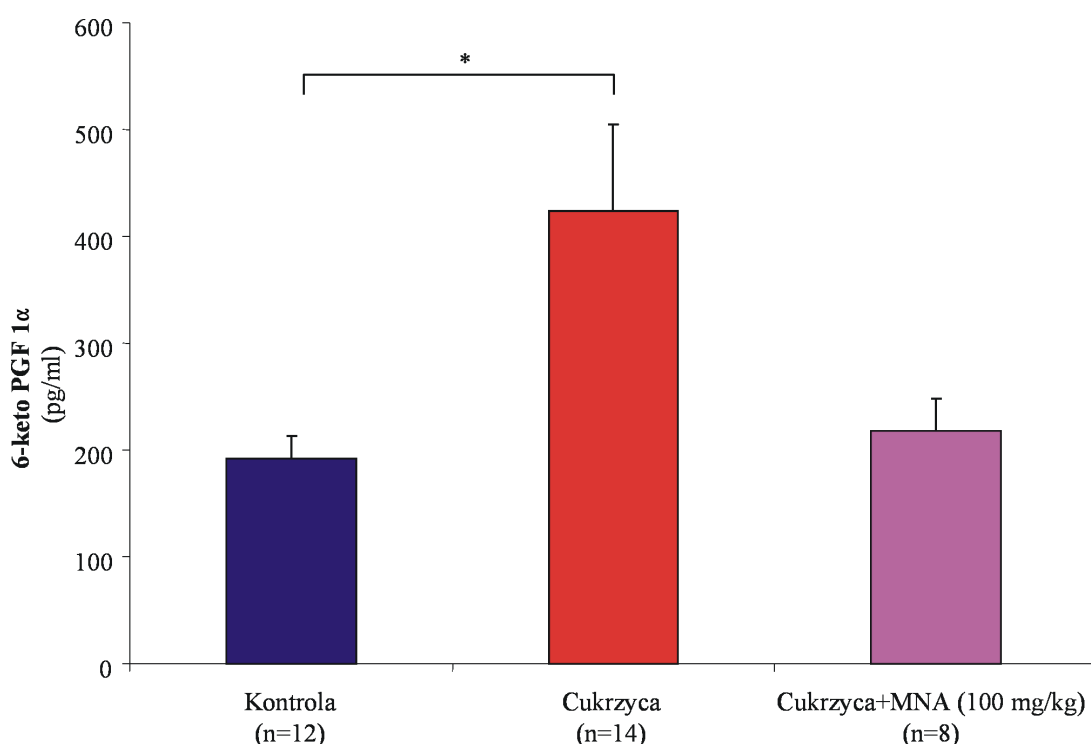
Podstawowy poziom stabilnego metabolitu PGI_2 (6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$), uwalnianego z krążków aorty niestymulowanych naciągiem u szczurów cukrzycowych i kontrolnych utrzymywała się na tym samym poziomie (Ryc. 28B).



Ryc. 28. Brak wpływu terapii MNA^+ na spadek podstawowej produkcji PGI_2 (6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) w krążkach aorty w cukrzycy. **Ryc. 28A** przedstawia wyniki dla krążków aorty stymulowanych naciągiem a **Ryc. 28B** dla krążków aorty niestymulowanych naciągiem. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów i grupą cukrzycową.

IV.1.2.4.3.3 Poziom PGI_2 w osoczu

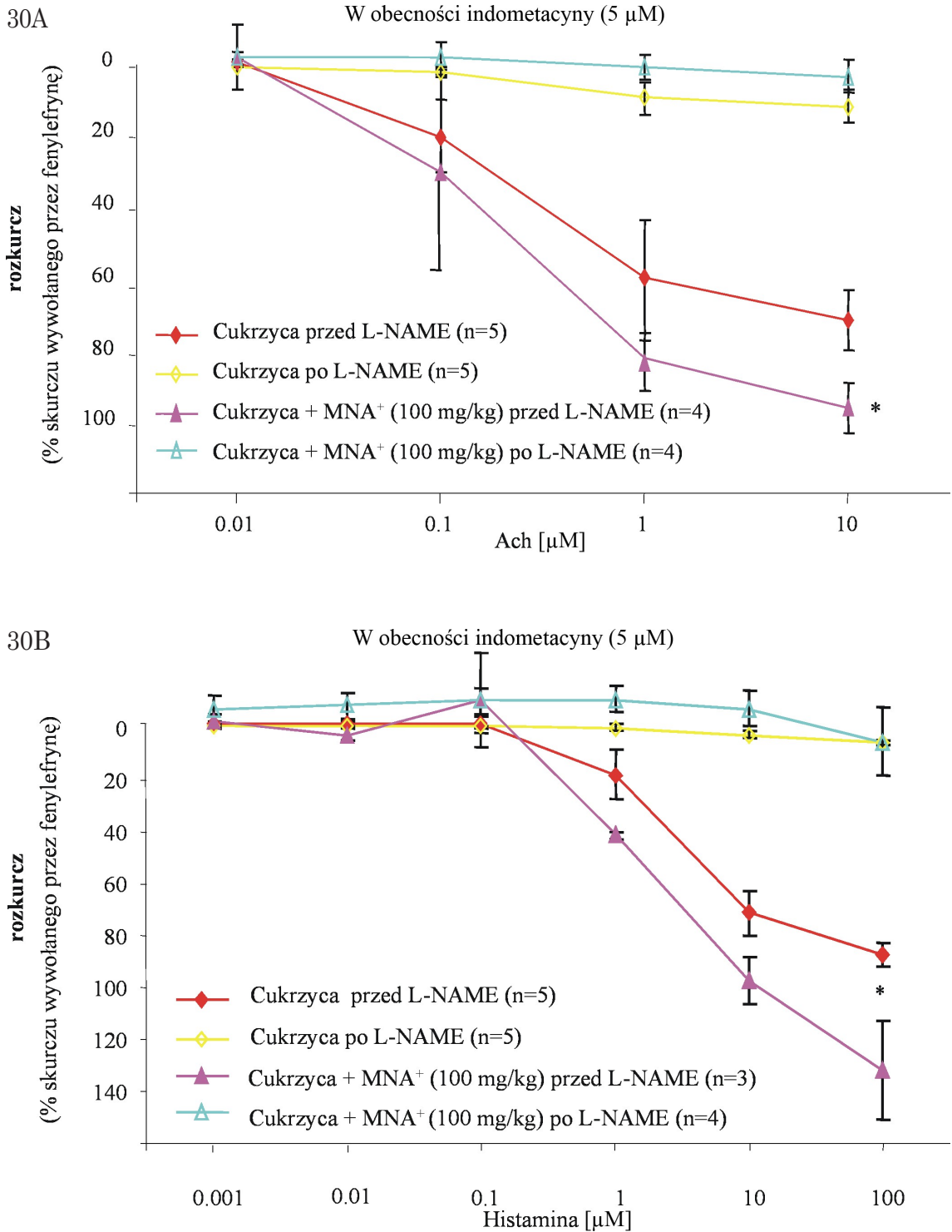
Poziom PGI_2 w osoczu w grupie cukrzycowej był wyższy niż z w grupie kontrolnej ($344,89 \pm 72,15$ vs $158,84 \pm 21,98$ pg/ml). U szczurów, którym podawano MNA^+ poziom PGI_2 ($217,75 \pm 30,29$ pg/ml) był niższy niż w grupie cukrzycowej, ale ta różnica nie osiągnęła znaczenia statystycznego (Ryc. 29).



Ryc. 29. Wpływ terapii MNA^+ na kompensacyjny wzrost podstawowego metabolitu PGI_2 (6-keto- $PGF_1\alpha$) w osoczu szczurów z cukrzycą. Wyniki przedstawiają średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną szczurów a grupą cukrzycową.

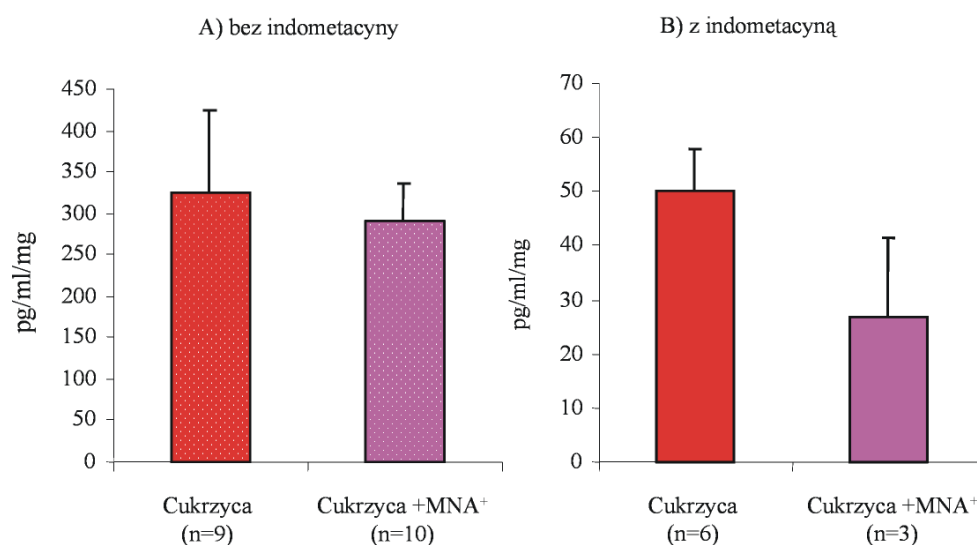
IV.1.2.5. Wpływ indometacyny podanej *in vitro* na wielkość odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez acetylocholinę i histaminę w aorcie u szczurów z cukrzycą traktowanych lub nie MNA^+

W obecności nieselektywnego inhibitora COX – indometacyny (dodanego do buforu, który omywał krążki aorty) różnica w wielkości odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez acetylocholinę (Ryc. 30A) i histaminę (Ryc. 30B) u szczurów z cukrzycą którym podawano lub nie MNA^+ , została zachowana podobnie jak w doświadczeniach bez użycia indometacyny.



Ryc. 30. Poprawa odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od śródbłonkowego NO wywołanych przez acetylocholinę Ryc. 30 A i histaminę Ryc. 30 B w aorcie u szczurów z cukrzycją traktowanych MNA⁺ w obecności indometacyny podanej *in vitro*. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów z cukrzycją i grupą cukrzycową traktowaną MNA⁺.

Dla sprawdzenia skuteczności zahamowania COX przez indometacynę dodawaną do buforu omywającego krążki aorty, zmierzono stężenie 6-keto-PGF_{1 α} w efluencie. Stwierdzono zmniejszony poziom 6-keto-PGF_{1 α} w obecności indometacyny zarówno w krążkach aorty od szczurów z cukrzycą nie przyjmujących (od 325,56±98,73 do 50,05±7,70 pg/ml/mg suchej masy aorty) jak i przyjmujących MNA⁺ (od 291,36±44,71 do 26,88±14,57 pg/ml/mg suchej masy aorty; Ryc. 31).



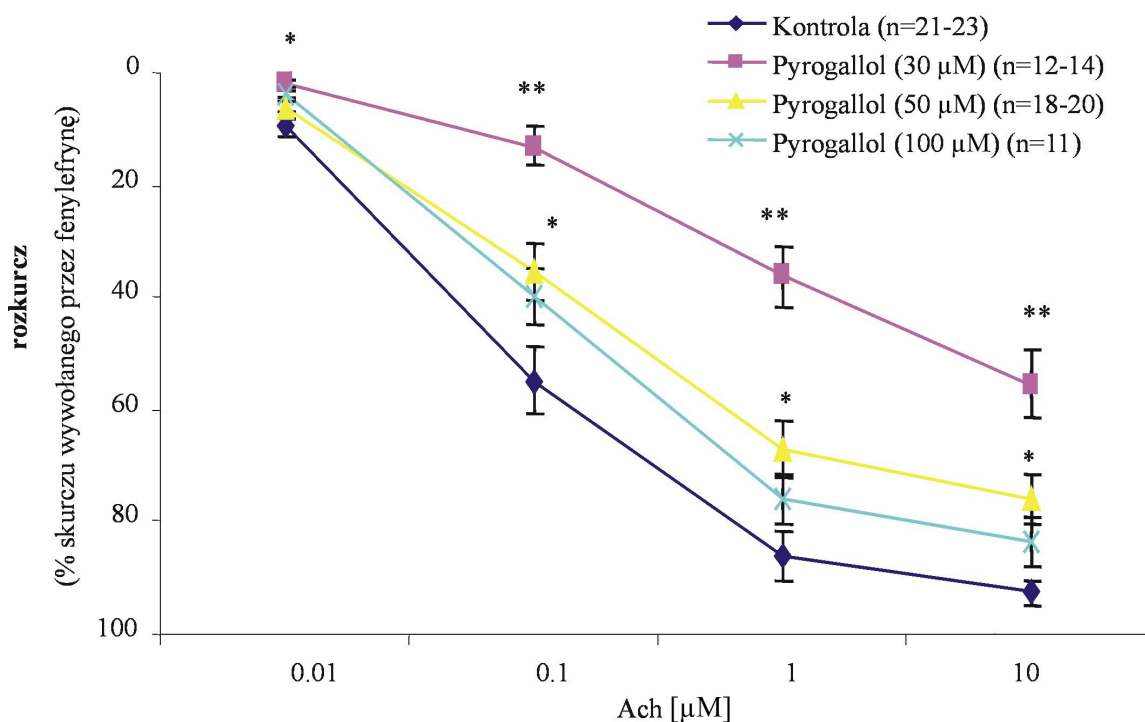
Ryc. 31. Zahamowanie wytwarzania PGI₂ (6-keto-PGF_{1 α}) przez indometacynę (podaną *in vitro*) w krążkach aorty (stymulowanych naciągami) u szczurów z cukrzycą traktowanych lub nie traktowanych MNA⁺. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M.

IV. 2. BADANIE ŚRÓDBŁONKOWEGO DZIAŁANIA MNA⁺ W MODELACH DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA *IN VITRO*

IV. 2.1. DZIAŁANIE MNA⁺ W MODELU DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA W AORCIE *IN VITRO* (PYROGALLOL)

IV211. Wolnorodnikowe uszkodzenie śródbłonka naczyń w aorcie szczura *in vitro* przez pyrogallol

Naczyniorozszerzające działanie acetylocholinyl i nitroprusydku sodu NaNP było badane w krążkach aorty traktowanych pyrogallem (30, 50 i 100 μM). Największy stopień uszkodzenia śródbłonka, w odpowiedziach naczyń na wzrastające stężenia acetylocholinyl, uzyskano przy stężeniu 30 μM pyrogallolu (Ryc. 32). Wyższe stężenia nie powodowały większego upośledzenia naczyniorozszerzającego działania acetylocholinyl.

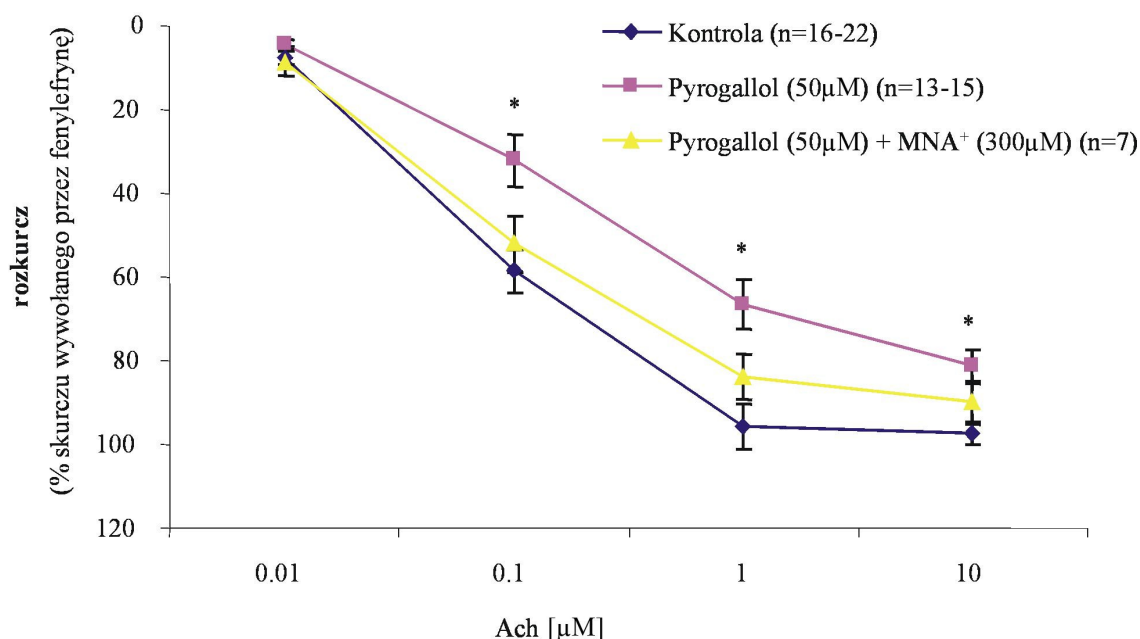


Ryc. 32. Upośledzenie odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od śródbłonka wywołanych przez acetylocholinę w aorcie szczura traktowanej przez pyrogallol. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ ** oznacza $p < 0,001$ pomiędzy grupą szczurów kontrolnych a grupami traktowanymi przez różne stężenia pyrogallolu.

IV212 Wpływ egzogennej MNA^+ na uszkodzenie śródbłonka naczyń przez pyrogallol

Inkubowanie izolowanych krążków aorty w obecności MNA^+ a następnie poddanych działaniu czynnika uszkodzającego pyrogallolu w stężeniu $50 \mu\text{M}$ prowadziło do niewielkiego stopnia poprawy naczyniorozszerzających odpowiedzi wywołanych przez acetylocholinę (Ryc. 33). MNA^+ nie wykazał protekcyjnego wpływu na uszkodzenie wywołane przez pyrogallol w stężeniu 30 i $100 \mu\text{M}$ (wyniki niezamieszczone).

Niezależny od śródbłonkowego NO rozkurcz aorty w odpowiedzi na NaNP nie różnił się w zależności od użytego stężenia pyrogallolu (ryciny nie zamieszczono).



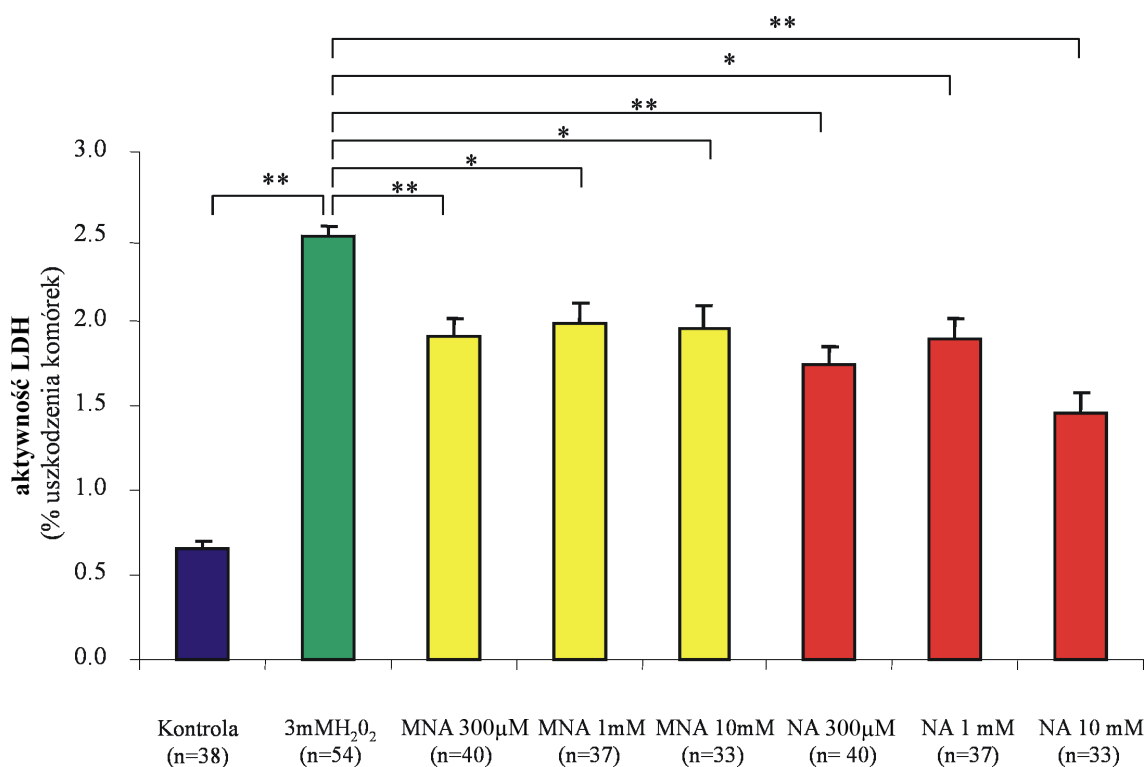
Ryc. 33. Wpływ MNA⁺ na wywołane przez pyrogallol (50 μM) upośledzenie odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od śródbłonna wywołanych przez acetylocholiny w aorcie szczura. Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm S.E.M. * oznacza $p < 0,05$ pomiędzy grupą szczurów kontrolnych a grupą traktowaną pyrogallolem w stężeniu 50 μM .

IV.2.2. DZIAŁANIE MNA⁺ W MODELU USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA PRZEZ NADTLENEK WODORU W LINII KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA EA. hy926

IV. 2.2.1. Uszkodzenie linii komórek śródbłonna EA. hy926 przez nadtlenek wodoru

Wyboru dawki uszkadzającej komórki linii EA. hy926 dokonano po wstępnej serii doświadczeń z użyciem różnych stężeń nadtlenku wodoru. Uszkodzenie 3 mM nadtlenkiem wodoru powodowało podobny stopień uszkodzenia, jaki można było uzyskać stosując 1% TRITON - X-100.

IV.2.2.2. Wpływ egzogenego MNA⁺ na uszkodzenie komórek śródbłonka wywołane przez nadtlenek wodoru



Ryc.34. Niewielki wpływ MNA⁺ na uszkodzenie komórek śródbłonka (EA. hy926) pod wpływem H₂O₂ (3mM). Uszkodzenie analizowano na podstawie aktywność uwolnionego do nadsącza enzymu LDH. Wyniki przedstawiają wartości średnie ± S.E.M. Dla porównania przedstawiono wyniki dla nikotynamidu (NA).

Oznaczając aktywność enzymu LDH nie zaobserwowano znaczącego wpływu MNA⁺ i nikotynamidu (Ryc. 34) na stopień uszkodzenia komórek śródbłonka pod wpływem H₂O₂ (3mM). MNA⁺ wykazywał tylko niewielkie działania ochronne. Słabe działanie MNA⁺ w tym modelu choć statystycznie znamienne nie było zależne od stężenia MNA⁺.

V. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

W tej rozprawie doktorskiej wykazano, że dieta bogata we fruktozę (60%) podawana szczurom przez okres 4 lub 8 tygodni wywoływała wzrost poziomu trójglicerydów w osoczu (z $1,55 \pm 0,12$ do odpowiednio $3,32 \pm 0,28$ i $4,25 \pm 0,27$ mmol/L) bez znaczących zmian innych parametrów profilu lipidowego i prowadziła do upośledzenia odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO w izolowanej aortie *ex vivo* (dysfunkcja śródbłonka). Podobnego stopnia dysfunkcja śródbłonka rozwijała się u szczurów nastrzykniętych streptozytocyną (75 mg/kg masy ciała), u których rozwój cukrzycy wyznaczały m.in. wzrost stężenia HbA1C (z $4,93 \pm 0,24$ % do $9,55 \pm 0,56$ %) i fruktozaminy (z $1,14 \pm 0,06$ do $2,53 \pm 0,10$ mmol DTF/mg białka). W cukrzycy, ale nie w hipertriglicerydemii upośledzeniu aktywności biologicznej NO towarzyszyło upośledzenie wytwarzania PGI₂ przez ścianę aorty (6-keto-PGF_{1 α} w efluencie z krążków naczyniowych spadł z $1602,91 \pm 272,23$ do $588,16 \pm 71,81$ pg/ml/mg suchej masy), i kompensacyjny wzrost ogólnoustrojowego wytwarzania PGI₂ (6-keto-PGF_{1 α}) w osoczu (wzrósł z $158,84 \pm 21,98$ do $344,89 \pm 72,15$ pg/ml).

Podawanie egzogennej MNA⁺ przez okres 4 tygodni w dawce 100 mg/kg, ale nie 10 mg/kg wywoływało wzrost poziomów endogennej MNA⁺ (z $0,32 \pm 0,06$ do $1,37 \pm 0,29$:mol/L) i jego metabolitów (2PYR: z $0,69 \pm 0,08$ do $3,45 \pm 0,90$ i 4 PYR: z $1,17 \pm 0,16$ do $3,75 \pm 0,84$:mol/L). Taka dawka MNA⁺ została więc wybrana do dalszych badań.

W hipertriglicerydemii, MNA⁺ (podawany z wodą do picia przez okres 4 tygodni) obniżał stężenie trójglicerydów w osoczu (z $4,25 \pm 0,27$ do $2,18 \pm 0,14$ mmol/L). W cukrzycy natomiast MNA⁺ (podawane przez okres 7 tygodni) w niewielkim stopniu poprawiał parametry biochemiczne cukrzycy: obniżał stężenie HbA1C (z $9,55 \pm 0,56$ do $8,80 \pm 1,22$ %) i fruktozaminy (z $2,53 \pm 0,10$ do $2,13 \pm 0,17$ mmol DTF/mg białka) oraz podnosił stężenie peptydu C (z $139,59 \pm 62,48$ do $446,45 \pm 275,11$). Paradoksalnie stężenie trójglicerydów w osoczu było podwyższone pod wpływem MNA⁺ (z $1,29 \pm 0,08$ do $1,79 \pm 0,15$ mmol/L).

Podawanie MNA⁺ w hipertriglicerydemii czy w cukrzycy przeciwdziało upośledzeniu odpowiedzi naczyniorozszerzającej aorty zależnej od śródbłonkowego NO wywołanej przez acetylocholinę czy histaminę. Jednak terapia MNA⁺ pozostawała bez wpływu na spadek podstawowej produkcji NO w hipertriglicerydemii mierzony przy użyciu znacznika

fluorescencyjnego DAF-FM ($9,32 \pm 0,81$, $4,99 \pm 0,45$ i $5,15 \pm 0,49$ odpowiednio dla kontroli, hipertriglicydemii i hipertriglicydemii + MNA⁺).

Wpływ podawania MNA⁺ na aktywność PGI₂ był odmienny w cukrzycy i w hipertriglicydemii. W cukrzycy terapia MNA⁺ nie odwracała upośledzenia wytwarzania PGI₂ przez ścianę aorty (dla cukrzycy $588,16 \pm 71,81$ i dla cukrzycy traktowanej MNA⁺ $466,52 \pm 117,21$ pg/ml/mg suchej masy), choć znosiła kompensacyjny wzrost stężenia 6-keto-PGF_{1 α} w osoczu (z $344,89 \pm 72,15$ dla cukrzycy do $217,75 \pm 30,29$ pg/ml dla cukrzycy traktowanej MNA⁺). W hipertriglicydemii natomiast podawanie MNA⁺ zdawało się nasilać wytwarzanie PGI₂ zarówno w efluencie jak i osoczu (z $7296,13 \pm 1831,19$ do $11830,44 \pm 2573,41$ pg/ml/mg suchej masy i z $179,17 \pm 54,42$ do $534,33 \pm 95,66$ pg/ml dla hipertriglicydemii vs hipertriglicydemii + MNA⁺).

W modelach uszkodzenia śródbłonna *in vitro*, takich jak model uszkodzenia śródbłonna aorty przez pyrogallol albo model uszkodzenia komórek w hodowli komórkowej przez nadtlenuk wodoru, MNA⁺ wykazywał tylko niewielkie, niezależne od stężenia działanie ochronne.

VI. DYSKUSJA

DYSFUNKCJA ŚRÓDBŁONKA A ROZWÓJ *ATHEROTROMBOSIS*

Istnieje wiele dowodów na to, że dysfunkcja śródbłonka odgrywa kluczową rolę w rozwoju *atherothrombosis* [21;98]. Dysfunkcja śródbłonka wyprzedza rozwój blaszki miażdżycowej [123] i może być wskaźnikiem rozwijających się symptomów klinicznych choroby. Dobrze znany jest fakt, że klasyczne czynniki ryzyka *atherotrombosis* takie jak: nadciśnienie, palenie tytoniu, cukrzyca, starzenie się, otyłość, różnego rodzaju dyslipidemie są związane z dysfunkcją śródbłonka. Ponadto stopień dysfunkcji śródbłonka koreluje z ilością czynników ryzyka [22;23]. Dlatego też dysfunkcja śródbłonka może być postrzegana jako barometr ryzyka wystąpienia czynników sercowo-naczyniowych [121], co ma znaczenie diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne w *atherothrombosis* [27;28]. Dysfunkcja śródbłonka w klinicznych warunkach jest głównie postrzegana i diagnozowana na podstawie upośledzenia rozkurczu naczyń zależnego od śródbłonkowego NO. Dysfunkcja śródbłonka jest jednak również wyznaczona przez szereg innych biochemicznych czynników włączając w to upośledzenie produkcji prostacykliny (PGI₂) i śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (EDRF), wzrost produkcji O²·, jak również pro-zapalną i pro-zakrzepową aktywację śródbłonka [21;28;51]. Spośród wielu czynników ryzyka rozwoju dysfunkcji śródbłonka i *atherothrombosis* dwa spośród nich, hipertriglicydemia oraz cukrzyca mają szczególne znaczenie i modele zwierzęce tych patologii układu krążenia zostały wybrane przeze mnie aby zbadać śródbłonkowe właściwości MNA⁺.

Rola trójglicerydów w rozwoju miażdżycy była przez długi czas negowana, panował bowiem pogląd, że podniesiony poziom trójglicerydów nie stanowi czynnika ryzyka tej choroby [55]. Ten pogląd zmienił się jednak przez szereg ważnych klinicznych badań [1]. Dzisiaj podwyższony poziom trójglicerydów jest uważany jako ważny czynnik miażdżycy [3;4;33;43;44], a dowodów na poparcie tej tezy jest coraz więcej. Istotnie, przedłużająca się hipertriglicydemia wywołuje typowe cechy dysfunkcji śródbłonka [62;70]. Ponadto hipertriglicydemia poposiłkowa może także wywoływać osłabienie funkcji śródbłonka, które przyczynia się do rozwoju *atherothrombosis* [5;6;80].

ZWIERZECY MODEL DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA - MODEL HIPERTRIGLICERYDEMII

Hipertriglicerydemię u szczurów można stosunkowo łatwo wywołać dietą bogatą we fruktozę. W takim modelu upośledzona jest czynność śródbłonka mierzona jako zdolność naczyń do rozkurczu zależnego od śródbłonkowego NO [62]. Dieta bogata we fruktozę prowadzi również do insulinooporności, hiperinsulinemii i niewielkiego nadciśnienia [66] wywołując w ten sposób zestaw objawów podobnych do zespołu metabolicznego u ludzi [19;24;32]. U ludzi każda z tych nieprawidłowości związana jest z dysfunkcją śródbłonka. W moich badaniach hipertriglicerydemia u szczurów również wywoływała rozwój dysfunkcji śródbłonka. W przeprowadzonych badaniach nie monitorowałam ciśnienia krwi, natomiast badałam insulinooporność (pomiar peptydu C) [62;108]. Opisywany w tym modelu wzrost ciśnienia krwi jest niewielki [75] a poziom peptydu C nie był podniesiony, tak więc wydaje się że przyczyną dysfunkcji śródbłonka u szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę jest hipertriglicerydemia, a nie nadciśnienie [75] czy insulinooporność [70]. Istotnie stężenie trójglicerydów było znacznie podwyższone u szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę już po czterech tygodniach żywienia i wykazywało dalszy wzrost po kolejnych czterech tygodniach stosowania tej diety.

Dysfunkcję śródbłonka w aorcie oceniałam z jednej strony na podstawie pomiaru aktywności podstawowej produkcji NO (znacznik fluorescencyjny DAF-FM), a z drugiej na podstawie wielkości zależnego od śródbłonkowego NO rozkurczu wywołanego przez acetylocholinę i histaminę. Pomiary wykonywane były w kążkach aorty piersiowej *ex vivo*. O udziale NO w rozkurczu aorty wywołanym przez acetylocholinę czy histaminę świadczyło całkowite zahamowanie tych odpowiedzi przez L-NAME, klasyczny inhibitor syntazy NO. Zarówno podstawowa produkcja NO, jak i stymulowana produkcja NO przez acetylocholinę czy histaminę były upośledzone w aorcie pochodzącej od szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę.

Warto dodać, że dysfunkcja śródbłonka i upośledzenie aktywności biologicznej NO, może być związane z kompensacyjnym wzrostem wytwarzania EDHF (endothelium-derived hyperpolarising factor). Istotnie, NO hamuje tworzenie EDHF [88] i osłabienie aktywności NO może prowadzić do zwiększonej aktywności EDHF [58]. W moich badaniach nie wykryłam jednak istotnego udziału EDHF w odpowiedzi na acetylocholinę czy histaminę. Zarówno w warunkach kontrolnych jak i w hipertriglicerydemii odpowiedzi te były hamowane

niemal całkowicie przez L-NAME. Być może rola EDHF w dysfunkcji śródbłonka zależy od typu naczyń krwionośnych [10;65] i zależy od patologii, która wywołuje dysfunkcję śródbłonka [31].

W wielu modelach doświadczalnych osłabienie odpowiedzi zależnych od śródbłonkowego NO było związane z osłabieniem wytwarzania PGI₂ pochodzącej z cyklooksygenazy COX-1 [37;51], lub z kompensacyjnym wzrostem wytwarzania PGI₂ przez COX-2 [36]. W moich badaniach, produkcja PGI₂ nie była modyfikowana przez hipertriglicerydemię. Być może wpływ na aktywność PGI₂ w aorcie pojawia się tylko po dłuższym okresie trwania hipertriglicerydemii [100].

Interesującą obserwacją było to, że upośledzenie aktywności biologicznej NO było widoczne zarówno u szczurów głodzonych i niegłodzonych, podczas gdy tylko u szczurów niegłodzonych przed pobraniem krwi stężenie trójglicerydów było podwyższone. Co więcej, upośledzenie rozkurczu aorty było nawet bardziej widoczne w grupie głodzonych szczurów. Głodzenie szczurów wpływało nie tylko na odpowiedzi zależne od NO, ale również na wytwarzanie prostacykliny (PGI₂). Istotnie, głodzenie szczurów wywołało wzrost wytwarzania PGI₂, który był niewielki u szczurów kontrolnych, natomiast znaczący u szczurów karmionych dietą bogatą we fruktozę. Powyższe wyniki wskazują, z jednej strony na interesujące zależności pomiędzy długością okresu głodzenia szczurów a czynnością śródbłonkowego NO i PGI₂, a z drugiej strony, na konieczność rygorystycznej kontroli okresu głodzenia szczurów przed pobraniem aorty, aby wiarygodnie ocenić czynność śródbłonka w warunkach *ex vivo*. W związku z tymi obserwacjami, w dalszych badaniach dotyczących badania wpływu MNA⁺ na dysfunkcję śródbłonka, zdecydowano się je przeprowadzić u szczurów niegłodzonych i tylko w kilku przypadkach dla porównania przedstawiono wyniki dla szczurów głodzonych.

W mojej pracy stwierdziłam, że hipertriglicerydemia u szczurów prowadzi do upośledzenia aktywności biologicznej NO bez zmian aktywności PGI₂ i bez kompensacyjnego wzrostu aktywności EDHF. Nie badałam jednak mechanizmu odpowiedzialnego za osłabienie zależnej od NO czynności naczyń. Wydaje się, że może on być związany ze zwiększonym wytwarzaniem O² [59;119;120], z rozprzęgnięciem dimeru NOS [5;70;108] niedoborem tetrahydrobiopteryny (BH₄) głównego kofaktora NO syntazy (NOS) [108;109] i zmniejszoną aktywnością śródbłonkowej NOS [64;83]. Sugerowano również udział podniesionego stężenia endoteliny-1 w rozwoju dysfunkcji śródbłonka w tym modelu [65;120]. Wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do upośledzenia aktywności biologicznej NO w modelu zwierzęcej hipertriglicerydemii wymaga więc dalszych badań.

ZWIERZECY MODEL DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA - MODEL CUKRZYCY

Od dawna cukrzyca była postrzegana jako ważny czynnik ryzyka zawału serca czy innych powikłań *atherothrombosis* i jest jedną z częstszych przyczyn rozwijającej się dysfunkcji śródbłonna u ludzi. Istotnie, zarówno cukrzyca insulino-zależna (IDDM) jak i insulino-niezależna (NIDDM) związane są z upośledzeniem zależnego od NO rozkurczu naczyń [86].

Szczurzy model cukrzycy indukowanej przez streptozytocyne (STZ) jest znany już od lat 60-tych zeszłego wieku i do dziś jest szeroko stosowany w badaniach doświadczalnych [78; 92; 104]. STZ będąca szerokim spektrum antybiotykiem, indukuje cukrzycę u zwierząt przez szybką degranulację komórek β wysp trzustkowych z nagromadzeniem się zredukowanego NAD (dinukleotyd nikotynamido adeninowy) [11]. Szczegółowy mechanizm tego selektywnego działania destrukcyjnego na komórki β wysp trzustkowych przez STZ nie jest dokładnie poznany [101]. STZ w dawce 50-65 mg/kg prowadzi do hiperglikemii (20-30 mmol/L) natomiast wyższe dawki (75 mg/kg) prowadzą do spontanicznej ketozy i śmierci w przeciągu kilku dni [122]. Cukrzyca wywołana przez STZ jest drugim najczęściej stosowanym modelem doświadczalnym ludzkiej choroby, po spontanicznym nadciśnieniu u szczurów SHR. Istnieją także inne doświadczalne modele cukrzycy [20; 84; 93]. Jednak model cukrzycy wywołanej przez STZ pomimo swoich ograniczeń jest wciąż najczęściej stosowany.

W wielu pracach opisywano dysfunkcję śródbłonna w cukrzycy, której towarzyszą prawidłowe [86], lub upośledzone odpowiedzi naczyniorozszerzające na donory NO [91]. Fenotyp dysfunkcji śródbłonna w cukrzycy związany jest ze zwiększonym stresem oksydacyjnym i wzrostem produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS). Istotnie zarówno hiperglikemia jak i hiperinsulinemia aktywują produkcję $O_2^{\cdot-}$ jak i OH^{\cdot} [79; 95; 96]. Proponowano, że dodatkowym źródłem wolnych rodników mogą być także produkty katalizy cyklooksygenazy [79; 117]. Wysoki poziom osoczowej glukozy prowadzi do kowalencyjnej, nieenzymatycznej modyfikacji białek. Te zmodyfikowane białka, końcowe produkty glikacji (AGEs), są magazynowane w tkankach i co najistotniejsze, są produktami toksycznymi dla komórek śródbłonna. AGE wywołują bowiem odpowiedź zapalną śródbłonna i zwiększony stres oksydacyjny poprzez aktywację specyficznych receptorów RAGE [15; 79; 107]. Istotnie, zablokowanie receptorów RAGE odwraca dysfunkcję śródbłonna w cukrzycy [42; 110].

Liczne badania w modelu cukrzycy wywołanej przez STZ potwierdzają udział ROS w rozwoju dysfunkcji śródbłonka w tym modelu [127]. Dla przykładu wykazano, że podniesiona produkcja $O_2^{\cdot-}$ przez NAD(P)H oksydazę prowadzi do rozprężenia śródbłonkowej syntazy NO i zmniejszenia aktywności biologicznej NO. Zresztą podobny mechanizm rozwoju dysfunkcji śródbłonka opisano nie tylko w modelu cukrzycy indukowanej streptozotocyną [57;73] ale także w modelu zwierzęcym genetycznie uwarunkowanej cukrzycy typu II [17] jak również u pacjentów z II typem cukrzycy [45;46;52].

W moich badaniach potwierdziłam rozwój dysfunkcji śródbłonka i upośledzenie zależnej od NO odpowiedzi w aorcie w modelu cukrzycy wywołanej przez STZ. Podobnie jak w modelu hipertriglicydemii i w tym przypadku nie badałam mechanizmów biochemicznych leżących u podstaw rozwoju dysfunkcji śródbłonka. Badałam jednak zmiany w aktywności PGI_2 i EDHF, które mogą towarzyszyć upośledzeniu aktywności biologicznej NO. Stwierdziłam podobnie jak inni autorzy spadek wytwarzania PGI_2 w aorcie szczurów [71;72]. Jednak w moich doświadczeniach widoczny on był jedynie w naciągniętych krążkach aorty. Ten metodyczny szczegół wydaje się być bardzo istotny. Powinien więc być brany pod uwagę w tego typu badaniach dla czulszej detekcji zaburzeń wytwarzania PGI_2 przez ścianę aorty w patologii układu krążenia.

Podobnie jak w modelu hipertriglicydemii, rozkurcz aorty wywołany przez acetylocholinę czy histaminę był zarówno u szczurów kontrolnych jak i u szczurów z cukrzycą całkowicie zależny od NO. Zmiany wytwarzania PGI_2 , nie miały więc udziału w upośledzeniu odpowiedzi na acetylocholinę czy histaminę [79]. Nie miał również w tym udziału EDHF. Jednak w osoczu poziom 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ był znacznie podwyższony, co może świadczyć o kompensacyjnym wzroście ustrojowego wytwarzania PGI_2 . Nie badałam ani źródła tkankowego, ani źródła enzymatycznego (COX-1 czy COX-2) podwyższonej ustrojowej produkcji PGI_2 u szczurów z cukrzycą. Pozostają więc one nieznane. Nasuwa się przypuszczenie, że zwiększone wytwarzanie PGI_2 pochodzi z płuc [49] i COX-2 [50]. Jednak ta kwestia pozostaje do wyjaśnienia w dalszych badaniach.

Podsumowując, w mojej pracy stwierdziłam że, cukrzyca u szczurów, podobnie jak hipertriglicydemia, prowadzi do upośledzenia aktywności biologicznej NO, któremu nie towarzyszy kompensacyjny wzrost aktywności EDHF. W cukrzycy jednak, w przeciwieństwie do hipertriglicydemii, dysfunkcja śródbłonka obejmuje również upośledzenie wytwarzania PGI_2 przez ścianę naczynia i kompensacyjny wzrost ustrojowej produkcji PGI_2 widoczny jako wzrost stężenia 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ w osoczu.

DZIAŁANIE MNA⁺ W SZCZURZYM MODELU HIPERTRIGLICERYDEMII I CUKRZYCY

Głównym celem tej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu MNA⁺ na rozwój dysfunkcji śródbłonna w modelach zwierzęcych hipertriglicerydemii i cukrzycy. W obydwóch modelach MNA⁺ stosowany był w dawce 100 mg/kg a nie 10 mg/kg, bowiem tylko w tej dawce powodował widoczny wzrost endogenego MNA⁺ oraz jego metabolitów (2-PYR i 4-PYR) w osoczu.

Barlow i wsp. [9] opisywali zmniejszenie poziomów 2-PYR i 4-PYR i niewielkie zmiany poziomu samego MNA⁺ w osoczu u szczurów z cukrzycą. W moich badaniach u szczurów z cukrzycą obserwowałam niewielki wzrost stężenia MNA⁺ w osoczu, a jedynie poziom 4-PYR był zmniejszony. Nie znana jest przyczyna tych różnic i wymaga wyjaśnienia.

Jedną z ciekawszych obserwacji tej rozprawy doktorskiej było stwierdzenie działania MNA⁺ obniżającego trójglicerydy u szczurów z hipertriglicerydemią, bez większego wpływu na pozostałe parametry lipidowe. Pilotowe badania kliniczne przeprowadzane przez doktora Janusza Kawińskiego z Kliniki Kardiologii Zakładu Kardiologii i Kardiochirurgii Akademii Medycznej w Łodzi, w grupie kilkunastu pacjentów z dyslipidemią w okresie okołozawałowym również wykazały, że leczenie MNA⁺ prowadzi do normalizacji parametrów lipidowych. Po 14 dniach terapii MNA⁺, trzy razy dziennie po posiłku, w dawce 30 mg, obserwowano prawie dwukrotny spadek stężenia trójglicerydów (z 409,50±138,90 do 216,31±42,84 mg/dl). Zaobserwowano także niewielki spadek poziomu cholesterolu całkowitego (z 248,63±35,15 do 212,56±47,15 mg/dl) (Kawiński i wsp. 2006, wyniki nie opublikowane). Tak więc moje wyniki badań zdają się potwierdzać działanie MNA⁺ na profil lipidowy w chorobach związanych z zaburzeniami lipidowymi i sercowo-naczyniowymi. W tym kontekście zadziwiający jest fakt, że w modelu cukrzycy terapia taką samą dawką MNA⁺, nie tylko nie wykazywała działania obniżającego stężenie trójglicerydów, ale nawet, prowadziła do nieznacznego ich podwyższenia przy niewielkim korzystnym wpływie MNA⁺ na poziom glukozy, HbA1C czy fruktozoaminy. Nieznany jest mechanizm działania hipolipemizującego MNA⁺. Jednak jeżeli jest on związany ze stymulacją śródbłonkowej lipazy lipoproteinowej, to wyjaśnieniem braku działania MNA⁺ na poziom trójglicerydów w cukrzycy mógłby być znany fakt upośledzonej czynności lipazy lipoproteinowej w cukrzycy [63;115;116]. Wyjaśnienie tego zagadnienia wymaga dalszych badań. Na podstawie wyników badań przedstawionych w tej rozprawie doktorskiej mogę tylko stwierdzić, że mechanizm działania hipolipemizującego MNA⁺, w przeciwieństwie do jego działania przeciwzakrzepowego [26], wydaje się być niezależny od COX i PGI₂ bowiem indometacyna nie znosiła tego działania.

Opisując działanie hipolipemizujące MNA⁺ można zauważyć pewne analogie z właściwościami kwasu nikotynowego. Ta paralela ma jednak swoje ograniczenia, bowiem u szczurów HDL, a nie LDL jest głównym nośnikiem cholesterolu. Chociaż więc moje badania wykazały wzrost poziomu HDL u szczurów przyjmujących MNA⁺, to jednak ograniczone jest znaczenie tej obserwacji.

Intrygujące jest przypuszczenie, że MNA⁺ jest w stanie oddziaływać na profil lipidowy przez te same receptory co kwas nikotynowy. Tak więc działanie MNA⁺ na poziom trójglicerydów (i HDL) może okazać się istotne klinicznie zwłaszcza w kontekście dzisiejszego zastosowania kwasu nikotynowego. Obecnie prowadzone są badania zarówno w modelach doświadczalnych jak i u ludzi nad skutecznością MNA⁺ w osłabianiu poposiłkowej hipertriglicydemii. Być może wyjaśnią one mechanizm działania MNA⁺ na poziom trójglicerydów. Badania wpływu MNA⁺ na HDL muszą być przeprowadzone u ludzi.

W mojej pracy głównie skupiłam się na badaniu zdolności MNA⁺ do odwracania dysfunkcji śródbłonka w modelach zwierzęcych hipertriglicydemii i cukrzycy. Wykazałam, że w obydwu tych modelach terapia MNA⁺ zapobiega rozwojowi dysfunkcji śródbłonka, a oznacza to, że terapia MNA⁺ prowadzi do zachowania aktywności biologicznej NO, pomimo istnienia groźnych dla śródbłonka patologii takich jak hipertriglicydemia czy cukrzyca. Można by sądzić, że w modelu hipertriglicydemii, obserwowana przeze mnie ochrona czynności śródbłonka wynika z działania MNA⁺ obniżającego poziom trójglicerydów. Jednak, efekt MNA⁺ na czynność śródbłonka widoczny był zarówno wtedy gdy poziom trójglicerydów był podwyższony (szczury niegłodzone) jak i wtedy gdy poziom trójglicerydów był prawidłowy (szczury głodzone). Wydaje się więc, że działanie hipolipemizujące i działanie śródbłonkowe MNA⁺ są od siebie niezależne. Tym bardziej, że w cukrzycy terapia MNA⁺ pozostawała bez wpływu na poziom trójglicerydów, a odwracała dysfunkcję śródbłonka równie skutecznie jak w modelu hipertriglicydemii.

Rodzi się pytanie, czy śródbłonkowe działanie MNA⁺ i odwracanie dysfunkcji śródbłonka przez MNA⁺ w modelach zwierzęcych hipertriglicydemii i cukrzycy jest powiązane ze zdolnością MNA⁺ do uwalniania PGI₂ [26]. Za udziałem PGI₂ może przemawiać fakt, że w modelu hipertriglicydemii terapia MNA⁺ prowadziła do zwiększonego uwalniania PGI₂ przez ścianę aorty jak również do zwiększonego poziomu 6-keto PGF_{1α} w osoczu. Jednak nie udało się wykazać, że MNA⁺ bezpośrednio stymuluje wytwarzanie PGI₂ w doświadczeniach *in vitro*. W obecności indometacyny podanej bezpośrednio na krążki aorty, która znacznie hamowała wytwarzanie PGI₂ przez krążki aorty *ex vivo*, widoczna była również wyraźna różnica w czynności śródbłonkowego NO, pomiędzy szczurami traktowanymi *in vivo* MNA⁺ i tymi, które MNA⁺ nie dostawały. Tak więc, jeżeli nawet PGI₂ jest

odpowiedzialna za poprawę czynności śródbłonkowego NO w tych dwóch modelach zwierzęcych dysfunkcji śródbłonka, to jest to trwała modyfikacja śródbłonka, której nie da się zniwelować kilkugodzinną obecnością indometacyny *in vitro*. Zależność śródbłonkowego działania MNA⁺ od PGI₂ powinno się więc wykryć przez kilkudniowe podawanie indometacyny *in vivo*. Przeprowadzono takie doświadczenia, które jednak nie przyniosły jednoznacznej odpowiedzi, bowiem w tych doświadczeniach zahamowanie wytwarzania PGI₂ przez ścianę naczynia było niewielkie. Na ich podstawie nie można więc ostatecznie rozstrzygnąć czy mechanizm śródbłonkowego działania MNA⁺ zależy od PGI₂ czy jest od PGI₂ niezależny. Można jedynie stwierdzić, obserwując krwawienia z przewodu pokarmowego szczurów, którym podawano indometacynę, że zahamowanie COX, nie jest najlepszym podejściem doświadczalnym do wyjaśnienia tej kwestii. Być może podawanie antagonisty receptora IP [18], mogłoby przynieść lepsze wyniki.

Obraz komplikuje również fakt, że w modelu cukrzycy terapia MNA⁺ nie wpływała na upośledzenie wytwarzania PGI₂ w aorcie natomiast odwracała kompensacyjny wzrost stabilnego metabolitu 6-keto-PGF_{1α}, widoczny w osoczu. Spadek kompensacyjnego wzrostu PGI₂ jaki wystąpił w osoczu u szczurów cukrzycowych leczonych MNA⁺ jest bezsprzecznie wyrazem poprawy czynności śródbłonka. Jednak jego związek z działaniem MNA⁺ uwalniającym PGI₂ nie jest oczywisty i pozostaje do wyjaśnienia.

Podsumowując, w tej rozprawie doktorskiej przedstawiłam przekonujące dowody na to, że MNA⁺ odwraca dysfunkcję śródbłonka i poprawia biologiczną aktywność NO w modelach zwierzęcych dysfunkcji śródbłonka. Jednak udział PGI₂ w opisanym w tej rozprawie śródbłonkowym działaniu MNA⁺ pozostaje do wyjaśnienia.

DZIAŁANIE MNA⁺ W MODELACH *IN VITRO* USZKODZENIE ŚRÓDBŁONKA PRZEZ ANION PONADTLENOWY I NADTLENEK WODORU

Zastosowanie generatora wolnych rodników O^{2•-} pyrogallolu oraz nadtlenku wodoru (H₂O₂) miało na celu zbadanie wpływu MNA⁺ na uszkodzenie powodowane przez reaktywne formy tlenu. W obu modelach *in vitro*, które opisywane są w literaturze [8; 29; 53; 74], nie udało się potwierdzić protekcyjnego działania MNA⁺ tak wyraźnie widocznego w modelach *in vivo*.

W modelu doświadczalnym z użyciem pyrogallolu, pomimo użycia kilku stężeń pyrogallolu nie wykazano stężenia-zależnego upośledzenia funkcji śródbłonka. Największe stężenie użytego pyrogallolu (100 μM) wcale nie spowodowało największego stopnia

uszkodzenia zdolności naczyń do rozkurczu zależnego od śródbłonkowego NO. Te wyniki odbiegają więc od doniesień innych autorów, którzy wykazali dawko-zależne uszkodzenie komórek śródbłonka w aorcie szczurzej pod wpływem pyrogallolu [118].

W badaniach *in vitro* wykorzystano też linię ludzkich komórek śródbłonka [58] będąca unieśmiertelnioną hybrydą epitelialnych komórek linii A549 i komórek otrzymanych z żyły pępowinowej [58]. Posłużyła ona do zbadania zdolności MNA⁺ do ochrony śródbłonka przez uszkodzeniem *in vitro* wywołanym przez H₂O₂. W pierwszym modelu działanie MNA⁺ było znikome, w drugim było widoczne, jednak nie zależne od stężenia MNA⁺. Istotnie, po zastosowaniu czynnika uszkadzającego, jakim była 3 mM H₂O₂ zaobserwowano zmniejszenie uwalniania enzymu LDH obrazującego uszkodzenie śródbłonka, o około 20% zarówno dla MNA⁺ w stężeniu 1 mM jak i 10 mM.

Różnorodne efekty działania MNA⁺ w modelach *in vivo* i *in vitro* nie pozwoliły na poznanie mechanizmu, przez który może działać ten związek. Pozostaje więc do wyjaśnienia czy w działaniu śródbłonkowym MNA⁺ mają udział PGI₂, receptory dla kwasu nikotynowego, a może również oddziaływania ujemnie naładowanych glikozamin glikokaliuksu śródbłonkowego z dodatnio naładowanym MNA⁺ [26].

Przedstawione w tej rozprawie wyniki opisują nowe biologiczne właściwości MNA⁺, który był dotychczas uważany za nieaktywny metabolit nikotynamidu. Tym samym, buduje się nowy rozdział w farmakologii MNA⁺. Co nie mniej istotne, profil śródbłonkowego działania MNA⁺ opisany w tej rozprawie doktorskiej rysuje potencjalne możliwości zastosowania tego związku w leczeniu chorób układu krążenia związanych z dysfunkcją śródbłonka chorób naczyniowych. Jestem o tym przekonana pomimo tego, że mechanizm działania MNA⁺ nie został wyjaśniony. To przekonanie wyrasta z ważnej dewizy farmakologii doświadczalnej: *in vivo veritas*.

VII. WNIOSKI

1 — U szczurów, którym wywołano cukrzycę lub hipertriglicydemię rozkurcz aorty wywołany przez acetylocholinę lub histaminę, który jest zależny od śródbłonkowego tlenku azotu (NO), jest upośledzony (dysfunkcja śródbłonka). W cukrzycy, ale nie w hipertriglicydemii dysfunkcja śródbłonka obejmuje również upośledzenie wytwarzania PGI_2 przez ścianę aorty i kompensacyjny wzrost wytwarzania PGI_2 , widoczny jako wzrost stężenia 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ w osoczu.

2 — Zarówno w cukrzycy jak i w hipertriglicydemii długotrwałe podawanie MNA^+ (100 mg/kg) p.o. podnosi poziom endogennego MNA^+ i jego metabolitów w osoczu oraz przeciwdziała rozwojowi dysfunkcji śródbłonka.

3 — W cukrzycy podawanie MNA^+ nie przeciwdziała upośledzeniu wytwarzania PGI_2 przez ścianę aorty, choć znosi kompensacyjny wzrost stężenia 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ w osoczu. W hipertriglicydemii natomiast MNA^+ zdaje się nasilać wytwarzanie PGI_2 przez ścianę aorty.

4 — W cukrzycy działanie śródbłonkowe MNA^+ jest niezależne od jego wpływu na parametry biochemiczne cukrzycy. Podobnie w hipertriglicydemii działanie śródbłonkowe MNA^+ jest niezależne od jego wpływu na poziom trójglicerydów.

5 — W przeciwieństwie do badań *in vivo*, w badaniach *in vitro* nie udało się ujawnić śródbłonkowego działania MNA^+ .

VIII. STRESZCZENIE

Prawidłowo funkcjonujący śródbłonek jest wyznacznikiem zdrowia układu krążenia, natomiast dysfunkcja śródbłonka odgrywa kluczową rolę w patofizjologii wielu chorób. Hipercholesterolemia, nadciśnienie, hipertriglicerydemia, cukrzyca, niewydolność krążenia czy pierwotne nadciśnienie płucne to tylko niektóre choroby, w których funkcja śródbłonka jest upośledzona. Farmakologia śródbłonka powinna skutecznie przywracać prawidłową czynność śródbłonka, aby za pośrednictwem naczynioprotekcyjnych mechanizmów śródbłonka naczyniowego chronić układ krążenia przed rozwojem jego patologii.

1-metylonikotynamid (MNA⁺), dotychczas był uznawany za nieaktywny endogenny metabolit nikotynamidu powstający w wątrobie w reakcji katalizowanej przez N-metylotransferazę nikotynamidu. Ponieważ, istniały przesłanki sugerujące, że MNA⁺ może wpływać na czynność śródbłonka, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie śródbłonkowego działania MNA⁺ w zwierzęcych modelach doświadczalnych naśladujących patologie układu krążenia człowieka oraz w badaniach *in vitro*. Dla zbadania właściwości MNA⁺ *in vivo* posłużyłam się dwoma modelami dysfunkcji śródbłonka: modelem cukrzycy wywołanej przez streptozytocynę oraz modelem hipertriglicerydemii wywołanej przez dietę bogatą we fruktozę. Rozwój cukrzycy czy hipertriglicerydemii był monitorowany przez szereg parametrów biochemicznych (profil lipidowy, pomiar stężenia: peptydu C, glukozy, HbA1C, frukozaminy), a czynność śródbłonka oceniana była na podstawie aktywności naczyniorozszerzającej tlenku azotu (NO) w izolowanych krążkach aorty, jak również na podstawie poziomu 6-keto-PGF_{1 α} , głównego metabolitu prostacykliny (PGI₂) w efluencie z krążków aorty i w osoczu. Ważnym elementem przedstawionych badań był pomiar stężeń endogenego MNA⁺ i jego metabolitów w zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonka, który pozwolił ustalić optymalną dawkę egzogenego MNA⁺, którą zastosowano w przedstawionych badaniach.

W badaniach *in vitro* posłużyłam się modelem uszkodzenia śródbłonka wywołanego przez pyrogallol w izolowanej aorcie szczura i modelem uszkodzenia śródbłonka wywołanego przez nadtlenuk wodoru w linii komórek śródbłonka EA. hy926. Uszkodzenie czynności

śródbłonka w pierwszym przypadku obserwowane było jako upośledzenie aktywności naczyniorozszerzającej NO, w drugim jako uwolnienie LDH.

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazałam, że zarówno u szczurów, którym wywołano cukrzycę jak i u tych z hipertriglicydemią rozwijała się dysfunkcja śródbłonka w aorcie *ex vivo* (upośledzenie odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od NO wywołanej przez acetylocholinę lub histaminę). W cukrzycy, ale nie w hipertriglicydemii widoczne było również upośledzenie wytwarzania PGI₂ przez ścianę aorty i kompensacyjny wzrost wytwarzania PGI₂ przez ścianę naczyniowa (wzrost stężenia 6-keto-PGF_{1α} w osoczu).

Zarówno w cukrzycy jak i w hipertriglicydemii długotrwałe podawanie MNA⁺ (100 mg/kg *per. os.*) podnosiło poziom endogenego MNA⁺ i jego metabolitów w osoczu oraz przeciwdziało rozwojowi dysfunkcji śródbłonka (upośledzenie zależnego od NO rozkurczu aorty wywołanego przez acetylocholinę i histaminę). Wpływ długotrwałego podawania MNA⁺ na aktywność PGI₂ był odmienny w cukrzycy i w hipertriglicydemii. W cukrzycy terapia MNA⁺ nie odwracała upośledzenia wytwarzania PGI₂ przez ścianę aorty, choć znosiła kompensacyjny wzrost stężenia 6-keto-PGF_{1α} w osoczu. W hipertriglicydemii natomiast podawanie MNA⁺ zdawało się nasilać wytwarzanie PGI₂ przez ścianę naczyń.

MNA⁺ obniżał stężenia trójglicerydów w modelu hipertriglicydemii jednakże efektu tego nie zaobserwowano w modelu cukrzycy. W modelu cukrzycy MNA⁺ wywierał natomiast niewielki wpływ na parametry biochemiczne cukrzycy (obniżał stężenie glukozy, HbA1C, fruktozaminy oraz powodował wzrost stężenia peptydu C).

Zarówno w cukrzycy jak i w hipertriglicydemii działanie śródbłonkowe MNA⁺ było niezależne od jego wpływu na parametry biochemiczne.

W badaniach *in vitro* MNA⁺ w niewielkim stopniu chronił przed uszkodzeniem śródbłonka w modelu uszkodzenia śródbłonka przez pyrogallol i w modelu uszkodzenia śródbłonka przez nadtlenek wodoru.

Podsumowując MNA⁺ był dotychczas uznawany za nieaktywny metabolit nikotynamidu. Przedstawione w tej rozprawie doktorskiej wyniki opisują jego biologiczne działanie w zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonka. Choć nie wyjaśniono mechanizmu działania MNA⁺, przedstawiony w tej pracy profil śródbłonkowego działania tego związku i zdolność do przeciwdziałania upośledzeniu aktywności biologicznej NO budzi nadzieje na możliwość jego wykorzystania w farmakoterapii chorób układu krążenia przebiegających z dysfunkcją śródbłonka.

IX. SUMMERY

Proper endothelial function is an indicator of a healthy circulatory system, whereas endothelial dysfunction plays a key role in pathophysiology of many diseases. Hypercholesterolemia, hypertension, hypertriglyceridemia, diabetes, heart failure and pulmonary hypertension are only a few examples of diseases in which endothelial function is impaired. Pharmacology of endothelium should effectively restore normal endothelial function so that endothelial mechanisms of vascular protection are used to prevent cardiovascular system from development of its pathology.

So far 1-methylnicotinamide (MNA⁺) has been considered to be an inactive endogenous metabolite of nicotinamide produced in liver in the reaction catalyzed by nicotinamide-N-methyltransferase. Since it has been implied that MNA⁺ may have an effect on endothelial function the objective of this PhD study was to characterize MNA⁺ endothelial function in animal models imitating cardiovascular system pathology in humans as well as *in vitro* study. To analyze characteristics of MNA⁺ *in vivo* I used 2 animal models of endothelial dysfunction: a streptozotocin-induced diabetes model and a model of hypertriglyceridemia induced by high-fructose diet. Development of diabetes and hypertriglyceridemia was monitored by a number of biochemical parameters (lipid profile, concentration levels of C-peptide, glucose, HbA1C, fructosamine), and endothelial function was assessed on the basis of nitric oxide (NO)-mediated vasodilation in isolated aortic rings and the level of 6-keto-PGF_{1α}, which is the main metabolite of prostacyclin (PGI₂) in efflux from aortic rings and in plasma.

Measuring of endogenous MNA⁺ and its metabolites concentration in animal endothelial dysfunction models constituted an important element of this research and allowed to determine optimal dose of exogenous MNA⁺ used in the presented study.

I used two models for *in vitro* study: a model of pyrogallol-induced endothelial impairment in isolated aorta of a rat and a model of endothelial impairment induced by hydrogen peroxide in the cell line EA.hy926. In the first model endothelial impairment was observed only as the endothelial impairment of NO-dependent vasodilation function, in the second model as a LDH release.

In the present study I demonstrated that both rats with induced diabetes and those with hypertriglyceridemia developed endothelial dysfunction in aorta *ex vivo* (impaired response of NO – dependent vasodilation induced by acetylcholine or histamine). Only in diabetes but not in hypertriglyceridemia production of PGI₂ by aortic wall was significantly impaired and compensatory increase in PGI₂ production by vascular wall was observed. (increase of 6-keto-PGF_{1α} concentration in plasma).

Both in diabetes and in hypertriglyceridemia prolonged MNA⁺ administration (100 mg/kg *per. os.*) increased the level of endogenous MNA⁺ and its metabolites in plasma. It prevented also endothelial dysfunction development (the endothelium-dependent relaxation dysfunction of aorta induced by acetylcholine and histamine). The effect of prolonged MNA⁺ administration on PGI₂ function varied in diabetes and hypertriglyceridemia. In diabetes MNA⁺ therapy did not reverse the PGI₂ production by aortic wall although it prevented compensatory increase of 6-keto-PGF_{1α} concentration in plasma. In hypertriglyceridemia, on the other hand, MNA⁺ administration seemed to increase PGI₂ production by vascular wall.

MNA⁺ decreased the level of triglycerides concentration in hypertriglyceridemic model; however, this effect was not observed in diabetes model. In diabetes model MNA⁺ had little effect on biochemical parameters of diabetes (it decreased concentration of glucose, HbA1C, fructosamine and caused the increase of C-peptide concentration).

Both in diabetes and in hypertriglyceridemia functioning of endothelial MNA⁺ was independent of its effect on biochemical parameters.

The research showed that *in vitro* MNA⁺ had little effect on preventing endothelial impairment in a model of pyrogallol-induced endothelial impairment and in a model of endothelial impairment induced by hydrogen peroxide.

To conclude, MNA⁺ has been considered so far to be an inactive metabolite of nicotinamide. The results presented in this PhD study describe its biological effect in animal models of endothelial dysfunction. Although the mechanism of MNA⁺ action has not been explained, the profile of endothelial activity of this substance and the ability to prevent biological impairment of NO activity presented in this work may raise hope that it could be used in pharmacotherapy of cardiovascular diseases involving endothelial dysfunction.

X. PIŚMIENICTWO

- [1] Albrink M.J., Man E.B., *Serum triglycerides in coronary artery disease*. *AMA Arch Intern Med* 1959; 103(1):4-8.
- [2] Aoyama K., Matsubara K., Okada K., Fukushima S., Shimizu K., Yamaguchi S., *et al.* *N-methylation ability for azaheterocyclic amines is higher in Parkinson's disease: nicotinamide loading test*. *J Neural Transm* 2000; 107(8-9):985-995.
- [3] Assmann G., Schulte H., *Role of triglycerides in coronary artery disease: lessons from the Prospective Cardiovascular Munster Study*. *Am J Cardiol* 1992; 70(19):10H-13H.
- [4] Austin M.A., Hokanson J.E., Edwards K.L., *Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor*. *Am J Cardiol* 1998; 81(4A):7B-12B.
- [5] Bae J.H., Bassenge E., Kim K.B., Kim Y.N., Kim K.S., Lee H.J., *et al.* *Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress*. *Atherosclerosis* 2001; 155(2):517-523.
- [6] Bae J.H., Schwemmer M., Lee I.K., Lee H.J., Park K.R., Kim K.Y., *et al.* *Postprandial hypertriglyceridemia-induced endothelial dysfunction in healthy subjects is independent of lipid oxidation*. *Int J Cardiol* 2003; 87(2-3):259-267.
- [7] Baker J.R., Metcalf P.A., Holdaway I.M., Johnson R.N., *Serum fructosamine concentration as measure of blood glucose control in type I (insulin dependent) diabetes mellitus*. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 290(6465):352-355.
- [8] Ballinger S.W., Patterson C., Yan C.N., Doan R., Burow D.L., Young C.G., *et al.* *Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells*. *Circ Res* 2000; 86(9):960-966.
- [9] Barlow G.B., Dickerson J.A., Wilkinson A.W., *Plasma biotin levels in children with burns and scalds*. *J Clin Pathol* 1976; 29(1):58-59.
- [10] Bartuś M., Łomnicka M., Lorkowska B., Franczyk M., Kostogryś R.B., Pisulewski P.M., *et al.* *Hypertriglyceridemia but not hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction in the rat*. *Pharmacol Rep* 2005; 57 Suppl:127-137.
- [11] Bassirat M., Khalil Z., *Endothelin and free radicals modulate microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Microvasc Res* 2000; 59(1):88-98.

- [12] Behme M.T., *Nicotinamide and diabetes prevention*. Nutr Rev 1995; 53(5):137-139.
- [13] Benyo Z., Gille A., Bennett C.L., Clausen B.E., Offermanns S., *Nicotinic acid-induced flushing is mediated by activation of epidermal langerhans cells*. Mol Pharmacol 2006; 70(6):1844-1849.
- [14] Benyo Z., Gille A., Kero J., Csiky M., Suchankova M.C., Nusing R.M., *et al*. *GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing*. J Clin Invest 2005; 115(12):3634-3640.
- [15] Bierhaus A., Humpert P.M., Morcos M., Wendt T., Chavakis T., Arnold B., *et al*. *Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products*. J Mol Med 2005; 83(11):876-886.
- [16] Bieron K., Swies J., Kostka-Trabka E., Gryglewski R.J., *Thrombolytic and antiplatelet action of xanthinol nicotinate (Sadamin): possible mechanisms*. J Physiol Pharmacol 1998; 49(2):241-249.
- [17] Bitar M.S., Wahid S, Mustafa S., Al Saleh E., Dhaunsi G.S., Al Mulla F., *Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes*. Eur J Pharmacol 2005; 511(1):53-64.
- [18] Bley K.R., Bhattacharya A., Daniels D.V., Gever J., Jahangir A., O'Yang C., *et al*. *RO1138452 and RO3244794: characterization of structurally distinct, potent and selective IP(prostacyclin)receptor antagonists*. Br J Pharmacol 2006; 147(3):335-345.
- [19] Boehm B.O., Claudi-Boehm S., *The metabolic syndrome*. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2005; 240:3-13.
- [20] Bolli G.B., *Physiological insulin replacement in type 1 diabetes mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109 Suppl 2:S317-S332.
- [21] Bonetti P.O., Lerman L.O., Lerman A., *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(2):168-175.
- [22] Brevetti G., Silvestro A., Di Giacomo S., Bucur R., Di Donato A., Schiano V., *et al*. *Endothelial dysfunction in peripheral arterial disease is related to increase in plasma markers of inflammation and severity of peripheral circulatory impairment but not to classic risk factors and atherosclerotic burden*. J Vasc Surg 2003; 38(2):374-379.
- [23] Brevetti G., Silvestro A., Schiano V., Chiariello M., *Endothelial dysfunction and cardio-vascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index*. Circulation 2003; 108(17):2093-2098.
- [24] Brown W.V., *Different definitions of the metabolic syndrome and risk for recurrent cardiovascular disease*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2006; 2(9):492-493.

- [25] Carlson L.A., *Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review.* J Intern Med 2005; 258(2):94-114.
- [26] Chłopicki S., Swies J., Mogielnicki A., Buczko W., Bartuś M., Łomnicka M., et al. *1-methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts antithrombotic activity mediated by COX-2/PGL₂ pathway.* J.Pharmacol.Exp.Ther. 2007.
- Ref Type: Generic
- [27] Chłopicki S., *Czynność śródbłonna - wyznacznik ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych atherothrombosis.* Kardiologia po Dyplomie 2005; 4(3):75-81.
- [28] Chłopicki S., *Farmakologia śródbłonna w atherothrombosis.* Kardiologia po Dyplomie 2005; 4(7):60-68.
- [29] Coyle C.H., Martinez L.J., Coleman M.C., Spitz D.R., Weintraub N.L., Kader K.N., *Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells.* Free Radic Biol Med 2006; 40(12):2206-2213.
- [30] Creeke P.I., Seal A.J., *Quantitation of the niacin metabolites 1-methylnicotinamide and 1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in random spot urine samples, by ion-pairing re-verse-phase HPLC with UV detection, and the implications for the use of spot urine samples in the assessment of niacin status.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005; 817(2):247-253.
- [31] Csanyi G., Bauer M., Dietl W., Łomnicka M., Stepuro T., Podesser B.K., et al. *Functional alterations in NO, PGI(2) and EDHF pathways in the aortic endothelium after myocardial infarction in rats.* Eur J Heart Fail 2006; 8(8):769-776.
- [32] Daskalopoulou S.S., Athyros V.G., Kolovou G.D., Anagnostopoulou K.K., Mikhailidis D.P., *Definitions of metabolic syndrome: Where are we now?* Curr Vasc Pharmacol 2006; 4(3):185-197.
- [33] Davignon J., Cohn J.S., *Triglycerides: a risk factor for coronary heart disease.* Atherosclerosis 1996; 124 Suppl:S57-S64.
- [34] Delaney J., Hodson M.P., Thakkar H., Connor S.C., Sweatman B.C., Kenny S.P., et al. *Tryptophan-NAD⁺ pathway metabolites as putative biomarkers and predictors of peroxisome proliferation.* Arch Toxicol 2005; 79(4):208-223.
- [35] Dęmbińska-Kiec A., Korbut R., Bieroń K., Kostka-Trębka E., Gryglewski R.J., *Beta-Pyridylcarbinol (Ronicol) releases a prostacyclin-like substance into arterial blood of patients with arteriosclerosis obliterans.* Pharmacol Res Commun 1983; 15(4):377-385.
- [36] FitzGerald G.A., Austin S., Egan K., Cheng Y., Pratico D., *Cyclo-oxygenase products and atherothrombosis.* Ann Med 2000; 32 Suppl 1:21-26.

- [37] Frein D., Schildknecht S., Bachschmid M., Ullrich V., *Redox regulation: a new challenge for pharmacology*. *Biochem Pharmacol* 2005; 70(6):811-823.
- [38] Fukushima T., Kaetsu A., Lim H., Moriyama M., *Possible role of 1-methylnicotinamide in the pathogenesis of Parkinson's disease*. *Exp Toxicol Pathol* 2002; 53(6):469-473.
- [39] Ganji S.H., Kamanna V.S., Kashyap M.L., *Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (review)*. *J Nutr Biochem* 2003; 14(6):298-305.
- [40] Gębicki J., Sysa-Jędrzejowska A., Adamus J., Woźniacka A., Rybak M., Zielonka J. *1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin*. *Pol J Pharmacol* 2003; 55(1):109-112.
- [41] Geiger J., Zou A.P., Campbell W.B., Li P.L., *Inhibition of cADP-ribose formation produces vasodilation in bovine coronary arteries*. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2):397-402.
- [42] Goova M.T., Li J., Kislinger T., Qu W., Lu Y., Bucciarelli L.G., et al. *Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice*. *Am J Pathol* 2001; 159(2):513-525.
- [43] Gotto A.M. Jr., *Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease*. *Am J Cardiol* 1998; 82(9A):22Q-25Q.
- [44] Gotto A.M. Jr., *Triglyceride: the forgotten risk factor*. *Circulation* 1998; 97(11):1027-1028.
- [45] Griendling K.K., FitzGerald G.A., *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS*. *Circulation* 2003; 108(16):1912-1916.
- [46] Griendling K.K., FitzGerald G.A., *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies*. *Circulation* 2003; 108(17):2034-2040.
- [47] Grodzińska L., Basista M., Byrska-Danek A., Kostka-Trąbka E., *Nicotinyl in the treatment of arteriosclerosis obliterans of the lower limbs*. *Pol Tyg Lek* 1984; 39(25-26):879-881.
- [48] Grodzińska L., Basista M., Kędzior A., Korbut R., Kostka-Trąbka E., Gryglewski R., *Fibrinolytic activity and the effects of beta-pyridylcarbinol (Ronicol) in patients with arteriosclerosis obliterans*. *Thromb Haemost* 1983; 50(4):797-799.
- [49] Gryglewski R.J., *The lung as a generator of prostacyclin*. *Ciba Found Symp* 1980; 78:147-164.
- [50] Gryglewski R.J., Chłopicki S., Uracz W., Marcinkiewicz E. *Significance of endothelial prostacyclin and nitric oxide in peripheral and pulmonary circulation*. *Med Sci Monit* 2001; 7(1):1-16.

- [51] Gryglewski R.J., Splawiński J., Korbut R., *Endogenous mechanisms that regulate prostacyclin release*. Adv Prostaglandin Thromboxane Res 1980; 7:777-787.
- [52] Guzik T.J., Mussa S., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R., *et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase*. Circulation 2002; 105(14):1656-1662.
- [53] Haj-Yehia AI, Nassar T, Assaf P, Nassar H, Anggard EE. *Effects of the superoxide dismutase-mimic compound TEMPOL on oxidant stress-mediated endothelial dysfunction*. Antioxid Redox Signal 1999; 1(2):221-232.
- [54] Hegyi J., Schwartz R.A., Hegyi V., *Pellagra: dermatitis, dementia, and diarrhea*. Int J Dermatol 2004; 43(1):1-5.
- [55] Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K., Meinertz T., Munzel T., *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. Circulation 2001; 104(22):2673-2678.
- [56] Hendricks W.M., *Pellagra and pellagralike dermatoses: etiology, differential diagnosis, dermatopathology, and treatment*. Semin Dermatol 1991; 10(4):282-292.
- [57] Hink U., Li H., Mollnau H., Oelze M., Matheis E., Hartmann M., *et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Circ Res 2001; 88(2):E14- E22.
- [58] Huang A., Sun D., Smith C.J., Connetta J.A., Shesely E.G., Koller A., *et al. In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 278(3):H762-H768.
- [59] Hyndman M.E., Verma S., Rosenfeld R.J., Anderson T.J., Parsons H.G., *Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282(6):H2167-H2172.
- [60] Ishikawa Y., *Niacin deficiency disease(pellagra)*. Ryoikibetsu Shokogun Shirizu 2000; (29 Pt 4):91-93.
- [61] Itoh Y., Ma F.H., Hoshi H., Oka M., Noda K., Ukai Y., *et al. Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry*. Anal Biochem 2000; 287(2):203-209.
- [62] Jonkers I.J., van de Ree M.A., Smelt A.H., de Man F.H., Jansen H., Meinders A.E., *et al. Insulin resistance but not hypertriglyceridemia per se is associated with endothelial dysfunction in chronic hypertriglyceridemia*. Cardiovasc Res 2002; 53(2):496-501.

- [63] Kalmar T., Seres I., Balogh Z., Kaplar M., Winkler G., Paragh G., *Correlation between the activities of lipoprotein lipase and paraoxonase in type 2 diabetes mellitus*. *Diabetes Metab* 2005; 31(6):574-580.
- [64] Kashiwagi A., Shinozaki K., Nishio Y., Maegawa H., Maeno Y., Kanazawa A., *et al.* *Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats*. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1):E976-E983.
- [65] Katakam P.V., Pollock J.S., Pollock D.M., Ujhelyi M.R., Miller A.W., *Enhanced endothelin-1 response and receptor expression in small mesenteric arteries of insulin-resistant rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(2):H522-H527.
- [66] Katakam P.V., Ujhelyi M.R., Hoenig M.E., Miller A.W., *Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance*. *Am J Physiol* 1998; 275 (3 Pt 2):R788-R792.
- [67] Kiuchi K., Yoshizawa K., Shikata N., Matsumura M., Tsubura A., *Nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats and C57BL mice*. *Exp Eye Res* 2002; 74(3):383-392.
- [68] Klaidman L., Morales M., Kem S., Yang J., Chang M.L., Adams J.D. Jr., *Nicotinamide offers multiple protective mechanisms in stroke as a precursor for NAD⁺, as a PARP inhibitor and by partial restoration of mitochondrial function*. *Pharmacology* 2003; 69(3):150-157.
- [69] Knowles H.J., te Poele R.H., Workman P., Harris A.L., *Niacin induces PPAR γ expression and transcriptional activation in macrophages via HM74 and HM74a-mediated induction of prostaglandin synthesis pathways*. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(5):646-656.
- [70] Kusterer K., Pohl T., Fortmeyer H.P., Marz W., Scharnagl H., Oldenburg A., *et al.* *Chronic selective hypertriglyceridemia impairs endothelium-dependent vasodilation in rats*. *Cardiovasc Res* 1999; 42(3):783-793.
- [71] Laight D.W., Carrier M.J., Anggard E.E., *Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction*. *Cardiovasc Res* 2000; 47(3):457-464.
- [72] Laight D.W., Desai K.M., Anggard E.E., Carrier M.J., *Endothelial dysfunction accompanies a pro-oxidant, pro-diabetic challenge in the insulin resistant, obese Zucker rat in vivo*. *Eur J Pharmacol* 2000; 402(1-2):95-99.
- [73] Li J.M., Shah A.M., *Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287(5):R1014-R1030.

- [74] Lopez B.L., Christopher T.A., Yue T.L., Ruffolo R., Feuerstein G.Z., Ma X.L., *Carvedilol, a new beta-adrenoreceptor blocker antihypertensive drug, protects against free-radical-induced endothelial dysfunction*. Pharmacology 1995; 51(3):165-173.
- [75] Lorkowska B., Bartuś M., Franczyk M., Kostogryś R.B., Jawień J., Pisulewski P.M., *et al. Hypercholesterolemia does not alter endothelial function in spontaneously hypertensive rats*. J Pharmacol Exp Ther 2006; 317(3):1019-1026.
- [76] Maiese K., Chong Z.Z., *Nicotinamide: necessary nutrient emerges as a novel cytoprotectant for the brain*. Trends Pharmacol Sci 2003; 24(5):228-232.
- [77] Maiza A., Daley-Yates P.T., *Estimation of the renal clearance of drugs using endogenous N-1-methylnicotinamide*. Toxicol Lett 1990; 53(1-2):231-235.
- [78] Malhotra A., Reich D., Reich D., Nakouzi A., Sanghi V., Geenen D.L., *et al. Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase C epsilon and phosphorylation of troponin I in the heart, which are prevented by angiotensin II receptor blockade*. Circ Res 1997; 81(6):1027-1033.
- [79] Maxwell A.J., *Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases*. Nitric Oxide 2002; 6(2):101-124.
- [80] McCarty M.F., *Does postprandial storage of triglycerides in endothelial cells contribute to the endothelial dysfunction associated with insulin resistance and fatty diets?* Med Hypotheses 2003; 61(2):167-172.
- [81] McKenney J.M., McCormick L.S., Weiss S., Koren M., Kafonek S., Black D.M., *A randomized trial of the effects of atorvastatin and niacin in patients with combined hyperlipidemia or isolated hypertriglyceridemia*. Collaborative Atorvastatin Study Group. Am J Med 1998; 104(2):137-143.
- [82] Melo S.S., Arantes M.R., Meirelles M.S., Jordao A.A. Jr., Vannucchi H., *Lipid peroxidation in nicotinamide-deficient and nicotinamide-supplemented rats with streptozotocin-induced diabetes*. Acta Diabetol 2000; 37(1):33-39.
- [83] Miatello R., Risler N., Gonzalez S., Castro C., Ruttler M., Cruzado M., *Effects of enalapril on the vascular wall in an experimental model of syndrome X*. Am J Hypertens 2002; 15(10 Pt 1):872-878.
- [84] Mori S., Takemoto M., Yokote K., Asaumi S., Saito Y., *Hyperglycemia-induced alteration of vascular smooth muscle phenotype*. J Diabetes Complications 2002; 16(1): 65-68.
- [85] Musfeld C., Biollaz J., Belaz N., Kesselring U.W., Decosterd L.A., *Validation of an HPLC method for the determination of urinary and plasma levels of N1-*

- methylnicotinamide, an endogenous marker of renal cationic transport and plasma flow.* J Pharm Biomed Anal 2001; 24(3):391-404.
- [86] Naseem K.M., *The role of nitric oxide in cardiovascular diseases.* Mol Aspects Med 2005; 26(1-2):33-65.
- [87] Nasser K., Daley-Yates P.T., *A comparison of N-1-methylnicotinamide clearance with 5 other markers of renal function in models of acute and chronic renal failure.* Toxicol Lett 1990; 53(1-2):243-245.
- [88] Nishikawa Y., Stepp D.W., Chilian W.M., *Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279(2):H459-H465.
- [89] Offermanns S., *The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target.* Trends Pharmacol Sci 2006; 27(7):384-390.
- [90] Orlando R., Floreani M., Napoli E., Padrini R., Palatini P., *Renal clearance of N(1)-methylnicotinamide: a sensitive marker of the severity of liver dysfunction in cirrhosis.* Nephron 2000; 84(1):32-39.
- [91] Oyama Y., Kawasaki H., Hattori Y., Kanno M., *Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats.* Eur J Pharmacol 1986; 132(1):75-78.
- [92] Ozturk Y., Altan V.M., Ozcelikay A.T., Yildizoglu-Ari N., *Beneficial effect of insulin on the decreased gastrointestinal beta-adrenergic responses in streptozotocin-diabetic rats: a contributing role of protein biosynthesis.* Arch Int Pharmacodyn Ther 1992; 317:81-92.
- [93] Ozyazgan S., Unlucerci Y., Bekpinar S., Akkan A.G., *Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment.* Int J Exp Diabetes Res 2000; 1(2):145-153.
- [94] Parsons R.B., Smith M.L., Williams A.C., Waring R.H., Ramsden D.B., *Expression of nicotinamide N-methyltransferase (E.C. 2.1.1.1) in the Parkinsonian brain.* J Neuropathol Exp Neurol 2002; 61(2):111-124.
- [95] Pieper G.M., Langenstroer P., Siebeneich W., *Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals.* Cardiovasc Res 1997; 34(1):145-156.
- [96] Pieper G.M., Meier D.A., Hager S.R., *Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia.* Am J Physiol 1995; 269(3 Pt 2):H845-H850.
- [97] Pike N.B., *Flushing out the role of GPR109A (HM74A) in the clinical efficacy of nicotinic acid.* J Clin Invest 2005; 115(12):3400-3403.
- [98] Poredos P., *Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis.* Int Angiol 2002; 21(2):109-116.

- [99] Pumpo R., Sarnelli G., Spinella A., Budillon G., Cuomo R., *The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production*. Am J Gastroenterol 2001; 96(4):1183-1187.
- [100] Puyo A.M., Mayer M.A., Cavallero S., Donoso A.S., Peredo H.A., *Fructose overload modifies vascular morphology and prostaglandin production in rats*. Auton Autacoid Pharmacol 2004; 24(2):29-35.
- [101] Rao V.S., Santos F.A., Silva R.M., Teixeira M.G., *Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats*. Vascul Pharmacol 2002; 38(3):127-130.
- [102] Reddy S., Salari-Lak N., Sandler S., *Long-term effects of nicotinamide-induced inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase activity in rat pancreatic islets exposed to interleukin-1 beta*. Endocrinology 1995; 136(5):1907-1912.
- [103] Ringeissen S., Connor S.C., Brown H.R., Sweatman B.C., Hodson M.P., Kenny S.P., et al. *Potential urinary and plasma biomarkers of peroxisome proliferation in the rat: identification of N-methylnicotinamide and N-methyl-4-pyridone-3-carboxamide by ¹H nuclear magnetic resonance and high performance liquid chromatography*. Biomarkers 2003; 8(3-4):240-271.
- [104] Rodriguez-Manas L., Angulo J., Peiro C., Llergo J.L., Sanchez-Ferrer A., Lopez-Doriga P., et al. *Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats*. Br J Pharmacol 1998; 123(8):1495-1502.
- [105] Rosenson R.S. *Antiatherothrombotic effects of nicotinic acid*. Atherosclerosis 2003; 171(1):87-96.
- [106] Sano A., Endo N., Takitani S., *Fluorometric assay of rat brain N-methyltransferase with 4-methylnicotinamide*. Biol Pharm Bull 1993; 16(3):304-306.
- [107] Schmidt A.M., Hori O., Cao R., Yan S.D., Brett J., Wautier J.L., et al. *RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products*. Diabetes 1996; 45 Suppl 3:S77-S80.
- [108] Shinozaki K., Kashiwagi A., Masada M., Okamura T., *Molecular mechanisms of impaired endothelial function associated with insulin resistance*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 2004; 4(1):1-11.
- [109] Shinozaki K., Kashiwagi A., Nishio Y., Okamura T., Yoshida Y., Masada M., et al. *Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂- imbalance in insulin-resistant rat aorta*. Diabetes 1999; 48(12):2437-2445.

- [110] Shoji T., Koyama H., Morioka T., Tanaka S., Kizu A., Motoyama K., *et al.* Receptor for advanced glycation end products is involved in impaired angiogenic response in diabetes. *Diabetes* 2006; 55(8):2245-2255.
- [111] Słominska E.M., Adamski P., Lipiński M., Świerczynski J., Smoleński R.T., *Liquid chromatographic/mass spectrometric procedure for measurement of nad catabolites in human and rat plasma and urine.* *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2006; 25(9-11):1245-1249.
- [112] Sprecher D.L., *Raising high-density lipoprotein cholesterol with niacin and fibrates: a comparative review.* *Am J Cardiol* 2000; 86(12A):46L-50L.
- [113] Stevens M.J., Li F., Drel V.R., Abatan O.I., Kim H., Burnett D., *et al.* Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320(1):458-464.
- [114] Stratford M.R., Dennis M.F., *High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide and its metabolites in human and murine plasma and urine.* *J Chromatogr* 1992; 582(1-2):145-151.
- [115] Taskinen M.R., *Lipoprotein lipase in diabetes.* *Diabetes Metab Rev* 1987; 3(2):551-570.
- [116] Taskinen M.R., Kuusi T., *Enzymes involved in triglyceride hydrolysis.* *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1987; 1(3):639-666.
- [117] Tesfamariam B., Cohen R.A., *Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose.* *Am J Physiol* 1992; 263(2 Pt 2):H321-H326.
- [118] Ulker S., McMaster D., McKeown P.P., Bayraktutan U., *Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation.* *Cardiovasc Res* 2003; 59(2):488-500.
- [119] Verma S., Bhanot S., Yao L., McNeill J.H., *Vascular insulin resistance in fructose-hypertensive rats.* *Eur J Pharmacol* 1997; 322(2-3):R1-R2.
- [120] Verma S., Skarsgard P., Bhanot S., Yao L., Laher I., McNeill J.H., *Reactivity of mesenteric arteries from fructose hypertensive rats to endothelin-1.* *Am J Hypertens* 1997; 10(9 Pt 1):1010-1019.
- [121] Vita J.A., Keaney J.F. Jr., *Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?* *Circulation* 2002; 106(6):640-642.
- [122] Wei M., Ong L., Smith M.T., Ross F.B., Schmid K., Hoey A.J., *et al.* The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung Circ* 2003; 12(1):44-50.

- [123] Werns S.W., Walton J.A., Hsia H.H., Nabel E.G., Sanz M.L., Pitt B., *Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease*. *Circulation* 1989; 79(2):287-291.
- [124] Wise A., Foord S.M., Fraser N.J., Barnes A.A., Elshourbagy N., Eilert M., *et al. Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid*. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9869-9874.
- [125] Woźniacka A., Wieczorkowska M., Gębicki J., Sysa-Jędrzejowska A., *Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot study*. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30(6):632-635.
- [126] Yang J., Klaidman L.K., Adams J.D., *Medicinal chemistry of nicotinamide in the treatment of ischemia and reperfusion*. *Mini Rev Med Chem* 2002; 2(2):125-134.
- [127] Zurova-Nedelceva J., Navarova J., Drabikova K., Jancinova V., Petrikova M., Bernatova I., *et al. Participation of reactive oxygen species in diabetes-induced endothelial dysfunction*. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27 Suppl 2:168-171.