



Katarzyna Grużewska

Rozprawa doktorska pt.:

**Rola związków wanadu w regulacji funkcji płytek krwi u pacjentów z  
cukrzycą**

Praca wykonana w  
Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

*dr hab. n. med. Hanna Bielarczyk prof. nadzw.*

Opiekun naukowy:

*dr n. med. Anna Michno*

Kierownik Zakładu Medycyny Laboratoryjnej:

*dr hab. n. med. Hanna Bielarczyk prof. nadzw.*

Kierownik Katedry Biochemii Klinicznej:

*prof. dr hab. n. med. Tadeusz Pawełczyk*

Praca została wykonana z funduszy projektów GUMed (MN 001-0116/08, S-57)

Gdańsk 2018

*Składam serdeczne podziękowania Mojemu Promotorowi  
Pani Profesor Hannie Bielarczyk  
za cierpliwość, cenne wskazówki i wyrozumiałość  
przy wykonywaniu i redagowaniu niniejszej pracy.*



*Składam również serdeczne podziękowania Mojemu Opiekunowi naukowemu  
Pani dr n. med. Annie Michno  
za poświęcony czas i wszystkie wskazówki metodyczne  
i merytoryczne, jak również za okazaną pomoc  
przy wykonywaniu i redagowaniu niniejszej pracy.*



*Dziękuję zespołowi Zakładu Medycyny Laboratoryjnej  
oraz Zakładu Medycyny Molekularnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
za pomoc i życzliwą atmosferę  
w trakcie wykonywania niniejszej rozprawy doktorskiej.*



*Dziękuję Zespołowi Flebotomistów  
Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.*



*Szczególne podziękowania składam mojej Rodzinie i Przyjaciołom za wsparcie,  
wyrozumiałość oraz motywację.*

*Niniejszą pracę dedykuję mojej Rodzinie...*

## SPIS TREŚCI

WYKAZ RYCIN, REAKCJI METABOLICZNYCH I TABEL UMIESZCZONYCH W TEKŚCIE.....	7
OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	10
1. STRESZCZENIE.....	13
2. ABSTRACT .....	15
1.1. Płytki krwi .....	17
1.1.1. Morfologia krwinek płytkowych.....	17
1.1.2. Receptory krwinek płytkowych.....	19
1.1.3. Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa krwinek płytkowych .....	22
1.2. Wpływ cukrzycy na metabolizm płytek krwi.....	25
1.3. Właściwości związków wanadu .....	28
1.3.1. Rola związków wanadu w cukrzycy .....	29
2. MATERIAŁY I METODY .....	34
2.1. Grupy doświadczalne .....	34
2.1.1. Kozuchy leukocytno-płytkowe.....	34
2.1.2. Pacjenci chorzy na cukrzycę oraz osoby zdrowe .....	34
2.2. Odczynniki i materiały zużywalne .....	35
2.2.1. Odczynniki.....	35
2.2.2. Materiały zużywalne.....	37
2.3. Aparatura .....	37
2.4. Izolacja krwinek płytkowych.....	38
2.4.1. Izolacja płytek krwi z kożuszków leukocytno-płytkowych (Michno, 2004) 38	
2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych ..	39
2.4.3. Weryfikacja procedury izolacji krwinek płytkowych .....	39
2.4.4. Porównanie funkcji płytek krwi pochodzących z kożuszków leukocytno-płytkowych i krwi pełnej .....	40
2.5. Ocena parametrów laboratoryjnych.....	41
2.5.1. Pomiar fruktozaminy .....	42
2.6. Oznaczanie glutationu całkowitego i zredukowanego (Akerboom i wsp. 1981).....	42
2.7. Adhezja płytek krwi (Roberts, 2009) .....	43
2.8. Zmiana kształtu płytek krwi z zastosowaniem techniki fluorescencyjnej.....	44
2.9. Tworzenie agregatów płytek krwi (Roberts, 2009).....	45
2.10. Wpływ związków wanadu na aktywność fosfatazy kwaśnej .....	45
2.11. Tworzenie agregatów płytek krwi z zastosowaniem techniki fluorescencyjnej ....	47
2.12. Agregacja krwinek płytkowych (Born, 1962) .....	47

2.13.	Oznaczanie ATP (Gorman i wsp. 2003) .....	48
2.14.	Oznaczanie zawartości tromboksanu A <sub>2</sub> (TXA <sub>2</sub> ) metodą ELISA .....	49
2.15.	Oznaczanie poziomu cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu (cAMP) metodą ELISA .....	49
2.16.	Półilościowe oznaczanie ekspresji białek regulujących funkcje płytek krwi metodą Western Blot (WB) .....	50
2.17.	Reaktywne związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (Panse i wsp., 1985) .....	51
2.18.	Białko całkowite (Bradford, 1976) .....	52
2.19.	Oznaczanie aktywności enzymów krwinek płytkowych .....	52
2.19.1.	Heksokinaza (6-fosfotransferaza ATP-D-heksoza) [EC 2.7.1.1] (Skibowska, 2003) .....	52
2.19.2.	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa GPDH [EC 1.1.1.49] (Glock i McLean, 1953).....	53
2.19.3.	Akonitaza [EC 4.2.1.3] (De Villafranca i Haines, 1974) .....	53
2.19.4.	Dehydrogenaza izocytrynianowa IDH [EC 1.1.1.42] (Plaut and Aogaichi, 1968) .....	54
2.19.5.	Dehydrogenaza mleczanowa LDH [EC 1.1.1.27] (Koh and Choi,1987) .....	55
2.20.	Dehydrogenaza bursztynianowa SDH [EC 1.3.5.1] (Wang, 2001) .....	55
2.21.	Metody statystyczne.....	56
3.	CEL PRACY .....	57
4.	WYNIKI.....	58
4.1.	Charakterystyka parametrów demograficznych i metabolicznych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą .....	58
4.2.	Korelacja pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu, a agregacją płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą .....	61
4.3.	Toksyczność i wpływ związków wanadu na integralność błon płytek krwi .....	62
4.4.	Wpływ związków wanadu na funkcje płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą .....	64
4.4.1.	Wpływ związków wanadu na adhezję krwinek płytkowych na powierzchni kolagenu i fibrynogenu u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2.....	64
4.4.2.	Wpływ związków wanadu na pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych kolagenem i fibrynogenem u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2 .....	66
4.4.3.	Wpływ związków wanadu na tworzenie agregatów krwinek płytkowych na powierzchni kolagenu i fibrynogenu u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą .....	70
4.4.4.	Wpływ związków wanadu na agregację krwinek płytkowych indukowaną trombiną u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2.....	74
4.5.	Wpływ związków wanadu na wydzielanie ATP w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2 .....	76

4.5.1.	Wpływ związków wanadu na wydzielanie TXA <sub>2</sub> w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	77
4.5.2.	Wpływ związków wanadu na wydzielanie cAMP w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	79
4.6.	Wpływ związków wanadu na szlaki przekazywania sygnału w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2 .....	80
4.6.1.	Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależne od kinazy białkowej A (PKA) i cAMP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	80
4.6.2.	Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależne od PKB w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2.....	82
4.6.3.	Wpływ związków wanadu na mechanizm przekazywania sygnału zależny od RhoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	84
4.6.4.	Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależny od MLC w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	86
4.6.5.	Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależne od białka VASP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2	88
4.7.	Wpływ związków wanadu na akumulację TBARS w płytkach krwi u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	90
4.8.	Wpływ związków wanadu na aktywność enzymów metabolizmu glukozy w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą .....	92
5.	DYSKUSJA.....	96
5.1.	Charakterystyka modelu doświadczalnego .....	96
5.1.1.	Charakterystyka parametrów metabolicznych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą .....	96
5.2.	Wpływ cukrzycy na funkcje płytek krwi.....	98
5.3.	Wpływ cukrzycy na produkcję tromboksanu A <sub>2</sub> i TBARS w płytkach krwi.....	100
5.4.	Wpływ cukrzycy na metabolizm glukozy w płytkach krwi .....	100
5.5.	Wpływ związków wanadu na metabolizm i funkcje płytek krwi w cukrzycy typu 2	102
5.5.1.	Weryfikacją zakresu stężeń i toksyczności związków wanadu .....	102
5.5.2.	Wpływ związków wanadu na funkcje płytek krwi pacjentów z cukrzycą .....	103
5.5.3.	Wpływ związków wanadu na wydzielanie ATP z płytek pacjentów z cukrzycą	105
5.5.4.	Wpływ związków wanadu na produkcję tromboksanu A <sub>2</sub> i TBARS w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą.....	106
5.5.5.	Wpływ związków wanadu na przekazywanie sygnału zależnego od wewnątrzpłytkowego cAMP u pacjentów z cukrzycą .....	107
5.6.	Wpływ związków wanadu na aktywność enzymów metabolizmu glukozy w płytkach krwi u pacjentów z cukrzycą.....	107
6.	WNIOSKI.....	110
7.	BIBLIOGRAFIA .....	112

RYCINY:

Rycina 1.	Wpływ związków wanadu na sygnalizację krwinek płytkowych.....	31
Rycina 2.	Wpływ związków wanadu na aktywność fosfatazy kwaśnej krwinek płytkowych.....	46
Rycina 3.	Dystrybucja stężenia Hb <sub>1c</sub> we krwi (A) i fruktozaminy w osoczu (B) osób zdrowych i pacjentów chorych na cukrzycę .....	60
Rycina 4.	Korelacja pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu, a agregacją krwinek płytkowych.....	61
Rycina 5.	Toksyczność i wpływ związków wanadu na integralność błon płytek krwi.....	63
Rycina 6.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na adhezję krwinek płytkowych na powierzchni kolagenu (5 µg/ml) i fibrynogenu (250 µg/ml).....	65
Rycina 7.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych kolagenem (5µg/ml).....	67
Rycina 8.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych fibrynogenu (250 µg/ml).....	69
Rycina 9.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na tworzenie agregatów płytkowych na powierzchni kolagenu (5 µg/ml).....	71
Rycina 10.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na tworzenie agregatów krwinek płytkowych na powierzchni fibrynogenu (250 µg/ml).....	73
Rycina 11.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na agregację krwinek płytkowych aktywowanych trombiną, w 2 minucie – A i w 12 minucie – B.....	75
Rycina 12.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na wydzielanie ATP w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	76
Rycina 13.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na produkcję TXA <sub>2</sub> w płytkach krwi u pacjentów z cukrzycą.....	78
Rycina 14.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na produkcję cAMP w płytkach krwi u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	79
Rycina 15.	Wpływ związków wanadu na fosforylację białka PKAc w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	81
Rycina 16.	Wpływ związków wanadu na fosforylację białka PKB-Ser <sup>473</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	83
Rycina 17.	Wpływ związków wanadu na fosforylację białka RhoA-Ser <sup>188</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	85

Rycina 18.	Wpływ związków wanadu na fosforylację białka MLC-Ser <sup>20</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	87
Rycina 19.	Wpływ związków wanadu na fosforylację białka VASP-Ser <sup>157</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	89
Rycina 20.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na akumulację TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	91

TABELE:

Tabela 1.	Skład zawiesiny krwinek płytkowych otrzymanych metodą wirowań różnicowych w kożuszkach leukocyarno-płytkowych i krwi pełnej.....	40
Tabela 2.	Porównanie agregacji płytek krwi izolowanych z kożuszków leukocyarno-płytkowych i pełnej krwi.....	41
Tabela 3.	Parametry demograficzne i laboratoryjne gospodarki węglowodanowej i lipidowej osób zdrowych i pacjentów chorych na cukrzycę typu 2.....	59
Tabela 4.	Wpływ związków wanadu BMOV i VCl <sub>3</sub> na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego aktywowanych krwinek płytkowych u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	93



## REAKCJE METABOLICZNE:

Reakcja 1.	Schemat reakcji, katalizowanej przez reduktazę glutationową.....	43
Reakcja 2.	Schemat reakcji, katalizowanej przez lucyferazę i jony magnezu.....	48
Reakcja 3.	Schemat reakcji, katalizowanej przez acetylocholinoesterazę.....	50
Reakcja 4.	Schemat reakcji, katalizowanej przez heksokinazę.....	53
Reakcja 5.	Schemat reakcji, katalizowanej przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową.....	53
Reakcja 6.	Schemat reakcji, katalizowanej przez akonitazę.....	54
Reakcja 7.	Schemat reakcji, katalizowanej przez dehydrogenazę izocytrynianową.....	54
Reakcja 8.	Schemat reakcji, katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową.....	55
Reakcja 9.	Schemat reakcji, katalizowanej przez dehydrogenazę bursztynianową.....	55

## SUPLEMENTY:

Suplement 1.	Cele wyrównania gospodarki węglowodanowo-lipidowej u pacjentów chorych na cukrzycę.....	111
--------------	---	-----

## OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

ADP	adenozynodifosforan
ATP	adenozynotrifosforan
BFOV	bis(alfa-furankarboksylato)oksowanad
BMOV	bis(maltolato)oksowanadan (IV)
cAMP	cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan
DAG	diacyloglicerol
GDP	guanozy-5'-difosforan
GLUT	transporter glukozy
GPCR	receptory sprzężone z białkami G
G-6-PDH	dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa
GSH	glutation zredukowany
GSK3	syntaza glikogenu 3
GTP	guanozy-5'-trifosforan
HbA <sub>1c</sub>	hemoglobina glikowana
HDL	frakcja cholesterolu o wysokiej gęstości
HMWK	kininogen wielkocząsteczkowy
IC	kwasy izocytrynianowe
IDH	dehydrogenaza izocytrynianowa
IP <sub>3</sub>	trifosforan inozytolu
IRS	receptor insuliny
LDH	dehydrogenaza mleczanowa
LDL	frakcja cholesterolu o niskiej gęstości
LPS	lipopolisacharyd
MAPK	kinaza aktywowana mitogenem
MDA	dialdehyd malonowy
MLC	łańcuchy lekkie miozyny
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	ortowanadan sodu
NADH	zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADP	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NADPH	zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

NaVO <sub>4</sub>	metawanadan sodu
OCS	system kanalików otwartych
P2X <sub>1</sub>	receptor purynowy dla ATP
P2Y <sub>1</sub> / P2Y <sub>12</sub>	receptor purynergiczny dla ADP
PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu
PAR	receptor aktywowany przez proteazy
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu
PF4	czynnik płytkowy 4
PI3K	kinaza-3 fosfatydyloinozytolu
PIP <sub>2</sub>	fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PKA	kinaza białkowa A
PKB/Akt	kinaza białkowa B
PKC	kinaza białkowa C
PLC	fosfolipaza C
PLT	liczba płytek krwi
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne
PTPN20B	białkowa fosfataza tyrozynowa, typu niereceptorowego 20
RBC	liczba krwinek czerwone
RhoA	białko z nadrodziny białek Ras
ROCK	kinaza związana z białkiem Rho
ROS	reaktywne formy tlenu
TBARS	związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym
TF	czynnik tkankowy
TLR	receptory Toll-podobne
TNF	czynniki martwicy guza
TP	receptor dla tromboksanu
TRPC	kanały jonowe indukowane napięciem
TXA <sub>2</sub>	tromboksan A <sub>2</sub>
VASP	białko biorące udział w wydłużaniu filamentów aktynowych
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
VLDL	frakcja cholesterolu o bardzo niskiej gęstości
VO <sup>2+</sup>	jony wanadylu (IV)
VO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	jony ortowanadanu (V)

VOSO <sub>4</sub>	siarczan wanadylu
vWF	czynnik von Willebranda
WBC	liczba krwinek białych
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia
β-TG	β tromboglobulina

## 1. STRESZCZENIE

Związki wanadu, stosowane w badaniach klinicznych u pacjentów z cukrzycą, wykazują właściwości insulinomimetyczne i przeciwzakrzepowe, jednakże ich wpływ na aktywność płytek krwi wciąż jest niewyjaśniony. W przedstawionej rozprawie weryfikowano hipotezę, że organiczny bismaltolatoosowanad (BMOV) (0,50 mM) i nieorganiczny chlorek wanadu ( $VCl_3$ ) (0,50 mM) mogą odgrywać istotną rolę w regulacji metabolizmu i funkcji płytek krwi, a także, czy wykazują podobne właściwości w płytkach krwi, izolowanych od osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2.

Stężenie glukozy w osoczu pacjentów z cukrzycą typu 2 było wyższe o 51%, stężenie  $HbA_{1c}$  przekroczyło cel ogólny o 31%, a stężenie fruktozaminy było wyższe o 112%, względem osób zdrowych. Przewlekła hiperglikemia w cukrzycy typu 2 powodowała wzrost aktywności płytkowej heksokinazy, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oraz akonitazy, odpowiednio o 52%, 22% i 28%. Równocześnie, nie obserwowano zmian w produkcji  $TXA_2$ , natomiast obserwowano spadek uwalniania cAMP o 29% w aktywowanych trombiną płytkach pacjentów z cukrzycą. Jednocześnie, nie obserwowano wpływu hiperglikemii na adhezję i kształt krwinek płytkowych (ang. spreading), aktywowanych kolagenem lub fibrynogenem. Natomiast aktywowana trombiną agregacja płytek krwi pacjentów z cukrzycą była wyższa o 20% ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do osób zdrowych.

BMOV hamował aktywność heksokinazy, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, akonitazy i dehydrogenazy izocytrynianowej, zarówno w płytkach osób zdrowych oraz w płytkach pacjentów z cukrzycą.

Jednocześnie u osób zdrowych BMOV zmniejszał adhezję, pole powierzchni krwinek płytkowych oraz tworzenie agregatów płytkowych o odpowiednio 93%, 76% i 96% na powierzchni kolagenu i odpowiednio o 89%, 58% i 92% na powierzchni fibrynogenu. BMOV podobnie wpływał na adhezję, pole powierzchni płytek oraz tworzenie agregatów płytkowych u pacjentów z cukrzycą. Natomiast związek ten redukował agregację płytek krwi indukowaną trombiną o 67% ( $p < 0,005$ ), jedynie u pacjentów z cukrzycą.

Jednocześnie,  $VCl_3$  nie redukował adhezji i pola powierzchni płytek krwi osób zdrowych, aktywowanych kolagenem bądź fibrynogenem. Jednak,  $VCl_3$  nasilił adhezję, zarówno na powierzchni kolagenu jak i fibrynogenu, odpowiednio o 55% i 90% płytek izolowanych od pacjentów z cukrzycą.  $VCl_3$  redukował agregację płytek krwi, indukowaną trombiną o 21% ( $p < 0,05$ ), jedynie u pacjentów z cukrzycą.

Zarówno BMOV jak i  $VCl_3$  hamowały wydzielanie ATP z aktywowanych płytek krwi osób zdrowych, odpowiednio o 88% i 67%. Podobne działanie związków wanadu obserwowano w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą.

BMOV nasilił produkcję  $TXA_2$  o 118% w płytkach pacjentów z cukrzycą. Natomiast po zastosowaniu  $VCl_3$  obserwowano cztero- i trzykrotny wzrost akumulacji  $TXA_2$ , odpowiednio w płytkach osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

Pomimo braku wpływu BMOV na poziom cAMP obserwowano, że związek ten zwiększał fosforylację białka VASP-Ser<sup>157</sup> w aktywowanych trombiną płytkach krwi osób zdrowych o 28%, a w cukrzycy dwukrotnie. Zaś  $VCl_3$  nasilał fosforylację białka VASP-Ser<sup>157</sup> jedynie w płytkach osób zdrowych o 76%.

BMOV silniej redukował agregację płytek krwi oraz zwiększał produkcję  $TXA_2$  i aktywację płytkowej sygnalizacji zależnej do cAMP u pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych. Może to świadczyć o tym, że w warunkach hiperglikemii, przeciwplatekcyjne właściwości BMOV polegają na hamowaniu produkcji lipidowych czynników aktywacji płytek krwi i nasilenia utylizacji cAMP. Natomiast  $VCl_3$  nasilał adhezję krwinek płytkowych, co sugeruje proaktywacyjne właściwości nieorganicznego związku wanadu we wstępnym etapie aktywacji płytek krwi. Nasilenie produkcji  $TXA_2$  w aktywowanych płytkach krwi po zastosowaniu  $VCl_3$ , przy jednoczesnej redukcji agregacji płytek krwi, wymaga dalszych weryfikacji w celu pełnego wyjaśnienia bezpieczeństwa stosowania nieorganicznych związków wanadu, zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą.

Przedstawiona praca dostarczyła nowych informacji na temat wpływu różnych form chemicznych wanadu na funkcje płytek osób zdrowych oraz pacjentów z cukrzycą typu 2. Przedstawione wyniki wskazują na zróżnicowane działanie organicznego i nieorganicznego związku wanadu na funkcje płytek krwi, co wymaga przeprowadzenia dalszych badań w celu weryfikacji czy byłyby one bezpieczne jako leczenie wspomagające w cukrzycy.

## 2. ABSTRACT

Vanadium compounds, being used in clinical trials in diabetic patients, exert insulinomimetic and antithrombotic properties, however their influence on platelet function and metabolism is still unclear. In the presented dissertation, the hypothesis that organic bis(maltolato)oxovanadium (BMOV) (0.50 mM) and inorganic vanadium chloride ( $VCl_3$ ) (0.50 mM) can play an important role in the regulation of platelet metabolism and function was verified. Also the hypothesis that they show similar properties in blood platelets isolated from healthy people and patients with type 2 diabetes was verified.

The plasma glucose concentration of patients with type 2 diabetes was higher by 51%, concentration of  $HbA_{1c}$  exceeded the general goal by 31%, and the fructosamine concentration was higher by 112% compared to healthy people. Chronic hyperglycemia in type 2 diabetes resulted in increased activity of the platelet hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and aconitase by 52%, 22% and 28%, respectively. At the same time, no effect of  $TXA_2$  production was observed, while the release of cAMP decreased by 29% in the thrombin-activated platelets of diabetic patients was observed. At the same time, no effect of hyperglycaemia on the adhesion and platelets shape change (spreading) in collagen or fibrinogen activated platelets was observed. In contrast, thrombin-activated platelet aggregation in diabetic patients was higher by 20% ( $p < 0.05$ ) compared to healthy subjects.

BMOV inhibited the activity of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, aconitase and isocitrate dehydrogenase both in platelets of healthy individuals and diabetic patients, respectively.

Simultaneously, BMOV reduced adhesion, surface area and platelet aggregates formation of healthy people by 93%, 76% and 96% on the collagen surface, respectively and by 89%, 58% and 92% on the fibrinogen surface, respectively. Similarly BMOV reduced the adhesion, surface area and platelet aggregates formation of diabetic patients. However, this compound reduced thrombin-induced aggregation by 67% ( $p < 0.005$ ) only in patients with diabetes mellitus.

At the same time,  $VCl_3$  did not reduce the collagen- or fibrinogen-induced adhesion and surface area of healthy individuals. However,  $VCl_3$  increased adhesion on both collagen and fibrinogen surfaces by 55% and 90% in diabetic platelets respectively.  $VCl_3$  reduced thrombin-induced platelet aggregation by 21% ( $p < 0.05$ ) only in patients with diabetes.

Both BMOV and  $VCl_3$  inhibited the ATP secretion from activated platelets of healthy individuals by 88% and 67%, respectively. Similar effects of vanadium compounds were observed in blood platelets of diabetic patients.

BMOV increased  $TXA_2$  production by 118% in diabetic platelets. Whereas after the use of  $VCl_3$  four- and three-fold increase in accumulation of  $TXA_2$  in healthy individuals and diabetic patients respectively, was observed.

Despite of no effect of BMOV on cAMP concentration, this vanadium compound increased phosphorylation of VASP-Ser<sup>157</sup> protein by 28% in thrombin-activated platelets of healthy individuals and doubled in diabetic patients.  $VCl_3$  intensified VASP-Ser<sup>157</sup> protein phosphorylation by 76% only in platelets of healthy individuals.

BMOV reduced platelets aggregation and enhances  $TXA_2$  production and activation of cAMP-dependent signaling in diabetic patients, compared to healthy controls. This may indicate that under hyperglycaemic conditions, anti-platelet properties of BMOV consist in inhibiting the production of lipid platelet activation factors and accelerating the cAMP utilization.  $VCl_3$ , on the other hand, intensified the adhesion of platelets, suggesting proaggregative properties of an inorganic vanadium compound in the initial stage of platelet activation. After use of  $VCl_3$ , increased  $TXA_2$  production in activated platelets with simultaneous reduction of platelet aggregation requires further verification to fully explain the safety of inorganic vanadium compounds in both healthy and diabetic patients.

Presented dissertation provided new information on the effects of various vanadium chemical forms on the blood platelets' functions of healthy individuals and patients with type 2 diabetes. Presented data indicate different effect of organic and inorganic vanadium compound on platelet function, that is why further analysis to verify their safeness as supplement treatment in diabetes are required.



## 1.1. Płytki krwi

### 1.1.1. Morfologia krwinek płytkowych

Krwinki płytkowe, odkryte przez Giulio Bizzozero w 1882 roku, w stanie spoczynku stanowią bezjądrzaste struktury o średnicy 2-3  $\mu\text{m}$ , dyskooidalnym kształcie i objętości około 7  $\mu\text{m}^3$  [1, 2]. Z jednego megakariocytu powstaje średnio  $10^2$ - $10^3$  płytek krwi. Przyczynia się do tego wysoce wyspecjalizowany proces endomitozy, co usprawnia proces poliploidyzacji megakariocytów, syntezy mRNA i białek, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania płytek krwi [2-4]. Proces ten może trwać około pięciu dni [5]. Następnie, w ciągu kilku godzin system mikrotubul, obecny w cytoplazmie megakariocytów, ulega reorganizacji, przesuając się do kory megakariocytów i umożliwiając formowanie wypustek zakończonych wybrzuszeniem, zwanych propłytkami, do których transportowane są organella wewnątrzkomórkowe. Jednocześnie jądro komórkowe ulega degradacji [4-6].

Nie zostało jednoznacznie potwierdzone, czy organella megakariocytów przemieszczają się samodzielnie czy wskutek ruchów mikrotubul [5-7]. Podejrzewa się, iż krwinki płytkowe uzyskują dyskooidalny kształt wskutek oderwania się uformowanej płytki od wydłużonej wypustki cytoplazmatycznej [8]. Propłytki miałyby uwalniać uformowane płytki krwi, przesuując i wydłużając mikrotubule w mechanizmie zależnym od białek motorycznych, w tym dyneiny, jednakże zaproponowany mechanizm wciąż nie jest wyjaśniony [9]. Inni podkreślają kluczową rolę  $\beta_1$ -tubuliny jako czynnika determinującego kształt płytek krwi [10].  $\beta_1$ -tubulina jest główną izoformą tubuliny, obecnej w megakariocytach, a jej udział w procesie reorganizacji cytoszkieletu i formowania propłytek wydaje się być kluczowy [11, 12]. Hipotezę powyższą dają się potwierdzać badania zarówno na myszach, jak też na ludziach, które wskazują na defekty ilościowe, strukturalne i funkcjonalne płytek krwi, w sytuacji niedoboru  $\beta_1$ -tubuliny [11, 12]. Po opuszczeniu szpiku kostnego, krwinki płytkowe krążą we krwi obwodowej do 10 dni, o ile nie zostaną wcześniej zużyte w procesie hemostazy [3, 8].

W błonie komórkowej płytek krwi można wyróżnić trzy strefy. Warstwę zewnętrzną, złożoną z bezpostaciowego glikokaliksu, który pokrywa właściwą błonę komórkową, zbudowaną z dwuwarstwy lipidowej. Pod warstwą zewnętrzną, w cytoplazmie umiejscowiony jest układ mikrofilamentów i mikrotubul, który wraz z systemem kanalików otwartych (ang. open canalicular system, OCS) tworzy cytoszkielet płytkowy. Odpowiada on za utrzymanie kształtu płytek krwi w warunkach spoczynkowych oraz zwiększenie efektywnej powierzchni

płytek krwi do wychwytu agonistów, w tym kolagenu i fibrynogenu, po ich aktywacji. Umożliwia to uwalnianie substancji efektorowych, takich jak adenozyno-5'-trifosforan (ATP), adenozyno-5'-difosforan (ADP), serotonina i tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) [3, 13].

Płytki krwi pełnią rolę magazynów substancji biologicznie czynnych, syntetyzowanych przez megakariocyty, bądź absorbowanych z osocza i uwalnianych w okolicach przerwania ciągłości naczynia krwionośnego. Substancje te zawarte są w trzech grupach ziarnistości: ziarnistości  $\alpha$ , ziarnistości gęstych i lizosomach, zróżnicowanych pod względem zarówno struktury, jak też funkcji pełnionych przez zawarte wewnątrz substancje [13]. I tak, ziarnistości  $\alpha$  zawierają białka o dużej masie cząsteczkowej, przez co stanowią ok. 10% całkowitej objętości krwinki płytkowej. Znajdują się w nich m.in. czynniki krzepnięcia (czynnik V, VIII, kininogen wielkocząsteczkowy (ang. high molecular weight kininogen, HMWK), białko C i S, fibrynogen, inhibitor aktywatora plazminogenu (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), białka adhezyjne ((czynnik von Willebranda, vWF), fibronektyna, trombospondyna, witronektyna), białka swoiste płytek ((czynnik płytkowy 4 (ang. platelet factor 4, PF4),  $\beta$  tromboglobulina ( $\beta$ -TG)), czynniki wzrostu ((płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor, PDGF), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor, bFGF), czynnik pochodzenia zrębowego (stromal cell-derived factor  $\alpha$ , SDF1 $\alpha$ ), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor VEGF)), metaloproteazy MMP2 i MMP9 (ang. matrix metalloproteinase), czy czynniki martwicy guza TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  (ang. tumor necrosis factor) [3, 14]. Ziarnistości gęste stanowią magazyn dla związków niebiałkowych, biorących udział w procesie aktywacji płytek krwi, takich jak ATP, ADP, guanozyno-5'-trifosforan (GTP), uanozyno-5'-difosforan (GDP), serotonina, fosfoinozytole, a także jony wapnia (Ca<sup>2+</sup>) i magnezu (Mg<sup>2+</sup>) [2, 3, 13-15]. Tak więc, proces degranulacji pełni kluczową rolę w mechanizmie formowania się i stabilizacji skrzepu. Lizosomy zaś stanowią rezerwuuar hydrolaz, związków uczestniczących w eliminacji agregatów płytkowych we krwi krążącej [3, 13].

W cytoplazmie płytek krwi obecne są też struktury typowe dla komórek jądrzastych, takie jak mitochondria, odpowiedzialne za produkcję energii, aparat Golgiego służący do potranslacyjnej modyfikacji białek i transportu lipidów czy ziarna glikogenu, służące jako materiał energetyczny [2, 3, 14, 15].

### 1.1.2. Receptory krwinek płytkowych

W błonie zewnętrznej płytek krwi zakotwiczone są liczne struktury białkowe i glikoproteiny, pełniące funkcję receptorów niezbędnych do procesu aktywacji, adhezji i agregacji płytek krwi [3].

Dużą rodzinę receptorów stanowią integryny, heterodimeryczne, transbłonowe białka, złożone z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ . Płytki krwi wykazują ekspresję trzech receptorów integrynowych z podjednostką  $\beta_1$ : fibrynogenowego  $\alpha_5\beta_1$ , lamininowego  $\alpha_6\beta_1$  oraz najlepiej poznanego receptora kolagenowego  $\alpha_2\beta_1$  [16]. Integryna  $\alpha_2\beta_1$  bierze udział w adhezji krwinek płytkowych, a jej aktywacja jest determinowana aktywacją integryny dla fibrynogenu  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [15-19]. Jedną z dwóch integryn zawierających podjednostkę  $\beta_3$ , jest  $\alpha_v\beta_3$ , wiążąca fibronektynę, witronektynę i osteospondynę [17]. Natomiast największą ekspresję wykazuje integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (określana również jako glikoproteina GPIIb/IIIa), która poprzez powinowactwo do fibrynogenu, ale także do vWF, kolagenu, fibronektyny i witronektyny, pełni kluczową rolę w procesie tworzenia i stabilizacji skrzepu [14, 17, 20]. Co więcej, dzięki zdolności wiązania vWF, integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pośredniczy w adhezji płytek krwi do śródbłona naczyniowego [16]. Kompleks integryna-ligand, na powierzchni błony komórkowej płytek krwi, aktywuje szereg procesów wewnątrzkomórkowych w mechanizmie rekrutacji i aktywacji (ang. outside-in) [15, 16, 21].

Kompleks GPIb-IX-V, należący do rodziny receptorów transbłonowych LRR (ang. leucine-rich repeats), jest aktywowany przez czynnik von Willebranda i uczestniczy w procesie adhezji płytek krwi [15]. Receptor ten składa się z podjednostek GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX i GPV, połączonych ze sobą w stosunku 2:2:2:1, a każda z nich zawiera domenę o strukturze transbłonowego białka, helikalną domenę transbłonową (TM) oraz krótką, wewnątrzkomórkową strukturę o aktywności enzymatycznej [22]. Główna podjednostka GPIb $\alpha$  posiada miejsca wiążące wewnątrzkomórkowe przekaźniki, w tym 14-3-3 $\xi$  i białka wiążące aktynę [22, 23]. Podjednostka GPIb $\beta$  wiąże kalmodulinę oraz TNF, natomiast ligandy dla GPIX i GPV nie są poznane [22].

Innym przedstawicielem receptorów płytek krwi są receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors, TLRs), w tym TLR4, złożone z reszty leucynowej, zawierającej domeny zewnątrzbłonowe oraz wewnątrzkomórkowe, o charakterze receptora dla interleukiny 1 (ang. toll/interleukin-1 receptor, TIR). Receptory te ulegają aktywacji w obecności lipopolisacharydu (LPS), bądź w odpowiedzi na wstrząs krwotoczny, aktywując kaskadę sygnalizacyjną i pośrednicząc w produkcji cytokin prozapalnych [18, 24, 25].

Aktywacja i agregacja płytek krwi zachodzi poprzez receptory sprzężone z białkami G (ang. G protein-coupled receptor, GPCR) o charakterze proteaz [16]. Z uwagi na pofałdowaną strukturę  $\alpha$ -helikalnego peptydu, siedmiokrotnie przechodzącego przez błonę komórkową, receptory te nazywa się również siedmiotransbłonowymi (7TM) [26]. Regiony zewnątrzbłonowe odpowiadają za wiązanie ligandów, natomiast wewnątrzbłonowe, poprzez zmiany konformacyjne, pośredniczą w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych regulacji funkcji receptora [26, 27]. Heterodimeryczne białka G składają się z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , tworząc z receptorem kompleks i uczestnicząc w procesie aktywacji płytek krwi. Ze względu na różnice w konformacji podjednostki  $\alpha$ , można wyróżnić cztery grupy białek G:  $G_q$ ,  $G_{12/13}$ ,  $G_{i/z}$ , pośredniczących w procesach aktywacji oraz  $G_s$ , uczestniczącą w procesie hamowania funkcji płytek krwi, poprzez zwiększenie syntezy cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP) (Rys. 1) [26, 27]. Taka struktura przestrzenna białek G charakteryzuje receptory trombinowe z rodziny PAR (ang. protease-activated receptors), bezpośrednio związane z białkami  $G_q$  i  $G_{12/13}$ , a prawdopodobnie również z  $G_i$  (Rys. 1) [15]. Ludzkie płytki krwi wykazują ekspresję receptorów PAR1, aktywowanych niskimi stężeniami trombiny, a także PAR4, wymagających wysokich jej stężeń [16]. Siedmiotransbłonową strukturę wykazują też dwa receptory dla ADP, takie jak receptor purynergiczny, sprzężony z białkiem  $G_q$ , (purinergic G protein-coupled receptor, P2Y<sub>1</sub>), który odpowiada za mobilizację jonów wapniowych indukowaną przez ADP i uczestniczy w procesie zmiany kształtu i agregacji płytek krwi (Rys. 1) [15, 16, 28]. Natomiast drugim receptorem purynergicznym jest P2Y<sub>12</sub>, związany z białkiem  $G_{i2/3}$ , który hamuje produkcję wewnątrzpłytkowego cAMP i odpowiada za aktywację płytek krwi (Rys. 1) [15, 16, 28].

Receptor dla tromboksanu (ang. thromboxane receptor, TP), aktywowany przez TXA<sub>2</sub>, występuje w postaci jednej z dwóch izoform: TP $\alpha$  (ekspresja w płytkach krwi) i TP $\beta$  (ekspresja w komórkach śródbłonna), różniących się C-końcem regionu cytoplazmatycznego. TP wiąże się ze wspomnianymi powyżej białkami  $G_q$  i  $G_{12/13}$  [16].

Reprezentantem nadrodziny immunoglobulin płytkowych, aktywowanych kolagenem jest glikoproteina VI (GP VI), złożona z dwóch zewnątrzbłonowych domen immunoglobulinowych, hydrofobowej domeny transbłonowej, wiążącej receptor FcR $\gamma$ , oraz domeny cytoplazmatycznej, wiążącej kinazy Src: Fyn i Lyn (Rys. 1) [23]. Receptor FcR $\gamma$  łączy się z cząsteczką ITAM (ang. immunoreceptor tyrosine-based activation motif), o sekwencji YxxL, tworząc domenę receptora tyrozynowego [15, 23]. Kolagen inicjuje proces adhezji głównie przy udziale GPVI, a w mniejszym stopniu przez integrynę  $\alpha_2\beta_1$ . GPVI posiada też zdolność wiązania lamininy [23].

Ważną grupę receptorów płytkowych stanowią selektyny, należące do rodziny receptorów lektynowych typu C i zlokalizowanych w ziarnistościach  $\alpha$  oraz ciałkach Weibel-Palade. Białka te złożone są z trzech domen: N-końcowej, o charakterze lektyny, zawierającej miejsca wiążące jony wapnia, środkowej, wykazującej podobieństwo do nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. epithelial growth factor, EGF), a także C-końcowej, której różnej długości sekwencje przypominają białka regulujące układ dopełniacza. Selektyna P ulega zmianom konformacyjnym, wskutek aktywacji i degranulacji krwinek płytkowych trombiną, histaminą bądź TNF, a powstały kompleks pełni na powierzchni błony płytkowej rolę receptora CD62P [29, 30]. Innym przedstawicielem rodziny receptorów lektynowych typu C jest receptor CLEC-2. N-końcowa domena cytoplazmatyczna tego receptora zawiera jedną domenę YxxL. Pojedyncza domena YxxL określana jest jako atypowa (ang. hemiITAM) [31, 32]. Poza tym CLEC-2 charakteryzuje się obecnością regionu transbłonowego i C-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej, których pobudzenie prowadzi do silnej agregacji płytek, wskutek aktywacji ścieżki sygnałowej kinaz Src i fosforylacji hemiITAM [31]. Pierwszym opisanym ligandem dla receptora CLEC-2 była rodocytyna, inaczej agretyna, obecna w jadzie żmii malajskiej, natomiast fizjologicznym ligandem jest podoplanina [13, 23, 31].

W błonie krwinek płytkowych obecne są kanały jonowe w postaci receptorów purynowych P2X<sub>1</sub>. Przyłączenie ATP do tych receptorów powoduje zmiany konformacyjne w samym kanale, prowadząc do jego otwarcia, a w konsekwencji do zmiany kształtu płytek krwi. Natomiast ADP prowadzi do zahamowania funkcji receptora P2X<sub>1</sub> (Ryc. 1) [13, 16].

Glukoza stanowi podstawowy substrat energetyczny dla krwinek płytkowych, a jej transport do wnętrza płytek krwi odbywa się głównie poprzez transporter glukozy typu 3 (ang. glucose transporter 3, GLUT3), niezależny od insuliny [33, 34]. W warunkach spoczynkowych 85% transportera GLUT3 jest zlokalizowana w błonie ziarnistości  $\alpha$  [20, 34-36]. Aktywacja płytek krwi prowadzi do fuzji ziarnistości  $\alpha$  z błoną komórkową w procesie degranulacji płytek krwi, co dwukrotnie zwiększa napływ glukozy do wnętrza krwinek płytkowych [36-38]. Płytki krwi zawierają także minimalne ilości transportera glukozy typu 1 (ang. glucose transporter 1, GLUT1), zlokalizowanego na powierzchni błony komórkowej [35]. Napływ glukozy do wnętrza płytek krwi jest regulowany w procesie fosforylacji Akt (inaczej kinazy białkowej B, (ang. protein kinase B, PKB)), w obecności trombiny i insuliny [35]. Jednakże, kinetyka wychwytu glukozy zależy od jej stężenia w środowisku pozakomórkowym [35]. I tak, przy bardzo niskich stężeniach glukozy (0,50 mM), trombina i insulina stymulują napływ glukozy do przestrzeni wewnątrzpłytkowej, zaś w warunkach fizjologicznych (5 mM glukoza), insulina hamuje napływ glukozy do wnętrza aktywowanych

płytek krwi [35]. Wiadomo również, że aktywacja płytek krwi zależy od napływu glukozy do ich wnętrza przy udziale GLUT3 [36].

W błonie komórkowej płytek krwi obecne są także receptory insulinowe IRS-1 i IRS-2 (ang. insulin receptor substrate, IRS), o aktywności kinazy tyrozynowej (Rys. 1) [37, 38]. Łączenie receptora z ligandem wymusza translokację jonów magnezu  $Mg^{2+}$  do wnętrza płytek, redukując syntezę  $TXA_2$  [39]. Fosforylacja IRS-1 i IRS-2 prowadzi również do aktywacji kinazy-3 fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K), a następnie do fosforylacji PKB, która odpowiada za regulację funkcji krwinek płytkowych, w tym ich inaktywację [40]. Insulina fosforyluje białka  $G_{i\alpha}$ , w wyniku czego zwiększa produkcję wewnątrzpłytkowego cAMP i inaktywuje receptory  $P2Y_{12}$ , hamując funkcję płytek i mobilizację jonów wapniowych [37, 38].

Dlatego wydaje się, że przy deficycie insuliny w cukrzycy może dochodzić do zwiększonego napływu glukozy do wnętrza płytek krwi, przyspieszenia jej metabolizmu energetycznego, nadmiernej aktywacji płytek krwi i powikłań zakrzepowych, obserwowanych w tej grupie pacjentów [41-43].

### 1.1.3. Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa krwinek płytkowych

Krwinki płytkowe odgrywają kluczową rolę w procesie hemostazy. W efekcie przerwania ciągłości ściany naczynia krwionośnego dochodzi do ekspozycji struktur podśródbłonkowych o charakterze proagregacyjnym, w tym kolagenu [2, 14].

Płytki krwi ulegają dynamicznym procesom adhezji do powierzchni podśródbłonkowej uszkodzonych naczyń krwionośnych, aktywacji prowadzącej do zmiany ich kształtu, degranulacji ziarnistości płytkowych, a w konsekwencji agregacji z wytworzeniem czopu hemostatycznego, przy współudziale osoczowych czynników krzepnięcia [3, 15].

Proces aktywacji krwinek płytkowych przebiega z udziałem szeregu ścieżek sygnalizacyjnych. Do najważniejszych z nich zaliczamy szlak aktywowany przy udziale glikoproteiny GPVI i receptora CLEC-2 oraz receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR) [16, 32].

GPVI fosforyluje ITAM, w powiązaniu z receptorem  $FcR\gamma$  i za pośrednictwem kinaz tyrozynowych Fyn i Lyn, z rodziny Src (Rys. 1). Powoduje to aktywację wewnątrzpłytkowych procesów, które prowadzą do fosforylacji kinazy tyrozynowej Syk i

aktywacji fosfolipazy C (PLC $\gamma$ ) [15, 19, 44, 45]. Aktywacja ścieżki sygnałowej kinaz Src z udziałem receptora CLEC-2 zachodzi natomiast poprzez fosforylację hemITAM, posiadającą tylko jeden łańcuch YxxL, ponieważ zewnątrzpłytkowa domena CLEC-2 nie ma zdolności wiązania reszt węglowodanowych, a tym samym ITAM [16, 23, 45].

W warunkach sił wysokiego ścinania w łożysku naczyniowym, gdy proces przylegania płytek krwi do uszkodzonej struktury naczynia jest utrudniony, w procesie adhezji uczestniczy vWF, zakotwiczony w warstwie podśródbłonkowej, który wiąże krwinki płytkowe za pośrednictwem glikoproteiny GPIIb $\alpha$  w kompleksie z glikoproteinami GPIIb $\beta$  i GPIIX [15, 44]. Innym miejscem wiążącym vWF przez płytki krwi jest integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , której ligandem jest fibrynogen, kluczowy w procesie agregacji [19].

Aktywowane krwinki płytkowe uwalniają szereg agonistów adhezji, aktywacji i agregacji, w tym ADP, czy TXA<sub>2</sub>, będących ligandami dla receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR). Związane z podjednostką G<sub>aq</sub> GDP, po przyłączeniu ligandu ulegają fosforylacji do aktywnej formy GTP, a następnie dysocjacji, uzyskując zdolność łączenia się z efektoorem, białkiem RhoA (białko z rodziny GTPaz) (Ryc. 1) [15, 46, 47]. Kaskada RhoA-ROCK-MLC inicjuje poszczególne etapy aktywacji płytek krwi [46]. I tak, aktywacja indukowana trombiną, za pośrednictwem białka G<sub>aq</sub>, aktywuje czynniki wymiany nukleotydu guaniny (GEFs) dla małych białek G RhoA, tj. p115RhoGEF, warunkując powstanie kompleksu RhoA-GTP, aktywację kinazy związanej z białkiem Rho (ang. Rho-associated protein kinase, ROCK) i fosforylacją łańcuchów lekkich miozyny (ang. myosin light chain, MLC) przez hamowanie niezależnej od jonów wapnia fosfatazy łańcuchów lekkich miozyny (ang. Ca<sup>2+</sup>-independent MLC phosphatase, MLCP). Proces ten prowadzi do zmiany kształtu płytek krwi z dyskoidalnego na kulisty i sekrecji ziarnistości (Ryc. 1) [21, 46-50]. Następnie białka G<sub>aq</sub> i G <sub>$\alpha_{13}$</sub>  uczestniczą w procesie łączenia c-Src z domeną cytoplazmatyczną integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , co aktywuje kompleks p190RhoGAP i w konsekwencji prowadzi do hydrolizy RhoA-GTP do RhoA-GDP (Ryc. 1) [46, 47]. Efektem tego procesu jest hamowanie aktywności białka Rho, odpowiadającego za skurcz włókienek aktynowych, co umożliwia zmianę kształtu płytek krwi (ang. spreading) [15, 49, 50]. Zmiany strukturalne w cytoszkielecie krwinek płytkowych i wydłużona błona komórkowa skutkuje powstaniem filopodiów i lamellipodiów, co zwiększa powierzchnię adhezyjną płytek krwi [21, 51]. W kolejnym etapie sygnalizacja wewnątrzpłytkowa, zależna od jonów wapniowych, aktywuje proteazę kalpainy, który odcina fragment  $\beta_3$  integryny, prowadząc do utraty aktywności c-Src, co prowadzi do skurczu cytoszkieletu płytek krwi i retrakcji skrzepu [46].

W przypadku, gdy rolę efektorą pełni rodzina białek Src, ścieżka transdukcji sygnału może przebiegać zarówno w obecności, jak i z pominięciem białka G [47]. Białko  $G_q$  bierze udział w przekazywaniu sygnału aktywacji, głównie poprzez aktywację podjednostki  $\beta$  fosfolipazy C ( $PLC\beta$ ), a w konsekwencji degranulacji ziarnistości płytkowych i agregacji (Ryc. 1) [15]. Mechanizm uwalniania ziarnistości płytkowych zachodzi również w wyniku fosforylacji kompleksu SNARE (ang. soluble NSF attachment protein receptor), który bierze udział w fuzji błony granulocytów z błoną komórkową płytek krwi [15, 49, 50, 52].

Degranulację ziarnistości, aktywację integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , agregację i proces formowania skrzepu poprzedza wzrost stężenia wewnątrzpłytkowych jonów wapnia  $Ca^{2+}$ . Proces ten inicjuje trisfosforan inozytoli (ang. inositol trisphosphate,  $IP_3$ ), powstały w wyniku hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate,  $PIP_2$ ) przez fosfolipazy C:  $PLC\gamma$ , aktywowaną GPVI i CLEC-2 oraz  $PLC\beta$ , aktywowaną GPCR (Rys. 1) [53].  $IP_3$  odpowiada za uwalnianie  $Ca^{2+}$  z retikulum endoplazmatycznego płytek, a nagły spadek  $Ca^{2+}$  pobudza białka STIM1 (ang. stromal interaction molecule 1) i Orai1 (ang. calcium release-activated calcium channel protein 1), a także kanały jonowe indukowane napięciem (ang. transient receptor potential channels, TRPC), umożliwiając napływ jonów z kompartmentów zewnątrzpłytkowych do wewnątrzpłytkowych [16, 53-55]. Wzrost stężenia jonów wapniowych aktywuje fosfolipazę  $A_2$  (ang. phospholipase  $A_2$ ,  $PLA_2$ ), która bierze udział w syntezie  $TXA_2$  z fosfolipidów uwolnionych z błony płytek krwi [56].

W procesie aktywacji krwinek płytkowych dochodzi również do indukowanej przez ADP zmiany kształtu płytek krwi, poprzez zahamowanie aktywacji kinazy białkowej A (PKA). Prowadzi to do redukcji wewnątrzpłytkowej produkcji cAMP i hamowania fosforylacji białka, stymulowanego rozkurczaniem naczyń krwionośnych (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP), odpowiedzialnego za hamowanie funkcji krwinek płytkowych (Rys. 1) [43, 57].

Ważną rolę odgrywa w tym procesie białko  $G_q$ , prawdopodobnie poprzez udział w aktywacji sygnałów wapniowo-zależnych w płytkach krwi [46, 50]. Białko  $G_i$ , związane z receptorem  $P2Y_{12}$  aktywuje PI3K, pobudzając GTPazę Rab1b, ważny aktywator integryn (Ryc. 1) [15, 46, 49, 50].

W procesie degranulacji uczestniczy także kinaza białkowa C (ang. protein kinase C, PKC), aktywowana przez diacyloglicerol (DAG), powstająca w wyniku hydrolizy  $PIP_2$  (Rys. 1). Płytki krwi zawierają szereg izoform PKC, w tym dobrze opisane  $\alpha$  i  $\beta$  (odpowiednio wapniowo- i DAG-zależne), ale także izoformy  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\eta$  czy atypową izoformę  $\zeta$  [15, 58]. Ponadto wzrost wewnątrzkomórkowego wapnia i aktywacja DAG aktywują kompleks



CalDAG-GEF1 (ang. calcium and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor 1), odgrywający ważną rolę w sygnalizacji integrynowej aktywacji-rekrutacji (ang. inside-out) [15]. Jest to rodzaj oddziaływania, gdzie mechanizmy wewnątrzkomórkowe zwiększają powinowactwo domen integryn na powierzchni błony komórkowej, poprzez zmianę ich konformacji [15, 21]. Kompleks CalDAG-GEF1 przy udziale PI3K, przekształca Rap1 z nieaktywnej formy związanej z GDP do formy aktywnej, wiążącej GTP i aktywującej integryny [16, 59]. Proces aktywacji płytek krwi przyczynia się do wzrostu powinowactwa integryn do ich swoistych ligandów, poprzez zmiany konformacyjne, inicjowane połączeniem białek regulatorowych, takich jak taliny i kindliny, do cytoplazmatycznej domeny  $\beta$  integryn [15, 16, 59].

Końcowy etap aktywacji krwinek płytkowych to agregacja, w wyniku której fibrynogen przekształca się w stabilną fibrynę [43].

## **1.2. Wpływ cukrzycy na metabolizm płytek krwi**

Pacjenci z cukrzycą charakteryzują się zwiększoną podatnością na incydenty zakrzepowe, z uwagi na nasilony proces krzepnięcia, zaburzenie procesów trombolitycznych, dysfunkcję śródbłonna naczyniowego i hiperaktywność płytek krwi, w wyniku upośledzenia wewnątrzkomórkowych mechanizmów transdukcji sygnału [37, 43, 60]. W hiperglikemii obserwuje się zwiększone stężenie czynników aktywujących kaskadę krzepnięcia, w tym czynników krzepnięcia VII, VIII, IX i XII, fibrynogenu, kalikreiny, vWF, nieaktywnych enzymatycznie fragmentów F1+2 protrombiny, których stężenie jest miernikiem aktywacji krzepnięcia wewnątrznaczyniowego czy kompleksu trombina-antytrombina, przy jednoczesnym hamowaniu procesów fibrylizacji [60-62]. W krążeniu u pacjentów z hiperglikemią wzrasta też liczba agregatów płytek krwi, nasila się kurczliwość ich cytoszkieletu oraz rośnie stężenie produktów ich aktywacji, w tym TXA<sub>2</sub>,  $\beta$ -tromboglobuliny ( $\beta$ -TG) czy czynnika płytkowego 4 (PF4) [60].

W hiperglikemii obserwuje się również nasiloną trombopoezę, prowadzącą do powstania płytek o dużej objętości, co może być powodowane nasilonym magazynowaniem zawartości ziarnistości w megakariocytach i nadmierną deformacją wewnątrzpłytkowych błon komórkowych [60, 63]. Tak zdeformowane płytki krwi stają się bardziej podatne na degranulację [60].

Hiperglikemia prowadzi do nieenzymatycznej glikacji białek, również tych kotwiczących w błonie komórkowej płytek, wynikających z aktywacji szlaków polioliowych i reakcji grup karbonylowych zredukowanych węglowodanów z grupami aminowymi białek [43, 64-66]. Proces nieenzymatycznej glikacji i powstałe końcowe produkty glikacji (ang. advanced glycation end products, AGE) indukują zmiany konformacyjne białek błonowych i modyfikują ich rozmieszczenie, a przez to zmniejszają płynność błony komórkowej [64, 65, 67]. Zmiany te prowadzą do wzrostu wrażliwości i ekspresji cząsteczek adhezyjnych, np. P-selektyny (CD62) i ligandu CD40 (ang. CD40 ligand, CD40L), nasilających aktywację płytek, jak też do wzrostu wrażliwości i ekspresji receptorów powierzchniowych na krwinkach płytkowych, w tym GPIIb/IIIa, GPIb-IX-V i GPIa/IIa, co zwiększa powinowactwo do wiązania vWF i fibrynogenu, w procesie tworzenia agregatów płytkowych [43]. Wiadomo, że poziom hemoglobiny glikowanej  $A_{1c}$  ( $HbA_{1c}$ ) koreluje z poziomem ekspresji receptorów aktywacji płytek krwi, tak więc prawidłowa kontrola glikemii może ograniczać nadreaktywność płytek krwi u pacjentów z cukrzycą [37, 43]. Natomiast nadekspresja rozpuszczalnej formy antygeny CD40, obserwowana we krwi pacjentów z cukrzycą, nie tylko nasila ekspresję P-selektyny, ale może też wiązać się z udziałem płytek krwi w procesie zapalnym i podwyższać stężenia białka C reaktywnego (ang. C reactive protein, CRP), gdyż cząsteczki adhezyjne aktywują leukocyty i komórki śródbłona naczyniowego [68, 69]. W konsekwencji może to prowadzić do wtórnej aktywacji krwinek płytkowych w cukrzycy [68]. Hiperglikemia może również nasilać ekspresję antygeny CD40 i prowadzić do nadreaktywności płytek krwi w mechanizmie niezależnym od wzrostu wewnątrzpłytkowego stężenia jonów wapnia [69]. Czynnikiem odpowiedzialnym za stan zapalny i dysfunkcję śródbłona w tym mechanizmie może być nadmierna aktywacja PKC $\beta$  [43].

Procesy nieenzymatycznej glikacji indukują również zaburzenia homeostazy wapnia, poprzez zwiększenie mobilizacji jonów  $Ca^{2+}$  z siateczki endoplazmatycznej, w odpowiedzi na trombinę [70]. Wysokie stężenie jonów wapnia koreluje ze zmniejszoną płynnością błony płytek krwi [71].

Podobnie, zwiększona ekspresja receptorów P2Y<sub>12</sub> w hiperglikemii, prowadzi do spadku poziomu wewnątrzpłytkowego cAMP, powodując wzrost reaktywności krwinek płytkowych [28, 43, 71].

W cukrzycy obserwuje się także wzrost produktu nieenzymatycznej peroksydacji kwasu arachidonowego i prostaglandyny F2 $\alpha$ , która jest markerem stresu oksydacyjnego [43].

Tromboksan (TXA<sub>2</sub>) jest jednym z głównych agonistów krzepnięcia [15, 16]. Wzrost aktywacji przemiany kwasu arachidonowego, prowadzący do nasilenia syntezy TXA<sub>2</sub>, jest

jednym z zaburzeń metabolizmu płytek krwi, obserwowanych w cukrzycy [72, 73]. Proces ten prowadzi do fosforylacji białek sygnalizacyjnych, wzrostu produkcji  $IP_3$  i wzrostu mobilizacji jonów wapniowych [62]. Aktywacja tego mechanizmu koreluje z hiperglikemią i wysokim stężeniem  $HbA_{1c}$ , dlatego też prawidłowa kontrola glikemii może go ograniczać [62]. Hiperglikemia warunkuje też wysokie stężenie pochodnej fosfodihydroksyacetonu, który ulegając redukcji do fosforanu-3-glicerolu, nasila syntezę DAG. Ten z kolei aktywuje szlak kinazy białkowej C i płytki krwi [65, 74].

Pacjenci z cukrzycą wykazują znaczny wzrost stężenia trombiny, w porównaniu do osób zdrowych [73, 75]. W cukrzycy obserwowana jest również zwiększona ekspresja czynnika tkankowego (ang. tissue factor, TF), w odpowiedzi na aktywację wysokim stężeniem glukozy oraz insuliny, które wykazują efekt addycyjny i nasilają proagregacyjne właściwości TF [73, 76]. Jego nadmierna produkcja zachodzi również wskutek powstających w cukrzycy końcowych produktów glikacji, poprzez aktywację NF- $\kappa$ B [77].

U pacjentów z cukrzycą, jak również w stanie przedcukrzycowym, którym towarzyszy otyłość, obserwuje się zwiększenie reaktywności krwinek płytkowych, związane z insulinoopornością lub niedoborem tego hormonu [43, 72]. Wydaje się, że insulinooporność rozwija się wskutek zaburzeń funkcji receptora insulinowego IRS, czego następstwem jest zmniejszenie poziomu wewnątrzpłytkowego cAMP, wzrost stężenia jonów wapnia, a w konsekwencji nadreaktywność płytek krwi [43, 78]. Paradoksalnie, zwiększona aktywacja płytek krwi obserwowana jest również u pacjentów stosujących terapię insulinową, a efekt ten nasilony jest dodatkowo wskutek upośledzenia wrażliwości krwinek płytkowych na śródbłonkowy tlenek azotu i prostacyklinę i koreluje z wysokim stężeniem  $HbA_{1c}$  [43, 79]. Patomechanizm aktywacji krwinek płytkowych insuliną pozostaje nieznany, jednakże podejrzewa się, iż może być związany z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego [62, 80].

W cukrzycy dochodzi również do zaburzeń metabolizmu lipidów [81-83]. Triglicerydemia indukuje powstanie lipoprotein o bardzo niskiej gęstości VLDL, które poprzez apolipoproteinę E i płytkowy receptor dla lipoproteiny o niskiej gęstości LDL zwiększają aktywację krwinek płytkowych [84]. W stanie przewlekłej hiperglikemii glikacji ulegają także cząsteczki LDL (glycLDL), co upośledza produkcję tlenu azotu przez śródbłonek naczyniowy i zwiększa stężenie jonów wapniowych w cytoplazmie [86, 87]. W konsekwencji, wzrost stężenia jonów wapniowych może powodować inhibicję aktywności fosfatazy błonowej  $Na^+/K^+$ -ATPazy, pobudzanie  $Ca^{2+}$ -ATPazy, nasilając tworzenie skrzepu. Oddziaływania te wskazują na właściwości prozakrzepowe glycLDL u pacjentów z cukrzycą [83, 84].

### 1.3. Właściwości związków wanadu

Pierwsze wzmianki na temat wanadu datuje się na 1801 r. i przypisuje Andresowi Manuelowi del Rio, jednakże dopiero w 1831 r., Nils Gabriel Sefström, nadał mu obecną nazwę na cześć skandynawskiej bogini piękna i płodności Vanadis [85, 86]. Potencjalne terapeutyczne właściwości wanadu w przebiegu wielu schorzeń stanowią źródło zainteresowania zarówno lekarzy, jak i pacjentów [87, 88]. Niemniej jego biologiczne i farmakologiczne znaczenie wciąż nie zostało dobrze poznane, a stale rosnące stężenie w środowisku wymusza analizę właściwości fizykochemicznych, ze względu na toksyczność wysokich dawek związków wanadu [87, 88].

Wanad jest pierwiastkiem śladowym, należącym do IV okresu i grupy Vb układu okresowego, powszechnie występującym na naszej planecie w postaci soli nieorganicznych [85, 86, 89]. Kompleksowanie organicznych związków wanadu z ligandami, np. maltolem, zwiększa ich przyswajalność, pozwalając osiągnąć taki sam efekt terapeutyczny, jak w przypadku związków nieorganicznych, przy zastosowaniu dawek mniejszych nawet o 50% [90].

Wanad występuje na sześciu stopniach utlenienia: -1, 0, +2, +3, +4, +5, przy czym układy na +4 (wanadyl) i na +5 (wanadan) stopniu utlenienia są najtrwalsze i najczęściej spotykane w przyrodzie [91]. Czworwartościową formę wanadylu ( $\text{VO}^{2+}$ ) pierwiastek przyjmuje w środowisku kwaśnym, natomiast pięciwartościową ortowanadanu ( $\text{VO}_4^{-3}$ ) w zasadowym, czym wykazuje podobieństwo do fosforanów ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) [85, 92]. Środowisko obojętne z kolei determinuje postać anionu kwasu wanadowego ( $\text{H}_2\text{VO}^4$ ) [85, 92, 93].

Źródłem pierwiastka wanadu w pożywieniu są m.in. grzyby, zboża, pietruszka, czarny pieprz, nasiona kopru włoskiego, szpinak czy owoce morza, dostarczając przeciętnie ok. 10-160  $\mu\text{g}$  wanadu na dobę [85]. Jednak z uwagi na niską stabilność jonów wanadanowych w kwaśnym środowisku żołądka, pierwiastek ten wchłania się jedynie w 1-10 % [85, 92]. Wanad jest wchłaniany do krwioobiegu drogą pokarmową lub oddechową, gdzie po przekształceniu w kationy wanadyłowe, tworzy kompleksy z transferyną i ferrytyną, rzadziej z albuminą czy hemoglobina [85, 86]. Kationy wanadyłowe  $\text{VO}^{2+}$  swobodnie dyfundują przez błony komórkowe, podczas gdy wanadanowe  $\text{VO}_4^{-3}$  wnikają do wnętrza komórek drogą kanałów anionowych [86].

Organizm człowieka zawiera 100-200  $\mu\text{g}$  wanadu, co stanowi wypadkową jego wchłaniania i wydalania [85]. Nieliczne dane literaturowe, dotyczących farmakokinetyki wanadu u ludzi, wskazują, że stężenie tego pierwiastka we krwi stanowi około 0,40-2,80  $\mu\text{g/l}$

[94]. Wartości wyższe wanadu, bo na poziomie 22  $\mu\text{g/l}$ , odnotowano w moczu, jako że układ moczowy stanowi główną drogę wydalania pierwiastka, z prędkością wydalania około 8  $\mu\text{g/dobę}$  [91, 94].

Dane literaturowe wskazują także, że w tkankach o zwiększonej insulinowrażliwości, takich jak wątroba czy tkanka tłuszczowa, wanad jest metabolizowany szybciej [91]. W stanach patologicznych (w przebiegu nowotworów, zakażeń czy stanów zapalnych) wanad akumuluje się w wątrobie, nerkach, płucach, śledzionie, tkance tłuszczowej, sercu, kościach i zębach [86].

W ostatnich latach podkreśla się kluczową rolę związków wanadu w utrzymaniu homeostazy ustrojowej, jednak jego rola u ludzi wciąż nie jest do końca wyjaśniona. Spekuluje się na temat właściwości insulinotropowych wanadu i jego związków, przez co może on odgrywać istotną rolę w regulacji metabolizmu glukozy u pacjentów z cukrzycą [86, 95].

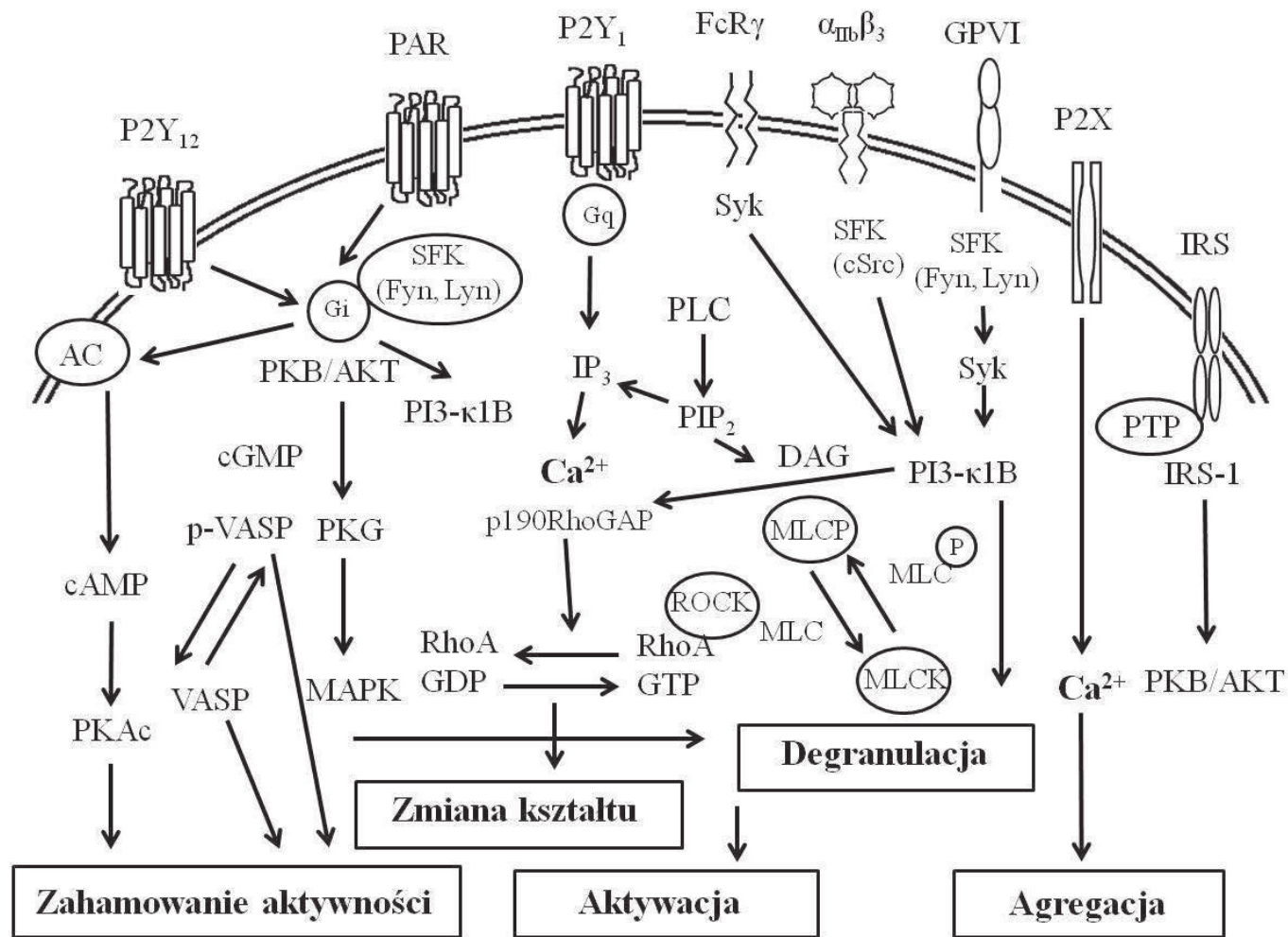
### **1.3.1. Rola związków wanadu w cukrzycy**

Pierwsze wzmianki na temat roli wanadu i jego związków w cukrzycy pojawiły się już w 1899 r., kiedy doustna suplementacja nieorganicznym ortowanadanem sodu  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  umożliwiła redukcję glikozurii u dwóch z trzech pacjentów chorych na cukrzycę, włączonych do badania [85].

Szereg prac poświęconych właściwościom insulinomimetycznym związków wanadu powstało jednak niecały wiek później [96-100]. Wiele informacji o roli związków wanadu w cukrzycy dostarczyły badania na zwierzętach [96].  $\text{VOSO}_4$ , podawany doustnie szczurom z cukrzycą indukowaną streptozotocyną (STZ), w dawkach 5 i 10  $\text{mg/kg}$  masy ciała, przez 30 dni, istotnie zmniejszył hiperglikemię, jednocześnie zwiększając stężenie insuliny we krwi w porównaniu do kontroli [101]. Zastosowany w podobnym modelu doświadczalnym  $\text{NaVO}_4$ , podawany w wodzie pitnej, w dawce 0,20  $\text{mg/ml}$ , obniżał stężenie glukozy we krwi, zwiększając przy tym wrażliwość tkanek na działanie insuliny po czterech tygodniach leczenia, jak również przyspieszał proces glukoneogenezy w hepatocytach szczurów [102]. Efekt ten utrzymywał się tak długo, jak długo stosowano suplementację [102, 103].

Organiczny bis(alfa-furankarboksylato)oksowanad (IV) (BFOV), podawany dojelitowo przez cztery tygodnie szczurom z cukrzycą typu 1, indukowaną STZ, jak też z cukrzycą insulinoniezależną (ang. non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM), w

dawce 0,20 mM/kg masy ciała, istotnie zmniejszył stężenie glukozy i hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) we krwi [104, 105]. Po zastosowaniu BFOV obserwowano również spadek stężenia cholesterolu całkowitego i triglicerydów oraz wzrost stężenia cholesterolu frakcji HDL, co sugeruje udział związków wanadu w regulacji zaburzeń metabolizmu lipidów w cukrzycy [104]. Powyższy model doświadczalny potwierdza także wpływ organicznego BFOV na poprawę metabolizmu energetycznego organizmu, poprzez poprawę wrażliwości tkanek na leptynę, przy jednoczesnym zmniejszeniu jej stężenia [104, 105]. Organiczny bis(maltolato)oksowanadan (IV) (BMOV), podawany szczurom z cukrzycą wyindukowaną streptozotocyną (STZ-D), w wodzie pitnej, w dawce 0,60 mM/kg masy ciała, przez 8 tygodni, poprawiał parametry glikemii poprzez zwiększanie translokacji transportera glukozy GLUT4 w błonie komórek serca [106, 107]. W odpowiedzi na pojedyncze dawki BMOV, również komórki mięśni szkieletowych szczurów z cukrzycą typu 1 zwiększyły ekspresję GLUT4, co poprawiało transport i utylizację glukozy, a efekt utrzymywał się nawet do 72 godzin po podaniu BMOV [108].



Ryc. 1. Wpływ związków wanadu na sygnalizację krwinek płytkowych typu 2.

Receptory sprzężone z białkami G (GPCR): PAR- receptor aktywowany proteazą, receptor dla trombiny; P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>- receptory purynergiczne; IRS- receptor insuliny; Ca<sup>2+</sup>- jony wapnia; IP<sub>3</sub>- trisfosforan inozytolu; PIP<sub>2</sub>- fosforan fosfatydyloinozytolu; PLC- kinaza białkowa C; DAG- diacyloglicerol; RhoA- białko z rodziny GTPaz; MLC- łańcuchy lekkie miozyny; Syk: kinazy z rodziny Syk; PI3-κ1B- kinaza fosfatydyloinozytolu; AC- cyklaza adenylowa; cAMP- cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; PKAc- kinaza białkowa A; AKT- kinaza białkowa; PKG- kinaza białkowa G; MAPK- kinaza aktywowana mitogenem; IP<sub>3</sub>- trisfosforan inozytolu; PTP- białkowa fosfataza tyrozynowa.

Ostatnie doniesienia literaturowe opisują także próby łączenia dekawanadu ze znanym doustnym lekiem, stosowanym w leczeniu cukrzycy, metforminą [109, 110]. Dekawanad metforminy (Metf- $V_{10}O_{28}$ ), podawany szczurom z wyindukowaną alloxanem cukrzycą typu 1, dwa razy w tygodniu, w dawce 4,80  $\mu M/300$  g m.c., w ciągu dwóch miesięcy, wykazywał efekt ochronny na komórki  $\beta$  wysp trzustkowych [109]. U szczurów z cukrzycą typu 2, Metf- $V_{10}O_{28}$  podawana dwa razy w tygodniu, w dawce 2,50  $\mu M/300$  g, w ciągu dwóch miesięcy, powodowała normalizację glikemii i profilu lipidowego [109, 110].

Po doustnym podaniu siarczanu wanadyłu  $VOSO_4$ , w dawkach 100-150 mg/dzień, przez okres od 3-6 tygodni, u pacjentów z cukrzycą typu 2 obserwowano poprawę insulinowrażliwości komórek wątroby i mięśni szkieletowych, względem grupy kontrolnej, otrzymującej placebo, gdzie nie obserwowano zmian [97-100]. Obserwacje te potwierdzono w badaniu klinicznym z udziałem sześćdziesięciu pacjentów z cukrzycą typu 2, przyjmujących nieorganiczny metawanadan sodu  $NaVO_4$ , w dawce 100 mg/dzień, przez 12 tygodni [111]. Dodatkowo, u pacjentów z cukrzycą obserwowano niższe stężenie hemoglobiny glikowanej  $HbA_{1c}$ , frakcji LDL-cholesterolu, triglicerydów i obniżenie wskaźnika masy ciała (BMI) [111]. Z drugiej strony, po doustnym podaniu  $VOSO_4$  i  $Na_3VO_4$ , w dawkach 300 mg/dzień, przez okres 6 tygodni, u pacjentów z cukrzycą typu 2 obserwowano nasilenie procesów prooksydacyjnych, na które najbardziej podatna jest frakcja nie-HDL lipoprotein, mimo, iż w warunkach *in vitro* związki wanadu wykazują właściwości antyoksydacyjne [112]. Ortowanadan sodu i siarczan wanadyłu powodowały przyspieszenie syntezy glikogenu oraz inhibicji lipolizy, przyspieszając jednocześnie procesy lipogenezy w hepatocytach i adipocytach, wyizolowanych od szczurów [103, 113, 114].

Udział związków wanadu w regulacji metabolizmu glukozy wciąż nie jest jasny i jednoznaczny. Obecnie badacze przypisują właściwości insulinomimetyczne soli wanadu, ich udziałowi w procesie hamowania białkowej fosfatazy tyrozynowej PTPazy, bądź innych fosforylaz:  $Na^+$ ,  $K^+$ - czy  $Ca^{2+}$ -ATPazy, w mechanizmie kompetycji enzymatycznej (Ryc. 1) [115, 116]. Sugeruje się, iż proces zachodzi poprzez fosforylację podjednostki  $\beta$  fosfatazy tyrozynowej (PTP-1 $\beta$ ) i prowadzi do aktywacji receptora insulinowego IRS [115, 117, 118]. Inny potencjalny mechanizm działania związków wanadu jest związany z aktywacją kinazy PKB/Akt (Ryc. 1) [101, 119]. Pełni ona kluczową rolę w metabolizmie glikogenu, jak również w transporcie glukozy, natomiast stan insulinooporności zaburza jej aktywację [120, 121].

Związki wanadu aktywują PKB/Akt, co skutkuje wzrostem wychwytu glukozy przez GLUT4, ale także fosforylacją kinazy syntazy glikogenu 3 (ang. Glycogen synthase kinase 3,



GSK3), biorącej udział w syntezie glikogenu [101, 119]. Badacze opisują także udział związków wanadu w procesie hamowania agregacji indukowanej PAF, w mechanizmie aktywacji cAMP/PKA (Ryc. 1) [93, 122]. Inne badania wskazują jednak, iż mimo fosforylacji i aktywacji kinaz aktywowanych mitogenem (ang. mitogen-activated protein kinase, MAPK), związki wanadu nie uczestniczyły w procesie fosforylacji IR czy IRS- $\beta$  (Ryc. 1) [123]. Można więc spekulować, że podobieństwo związków wanadu do insuliny w oparciu o mechanizm działania polega na aktywacji drogi zależnej od MAPK, niezależnie od fosforylacji IRS- $\beta$  [122, 123].

Nieliczne dane literaturowe zwracają uwagę na występowanie działań niepożądanych, po zastosowaniu nieorganicznych związków wanadu, jak biegunki, nudności, wymioty [96, 97, 99]. Badania na zwierzętach ujawniły, że efekt toksyczny zależy od gatunku zwierzęcia, dawki, drogi i czasu podania oraz stopnia utlenienia jonów wanadowych [124, 125]. Naukowcy podkreślają jednak występowanie efektu toksycznego w warunkach *in vitro*, podczas stosowania dużych dawek wanadu, których osiągnięcie nie jest możliwe w warunkach *in vivo* [124]. Jednocześnie wydaje się też, że organiczne związki wanadu, kompleksowane z maltolem, stanowiącym powszechnie stosowany dodatek do żywności, wykazują większe bezpieczeństwo u zwierząt doświadczalnych [85, 90, 126].

Ponadto, związki wanadu mogą przyczyniać się do generowania ROS i wykazywać działanie potencjalnie przeciwnowotworowe [86]. W literaturze opisuje się właściwości przeciwnowotworowe nieorganicznego metawanadu [127-129]. I tak, w badaniach na liniach komórkowych raka jajnika i jądra, metawanad przyspieszał generację ROS, zużycie glutationu i utraty potencjału błony mitochondrialnej [127-129]. Przeciwnowotworowe i antyoksydacyjne właściwości oksydowanadu (IV) pozwoliły natomiast stworzyć kompleksy z flawonoidami, wykorzystywane w terapii leczenia nowotworów jako antyoksydanty [130].

Towarzysząca cukrzycy hiperglikemia może powodować zaburzenia metabolizmu energetycznego zarówno w tkankach insulino-zależnych jak i insulino-niezależnych. Mechanizm regulacji glikemii z udziałem związków wanadu wciąż nie jest dobrze poznany. Brak również danych dotyczących wpływu związków wanadu na funkcje i metabolizm komórek krwi, w tym krwinek płytkowych. Dlatego też badania wpływu związków wanadu na funkcje i metabolizm krwinek płytkowych mogą pomóc w wyjaśnieniu, czy terapia suplementacyjna wybranymi związkami wanadu w cukrzycy może wykazywać potencjalne korzystne właściwości przeciwpłytkowe i przeciwzakrzepowe oraz czy potencjalny efekt związków wanadu jest pozbawiony działań niepożądanych.

## **2. MATERIAŁY I METODY**

### **2.1. Grupy doświadczalne**

#### **2.1.1. Kożuchy leukocyтарno-płytkowe**

Postawione w niniejszej pracy tezy wymagały zastosowania modelu doświadczalnego, odzwierciedlającego stan podwyższonego stężenia glukozy. W celu ustalenia warunków przeprowadzonych doświadczeń wykorzystano kożuszki leukocyтарno-płytkowe, pozyskiwane w procesie aferezy. Płytki krwi izolowano z 80 kożuchów leukocyтарno-płytkowych (KLP), pochodzących od honorowych dawców krwi, kobiet i mężczyzn, w wieku 18-65 lat, z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Gdańsku (Zgoda RCKiK.Dyr.M-073/17/JJ/11).

Zastosowany materiał biologiczny (KLP) był produktem odpadowym po izolacji z pełnej krwi krwinek czerwonych oraz osocza. Zawierał on antykoagulant i bufony o następującym składzie i końcowym stężeniu: 0,04% kwas cytrynowy, 0,32% cytrynian sodowy, 0,025% fosforan sodowy, 0,32% dekstroza. Płytki krwi izolowane z KLP zostały wykorzystane do ustalenia warunków przeprowadzanych doświadczeń.

#### **2.1.2. Pacjenci chorzy na cukrzycę oraz osoby zdrowe**

Doświadczenia zostały przeprowadzone na płytkach krwi izolowanych z pełnej krwi, pobranej z żyły łokciowej pomiędzy 7.00-9.00, od osób będących na czczo, do próbek zawierających 3,20% cytrynianu sodu.

Badania były prowadzone na płytkach krwi, pochodzących od zdrowych ochotników (58 pracowników i studentów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) oraz 63 pacjentów z cukrzycą typu 2, będących pod opieką Regionalnego Centrum Diabetologicznego przy Uniwersyteckim Centrum Klinicznym (UCK) w Gdańsku, skąd zostali skierowani na rutynowe badania kontrolne krwi w celu oceny poziomu glikemii, cholesterolu i triglicerydów, wykonane w Centralnym Laboratorium Klinicznym UCK w Gdańsku.

Pacjenci włączeni do badania zostali poinformowani o celu i charakterze badania, a także wyrazili pisemną zgodę na oddanie dodatkowo 18 ml krwi, przy okazji pobierania krwi do rutynowych badań, zleconych przez lekarza prowadzącego. Badania uzyskały zgodę

Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym – NKBBN 206/2012.

Analiza wyników została przeprowadzona u pacjentów z cukrzycą typu 2 (63 pacjentów) w przedziale wiekowym 46-82 lat, w tym 31 kobiet i 32 mężczyzn, ze średnim czasem trwania cukrzycy  $14,00 \pm 2,30$  lat.

Kontrolę stanowiła grupa 58 osób zdrowych, w przedziale wiekowym 50-87 lat, w tym 27 kobiet i 31 mężczyzn.

Z badania zostały wykluczone osoby przyjmujące w przeciągu 14 dni przed pobraniem krwi leki zaburzające funkcje płytek krwi, np.: niesterydowe leki przeciwzapalne, inhibitory kanału wapniowego oraz fosfodiesterazy, a także modyfikujące funkcję receptorów płytkowych.

## **2.2. Odczynniki i materiały zużywalne**

### **2.2.1. Odczynniki**

Odczynniki zakupione z firmy Sigma Chemicals Co., Poznań, Polska:  
glukoza, chlorek magnezu ( $MgCl_2$ ), chlorek wapnia ( $CaCl_2$ ), kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy (HEPES), wodorofosforan sodu ( $NaH_2PO_4$  anh), wodorofosforan sodu uwodniony ( $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ ), wodorofosforan potasu ( $KH_2PO_4$ ), wodorowęglan sodu ( $NaHCO_3$  anh), kwas cytrynowy, cytrynian sodu, szczawian amonu, wzorzec immunoglobuliny ludzkiej, bydlęca surowica płodowa (FBS, ang. Fetal Bovine Serum), albumina surowicy bydlęcej (BSA, ang. Bovine Serum Albumin), trombina, fibrynogen, kwas 2-tiobarbiturowy (TBA), dimetylosulfotlenek (DMSO), p-nitrofenylofosforan, falloidyna znakowana izotiocyanianem fluoresceiny (FITC – ang. fluorescein isothiocyanate), paraformaldehyd, Trisma base, zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH), adenzynotrójfosforan (ATP), ditiotreitrol (DTT), kwas izocytrynianowy (IC), dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH), cis-akonitan, siarczan dodecyli (SDS), glicyna, lucyferyna, lucyferaza, kinaza pirogronianowa, pirogronian, fosforan bromo-4-chloro-3-indolyli (BCIP), N,N-dimetylformamid (DMF), azydek sodu, kwas 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DNTB), glukozo-6-fosforan, dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa, glutation całkowity i zredukowany, forskolina, chlorek wanadu ( $VCl_3$ ), TWEEN 20, bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylotetrazolu (MTT), N,N-dimetylo-

formamid (DMF), poliklonalne anty-mysie przeciwciała drugorzędowe IgG skoniugowane z fosfatazą alkaliczną;

Odczynniki zakupione w:

Chrono-Log (Warszawa, Polska) – kolagen typu 1;

Enzo Life Science (New York, USA) – bis(maltolato)oksowanadan (IV) (BMOV);

Fluka (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria) – Triton X-100, merkaptoetanol, kwas trichlorooctowy (TCA);

Avantor Performance Materials POCH (Gliwice, Polska) – alkohol etylowy, chlorek sodu (NaCl), chlorek potasu (KCl), kwas solny (HCl), kwas ortofosforowy ( $H_3PO_4$ ), wodorowęglan sodu ( $NaHCO_3$ ), wodorowęglan potasu ( $KHCO_3$ ), wersenian sodu (EDTA);

ICN Biomedicals Inc. (Ohio, USA) – Coomassie Brilliant Blue G250;

Tocris Bioscience (Abingdon, UK) – tetrapeptyd RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser);

Bio-Rad (Warszawa, Polska) – bufor obciążający Laemmli'ego, gradientowe żele poliakrylamidowe 4-20% Mini-PROTEIN TGX;

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) – białkowe markery mas o spectrum 10-260kDa (Spectra Multicolor Broad Range);

Cell Signaling Technology (Danvers, USA) – poliklonalne mysie przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko białkowej kinazie B (PKB), poliklonalne królicze przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko fosforylowanemu białku VASP, monoklonalne królicze przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko  $\beta$ -tubulinie ludzkiej;

ABCAM Co (Cambridge, Wielka Brytania) – poliklonalne królicze przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko fosforylowanemu białku z nadrodziny białek Ras (ang. Ras homolog gene family, member A, RhoA), poliklonalne królicze przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko katalitycznej podjednostce kinazy białkowej, zależnej od cAMP (ang. cAMP-dependent protein kinase, PKAc alfa/beta/gamma), poliklonalne królicze przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko fosforylowanej formie fosfatazy łańcuchów lekkich miozyny (ang. Myosin light-chain kinase, MLC);

Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, USA) – poliklonalne anty-królicze przeciwciała drugorzędowe IgG skoniugowane z fosfatazą alkaliczną;

National Diagnostics Inc (Charlotte, USA) – Histomount;

Cloud-Clone Corp (Huston, USA) – zestaw do oznaczania tromboksanu  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) metodą ELISA;

Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA) – zestaw do oznaczania cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP) metodą ELISA;

Biorbyt (Cambridge, Wielka Brytania) – zestaw do oznaczania fruktozaminy metodą kolorymetryczną;

Life Technologies Polska Sp. Z o.o. (Warszawa, Polska) – zestaw do elektrotransferu białek (iBlot® Gel Transfer Stacks PVDF, regular size);

### **2.2.2. Materiały zużywalne**

Kuwety do pomiaru agregacji pochodziły z firmy LabiTec (Ahrensburg, Niemcy). Probówki typu Eppendorf, probówki typu Falcon (15 i 50 ml), kuwety do pomiarów spektrofotometrycznych, 96-dołkowe płytki hodowlane płaskodenne, pipety, a także końcówki do pipet pochodziły z firmy Saersedt (Stare Babice, Polska). Probówki wirówkowe, szkiełka mikroskopowe podstawowe i nakrywkowe oraz inne drobne materiały zużywalne dostarczono z firmy Medlab (Gdynia, Polska).

### **2.3. Aparatura**

- Wirówki: 25 Jouan CT 1000 (Thermo Scientific, Gliwice, Polska); MPW-223e (MPW-Instruments, Warszawa, Polska);

- Agregometr dwukanałowy AFACT – Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer (Labor, Hamburg, Niemcy);

- Spektrofotometry: UV-1202 Spectrophotometr (Shimadzu, Japan); Victor 3, 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, USA); Ultraspec 3100 Pro (Amersham Biosciences, UK) z nakładką termostatyczną MultiTempIII (ThermoElectron, Niemcy);

- Termo wytrząsarki: MixMate (Eppendorf, Niemcy); Termomixer Comfort (Eppendorf, Niemcy); Termomixer Compact (Eppendorf, Niemcy); wytrząsarka typ 357 (Elpin+, Polska);

- Luminometr Junior (Berthold Technology, Niemcy); LS 55 z oprogramowaniem FLWinLab® Version 4.00.02 (Perkin Elmer Instruments, USA);

- Zestaw do rozdziału elektroforetycznego: Mini-Protean III (Bio-Rad, Polska);

- Zestaw do suchego transferu: iBlot Dry Blotting System (Life Technologies Co., USA);
- System do dokumentacji żeli: UVITEC Allince 4.7 z oprogramowaniem UVlband<sup>®</sup> (UVITEC, Wielka Brytania);
- Mikroskopy: mikroskop fluorescencyjny firmy Nikon (Preoptic Co, Warszawa, Polska); odwrócony mikroskop fluorescencyjny IX83 firmy Olympus (Olympus Polska Sp. z o.o., Warszawa, Polska);
- pH-metr: AD100 (ADWA, Polska);
- analizator hematologiczny HMX (Beckman- Coulter, Miami, Florida, USA);
- analizator biochemiczny Architect 8000 (Abbott, Warszawa, Polska);
- Variant II Hemoglobin Testing System do oznaczania hemoglobiny glikowanej (Bio-Rad Laboratories, GMBH, Monachium, Niemcy);
- program do oceny zdjęć mikroskopowych Image J (Java, National Institutes of Health, USA).

## **2.4. Izolacja krwinek płytkowych**

### **2.4.1. Izolacja płytek krwi z kożuszków leukocyтарно-płytkowych (Michno, 2004)**

Krwinki płytkowe izolowano metodą wirowania różnicowego w temperaturze pokojowej. Kożuszek leukocyтарно-płytkowy przenoszono do probówek typu Falcon, zawierających cytrynian sodu o końcowym stężeniu 3,20% oraz bufor PBS (2,70 mM KCl; 1,20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,20 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM NaCl; 7,40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH=7,40), a następnie wirowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut z prędkością 100×g w wirówce 25 Jouan CT 1000 (Thermo Scientific, Gliwice, Polska). Następnie, znad osadu, złożonego z osadzonych erytrocytów i leukocytów, zbierano osocze bogatopłytkowe (PRP) i przenoszono do 15 ml probówek typu Falcon. Dodawano kwas cytrynowy (końcowe stężenie 0,30 mM) w celu odwracalnego zahamowania aktywności i metabolizmu płytek krwi, a następnie wirowano przez 15 minut z prędkością 100×g w wirówce MPW 223e (MPW-Instruments, Warszawa, Polska). Po odwirowaniu, oczyszczony nadsącz bogatopłytkowy przenoszono do świeżych probówek typu Falcon i wirowano przez 15 minut z prędkością 800×g.

Uzyskane osocze zawieszano w buforze Tyroda, zawierającym 150 mM NaCl; 5 mM HEPES; 0,55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anh; 7 mM NaHCO<sub>3</sub> anh; 2,70 mM KCl; 0,50 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM glukoza; pH=7,40, natomiast nadsącz odrzucono. Liczbę płytek krwi oceniono w hemocytometrze Superior (Marienfeld, Niemcy), po uprzednim zawieszeniu komórek w 1% roztworze siarczanu amonu.

#### **2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych**

Płytki krwi izolowano z krwi pełnej pobranej do probówek zawierających 3,20% cytrynian sodu metodą wirowania różnicowego w temperaturze pokojowej przez 15 minut z prędkością 100×g, w wirówce MPW 223e (MPW-Instruments, Warszawa, Polska). Osocze bogatopłytkowe przenoszono z nad warstwy osadzonych leukocytów i erytrocytów do czystych probówek, dodawano kwas cytrynowy (końcowe stężenie 0,30 mM) i wirowano przez 20 min z prędkością 800×g. Nadsącz w postaci osocza ubogopłytkowego (PPP) zebrano do probówek typu Eppendorf i zamrożono w temperaturze -20°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia fruktozaminy, natomiast uzyskane osocze bogatopłytkowe zawieszono w buforze Tyroda.

Krwinki płytkowe zawieszano w 1% roztworze siarczanu amonu, a ich liczbę oraz stopień zanieczyszczenia innymi parametrami morfologicznymi oceniono w hemocytometrze Superior (Marienfeld, Niemcy).

#### **2.4.3. Weryfikacja procedury izolacji krwinek płytkowych**

Procedura izolacji płytek krwi, opisana w podrozdziale „2.4.1. Izolacja płytek krwi z kożuszków leukocyarno-płytkowych” oraz „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, pozwoliła na uzyskanie zawiesiny komórek, minimalnie zanieczyszczonej pozostałymi elementami morfotycznymi (Tab. 1).

Tabela 1. Skład zawiesiny krwinek płytkowych otrzymanych metodą wirowań różnicowych w kożuszkach leukocyarno-płytkowych i krwi pełnej.

<b>Parametr</b>	<b>Kożuszki leukocyarno-płytkowe</b>	<b>Krwinki płytkowe izolowane z krwi pełnej</b>
<b>PLT (<math>\times 10^8/\text{ml}</math>)</b>	3,20 $\pm$ 0,02	2,90 $\pm$ 0,14
<b>WBC (<math>\times 10^8/\text{ml}</math>)</b>	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
<b>RBC (<math>\times 10^8/\text{ml}</math>)</b>	0,05 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 10 badań.

Liczba białych i czerwonych krwinek stanowiła odpowiednio 0,70 i 1,40% liczby krwinek płytkowych, wyizolowanych z próbek zawierających 3,20% cytrynian sodu. Dane te wskazują na znikomy stopień zanieczyszczenia płytek krwi innymi elementami morfotycznymi.

#### **2.4.4. Porównanie funkcji płytek krwi pochodzących z kożuszków leukocyarno-płytkowych i krwi pełnej**

Oceny funkcji krwinek płytkowych dokonano na podstawie porównania zdolności płytek krwi pochodzących z kożuszków leukocyarno-płytkowych i krwi pełnej do agregacji trombinowej (końcowe stężenie 0,10 JM/ml) i kolagenowej (końcowe stężenie 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Tab. 2).



Tabela 2. Porównanie agregacji płytek krwi izolowanych z kożuszków leukocytno-płytkowych i pełnej krwi.

<b>Parametr</b>	<b>Kożuszki leukocytno-płytkowe</b>	<b>Krwinki płytkowe izolowane z krwi pełnej</b>
<b>Agregacja (0,1 JM/ml trombina)</b>	81,70 ± 2,90%	79,90 ± 2,50%
<b>Agregacja (5 µg/ml kolagen)</b>	72,60 ± 2,40%	70,90 ± 2,50%

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 10 badań.

Nie wykazano różnic w procesie agregacji płytek krwi, aktywowanej zarówno trombiną (0,10 JM/ml), jak i kolagenem (5 µg/ml), pomiędzy analizowanym materiałem biologicznym różnego pochodzenia. Jest to zgodne z raportem Reddoch i wsp., w którym wykazano, iż morfologia krwinek płytkowych, izolowanych z kożuszków leukocytno-płytkowych, jak też ich zdolność do agregacji zostały zachowane nawet do piątego dnia od pobrania krwi od dawców i mogą być bezpiecznie przetaczane pacjentom [131, 132].

Dane te wskazują, że krwinki płytkowe, pochodzące z kożuszków leukocytno-płytkowych, stanowią cenny materiał do ustalania warunków prowadzonych doświadczeń.

## **2.5. Ocena parametrów laboratoryjnych**

Parametry laboratoryjne, wykorzystane do oceny stanu klinicznego pacjentów, zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, z zastosowaniem standardowych procedur analitycznych. Krew do badań była pobierana z żyły łokciowej, od osób będących na czczo, w godzinach porannych. Badanie morfologii krwi obwodowej wraz z oceną liczby płytek (PLT) i ich średnią objętością (MPV) wykonano na analizatorze hematologicznym HMX (Beckman-Coulter, Miami, Florida, USA).

Ocenę stężenia glukozy w osoczu krwi i profilu lipidowego dokonano przy użyciu komercyjnego zestawu, na analizatorze Architect 8000 (Abbott, Warszawa, Polska). Frakcję LDL lipidów wyliczono ze wzoru Friedewalda. Oznaczanie hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) przeprowadzono za pomocą zestawu komercyjnego Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, GMBH, Monachium, Niemcy) na aparacie Variant II Hemoglobin Testing System (Bio-Rad Laboratories, GMBH, Monachium, Niemcy).

### 2.5.1. Pomiar fruktozaminy

Fruktozamina stanowi frakcję całkowitej albuminy w surowicy krwi, która uległa glikacji. Ponieważ okres półtrwania albuminy wynosi około 20 dni, stężenie fruktozaminy odzwierciedla 3 tygodniowe retrospektywne zmiany stężenia glukozy we krwi.

Osocze ubogopłytkowe (PPP), przygotowano zgodnie z podrozdziałem: „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, a następnie postępowano zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu do oznaczania fruktozaminy firmy Biorbyt (Cambridge, Wielka Brytania). Test opiera się na bezpośredniej redukcji nitrotetraformazolu (NBT) do barwnego formazanu, w środowisku alkalicznym (pH=10,30). Natężenie barwy jest wprost proporcjonalne do stężenia fruktozaminy w próbce, której absorbancję odczytano w spektrofotometrze VICTOR 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer (Warszawa, Polska), przy długości fali 530 nm. Wyniki wyrażano w  $\mu\text{mol/l}$ , w odniesieniu do krzywej wzorcowej.

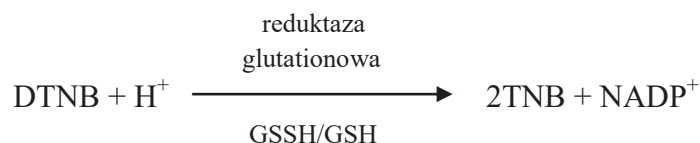
### 2.6. Oznaczanie glutationu całkowitego i zredukowanego (Akerboom i wsp. 1981)

Krwinki płytkowe, uzyskane z kożuszków leukocyarno-płytkowych (Patrz rozdział: „2.4.1. Izolacja płytek krwi z kożuszków leukocyarno-płytkowych”), zawieszono w buforze Tyroda, uzyskując stężenie końcowe  $5 \times 10^8$  płytek/ml, po czym inkubowano z analizowanymi związkami wanadu: (końcowe stężenie 0,50 mM) i  $\text{VCl}_3$  (końcowe stężenie 0,50 mM), przez 20 minut, w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Następnie próby denaturowano kwasem sulfosalicylowym (końcowe stężenia 5%), wytrząsano przez 15 minut w  $4^\circ\text{C}$  i wirowano przy  $3500 \times g$ , w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ . Uzyskany nadsącz przenoszono do probówek typu Eppendorf. Próby zobojętniano 2 M NaOH do pH=7,40. Środowisko do oznaczenia glutationu zawierało: 95 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,95 mM EDTA; 0,031 mg.ml DTNB; 0,115 JM reduktazy glutationowej.

Mieszanina reakcyjna do oznaczenia glutationu utlenionego nie zawierała reduktazy glutationowej (o końcowym stężeniu 0,115 JM). Próby inkubowano 5 minut, po czym dodawano 50  $\mu\text{l}$  NADPH (o końcowym stężeniu 48  $\mu\text{M}$ ) w celu rozpoczęcia reakcji.

Test opiera się na bezpośredniej redukcji NBT do barwnego formazanu. Natężenie barwy jest wprost proporcjonalne do stężenia glutationu w próbce, absorbancję której

odczytano w spektrofotometrze VICTOR 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer (Warszawa, Polska), przy długości fali 405 nm.



Wyniki odczytano w odniesieniu do krzywej wzorcowej, natomiast stężenie glutationu zredukowanego wyliczono jako różnicę glutationu całkowitego i utlenionego.

## 2.7. Adhezja płytek krwi (Roberts, 2009)

Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych” i zawieszano płytki w stężeniu końcowym  $3 \times 10^8$  płytek/ml. Pomiaru adhezji dokonano na płytkach 96-dołkowych, które były opłaszczane czynnikami adhezyjnymi aktywującymi płytki krwi w tym: kolagenem (końcowe stężenie 5  $\mu\text{g/ml}$ ) oraz fibrynogenem (końcowe stężenie 250  $\mu\text{g/ml}$ ) i inkubowane przez 24 godziny w temperaturze 4°C.

Kontrolę stanowiły dołki pokryte 100% surowicą bydlęcą (FBS, Fetal Bovine Serum). Po opłaszczeniu dołków płytek inkubacyjnych wybranymi czynnikami aktywującymi płytki krwi i przemyciem buforem PBS, dodawano 5% FBS i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w celu zablokowania niespecyficznego miejsc wiążących białko. Izolowane krwinki płytkowe preinkubowano przez 20 min w temperaturze 37°C z RGDS (końcowe stężenie 0,20 mM), czynnikiem zapobiegającym agregacji aktywowanych krwinek płytkowych. Następnie do preinkubowanej zawiesiny płytek krwi dodawano wybrane związki wanadu: BMOV (0,50 mM) i  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM). Tak przygotowaną zawiesinę płytek krwi nanoszono na opłaszczone 96-dołkowe płytki i inkubowano 30 minut w temperaturze 37°C. Po zakończonej inkubacji, płytki przepłukano buforem PBS, celem usunięcia krwinek płytkowych, które nie uległy adhezji. Następnie płytki krwi inkubowano w 150  $\mu\text{l}$  mieszaniny zawierającej bufor cytrynianowy (32 mM kwas cytrynowy, 68 mM cytrynian sodu, pH=5,40), Triton-X 100 (końcowe stężenie 0,10%) oraz fosforan p-nitrofenyłu (końcowe stężenie 5

mM), przez 1 godzinę, w warunkach bez dostępu światła. Po godzinie przerywano reakcję przez dodanie 100 µl NaOH (końcowe stężenie 2 M).

Intensywność żółtego zabarwienia prób, wprost proporcjonalna do aktywności fosfatazy kwaśnej, została odczytana spektrofotometrycznie, przy długości fali 405 nm, w aparacie VICTOR 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer (Warszawa, Polska). Dla każdego dwukrotnego oznaczenia prób wyliczono wartość średnią, od której odjęto absorbancję próby, inkubowanej w dołkach pokrytych 100% FBS, stanowiącej próbę ślepą.

Otrzymane wartości zostały wyrażone jako procent adhezji, gdzie wynik dla prób kontrolnych, nie inkubowanych ze związkami wanadu przedstawiono jako 100%. Uzyskane wyniki zostały przedstawione jako wartość średnia  $\pm$  standardowy błąd średniej.

## **2.8. Zmiana kształtu płytek krwi z zastosowaniem techniki fluorescencyjnej**

Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, uzyskując stężenie końcowe  $1 \times 10^7$  płytek/ml. Mikroskopowe szkiełka podstawowe opłaszczono kolagenem (końcowe stężenie 5 µg/ml), fibrynogenem (końcowe stężenie 250 µg/ml) i 100% FBS, stanowiącym kontrolę negatywną, następnie inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 4°C. Następnie szkiełka przepłukano buforem PBS. Niespecyficzne miejsca wiążące białko blokowano, inkubując płytki inkubacyjne z 5% FBS przez 30 minut w temperaturze pokojowej i ponownie płukano 4-krotnie w buforze PBS.

Krwinki płytkowe, inkubowano ze związkami wanadu BMOV (0,50 mM/ml) lub  $VCl_3$  (0,50 mM), przez 2 minuty, następnie nanoszono na przygotowane wcześniej szkiełka po 100 µl zawiesiny i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu szkiełka przemywano 3-krotnie buforem PBS, w celu odpłukania niezwiązanych krwinek płytkowych. Preparaty utrwalano 4% paraformaldehydem przez 15 minut, w temperaturze pokojowej, 3-krotnie przepłukano buforem PBS i dodano 100 µl Triton-X 100 (końcowe stężenie 0,30%). Po 5 min inkubacji w temp. pok. szkiełka ponownie przemyto 3-krotnie buforem PBS. Tak przygotowane preparaty mikroskopowe znakowano 100 µl falloidyną FITC (końcowe stężenie 10 µg/ml), inkubując przez 45 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Niezwiązany barwnik odpłukano buforem PBS, a preparaty utrwalono odczynnikami Histomount i zabezpieczono szkiełkiem nakrywkowym.

Agregaty płytkowe oceniano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego firmy Nikon (Precoptic Co, Warszawa, Polska, obiektyw 40x), wyposażonego w kamerę do wykonania zdjęć Digital Sight DS. 5Mc (Precoptic Co, Warszawa, Polska) oraz odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego IX83 firmy Olympus (Warszawa, Polska; obiektyw 40x), wyposażonego w kamerę DP27 (Olympus Optical Co, Japan).

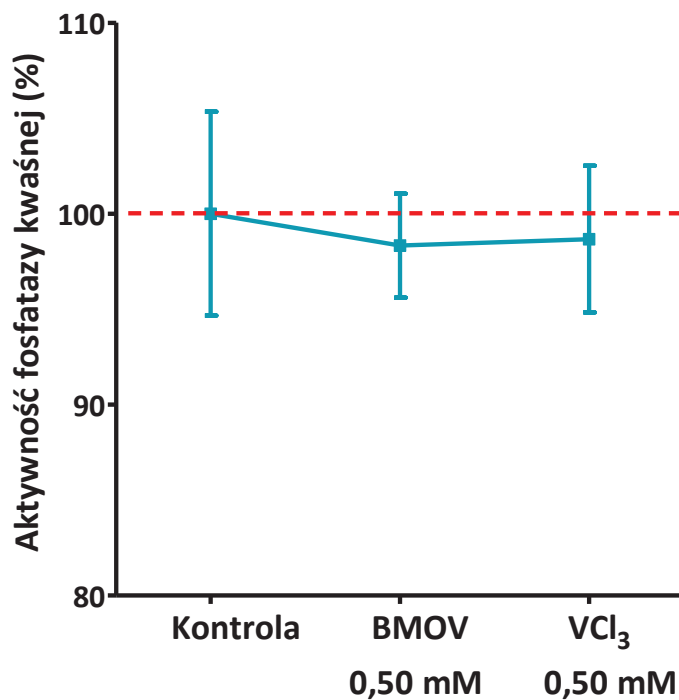
Wyniki analizowano na podstawie 10 zdjęć wykonanych w reprezentacyjnych częściach preparatów z pomocą programu Image J (Java, National Institutes of Health, America).

## **2.9. Tworzenie agregatów płytek krwi (Roberts, 2009)**

Pomiaru tworzenia agregatów krwinek płytkowych dokonano w analogiczny sposób, jak w punkcie „2.7. Adhezja płytek krwi (Roberts, 2009)”, z pominięciem preinkubacji z RGDS (końcowe stężenie 0,20 mM). Otrzymane wartości wyrażono jako procent tworzenia agregatów krwinek płytkowych, a wynik dla prób kontrolnych, nie inkubowanych ze związkami wanadu, przedstawiono jako 100%. Uzyskane wyniki zostały przedstawione jako wartość średnia  $\pm$  standardowy błąd średniej.

## **2.10. Wpływ związków wanadu na aktywność fosfatazy kwaśnej**

Istnieją również doniesienia na temat zdolności ortowanadanu sodu, w stężeniach 0,25-1 mM, do hamowania fosfatazy kwaśnej w mysich neuronach cholinergicznym neuroblastoma oraz ludzkich erytrocytach [133].



Rycina. 2. Wpływ związków wanadu na aktywność fosfatazy kwaśnej krwinek płytkowych.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 3 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były aktywowane na powierzchni kolagenu ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) w  $37^\circ\text{C}$  przez 30 min, lizowane Triton-X 100 (końcowe stężenie 0,10%), a następnie inkubowane w mieszaninie zawierającej bufor cytrynianowy (32 mM kwas cytrynowy, 68 mM cytrynian sodu,  $\text{pH}=5,40$ ), oraz fosforan p-nitrofenylu (końcowe stężenie 5 mM), przez 50 minut, w warunkach bez dostępu światła. Następnie dodawano do mieszaniny płytek 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM  $\text{VCl}_3$  na 10 min. Reakcję przerywano dodaniem 0,20 M NaOH.

Dlatego też, w niniejszej pracy oceniano bezpośredni wpływ 0,50 mM BMOV i 0,50 mM  $\text{VCl}_3$  na aktywność płytkowej fosfatazy kwaśnej (Ryc. 2).

## **2.11. Tworzenie agregatów płytek krwi z zastosowaniem techniki fluorescencyjnej**

Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, uzyskując stężenie końcowe  $3 \times 10^8$  płytek/ml. Dalej postępowano tak, jak w punkcie „2.9. Tworzenie agregatów płytek krwi (Roberts, 2009)”.

Agregaty płytkowe oceniano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego firmy Nikon (Precoptic Co, Warszawa, Polska, obiektyw 40x), wyposażonego w kamerę do wykonania zdjęć Digital Sight DS. 5Mc (Precoptic Co, Warszawa, Polska) oraz odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego IX83 firmy Olympus (Warszawa, Polska; obiektyw 40x), wyposażonego w kamerę DP27 (Olympus Optical Co, Japan).

Wyniki analizowano na podstawie 10 zdjęć wykonanych w reprezentacyjnych częściach preparatów z pomocą programu Image J (Java, National Institutes of Health, America).

## **2.12. Agregacja krwinek płytkowych (Born, 1962)**

Zdolność płytek krwi do agregacji oznaczono metodą turbidymetryczną, opartą na pomiarze zmian natężenia światła, przechodzącego przez zawiesinę płytek krwi, w agregometrze dwukanałowym APACT – Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer (Labor, Hamburg, Niemcy). Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, uzyskując stężenie końcowe  $3 \times 10^8$  płytek/ml. Pomiaru agregacji dokonano w komercyjnie dostępnych kuwetach agregacyjnych z mieszadłem magnetycznym, w końcowej objętości 300  $\mu$ l środowiska, zawierającego bufor Tyroda. Agregometr APACT kalibrowano względem powietrza, a następnie zawiesiny płytek krwi.

Krwinki płytkowe poddawano 2 minutowej preinkubacji w agregometrze, w temperaturze 37°C, z analizowanymi związkami wanadu: BMOV (0,50 mM) i  $VCl_3$  (0,50 mM), przy stałym mieszaniu zawiesiny mieszadłem magnetycznym z prędkością  $3500 \times g$ , po czym aktywowano trombiną (0,10 JM/ml) i rejestrowano zmiany natężenia światła przechodzącego przez kuwetę przez 12 minut. Wynik agregacji odczytywano co 2 minuty, uzyskane wyniki wyrażono jako procent światła przechodzącego przez badaną próbkę.

### 2.13. Oznaczanie ATP (Gorman i wsp. 2003)

Izolowane krwinki płytkowe pochodzące od osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą, zawieszano w buforze Tyroda, uzyskując stężenie końcowe  $3 \times 10^8$  płytek/ml. Następnie płytki krwi preinkubowano z peptydem antyagregacyjnym RGDS (końcowe stężenie 0,20 mM) przez 20 minut, w  $37^\circ\text{C}$ , dodawano, po czym inkubowano ze związkami wanadu: BMOV (końcowe stężenie 0,50 mM) i  $\text{VCl}_3$  (końcowe stężenie 0,50 mM), przez 20 minut, w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Tak przygotowane krwinki płytkowe aktywowano trombiną (końcowe stężenie 0,10 JM/ml) przez 5 minut w  $37^\circ\text{C}$ .

Następnie próby wirowano przez 3 minuty, przy  $3500 \times g$ , w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ . Uzyskany nadsącz przynoszono do świeżych probówek typu Eppendorf, natomiast osad zawieszano w wodzie destylowanej, w objętości analogicznej do odebranego nadsączu. Próby gotowano przez 3 minuty w temperaturze  $100^\circ\text{C}$ , następnie zamrażano w  $-20^\circ\text{C}$  i przechowywano nie dłużej niż miesiąc do momentu wykonania oznaczenia. W nadsączu oceniono ilość wydzielonego ATP, natomiast osad wykorzystano do pomiarów wewnątrzpłytkowej puli ATP.

Pomiaru dokonano w obecności lucyferyny, stanowiącej substrat dla enzymu lucyferazy. Enzym ten katalizuje reakcję adenylacji lucyferyny przez ATP, co prowadzi do powstania kwantu światła, mierzonego luminometrycznie w luminometrze Junior (Berthold Technology, Bad Wild-bad, Niemcy).



Środowisko inkubacyjne do pomiaru ATP ( $V_k=0,20$  ml) zawierało w końcowej objętości: 25 mmol/l Tris-HCl (pH=7,80), 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 0,10 mmol/l EDTA, 1,00 mmol/l, DTT, 0,50 mmol/l lucyferyny i 6 JM lucyferazy [EC 1.13.12.7]. Pomiar rozpoczynano od analizy emisji środowiska inkubacyjnego i prowadzono przez 10 sekund, następnie dodawano 0,02 ml badanej próby, ponawiając pomiar. Zawartość ATP w próbach odczytano na podstawie krzywej kalibracyjnej, a wynik został wyrażony w nmolach /mg białka.



#### **2.14. Oznaczanie zawartości tromboksanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) metodą ELISA**

Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, uzyskując stężenie końcowe  $5 \times 10^8$  płytek/ml. Następnie postępowano zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale: „2.13. Oznaczanie ATP (Gorman i wsp. 2003)”. Tak przygotowane próby wytrząsano z 5% TCA w temperaturze 4°C przez 5 minut, celem odbiałczenia, a następnie wirowano przez 3 minuty, przy  $3500 \times g$ , w temperaturze 4°C. Osad odrzucono, natomiast uzyskany nadsącz odbierano do świeżych probówek typu Eppendorf i zobojętniono poprzez dodanie NaOH (końcowe stężenie 0,20 M). Uzyskany nadsącz przenoszono na komercyjnie dostępną płytkę 96-dółkową i dalej postępowano zgodnie z protokołem, dołączonym do komercyjnie dostępnego testu na tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), w oparciu o metodę kompetycyjną ELISA. Zgodnie z zasadą reakcji kompetycji analog TXA<sub>2</sub>, znakowany biotyną, wiązał się z awidyną, sprzężoną z peroksydazą chrzanową, uniemożliwiając związanie wolnego TXA<sub>2</sub>. Obserwowano żółte zabarwienie prób, odwrotnie proporcjonalne do zawartości wolnego TXA<sub>2</sub> w płytkach krwi, które odczytano w spektrofotometrze VICTOR 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer (Warszawa, Polska), przy długości fali 450 nm. Wyniki odczytano na podstawie krzywej standardowej, wyrażonej w skali logarytmicznej i wyrażono w  $ng/10^8 PLT$ .

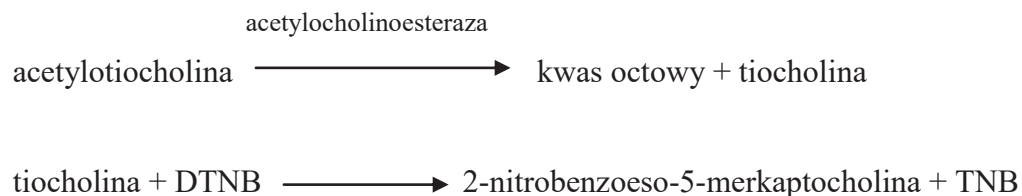
#### **2.15. Oznaczanie poziomu cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP) metodą ELISA**

Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, uzyskując stężenie końcowe  $3 \times 10^9$  płytek/ml. Następnie postępowano zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale: „2.13. Oznaczanie ATP (Gorman i wsp. 2003)”. Z tak przygotowanymi próbami postępowano jak w podrozdziale: „2.14. Oznaczanie zawartości tromboksanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) metodą ELISA”.

Uzyskany nadsącz nanoszono na komercyjnie dostępną płytkę 96-dółkową i dalej postępowano zgodnie z protokołem dołączonym do testu oznaczania cAMP, w oparciu o metodę kompetycyjną ELISA.

W reakcji tej acetylotiocholina, związana z analogiem cAMP ulegała przekształceniu do kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TNB), obserwowanego w postaci żółtego zabarwienia prób. Katalizatorem reakcji była acetylocholinoesteraza (AChE).

Zawartość TNB była odwrotnie proporcjonalna do zawartości wolnego cAMP w płytkach krwi, które odczytano spektrofotometrycznie, przy długości fali 405 nm, w aparacie VICTOR 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer (Warszawa, Polska).



Wyniki odczytano na podstawie krzywej standardowej, wyrażonej w skali logarytmicznej i wyrażono w pmolach/ $10^9$ PLT.

#### **2.16. Półilościowe oznaczanie ekspresji białek regulujących funkcje płytek krwi metodą Western Blot (WB)**

Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, uzyskując stężenie końcowe  $5 \times 10^8$  płytek/ml. Następnie płytki krwi preinkubowano z analizowanymi związkami wanadu: BMOV (0,50 mM) i  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) przez 2 minut, w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , po wcześniejszej preinkubacji w obecności peptydu antyagregacyjnego RGDS (0,20 mM) i aktywowano trombiną (0,10 JM/ml).

Do zawiesiny płytek krwi dodawano równą objętość buforu lizującego o następującym składzie: 50 mM Tris-HCL, 4% SDS, 20% glicerol i 5% merkaptoetanol, do uzyskania końcowego stężenia białka 0,50-3 mg/ml. Próby zamrażano i przechowywano w temp  $-20^\circ\text{C}$  do momentu oznaczenia (do 1-go miesiąca).

Przed rozdziałem elektroforetycznym próby rozmrażano, gotowano w  $100^\circ\text{C}$  przez 10 min i наносzono 10-60  $\mu\text{g}$  lizatów komórkowych i 10  $\mu\text{g}$  mieszaniny białek wzorcowych na ścieżki elektroforetyczne żelu. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy użyciu aparatu Mini-Protean III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) na poliakrylamidowym żelu gradientowym (4-20%, firmy Bio-Rad, Warszawa, Polska), który zanurzono w buforze rozwijającym, katodowo-anodowym, o składzie: 25 mmol/l Tris (pH=8,30), 192 mmoli/l glicyna i 0,10% dodecylsulfian sodu (SDS). Elektroforezę prowadzono w czasie 2 godzin, przy stałym

napięciu 90V, w temperaturze pokojowej, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Następnie przeprowadzono suchy elektrotransfer białek na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF), przy napięciu 20V, w aparacie iBlot Dry Blotting System (Life Technologies Co., USA), w czasie 8 minut i blokowano niespecyficzne miejsca wiążące białka na membranie, przez 90 min, w roztworze zawierającym 10% roztwór albuminy surowicy bydlęcej (BSA) w buforze TBS-T o składzie: 25 mmol/l Tris-HCl (pH=7,40), 134 mmol/l NaCl, 3 mmol/l KCl i 0,10% Tween 20. W kolejnym etapie membranę PVDF płukano przez 5 minut buforem TBS-T i inkubowano przez noc w 4°C z wybranymi monoklonalnymi lub poliklonalnymi mysimi i króliczymi przeciwciałami 1°, zawieszonymi w 2% BSA zgodnie z zaleceniami producentów, tj: anty-p-Akt (stężenie 1:1000), anty-p-VASP (stężenie 1:1000), anty- $\beta$ -tubulina, (w stężeniu 1:1000), anty-p-RhoA (stężenie 1:1000), anty-PKAc alpha/beta/gamma (stężenie 1:1000) i anty-p-MLC (stężenie 1:2500). Następnego dnia membranę PVDF czterokrotnie płukano po 15 minut w roztworze TBS-T i poddawano 2 godzinnej inkubacji, w temperaturze pokojowej, z odpowiednimi poliklonalnymi przeciwciałami 2°, skoniugowanymi z fosfatazą alkaliczną i zawieszonymi w 2% BSA TBS. Następnie błony 4-krotnie płukano po 15 minut w roztworze TBS-T. W końcowym etapie membranę poliwyliidenową inkubowano w buforze do detekcji fosfatazy alkalicznej, chronionym przed światłem, o składzie 100 mmol/l Tris-HCl (pH=9,50), 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0,33 mg/ml NBT i 0,17 mg/ml BCIP, do momentu pojawienia się prążków białek (około 15 minut).

### **2.17. Reaktywne związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (Panse i wsp., 1985)**

Po zakończeniu agregacji krwinek płytkowych z dodatkiem trombiny (0,10 JM/ml), w agregometrze, przez 12 minut, w temperaturze 37°C, próby odbiańczano przez dodanie 0,30 ml kwasu trichlorooctowego (stężenie końcowe 10%), następnie wytrząsano przez 20 minut w 4°C i wirowano przez 3 min, 3500×g, w temperaturze 4°C. Uzyskany nadsącz przenoszono do świeżych probówek typu Eppendorf, dodawano 200  $\mu$ l 2% kwasu tiobarbiturowego i gotowano przez 15 minut w temperaturze 100°C. Absorbancję mierzono metodą kolorymetryczną względem próby zerowej, na spektrofotometrze Shimadzu UV 1202 (Shimadzu Europa, Duisburg, Germany), przy długości fali  $\lambda$ =535 nm. Akumulację TBARS wyrażono jako nmole/12min/mg białka.

## **2.18. Białko całkowite (Bradford, 1976)**

Zawartość białka w płytkach krwi została oznaczona metodą według Bradford względem krzywej kalibracyjnej, w zakresie stężeń 20-50 mg/ml immunoglobuliny ludzkiej. Do 50  $\mu$ l wzorca bądź próby badanej dodano 4,50 ml roztworu błękitu brylantowego G-250, inkubowano 10 minut i mieszano. Absorbancję próbek odczytywano w spektrofotometrze Shimadzu UV 1202 (Shimadzu Europa, Duisburg, Niemcy), przy długości fali  $\lambda=578$  nm.

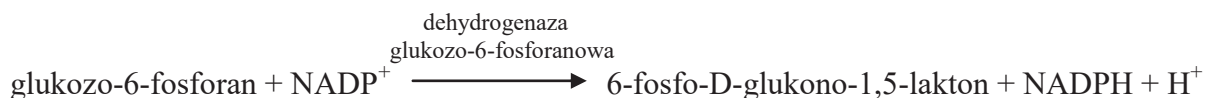
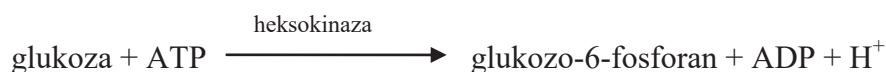
## **2.19. Oznaczanie aktywności enzymów krwinek płytkowych**

Krwinki płytkowe izolowano zgodnie z podrozdziałem „2.4.2. Izolacja płytek krwi pobranych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych”, uzyskując stężenie końcowe  $3 \times 10^8$  płytek/ml, po czym inkubowano z analizowanymi związkami wanadu: BMOV (0,50 mM) i  $VCl_3$  (0,50 mM) przez 2 minuty, w temperaturze  $37^\circ C$ , po wcześniejszej preinkubacji z RGDS (0,20 mM), a następnie aktywowano trombiną (0,10 JM/ml).

Tak przygotowaną zawiesinę płytek krwi rozcieńczano Tritonem X-100 (końcowe stężenie 0,20%) i inkubowano przez 10 minut, w temperaturze  $4^\circ C$ . Pomiar aktywności enzymów prowadzono w ciągu 2 godzin od zakończenia preparatyki, w temperaturze  $37^\circ C$ , na spektrofotometrze Ultrospect 3000 pro (Amersham-Pharmacia-Biotech, Cambridge, Wielka Brytania).

### **2.19.1. Heksokinaza (6-fosfotransferaza ATP-D-heksoza) [EC 2.7.1.1] (Skibowska, 2003)**

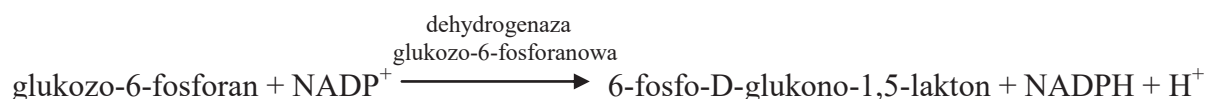
Do środowiska inkubacyjnego ( $V_k=0,60$  ml), zawierającego: 100 mmol/l bufor Tris HCl (pH=7,40), 5 mmol/l glukozę; 0,20 mmol/l  $MgCl_2$ ; 0,25 mmol/l NADPH; 1 J.M. GPDH, dodawano 0,10 ml badanej próby, zawierającej 0,05 mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem ATP (o końcowym stężeniu  $1,20 \mu M/l$ ) i mierzono wzrost absorbancji związany z redukcją NADPH, przy długości fali  $\lambda=340$  nm.



Aktywność enzymu została wyrażona w nanomolach zredukowanego NADP/min/mg białka, na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADP równej 6,22/mol/cm.

### 2.19.2. Dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa GPDH [EC 1.1.1.49] (Glock i Mc. Lean, 1953)

Do środowiska inkubacyjnego ( $V_k=0,70$  ml), zawierającego: 100 mmol/l bufor Tris HCl (pH=7,40), 4 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ; 0,50 mmol/l NADP dodawano 0,10 ml badanej próby, zawierającej 0,05 mg białka. Reakcję zapoczątkowano poprzez dodanie glukozo-6-fosforanu (o końcowym stężeniu 14  $\mu\text{M/l}$ ), przy długości fali  $\lambda=340$  nm obserwując przyrost absorbancji, wynikającej z redukcji NADP do NADPH, w procesie utleniania glukozo-6-fosforanu do 6-fosfoglukonianu.

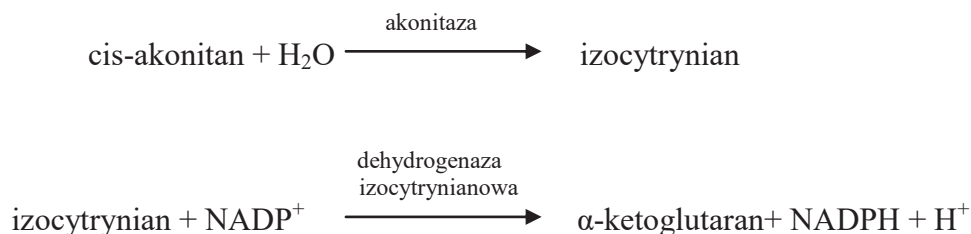


Aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej wyrażono w nanomolach zredukowanego NADP/min/mg białka, na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADP równej 6,22/mol/cm.

### 2.19.3. Akonitaza [EC 4.2.1.3] (De Villafranca i Haines, 1974)

Do środowiska inkubacyjnego ( $V_k=1,00$  ml), zawierającego: 50 mmol/l bufor Tris-HCl (pH=7,40), 2 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 0,10 mmol/l NADH i 1 J.M. dehydrogenazy

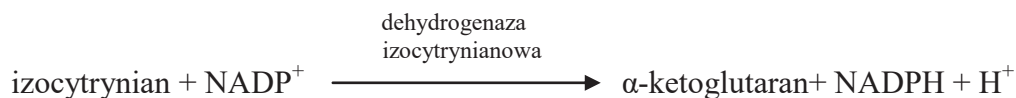
izocytrynianowej, dodano 0,10 ml badanej próby, zawierającej 0,20 mg białka. Reakcję zapoczątkowano dodaniem cis-akonitanu (o końcowym stężeniu 0,20 mM/l) i rejestrowano wzrost absorbancji w temperaturze 37°C, przy długości fali  $\lambda=340$  nm.



Aktywność enzymu wyrażono w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADP, która wynosi 6,22/mol/cm.

#### 2.19.4. Dehydrogenaza izocytrynianowa IDH [EC 1.1.1.42] (Plaut and Aogaichi, 1968)

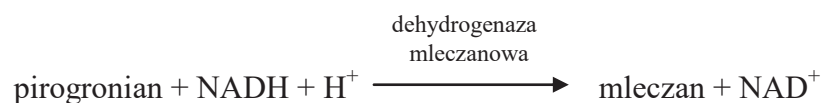
Do środowiska inkubacyjnego ( $V_k=0,60$  ml), zawierającego: 50 mmol/l bufor Tris-HCl (pH=7,40), 0,60 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 0,50 mmol/l NADP, dodano 0,10 ml badanej próby, zawierającej 0,05 mg białka i poddano wstępnej inkubacji przez 5 minut w temperaturze 37°C. Reakcja została zapoczątkowana dodaniem D,L-izocytrynianu (o końcowym stężeniu 0,10 mM/l) i była prowadzona w temperaturze 37°C przy długości fali  $\lambda=340$  nm.



Aktywność enzymu wyrażono w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADP, która wynosi 6,22/mol/cm.

### 2.19.5. Dehydrogenaza mleczanowa LDH [EC 1.1.1.27] (Koh and Choi,1987)

Do środowiska inkubacyjnego ( $V_k=1,00$  ml) zawierającego: 125 mmol/l bufor Tris-HCl (pH=7,40), 0,20 mmol/l NADH dodano 0,05 ml wody destylowanej oraz 0,15 ml badanej próby, zawierającej 0,05 mg białka i inkubowano wstępnie 5 minut w temperaturze 37°C. Reakcję rozpoczęto dodaniem pirogronianu sodu (o końcowym stężeniu 10 mM/l) i prowadzono w temperaturze 37°C, mierząc spadek absorbancji, wynikający z utleniania NADH przy długości fali  $\lambda=340$  nm.

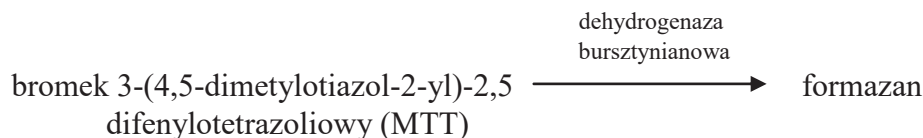


Wynik wyrażono w postaci nmoli utlenionego NADH/min/mg białka, na podstawie molowego współczynnika absorbancji dla NADH: 6,22/mol/cm.

Aktywność enzymu LDH była badana zarówno w płytkach krwi, jak również w supernatantach, powstałych po zwirowaniu badanych prób, w celu oceny toksyczności związków wanadu. Próbę reprezentującą stuprocentową śmiertelność krwinek poddano inkubacji z Tritonem X-100 (końcowe stężenie 0,20%) przez 15 minut, w temperaturze 4°C.

### 2.20. Dehydrogenaza bursztynianowa SDH [EC 1.3.5.1] (Wang, 2001)

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej można mierzyć pośrednio poprzez konwersję MTT do kryształów formazanu.



Izolowane krwinki, w stężeniu  $6 \times 10^7$  płytek/ml inkubowano z analizowanymi związkami wanadu: BMOV (0,50 mM) i  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) przez 2 minuty, w temperaturze 37°C, po wcześniejszej preinkubacji z RGDS (0,20 mM) i aktywacji trombiną (0,10 JM/ml).

Tak przygotowaną zawiesinę płytek krwi (200  $\mu$ l) przenoszono na płytkę hodowlaną 96 dołkową i dodawano 10  $\mu$ l MTT (o stężeniu wyjściowym 5 mg/ml). Płytki inkubowano przez 3h, w 37°C bez dostępu światła. Następnie dodawano 120  $\mu$ l roztworu solubilizującego (o składzie wyjściowym: 50% DMF i 20% SDS, pH=4,70). Całość inkubowano przez 12h w temperaturze 37°C. Płytki wytrząsano, a następnie oznaczano absorbancję spektrofotometrycznie, przy długości fali 570 nm. w aparacie VICTOR 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer (Warszawa, Polska). Dla każdego dwukrotnego oznaczenia prób wyliczono wartość średnią, od której odjęto absorbancję próby ślepej, mierzoną przy długości fali 690 nm. Otrzymane wartości wyrażono jako procent aktywności, a wynik dla prób kontrolnych, nie inkubowanych ze związkami wanadu, przedstawiono jako 100%. Uzyskane wyniki zostały przedstawione jako wartość średnia  $\pm$  standardowy błąd średniej.

## **2.21. Metody statystyczne**

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  standardowy błąd średniej (SEM). Do oceny różnic statystycznie znamiennej między grupą badaną a kontrolną zastosowano test t-studenta, a za najmniejszy znamienny poziom istotności różnicy uznano  $p < 0,05$ .

Dystrybucja wyników była oceniana testem Kolmogorova-Smirnova; wartość  $p > 0,10$  uznawano za wskaźnik normalnej dystrybucji. Współzależność pomiędzy analizowanymi parametrami oceniano przy pomocy współczynnika korelacji liniowej z użyciem testu Pearsona.

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu programu Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, USA).



### 3. CEL PRACY

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że związki wanadu mogą odgrywać istotną rolę w regulacji metabolizmu i funkcji płytek krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2.

W tym celu:

- Porównano wpływ związków wanadu na funkcje płytek krwi u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2.
- Zbadano wpływ związków wanadu: organicznego BMOV i nieorganicznego  $VCl_3$  na wybrane szlaki metaboliczne przekazywania sygnału oraz metabolizm energetyczny płytek krwi u osób zdrowych oraz pacjentów z cukrzycą typu 2.

## **4. WYNIKI**

### **4.1. Charakterystyka parametrów demograficznych i metabolicznych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą**

Uzyskane wyniki parametrów metabolicznych u pacjentów z cukrzycą oceniane były w oparciu o stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD), opublikowanego w 2018 roku, dotyczącego celów w leczeniu cukrzycy (Supl. 1). Analizując dane epidemiologiczne pacjentów z cukrzycą, należy brać pod uwagę jej złożony patomechanizm i długoletni rozwój, znacznie utrudniający oszacowanie momentu zachorowania [134, 135].

Średni wiek pacjentów z cukrzycą typu 2 był skorelowany odpowiednio z wiekiem osób zdrowych (Tab. 3).

Tabela 3. Parametry demograficzne i laboratoryjne gospodarki węglowodanowej i lipidowej osób zdrowych i pacjentów chorych na cukrzycę typu 2.

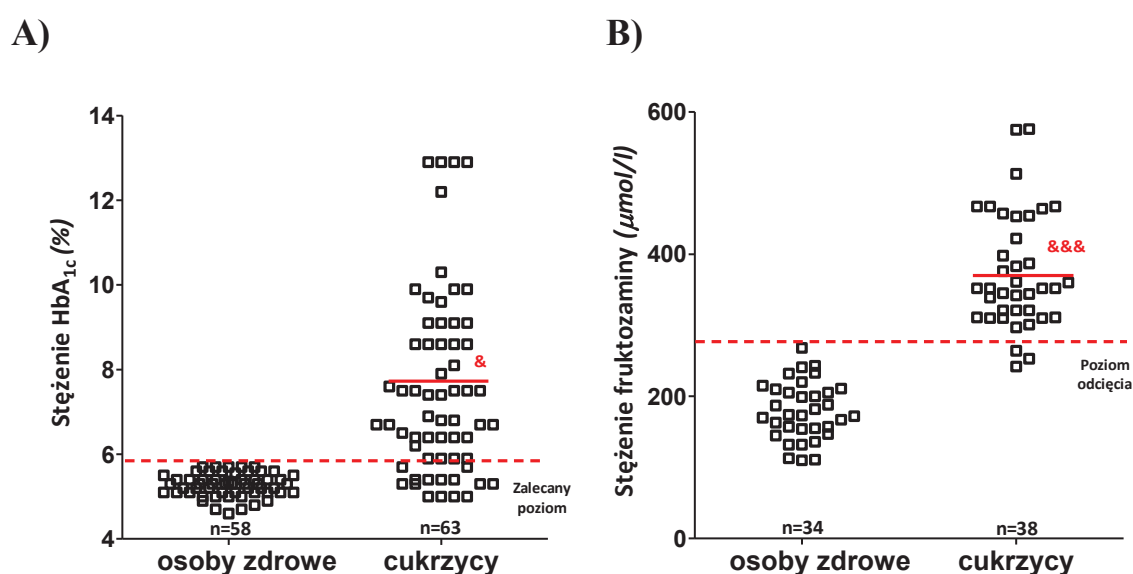
	<b>Osoby zdrowe</b>	<b>Pacjenci z cukrzycą typu 2</b>
<b>Parametr</b>	<b>K/M</b>	<b>K/M</b>
<b>Kobiety/Mężczyźni</b>		
<b>Liczba osób badanych</b>	27/31	31/32
<b>Wiek (lata)</b>	63,30±1,60	65,90±1,60
<b>Czas trwania choroby (lata)</b>	nie dotyczy	14,00±2,30
<b>Glukoza (mg/dl)</b>	89,90±3,40	135,40±7,10 <sup>&amp;&amp;</sup>
<b>Hemoglobina glikowana HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	≤ 5,90	7,70±0,60
<b>Fruktozamina (μmol/l)</b>	176,80±9,40	374,50±13,30 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
<b>Cholesterol całkowity (mg/dl)</b>	168,00±8,50	165,10±10,40
<b>Cholesterol LDL (mg/dl)</b>	81,70±5,10	85,30±8,50
<b>Cholesterol HDL (mg/dl)</b>	40,70±2,30	41,80±2,40
<b>Trójglicerydy (mg/dl)</b>	82,70±4,10	170,50±22,60 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z liczby badań podanej w tabeli. Wartość hemoglobiny glikowanej w grupach osób zdrowych jest zgodna z przyjętym zakresem wartości referencyjnych. Wartości znamienne różne od kontroli w grupie osób zdrowych: <sup>&&</sup>p<0,005, <sup>&&&</sup>p<0,001.

Stężenie glukozy w osoczu u pacjentów z cukrzycą było znamienne wyższe, o 51% (p<0,005), względem grupy osób zdrowych (Tab. 3). Jednocześnie, u 22% z cukrzycą (11% kobiet i 11% mężczyzn), stężenie glukozy we krwi było poniżej 99 mg/dl, zgodnie ze stanowiskiem Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego 2018 (Tab. 3, Supl. 1). Stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) przekroczyło cel ogólny o 31% (p<0,05), u chorych na cukrzycę, wg PTD dla HbA<sub>1c</sub>: ≤7,00% u 54% pacjentów z cukrzycą (27% kobiet i 27% mężczyzn) (Ryc. 3A, Supl. 1). Jednakże, zgodnie z obowiązującą obecnie zasadą

indywidualizacji celów terapii w cukrzycy, zakres wartości referencyjnych należy rozpatrywać w szerokim spektrum, a wynik każdego pacjenta oceniać indywidualnie (PTD 2018). Jednocześnie, u 10% osób zdrowych, wartości HbA<sub>1c</sub> przekroczyły poziom zalecany dla osób zdrowych (Ryc. 3A, Supl. 1).

Poziom odcięcia dla fruktozaminy, drugiego parametru retrospektywnej oceny glikemii, ustalono dla wartości 285  $\mu\text{mol/l}$  (Ryc. 3B). Stężenie fruktozaminy było znamienne wyższe o 112% ( $p < 0,001$ ), u chorych na cukrzycę, względem grupy osób zdrowych (Ryc. 3B, Supl. 1). Jednocześnie, poziom odcięcia dla fruktozaminy był przekroczony (Ryc. 3B) u 50% pacjentów z cukrzycą (25% kobiet i 25% mężczyzn) (Ryc. 3B).



Rycina 3. Dystrybucja parametrów retrospektywnej oceny glikemii: stężenia HbA<sub>1c</sub> we krwi (A) i fruktozaminy w osoczu (B) osób zdrowych i pacjentów chorych na cukrzycę.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z liczby badań, podanej w tabeli. Wartości znamienne różne od kontroli w grupie osób zdrowych: &  $p < 0,05$ , &&&  $p < 0,001$ .

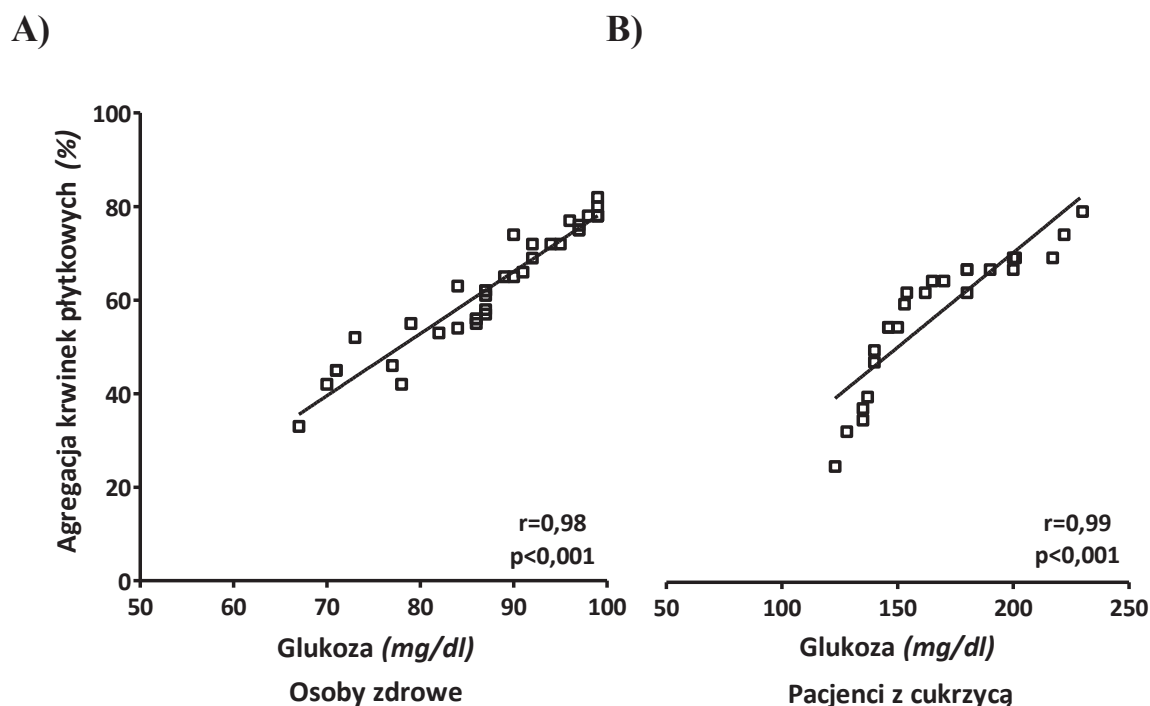
Stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji LDL i HDL były zbliżone w grupie osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą (Tab. 3). Stężenie trójglicerydów było natomiast znamienne wyższe o 106% ( $p < 0,001$ ) w grupie pacjentów z cukrzycą, wobec grupy osób zdrowych (Tab. 2).

Uwzględniając zakres wartości rekomendowanych przez PTD, prawidłowe wartości cholesterolu całkowitego (cholesterol całkowity:  $\leq 175$  mg/dl) obserwowano jedynie u 21% pacjentów z cukrzycą (10% kobiet i 11% mężczyzn) (Tab. 3, Supl. 1). Frakcja LDL, w zakresie wartości referencyjnych (cholesterol frakcja LDL:  $\leq 70$  mg/dl) występowała u 6% pacjentów z cukrzycą (3% kobiet i 3% mężczyzn) (Tab. 3, Supl. 1). Natomiast cholesterol

frakcji HDL w zakresie wartości referencyjnych (cholesterol frakcja HDL:  $\geq 40$  mg/dl) obserwowano jedynie u 25% pacjentów z cukrzycą (16% kobiet i 9% mężczyzn) (Tab. 3, Supl. 1). Wartości TG w zakresie wartości rekomendowanych wg PTD (TG:  $\leq 150$  mg/dl) obserwowano u 19% pacjentów z cukrzycą (8% kobiet i 11% mężczyzn) (Tab. 3, Supl. 1).

#### 4.2. Korelacja pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu, a agregacją płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą

Wykazano znamienne korelacje pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu a agregacją płytek krwi, indukowaną trombiną (0,10 JM/ml) w 12 minucie, u osób zdrowych oraz u pacjentów z cukrzycą (Ryc. 4A i B).



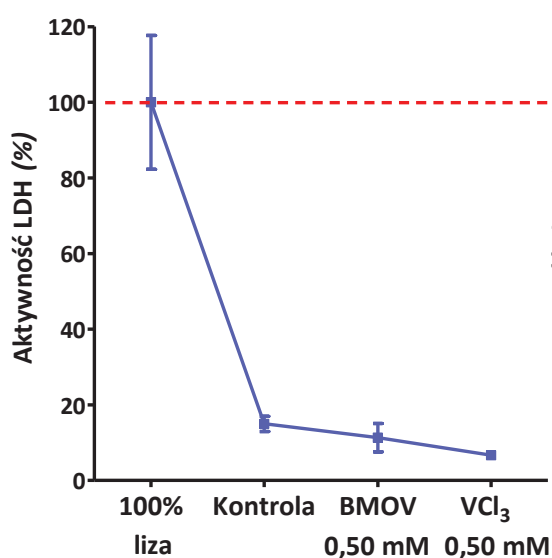
Rycina 4. Korelacja pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu, a agregacją krwinek płytkowych. Dane z Tab. 2, A i B-30 par pomiarów. Warunki doświadczalne jak w opisie Tabeli 1.

Znamienność korelacji pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu a agregacją płytek krwi (trombina 0,10 JM/ml) u osób zdrowych była podobna do tej u pacjentów z cukrzycą (Ryc. 4A i B).

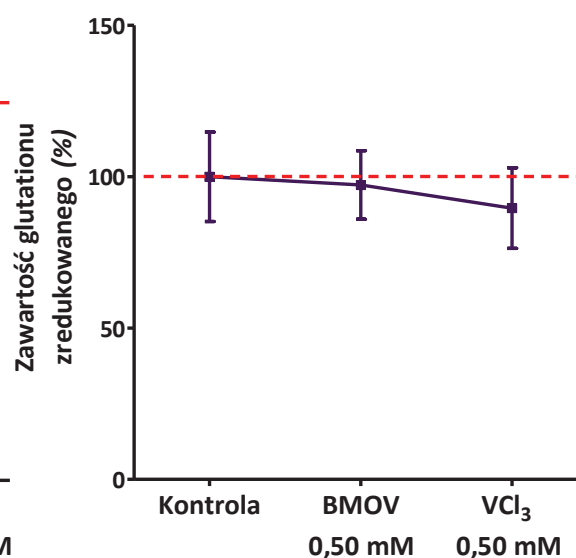
### 4.3. Toksyczność i wpływ związków wanadu na integralność błon płytek krwi

Szereg doniesień naukowych i badań epidemiologicznych wskazuje na toksyczne działanie wysokich stężeń związków wanadu na tkanki i narządy [94, 136]. Dlatego też, przed przystąpieniem do analizy wpływu wybranych stężeń związków wanadu na funkcję i metabolizm płytek krwi, oceniono ich potencjalną cytotoksyczność i zdolność do dezintegracji komórkowej. W tym celu inkubowano płytki krwi z wybranymi stężeniami związków wanadu i oceniano aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w środowisku pozakomórkowym, co umożliwia ocenę dezintegracji błon komórkowych wskutek ich uszkodzenia [137]. Dodatkowo analizowano aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (jako test MTT), który umożliwia ocenę aktywności cytotoksycznej związków *in vitro* (Wang 2001). Dokonano również oceny stężenia zredukowanego glutationu (GSH), stanowiącego jeden z istotnych i nieenzymatycznych czynników antyoksydacyjnych w komórkach [138].

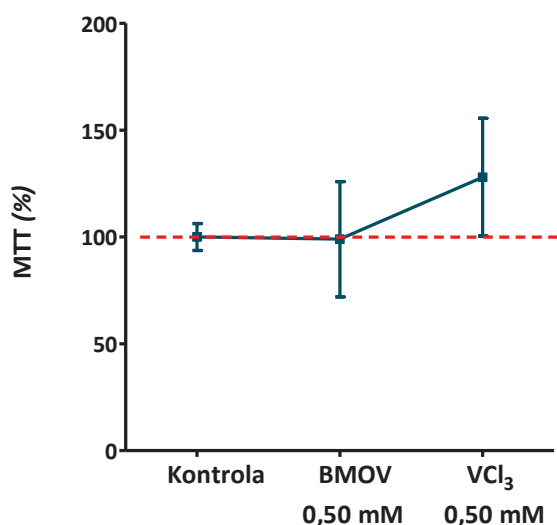
A)



B)



C)



Rycina. 5. Toksyczność i wpływ związków wanadu na integralność błon płytek krwi.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 3-5 powtórzeń. Kontrolę stanowiły krwinki płytkowe (A:  $3 \times 10^8$ /ml, B:  $3 \times 10^9$ /ml, C:  $6 \times 10^7$ /ml), preinkubowane w  $37^\circ\text{C}$ , przez 20 min z 0,20 mM RGDS i aktywowane 0,10 JM/ml trombiną. A) Aktywność LDH oceniono w odniesieniu do kontrolnej 100% lizy krwinek płytkowych z użyciem 0,20% Tritonu. B) Zawartość glutationu zredukowanego obliczono jako różnicę pomiędzy zawartością glutationu całkowitego i utlenionego. C) Aktywność całkowitego SDH (jako test MTT).

W warunkach kontrolnych, aktywność LDH w środowisku pozakomórkowym wynosiła  $96,60 \pm 17,70$  nmoli/min/mg białka, natomiast w przestrzeni wewnątrzkomórkowej wynosiła  $1701 \pm 129,80$  nmoli/min/mg białka. Tak więc, w warunkach kontrolnych aktywność LDH w środowisku pozakomórkowym nie przekraczała 5%.

Nie obserwowano różnic w aktywności LDH w nadsączu płytek krwi po zastosowaniu zarówno BMOV (0,50 mM), jak i  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM), w porównaniu do kontroli (Ryc. 5A).

Zawartość zredukowanego glutationu (GSH) w warunkach kontrolnych stanowiła  $52,10 \pm 12,90$  nmoli/ $10^9$  PLT (Ryc. 5B). Po inkubacji krwinek płytkowych z organicznym BMOV (0,50 mM) i nieorganicznym  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) zawartość zredukowanego GSH nie ulegała istotnej zmianie (Ryc. 5B).

Zarówno BMOV (0,50 mM), jak i  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) nie wpływały na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (test MTT), co świadczy, że użyte stężenia nie wykazują właściwości cytotoksycznych w stosunku do płytek krwi (Ryc. 5C).

Podsumowując, związki wanadu w użytych stężeniach nie wpływały na przeżywalność, potencjał antyoksydacyjny płytek krwi oraz integralność ich błony komórkowej (Ryc. 5).

#### **4.4. Wpływ związków wanadu na funkcje płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą**

Nieliczne dane literaturowe wskazują, że zarówno organiczne, jak i nieorganiczne związki wanadu mogą regulować funkcje krwinek płytkowych, jednakże mechanizm ich działania wciąż nie jest wyjaśniony [3, 91]. Niektórzy badacze sugerują, że przeciwzakrzepowe właściwości związków wanadu są związane z ich wpływem na aktywację procesów sygnalizacji wewnątrzpłytkowej, zależnej od cAMP/PKA i prowadzącej do hamowania aktywności płytek krwi [93].

W celu weryfikacji hipotezy, że związki wanadu hamują funkcje krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą, dokonano analizy adhezji, zmiany pola powierzchni płytek, tworzenia agregatów płytkowych na powierzchni kolagenu (5 µg/ml) i fibrynogenu (250 µg/ml) oraz agregacji po zastosowaniu trombiny (0,10 JM/ml), w obecności organicznego BMOV (0,50 mM) i nieorganicznego VCl<sub>3</sub> (0,50 mM).

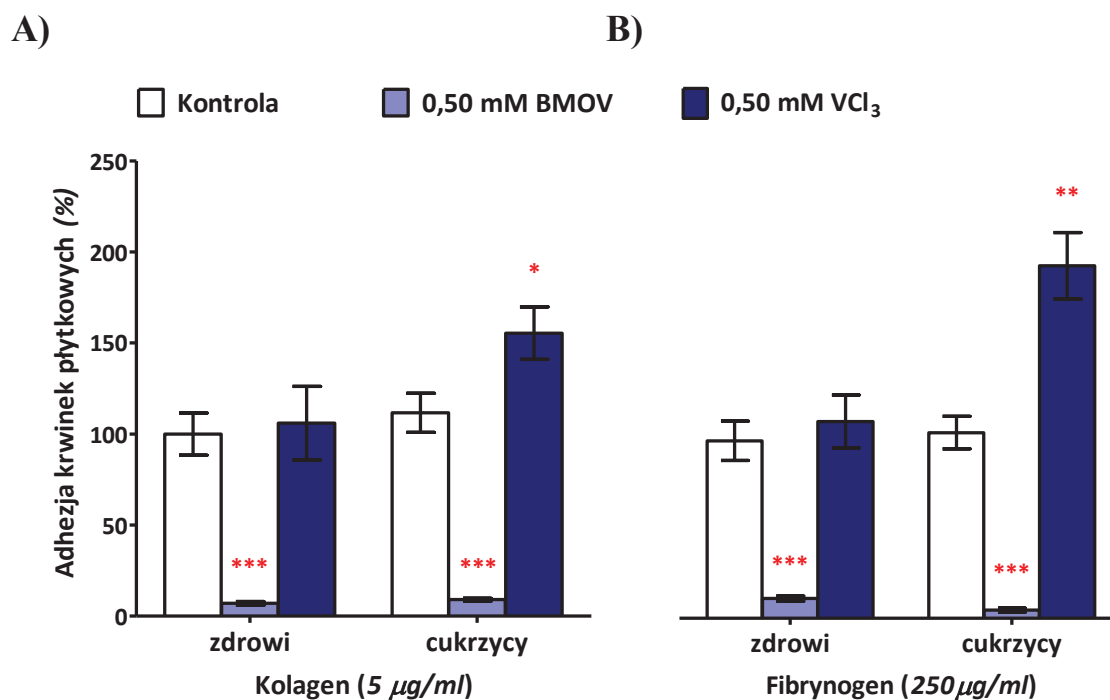
##### **4.4.1. Wpływ związków wanadu na adhezję krwinek płytkowych na powierzchni kolagenu i fibrynogenu u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2**

Adhezja krwinek płytkowych na powierzchni kolagenu (5 µg/ml) była podobna u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2 (Ryc. 6A).

BMOV (0,50 mM) w tych warunkach, hamował adhezję o 93% (p<0,001) w grupie osób zdrowych (Ryc. 6A). Nie obserwowano różnic w adhezji po zastosowaniu VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) w grupie osób zdrowych (Ryc. 6A).

U pacjentów z cukrzycą typu 2, BMOV (0,50 mM) redukował adhezję płytek krwi na powierzchni kolagenu o 92% (p<0,001) (Ryc. 6A). Z drugiej strony VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) zwiększał adhezję płytek krwi o 55% (p<0,05) u pacjentów z cukrzycą (Ryc. 6A).





Rycina 6. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na adhezję krwinek płytkowych na powierzchni kolagenu (5 µg/ml) i fibrynowu (250 µg/ml).

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 15-20 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były preinkubowane przez 20 min w 37°C z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane na powierzchni kolagenu (5 µg/ml) lub fibrynowu (250 µg/ml), w 37°C przez 30 min. Wartości znamienne różne od kontroli: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Adhezja krwinek płytkowych na powierzchni fibrynowu (250 µg/ml) u pacjentów z cukrzycą była porównywalna do adhezji krwinek płytkowych u osób zdrowych (Ryc. 6B).

BMOV (0,50 mM), hamował adhezję płytek krwi o 89% ( $p < 0,001$ ), w grupie osób zdrowych, względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 6B). Natomiast nie obserwowano różnic w adhezji po zastosowaniu VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) w grupie osób zdrowych, względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 6B).

W przypadku pacjentów z cukrzycą, BMOV (0,50 mM) redukował adhezję płytek krwi na powierzchni fibrynowu o 96% ( $p < 0,001$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 6B). Natomiast VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) zwiększał adhezję płytek krwi o 90% ( $p < 0,005$ ), w grupie pacjentów z cukrzycą, wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 6B).

Wyniki te wskazują, że na powierzchni kolagenu i fibrynowu organiczny BMOV redukował w podobnym stopniu adhezję płytek krwi zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą. Natomiast nieorganiczny VCl<sub>3</sub> nie miał wpływu na proces adhezji

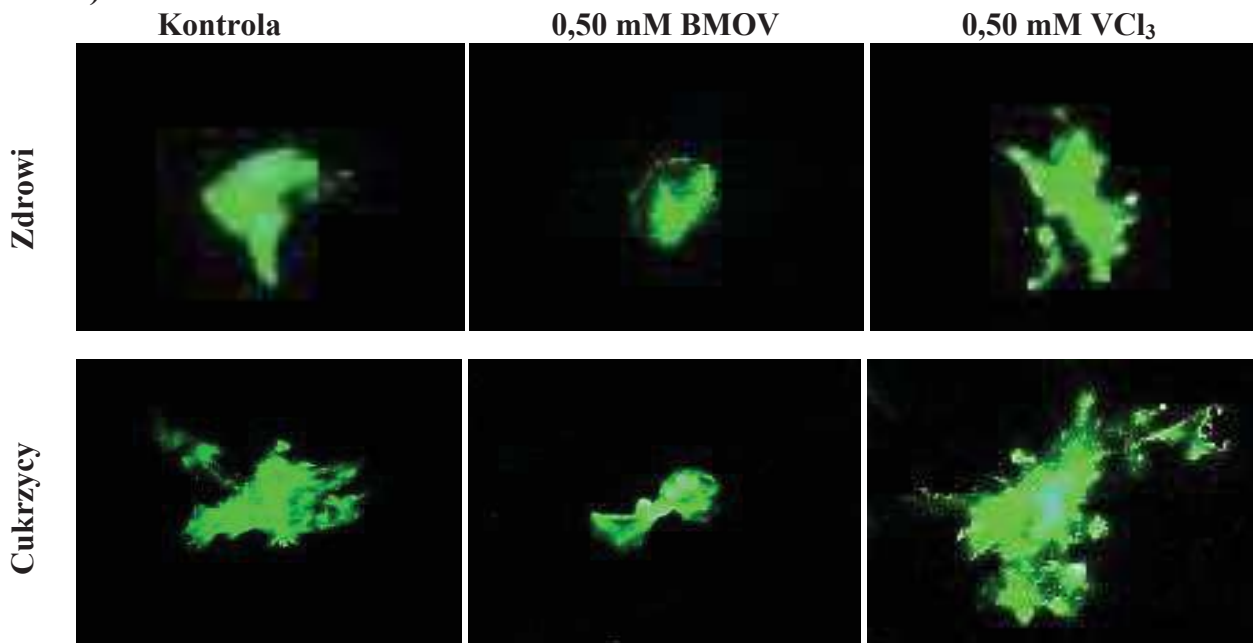
płytek krwi pochodzących od osób zdrowych, jednakże zwiększał adhezję płytek krwi w cukrzycy (Ryc. 6A i B).

#### 4.4.2. Wpływ związków wanadu na pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych kolagenem i fibrynogenem u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2

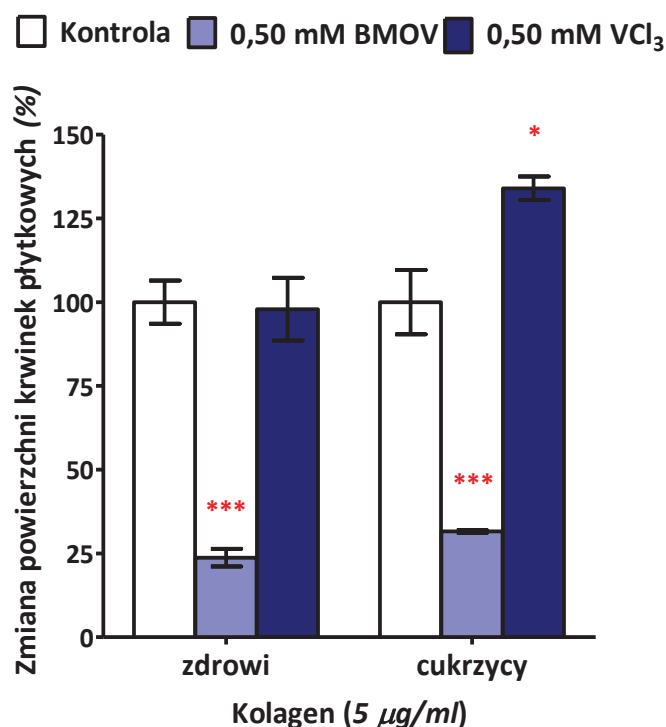
Pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych kolagenem (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) było porównywalne w obu badanych grupach.(Ryc. 7A i B).

BMOV (0,50 mM) istotnie hamował zdolność krwinek płytkowych do zmiany kształtu na powierzchni kolagenu (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). W tych warunkach obserwowano spadek pola powierzchni krwinek płytkowych u osób zdrowych o 76% ( $p < 0,001$ ) (Ryc. 7A i B). Zastosowanie  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) nie miało wpływu na zmianę pola powierzchni krwinek płytkowych, izolowanych od osób zdrowych (Ryc. 7A i B).

A)



B)



Ryc. 7. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych kolagenem (5µg/ml).

A) Krwinki płytkowe ( $1 \times 10^7$ /ml) były znakowane 10 µM falloidyną, w 37°C przez 30 min. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon ECLIPSE E200 (Precoptic Co, Warszawa, Polska) są reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń (powiększenie 100x).

B) Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 15-20 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $1 \times 10^7$ /ml) były inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane na powierzchni kolagenu (5 µg/ml) w 37°C przez 30 min. Wartości znamienne różne od kontroli: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

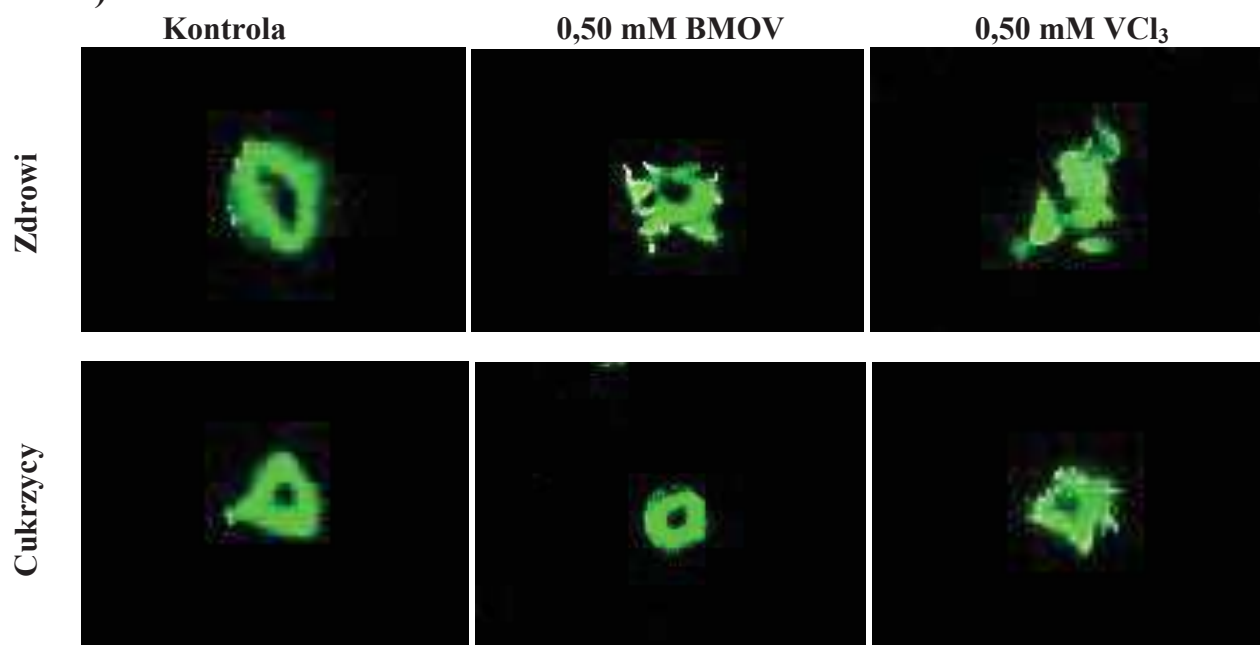
Podobnie u pacjentów z cukrzycą, na powierzchni kolagenu (5 µg/ml), BMOV (0,50 mM) istotnie hamował zdolność krwinek płytkowych do zmiany kształtu o 68% ( $p < 0,001$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 7A i B). Jednocześnie, VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) istotnie nasilał zdolność krwinek płytkowych do zmiany kształtu o 33% ( $p < 0,05$ ) w grupie pacjentów z cukrzycą (Ryc. 7A i B).

Pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych fibrynogenem (250 µg/ml) była porównywalne w grupie osób zdrowych oraz osób z cukrzycą (Ryc. 8A i B).

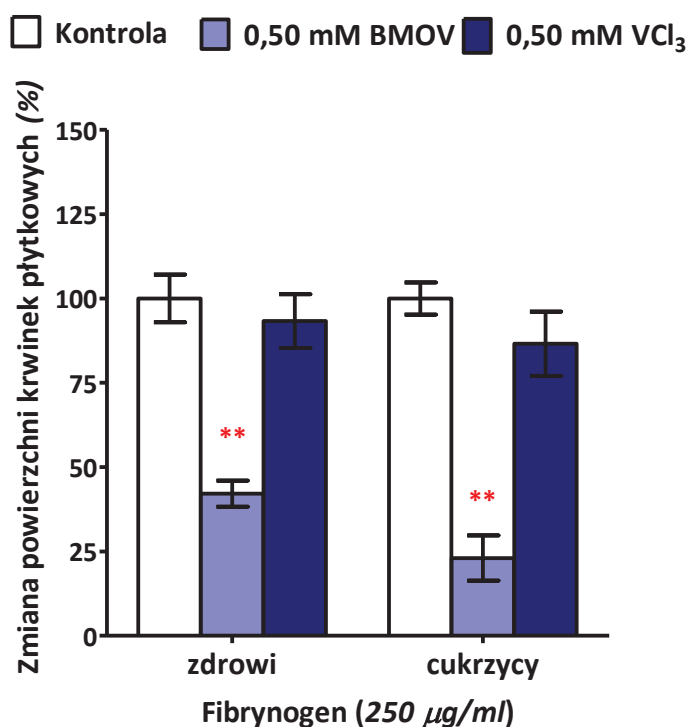
W tych warunkach doświadczalnych, BMOV (0,50 mM) istotnie zmniejszał pole powierzchni krwinek płytkowych u osób zdrowych o 58% ( $p < 0,005$ ), względem kontroli bez

związków wanadu (Ryc. 8A i B). Natomiast  $VCl_3$  (0,50 mM) w tych warunkach nie wpływał na zmianę pola powierzchni krwinek płytkowych osób zdrowych (Ryc. 8A i B).

A)



B)



Rycina 8. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na pole powierzchni krwinek płytkowych, aktywowanych fibrynogenem (250 µg/ml).

(A) Krwinki płytkowe ( $1 \times 10^7/\text{ml}$ ) były znakowane 10 µM falloidyną, w 37°C przez 30 min. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon ECLIPSE E200 (Precoptic Co, Warszawa, Polska) są reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń (powiększenie 100x).

(B) Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 15-20 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $1 \times 10^7/\text{ml}$ ) były inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane na powierzchni fibrynogenu (250 µg/ml) w 37°C przez 30 min. Wartości znacznie różne od kontroli: \*\* $p < 0,005$ .

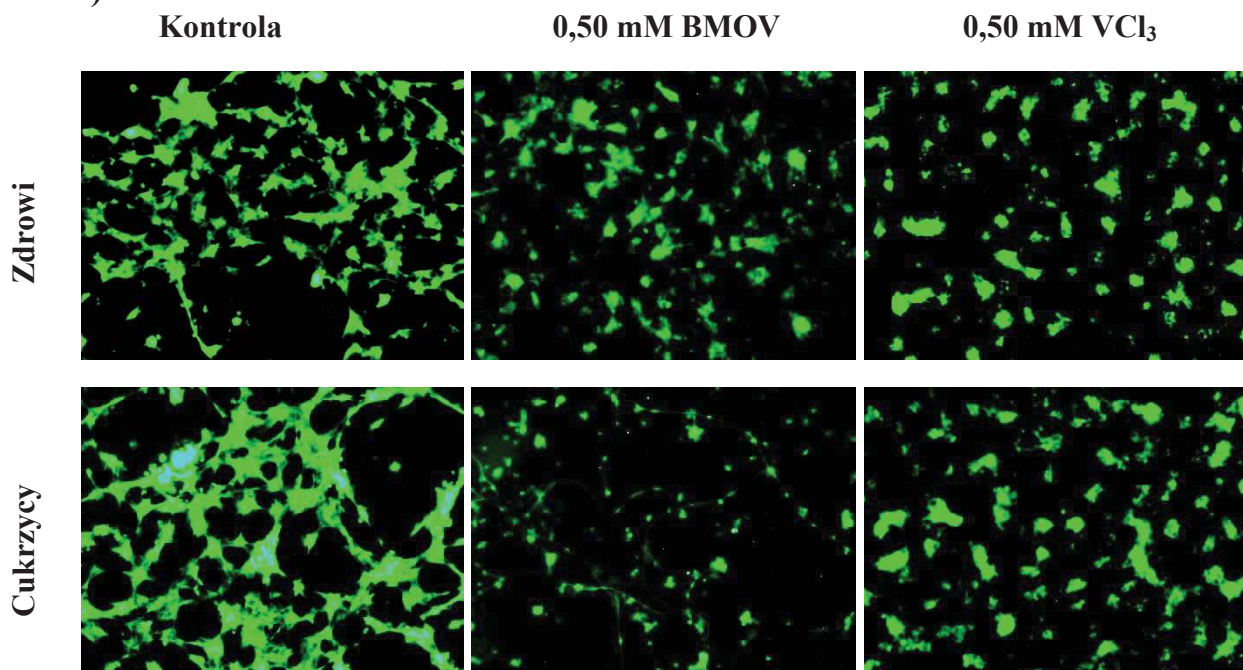
Podobnie, u pacjentów z cukrzycą typu 2, BMOV (0,50 mM) istotnie zmniejszył pole powierzchni krwinek płytkowych o 77% ( $p < 0,001$ ) (Ryc. 8A i B). Natomiast VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) nie wykazał wpływu na zmianę pola powierzchni krwinek płytkowych u tych pacjentów (Ryc. 8A i B).

#### 4.4.3. Wpływ związków wanadu na tworzenie agregatów krwinek płytkowych na powierzchni kolagenu i fibrynogenu u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą

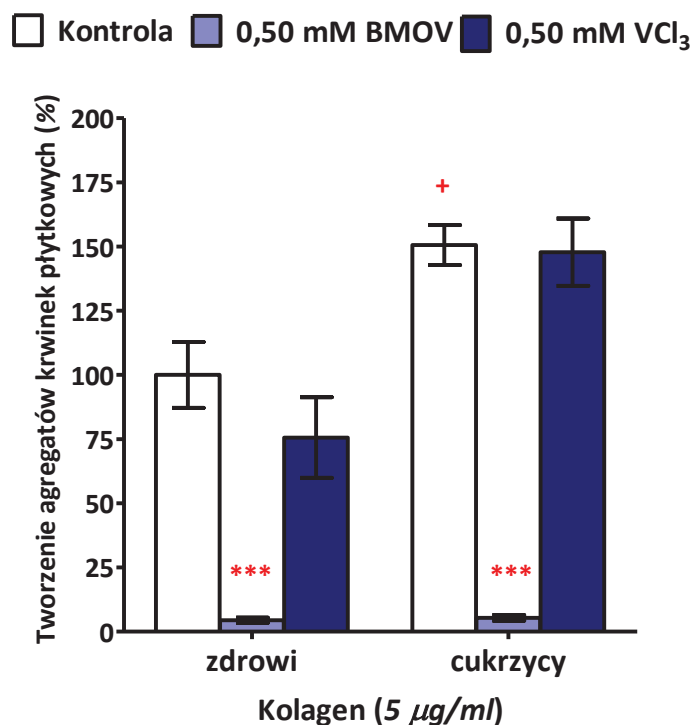
Tworzenie agregatów płytkowych na powierzchni kolagenu (5  $\mu\text{g/ml}$ ) u pacjentów z cukrzycą było większe o 51% ( $p < 0,05$ ) względem osób zdrowych (Ryc. 9A i B).

BMOV (0,50 mM) istotnie redukował zdolność krwinek płytkowych osób zdrowych do tworzenia agregatów płytkowych 96% ( $p < 0,001$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 9A i B). Nie obserwowano wpływu  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) na tworzenia agregatów płytkowych u osób zdrowych (Ryc. 9A i B).

A)



B)



Rycina 9. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na tworzenie agregatów płytkowych na powierzchni kolagenu (5 µg/ml).

(A) Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8/\text{ml}$ ) były znakowane 10 µM falloidyną, w 37°C przez 30 min. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon ECLIPSE E200 (Precoptic Co, Warszawa, Polska) są reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń (powiększenie 20x).

(B) Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 15-20 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8/\text{ml}$ ) były inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane na powierzchni kolagenu (5 µg/ml) w 37°C przez 30 min. Wartości znamienne różne od kontroli: \*\*\* $p < 0,001$ . Wartości znamienne różne od grupy osób zdrowych: <sup>+</sup> $p < 0,05$ .

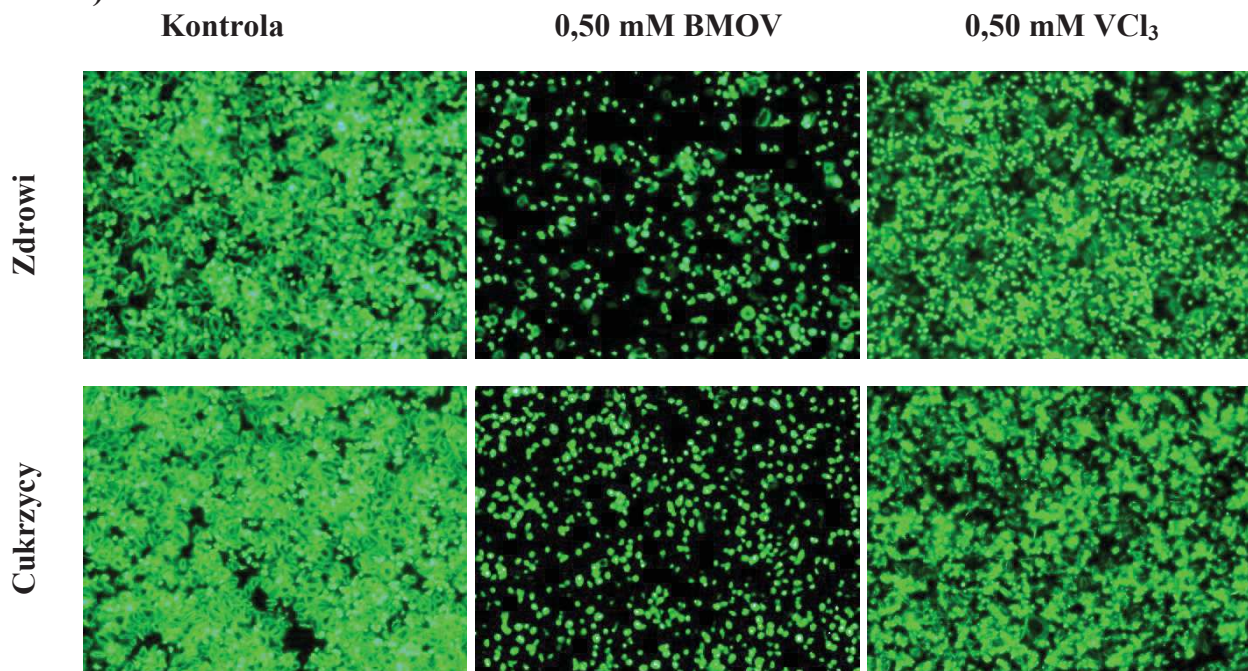
BMOV (0,50 mM) zmniejszał również zdolność krwinek płytkowych, izolowanych od pacjentów z cukrzycą, do tworzenia agregatów na powierzchni kolagenu (5 µg/ml), 97% ( $p < 0,001$ ) (Ryc. 9A i B). Natomiast VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) nie miał wpływu na tworzenie agregatów krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą (Ryc. 9A i B).

Wyniki te wskazują, że BMOV silniej redukowało tworzenie agregatów na powierzchni kolagenu oraz liczbę płytek krwi, zaangażowanych w tworzenie tych agregatów u pacjentów z cukrzycą. (Ryc. 9A i B). Jednocześnie, w tych samych warunkach doświadczalnych, VCl<sub>3</sub> nie miał istotnego wpływu na tworzenie agregatów płytek krwi u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą. Jednakże wielkość agregatów płytek krwi i połączeń między nimi, po zastosowaniu VCl<sub>3</sub> uległa redukcji, zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą (Ryc. 9A i B).

Agregacja krwinek płytkowych na powierzchni fibrynogenu (250  $\mu\text{g/ml}$ ) była wyższa u pacjentów z cukrzycą o 53% ( $p < 0,05$ ), względem kontroli osób zdrowych (Ryc. 10A i B).

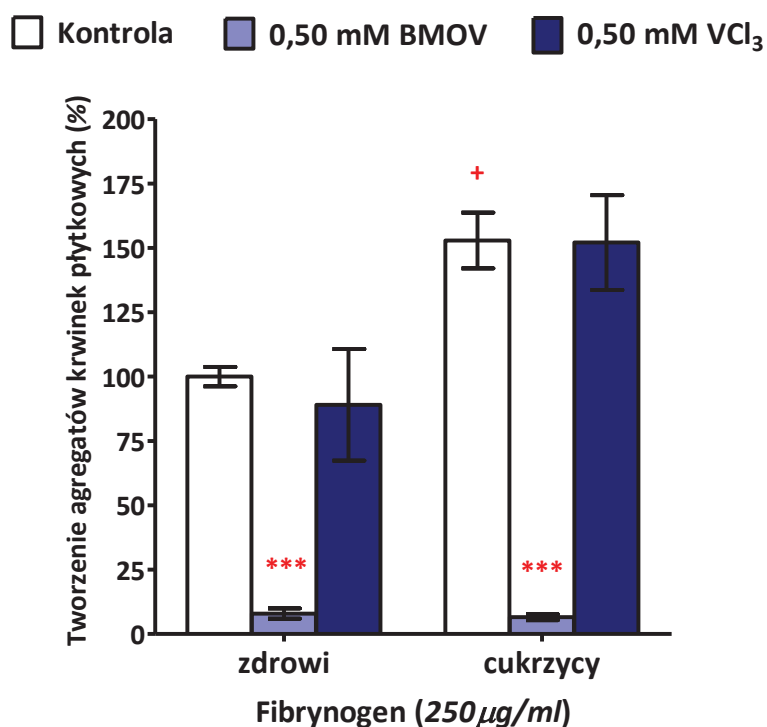
W tych samych warunkach doświadczalnych, BMOV (0,50 mM) istotnie redukował zdolności krwinek płytkowych osób zdrowych do tworzenia agregatów płytkowych o 92% ( $p < 0,001$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 10A i B).  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) nie miał wpływu na tworzenie agregatów płytkowych zarówno u osób zdrowych, wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 10A i B).

A)





B)



Rycina 10. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na tworzenie agregatów płytkowych na powierzchni fibrynogenu (250 µg/ml).

(A) przedstawione wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 10 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były znakowane 10 µM falloidyną, w 37°C przez 30 min. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon ECLIPSE E200 (Precoptic Co, Warszawa, Polska) są reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń (powiększenie 20x).

(B) Przedstawione wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 15-20 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane na powierzchni fibrynogenu (250 µg/ml) w 37°C przez 30 min. Wartości znacznie różne od kontroli: \*\*\* $p < 0,001$ . Wartości znacznie różne od grupy osób zdrowych: † $p < 0,05$ .

U pacjentów z cukrzycą, BMOV (0,50 mM) istotnie hamował tworzenie agregatów płytkowych na powierzchni fibrynogenu (250 µg/ml) o 96% ( $p < 0,001$ ) (Ryc. 10A i B). W tych samych warunkach, zastosowanie VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) nie miało wpływu na tworzenie agregatów krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą (Ryc. 10A i B).

Podsumowując, BMOV w podobnym stopniu redukuje tworzenie agregatów płytkowych na powierzchni kolagenu i fibrynogenu u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą. Natomiast VCl<sub>3</sub> nie wpływał na agregację płytek krwi zarówno aktywowanych kolagenem jak i fibrynogenem w obu badanych grupach.

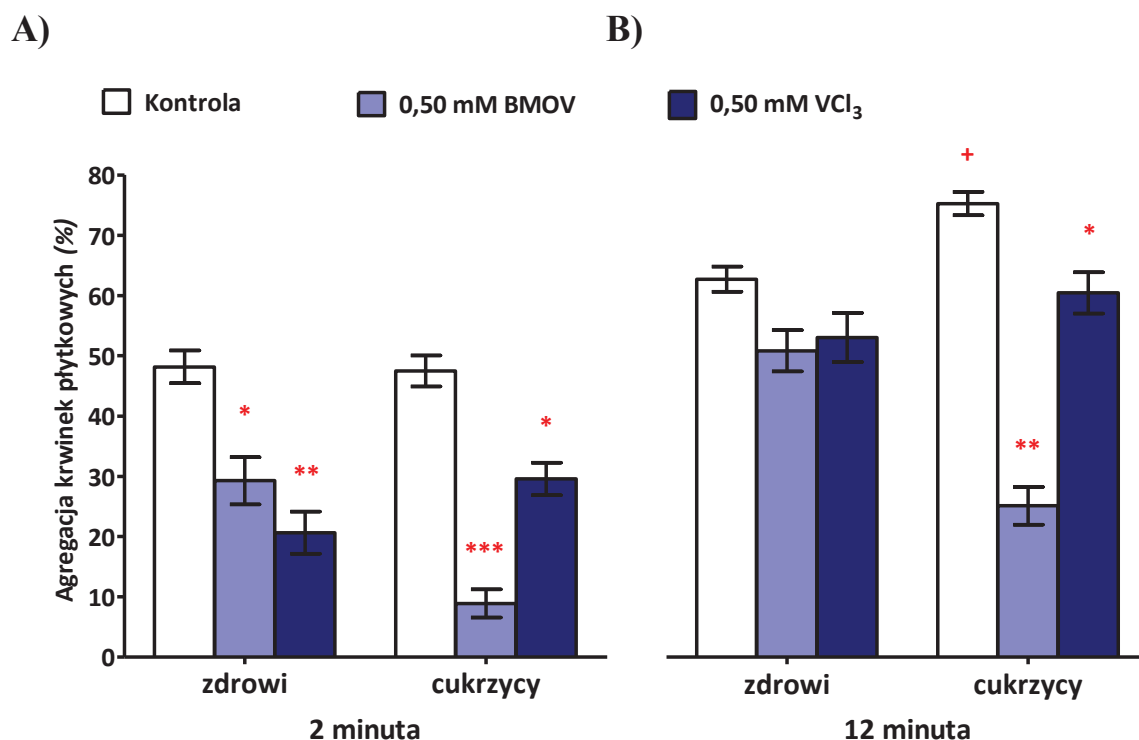
#### **4.4.4. Wpływ związków wanadu na agregację krwinek płytkowych indukowaną trombiną u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2**

W początkowej, 2 minucie agregacji indukowanej trombiną (0,10 JM/ml), agregacja krwinek płytkowych była podobna w grupie osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2 (Ryc. 11).

Organiczny BMOV (0,50 mM) hamował agregację płytek krwi, izolowanych od osób zdrowych o 39% ( $p < 0,05$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 11A). W tych samych warunkach, nieorganiczny  $VCl_3$  (0,50 mM) redukował agregację płytek krwi, izolowanych od osób zdrowych o 57% ( $p < 0,005$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 11A).

Natomiast u pacjentów z cukrzycą organiczny BMOV (0,50 mM) hamował agregację płytek krwi (trombina 0,10 JM/ml) o 81% ( $p < 0,001$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 11A).  $VCl_3$  (0,50 mM) redukował agregację płytek krwi indukowaną trombiną (0,10 JM/ml) w grupie pacjentów z cukrzycą o 38% ( $p < 0,05$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 11A).

Wyniki te wskazują, że w początkowej fazie agregacji (2 min) BMOV (0,50 mM) silniej, zaś  $VCl_3$  (0,50 mM) słabiej, redukowały agregację płytek krwi u pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 11A).



Rycina 11. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na agregację krwinek płytkowych aktywowanych trombiną, w 2 minucie – A i w 12 minucie – B.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 21-37 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znamienne różne od kontroli: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Wartości znamienne różne od grupy osób zdrowych: <sup>+</sup> $p < 0,05$ .

W końcowym etapie agregacji (12 min) indukowanej trombiną (0,1 IU/ml), obserwowano znamienne wyższą agregację u pacjentów z cukrzycą typu 2 o 20% ( $p < 0,05$ ), względem grupy osób zdrowych (Ryc. 11).

Zarówno BMOV (0,5 mM), jak i VCl<sub>3</sub> (0,5 mM) nie miały wpływu na agregację płytek krwi (trombina 0,1 JM/ml) u osób zdrowych (Ryc. 11B).

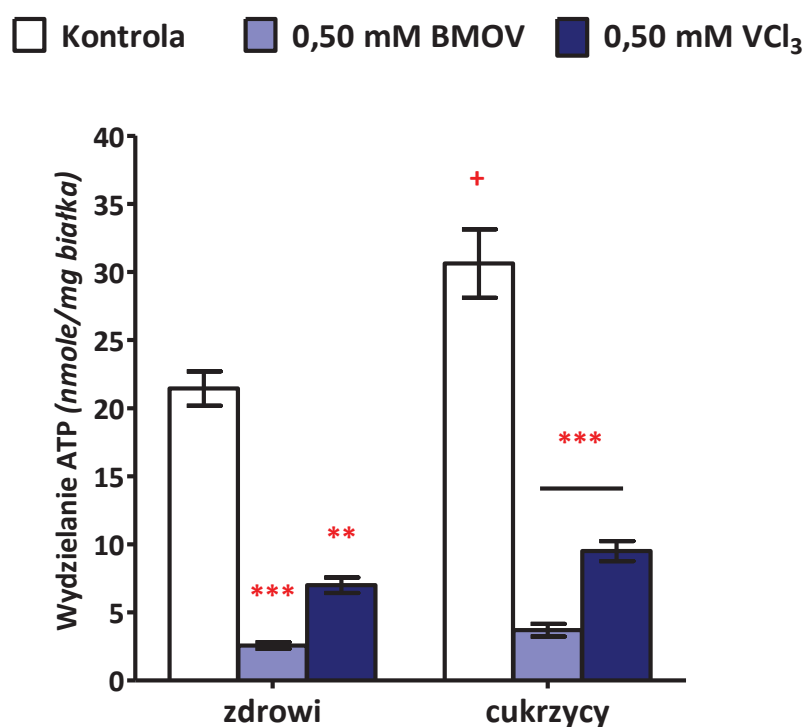
Z drugiej jednak strony, BMOV (0,5 mM) redukował agregację indukowaną trombiną (0,1 JM/ml) w 12 minucie w grupie pacjentów z cukrzycą o 67% ( $p < 0,005$ ), zaś VCl<sub>3</sub> (0,5 mM) zmniejszył agregację płytek krwi w grupie pacjentów z cukrzycą o 21% ( $p < 0,05$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 11B).

Zastosowane związki wanadu silniej redukowały agregację indukowaną trombiną w płytkach osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą w początkowej fazie agregacji w porównaniu do fazy końcowej. Równocześnie organiczny BMOV silniej hamował agregację w płytkach pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do nieorganicznego VCl<sub>3</sub>.

#### 4.5. Wpływ związków wanadu na wydzielanie ATP w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2

Wydzielanie ATP z ziarnistości płytkowych, związane z etapem reorganizacji cytoszkieletu nasila się w warunkach hiperglikemii [21, 62].

Aktywacja krwinek płytkowych, indukowana trombiną (0,10 JM/ml), powodowała zwiększenie wydzielanie ATP z płytek krwi pacjentów z cukrzycą typu 2 o 43% ( $p < 0,05$ ), względem kontroli osób zdrowych (Ryc. 12).



Rycina 12. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na wydzielanie ATP w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 10-15 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były preinkubowane przez 20 min w 37°C z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znamienne różne od kontroli: \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Wartości znamienne różne od grupy osób zdrowych: + $p < 0,05$ .

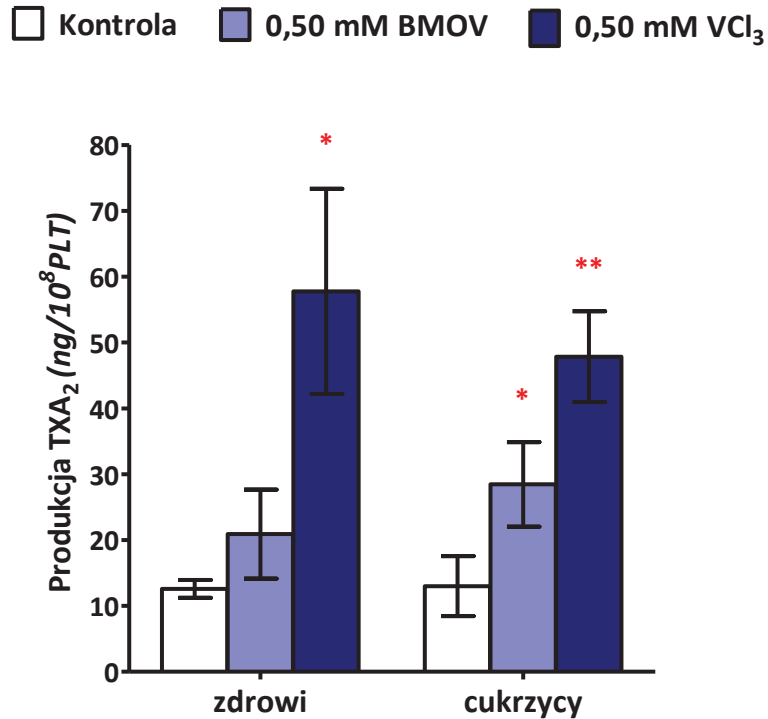
BMOV (0,50 mM) istotnie zmniejszał wydzielanie ATP w płytkach krwi osób zdrowych o 88% ( $p < 0,001$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 12). Podobnie, VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) zmniejszył degranulację ATP z krwinek płytkowych w grupie osób zdrowych o 67% ( $p < 0,005$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 12).

W podobnym stopniu, BMOV (0,50 mM) hamował uwalnianie ATP z aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą o 88% ( $p < 0,001$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Ryc. 12).  $VCl_3$  (0,50 mM) hamował wydzielanie ATP z aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytek krwi u pacjentów z cukrzycą o 71% ( $p < 0,001$ ), w porównaniu do kontroli bez związków wanadu (Ryc. 12).

Reasumując, związki wanadu w podobnym stopniu redukowały wydzielanie ATP w aktywowanych płytkach krwi osób z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 12).

#### **4.5.1. Wpływ związków wanadu na wydzielanie $TXA_2$ w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą**

Tromboksan  $A_2$  ( $TXA_2$ ) powstaje w płytkach krwi w szlaku przemian kwasu arachidonowego, przy udziale  $PLA_2$  [16]. Z względu na zaangażowanie  $TXA_2$  w aktywację procesu agregacji płytek krwi, przeanalizowano wpływ związków wanadu na produkcję  $TXA_2$  [16, 56].



Rycina 13. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na produkcję TXA<sub>2</sub> w płytkach krwi u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 6-7 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $5 \times 10^8$ /ml) były preinkubowane przez 20 min w 37°C z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znacznie różne od kontroli: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ .

W aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi pacjentów z cukrzycą typu 2, produkcja TXA<sub>2</sub> była porównywalna z kontrolą osób zdrowych (Ryc. 13).

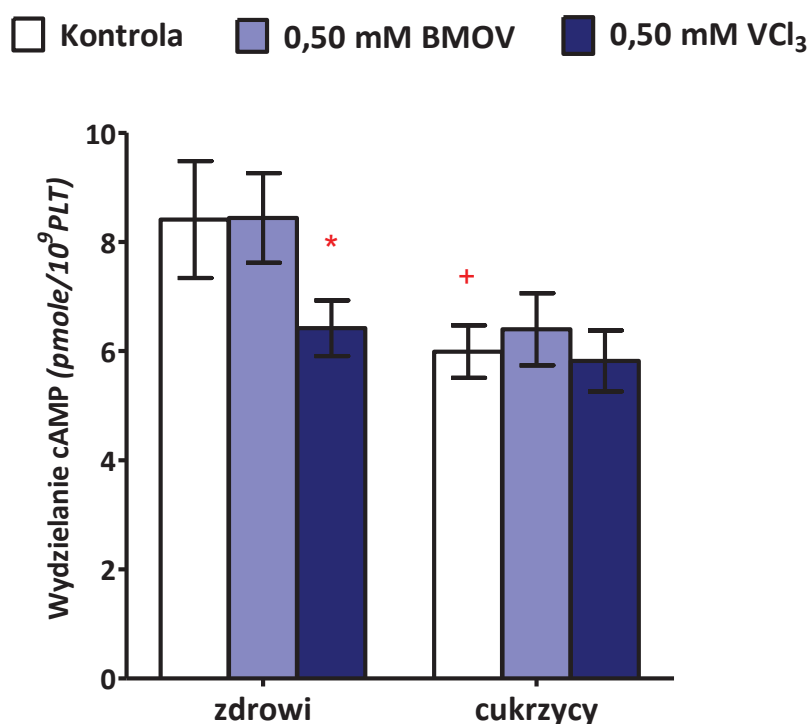
W zawiesinie płytek krwi osób zdrowych, BMOV (0,50 mM) nie miał wpływu na produkcję TXA<sub>2</sub>, natomiast VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) czterokrotnie zwiększył produkcję TXA<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 13).

W aktywowanych trombiną płytkach krwi pacjentów z cukrzycą, BMOV (0,50 mM) istotnie nasilił produkcję TXA<sub>2</sub> o 118% ( $p < 0,05$ ), natomiast VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) trzykrotnie zwiększył produkcję TXA<sub>2</sub> ( $p < 0,005$ ) (Ryc. 13).

#### 4.5.2. Wpływ związków wanadu na wydzielanie cAMP w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą

Aktywacja płytkowej cykazy adenylowej i wzrost syntezy wewnątrzpłytkowego cAMP prowadzi do aktywacji białkowych kinaz zależnych od cAMP [43]. Proces ten warunkuje transport  $\text{Ca}^{2+}$  do magazynów wapnia, zapobiegając spontanicznej aktywacji płytek krwi w naczyniu krwionośnym [43].

Produkcja cAMP w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą typu 2 była niższa o 29% ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 14). Zastosowanie BMOV (0,50 mM) nie miało wpływu na produkcję wewnątrzpłytkowego cAMP zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą (Ryc. 14). Z drugiej strony,  $\text{VCl}_3$  (0,50 mM) istotnie redukowało zawartość cAMP o 24% ( $p < 0,05$ ) w płytkach krwi tylko u osób zdrowych (Ryc. 14).



Rycina 14. Wpływ związków wanadu BMOV i  $\text{VCl}_3$  na produkcję cAMP w płytkach krwi u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 6 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^9/\text{ml}$ ) były preinkubowane przez 20 min w  $37^\circ\text{C}$  z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM  $\text{VCl}_3$ , a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znamienne różne od kontroli: \* $p < 0,05$ . Wartości znamienne różne od grupy osób zdrowych: <sup>+</sup> $p < 0,05$ .

Wydzielanie cAMP było niższe w aktywowanych płytkach pacjentów z cukrzycą. Organiczny BMOV nie wpływał na ilość wydzielonego cAMP w płytkach krwi. Nieorganiczny chlorek wanadu redukował zawartość cAMP w płytkach krwi izolowanych jedynie od osób zdrowych.

#### **4.6. Wpływ związków wanadu na szlaki przekazywania sygnału w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2**

Szereg doniesień wskazuje na wpływ związków wanadu na regulację mechanizmów sygnalizacyjnych w komórkach krwi, co wynika z podobieństwa związków wanadu do fosforanów [91, 93, 94]. Działanie związków wanadu może być związane z aktywacją białkowej fosfatazy tyrozynowej (ang. tyrosine-protein phosphatase, PTP), a w konsekwencji do fosforylacji receptora insulinowego IR (ang. insulin receptor IR) [94].

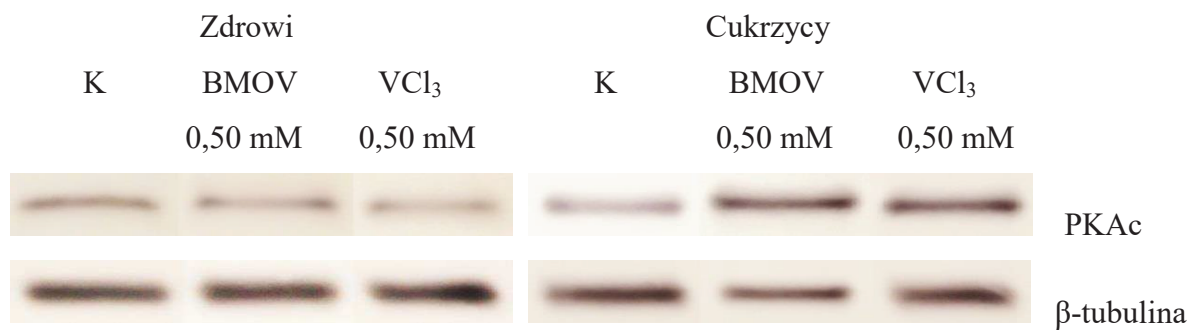
##### **4.6.1. Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależne od kinazy białkowej A (PKA) i cAMP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą**

Zależna od cyklicznego AMP kinaza białkowa A (PKA) odgrywa istotną rolę w procesie hamowania ścieżki sygnałowej kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (ang. mitogen-activated protein kinase, MAPK), hamuje również syntezę TXA<sub>2</sub> czy kluczowe w procesie aktywacji płytek krwi enzymy, w tym kinazę białkową C [43].

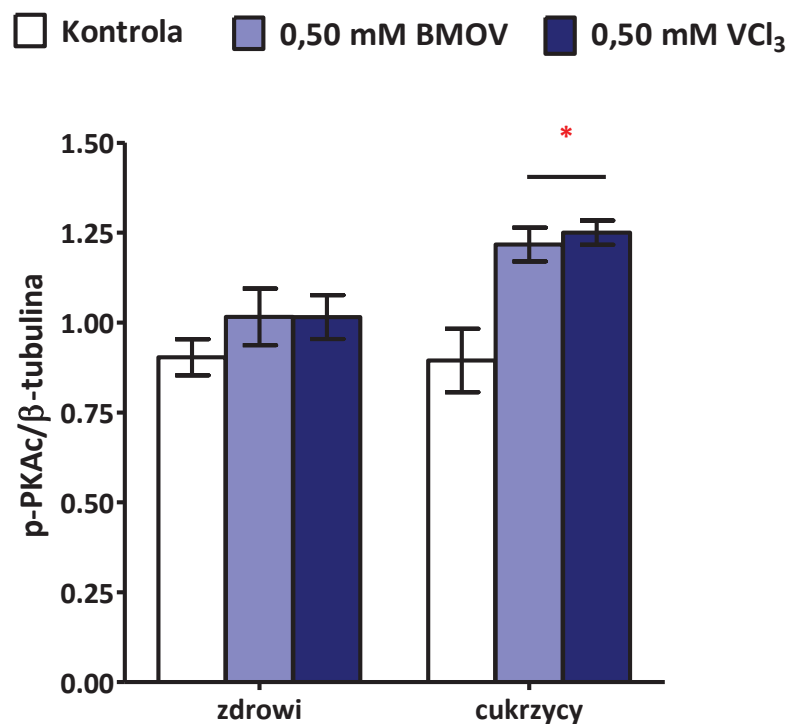
Fosforylacja białkowej kinazy A, cAMP-zależnej (ang. cAMP-dependent protein kinase A, PKAc) w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą i była podobna (Ryc. 15A i B).



A)



B)



Rycina 15. Wpływ związków wanadu na fosforylację białka PKAc w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

A - Obraz rozdziału metodą Western Blot uzyskany dla fosforylacji białka PKAc, B – poziomy PKAc wyliczone względem β-tubuliny, wykonywane techniką Western Blot. Zdjęcia reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń. Krwinki płytkowe ( $1 \times 10^7/\text{ml}$ ) były preinkubowane przez 20 min w  $37^\circ\text{C}$  z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znamienne różne od kontroli: \* $p < 0,05$ .

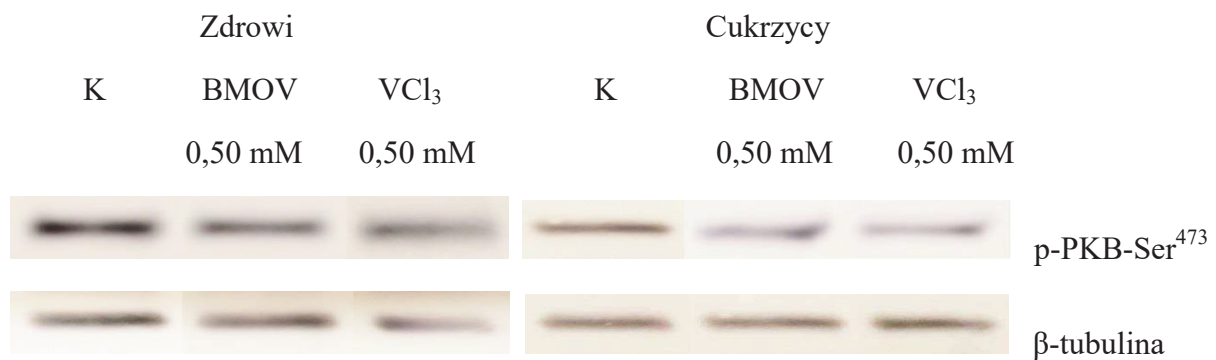
Zarówno BMOV (0,50 mM), jak i VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) nie miały wpływu na fosforylację PKAc w aktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych (Ryc. 15). Natomiast u pacjentów z cukrzycą, zarówno BMOV (0,50 mM) jak i VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) zwiększały istotnie fosforylację białka PKAc w płytkach krwi o 25% ( $p < 0,05$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 15A i B).

#### 4.6.2. Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależne od PKB w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2

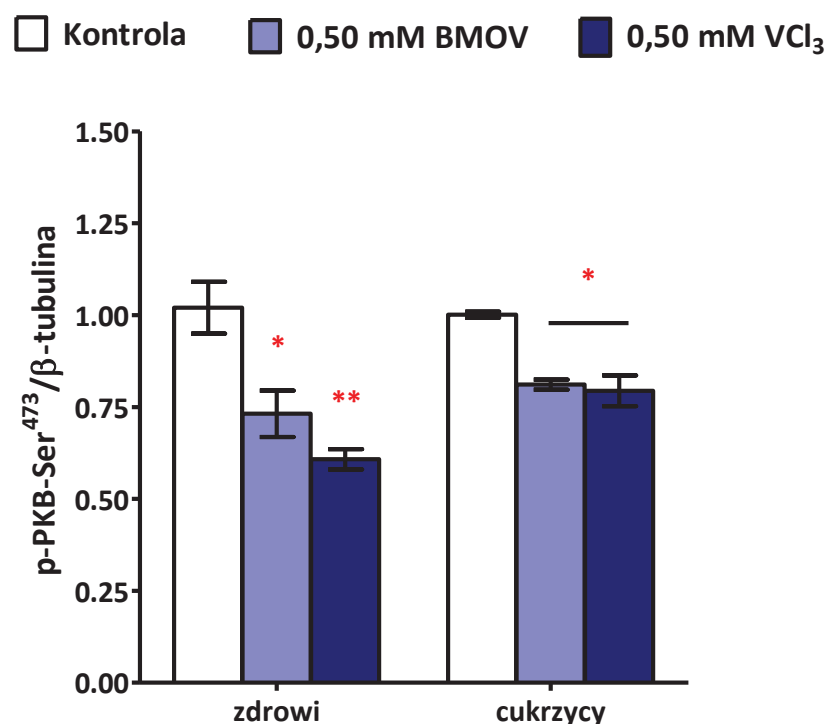
Aktywacja kinazy białkowej PKB (inaczej Akt) w pozycji seryny 473, w obrębie końca karboksylowego, która jest zależna od fosfatazy 3 fosfoinozytolu (ang. phosphoinositide 3-phosphates, PIP<sub>3</sub>), prowadzi do fosforylacji szeregu białek odpowiedzialnych za aktywację krwinek płytkowych [20, 139]. Akt/PKB reguluje również aktywność integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , biorącej udział w procesie agregacji płytek krwi [140].

Nie obserwowano istotnych różnic w fosforylacji PKB-Ser<sup>473</sup> (p-Akt1-Ser<sup>473</sup>) w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi, w grupie pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych (Ryc. 16A i B). BMOV (0,50 mM) istotnie zmniejszył fosforylację płytkowej PKB-Ser<sup>473</sup> w grupie osób zdrowych o 30% ( $p < 0,05$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 16A i B).

A)



B)



Rycina 16. Wpływ związków wanadu na fosforylację białka PKB-Ser<sup>473</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

A - Obraz rozdziału metodą Western Blot uzyskany dla fosforylacji białka PKB-Ser<sup>473</sup>, B - poziomy p-PKB-Ser<sup>473</sup> wyliczone względem poziomu β-tubuliny, wykonywane techniką Western Blot. Zdjęcia reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń. Krwinki płytkowe ( $1 \times 10^7$ /ml) były preinkubowane przez 20 min w 37°C z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znacznie różne od kontroli: \*p<0,05, \*\*p<0,005.

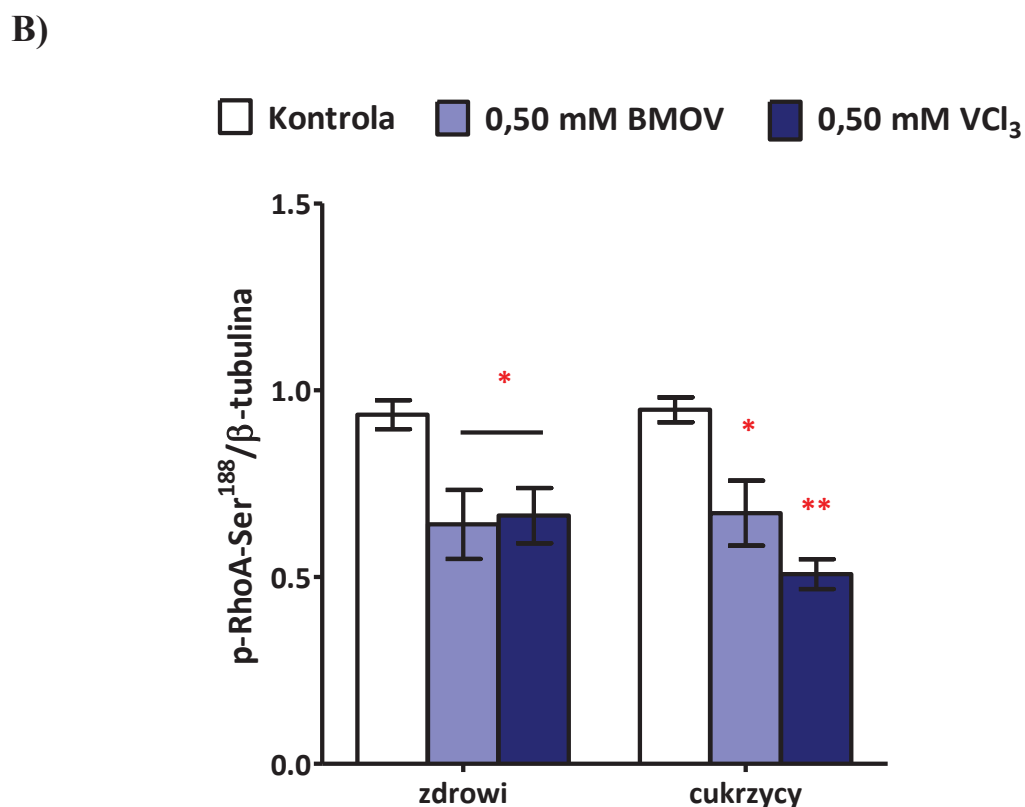
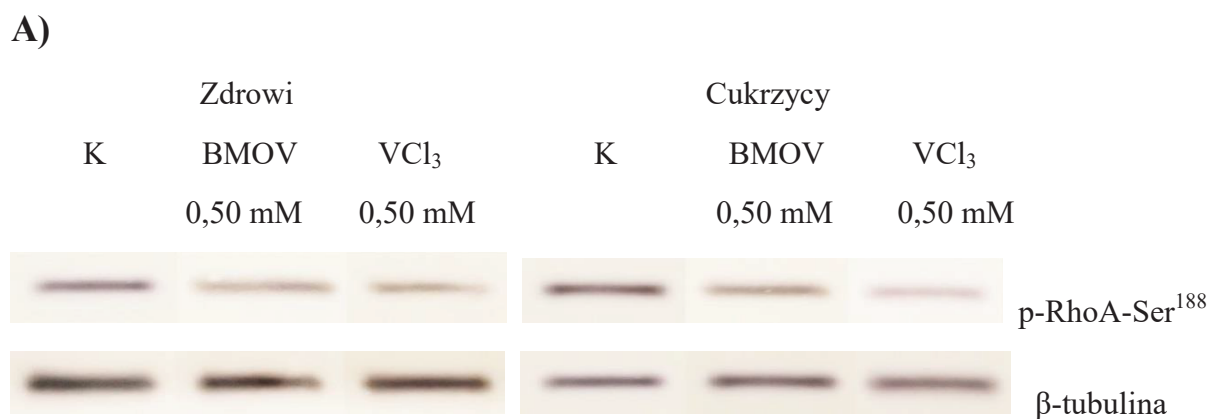
Podobnie, VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) istotnie zmniejszył fosforylację PKB-Ser<sup>473</sup> w grupie osób zdrowych o 40% (p<0,005), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 16A i B).

Również u pacjentów z cukrzycą zarówno BMOV, jak i  $VCl_3$  zmniejszyły fosforylację PKB w pozycji seryny 473, jednakże był to spadek znacznie mniejszy i wynosił o ok. 20% ( $p < 0,05$ ).

#### **4.6.3. Wpływ związków wanadu na mechanizm przekazywania sygnału zależny od RhoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą**

Białko z rodziny genów homologicznych Ras, (ang. Ras homolog gene family, member A, RhoA) odgrywa kluczową rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego w płytkach krwi [46, 48, 141]. Fosforylacja białka RhoA w pozycji 188 seryny, zależna od cAMP i cGMP, reguluje zatem procesy sekrecji ziarnistości, zmiany kształtu płytek krwi, agregacji i formowania skrzepu [48].

Nie obserwowano istotnych różnic w fosforylacji białka RhoA-ser<sup>188</sup> w aktywowanych płytkach krwi (trombina 0,10 JM/ml) osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą (Ryc. 17A i B). W tych warunkach, zarówno BMOV (0,5 mM) jak i  $VCl_3$  (0,5 mM) istotnie obniżały fosforylację białka p-RhoA-ser<sup>188</sup> w płytkach krwi, w grupie osób zdrowych o ok. 35% ( $P < 0,05$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 17A i B).



Rycina 17. Wpływ związków wanadu na fosforylację białka RhoA-Ser<sup>188</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

A - Obraz rozdziału metodą Western Blot uzyskany dla fosforylacji białka RhoA-Ser<sup>188</sup>, B – poziomy p-RhoA-Ser<sup>188</sup> wyliczone względem poziomu β-tubuliny, wykonywane techniką Western Blot. Zdjęcia reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń. Krwinki płytkowe ( $5 \times 10^9$ /ml) były preinkubowane przez 20 min w 37°C z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znamienne różne od kontroli: \*p<0,05, \*\*p<0,005.

Podobny spadek fosforylacji tego białka obserwowano w obecności BMOV (0,50 mM) w płytkach krwi, izolowanych od pacjentów z cukrzycą o 30% (p<0,05), wobec kontroli (Ryc. 17A i B). VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) istotnie redukowało fosforylację białka RhoA-Ser<sup>188</sup> w

płytkach krwi, w grupie pacjentów z cukrzycą o 47% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 17A i B).

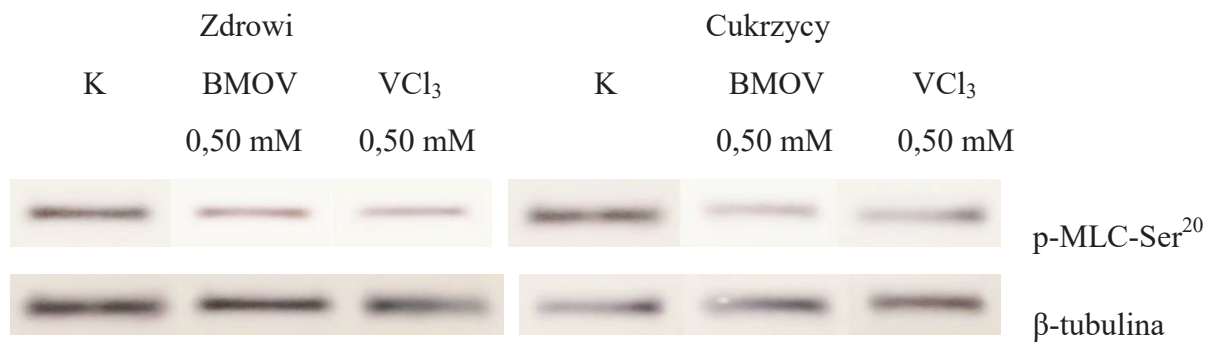
Dane te wskazują, że związki wanadu w podobny sposób regulują fosforylację białka RhoA-Ser<sup>188</sup> w aktywowanych płytkach u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą. Jednakże nieorganiczny chlorek wanadu silniej redukuje fosforylację tego białka w płytkach cukrzycowych.

#### **4.6.4. Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależny od MLC w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą**

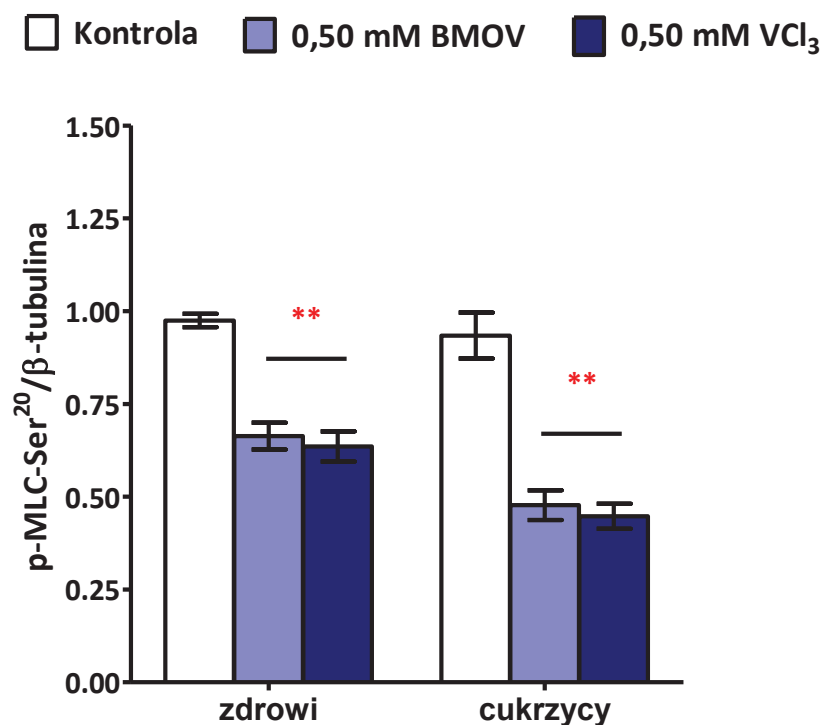
Białko łańcuchów lekkich miozyny (ang. myosin light chain, MLC) odgrywa kluczową rolę w procesach adhezji i zmiany kształtu komórek, ponieważ fosforylacja MLC w pozycji 20 seryny (p-MLC-Ser<sup>20</sup>) prowadzi do skurczu włókien kurczliwych i uczestniczy w przebudowie cytoszkieletu aktynowego krwinek płytkowych [57, 142].

Nie obserwowano istotnych różnic w fosforylacji białka MLC-Ser<sup>20</sup> w aktywowanych (trombina 0,10 JM/ml) płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą (Ryc. 18A i B). BMOV (0,50 mM) istotnie zmniejszył fosforylację białka MLC-Ser<sup>20</sup> w płytkach krwi osób zdrowych o 35% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 18A i B). Podobnie, VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) istotnie zmniejszył fosforylację białka MLC-Ser<sup>20</sup> w płytkach krwi osób zdrowych o 37% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 18A i B).

A)



B)



Rycina 18. Wpływ związków wanadu na fosforylację białka MLC-Ser<sup>20</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

A - Obraz rozdziału metodą Western Blot uzyskany dla fosforylacji białka MLC-Ser<sup>20</sup>, B – poziomy p-MLC-Ser<sup>20</sup> wyliczone względem poziomu β-tubuliny, wykonywane techniką Western Blot. Zdjęcia reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń. Krwinki płytkowe ( $5 \times 10^9$ /ml) były preinkubowane przez 20 min w 37°C z RGDS (0,20 mM), inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znacznie różne od kontroli: \*\*p<0,005.

Natomiast u pacjentów z cukrzycą zaobserwowano silniejszy wpływ zastosowanych związków wanadu na fosforylację tego białka. Zahamowanie fosforylacji w tych warunkach wynosiło ok 50% (Ryc. 18A i B).

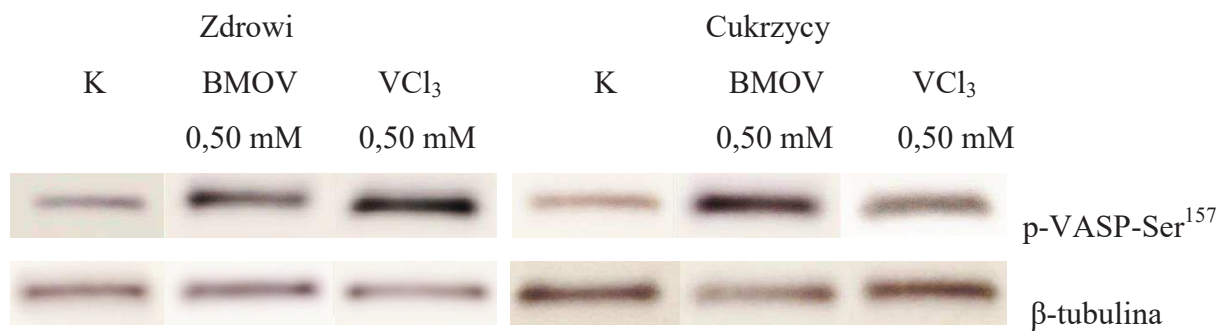
#### **4.6.5. Wpływ związków wanadu na mechanizmy przekazywania sygnału zależne od białka VASP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2**

VASP jest białkiem, które reguluje dynamikę zmian filamentów aktynowych, ale także stanowi substrat dla kinaz białkowych, zależnych od cAMP/PKA i cGMP/PKG [143]. Fosforylacja VASP jest kluczowa w wydłużaniu elementów aktynowych, dlatego też utrata ekspresji tego białka prowadzi do nadmiernej aktywacji płytek krwi, a w konsekwencji do rozwoju zakrzepicy, co udowodniły badania na myszach [144]. Fosforylacja białka VASP w pozycji 157 seryny stanowi marker oceny ścieżki sygnalizacyjnej, zależnej od cAMP/PKA [145].

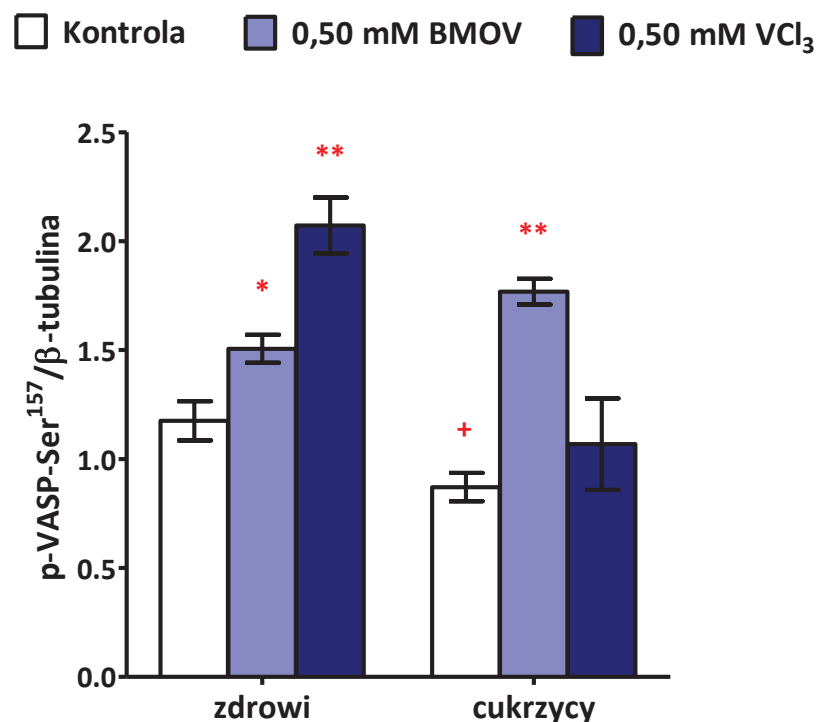
Fosforylacja białka VASP-Ser<sup>157</sup> w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi pacjentów z cukrzycą była niższa o 26% ( $p < 0,05$ ), względem osób zdrowych (Ryc. 19A i B). BMOV (0,50 mM) istotnie zwiększył fosforylację białka VASP-Ser<sup>157</sup> w płytkach krwi osób zdrowych o 28% ( $p < 0,05$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 19A i B). VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) również, lecz w sposób bardziej istotny niż BMOV, zwiększył fosforylację badanego białka w płytkach krwi osób zdrowych o 76% ( $p < 0,005$ ), w porównaniu do kontroli bez związków wanadu (Ryc. 19A i B).



A)



B)



Rycina 19. Wpływ związków wanadu na fosforylację białka VASP-Ser<sup>157</sup> w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

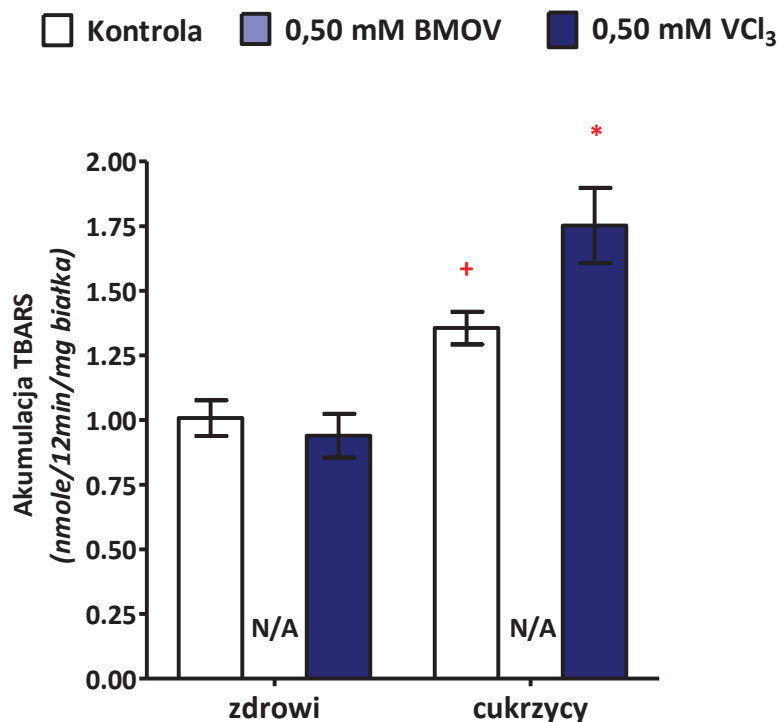
A - Obraz rozdziału metodą Western Blot uzyskany dla fosforylacji białka VASP-Ser<sup>157</sup>, B – poziomy VASP-Ser<sup>157</sup> wyliczone względem poziomu β-tubuliny, wykonywane techniką Western Blot. Zdjęcia reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń. Kontrolę stanowiły krwinki płytkowe (1x10<sup>7</sup>/ml) preinkubowane przez 20 min z RGDS (0,20 mM), inkubowane w warunkach kontrolnych lub z wybranymi związkami wanadu i aktywowane 0,10 JM/ml trombiną. Wartości znamienne różne od kontroli: \*p<0,05, \*\*p<0,005. Wartości znamienne różne względem parametrów uzyskanych w grupie osób zdrowych: <sup>+</sup>p<0,05.

Podobnie jak u osób zdrowych, BMOV (0,50 mM) zwiększał fosforylację białka VASP-Ser<sup>157</sup> w aktywowanych płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 103% (p<0,005), wobec kontroli bez związków wanadu (Ryc. 19A i B). Natomiast VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) nie miał wpływu na fosforylację VASP-Ser<sup>157</sup> w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą (Ryc. 19).

Podsumowując, fosforylacja VASP w pozycji 157 seryny była niższa w aktywowanych płytkach krwi pacjentów z cukrzycą. Jednocześnie, BMOV silniej zwiększał fosforylację VASP w płytkach osób z cukrzycą, zaś  $VCl_3$  zwiększał fosforylację VASP jedynie w płytkach osób zdrowych.

#### **4.7. Wpływ związków wanadu na akumulację TBARS w płytkach krwi u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą**

Hiperglikemia jest stanem predysponującym do wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego, co prowadzi do wzmożonej peroksydacji lipidów [146]. W literaturze opisano hamujący wpływ nieorganicznych związków wanadu na peroksydację lipidów w moczu u pacjentów z cukrzycą [147, 148]. Do analizy stopnia peroksydacji lipidów posłużono się oceną akumulacji reaktywnych związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).



Rycina 20. Wpływ związków wanadu BMOV i VCl<sub>3</sub> na akumulację TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 20 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM VCl<sub>3</sub>, a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znamienne różne od kontroli: \* $p < 0,05$ . Wartości znamienne różne względem parametrów uzyskanych w grupie osób zdrowych: + $p < 0,05$ .

N/A - ang. (not applicable) wyniki nie ujęte w pracy ze względu na możliwą interferencję BMOV w spektrofotometryczne oznaczanie TBARS.

Akumulacja reaktywnych związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) po aktywacji trombiną (0,10 JM/ml) była wyższa w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 22% ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do kontroli osób zdrowych (Ryc. 20). Nieorganiczny VCl<sub>3</sub> (0,50 mM) nie wpływał na akumulacji TBARS u osób zdrowych (Ryc. 20). Natomiast istotnie zwiększał akumulację TBARS w płytkach krwi, w grupie pacjentów z cukrzycą o 43% ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do kontroli bez związków wanadu (Ryc. 20).

#### 4.8. Wpływ związków wanadu na aktywność enzymów metabolizmu glukozy w płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą

Celem weryfikacji hipotezy, że związki wanadu mogą regulować metabolizm energetyczny krwinek płytkowych, dokonano oceny wpływu BMOV (0,50 mM) i  $VCl_3$  (0,50 mM) na aktywność wybranych enzymów, uczestniczących w przemianach energetycznych płytek krwi.

Heksokinaza jest pierwszym enzymem w szlaku glikolizy, który pośredniczy w utylizacji glukozy, będącej podstawowym substratem energetycznym płytek krwi [149, 150].

Aktywność heksokinazy w krwinkach płytkowych aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml), w grupie pacjentów z cukrzycą była wyższa o 52% ( $p < 0,005$ ), wobec grupy kontrolnej osób zdrowych (Tab. 4). W tych samych warunkach doświadczalnych, organiczny BMOV (0,50 mM) istotnie hamował aktywność heksokinazy w płytkach krwi osób zdrowych o 61% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4). Podobnie,  $VCl_3$  (0,50 mM) zmniejszył aktywność enzymu w płytkach krwi osób zdrowych o 46% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

BMOV (0,50 mM) hamował aktywność heksokinazy w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 53% ( $p < 0,005$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Tab. 4). Podobnie,  $VCl_3$  (0,50 mM), hamował aktywność heksokinazy w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 33% ( $p < 0,05$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G-6-PDH) katalizuje reakcję dehydratacji glukozy-6-fosforanu w szlaku pentozofosforanowym, z wytworzeniem dwóch cząsteczek NADPH [149-151]. Enzym pośrednio uczestniczy także w redukcji glutationu i poprawia wydajność glikolizy [151].

Aktywność G-6-PDH w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi pacjentów z cukrzycą była wyższa o 22% ( $p < 0,05$ ), wobec grupy kontrolnej osób zdrowych (Tab. 4). Organiczny BMOV (0,50 mM) istotnie redukował aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w płytkach krwi osób zdrowych o 54% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4). Podobnie,  $VCl_3$  (0,50 mM) hamował aktywność enzymu w płytkach krwi osób zdrowych o 48% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

BMOV (0,50 mM), hamował aktywność G-6-PDH w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 65% ( $p < 0,005$ ), względem kontroli bez

związków wanadu (Tab. 4).  $VCl_3$  (0,50 mM) redukował aktywność G-6-PDH w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 51% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

Tabela 4. Wpływ związków wanadu BMOV i  $VCl_3$  na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego aktywowanych krwinek płytkowych u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

	Osoby zdrowe	Pacjenci z cukrzycą
<b>Heksokinaza (nmole/min/mg białka)</b>		
<b>Kontrola</b>	78,90±2,90	120,10±7,90 <sup>++</sup>
<b>BMOV (0,50 mM)</b>	30,50±6,60 <sup>**</sup>	66,30±8,90 <sup>**</sup>
<b><math>VCl_3</math> (0,50 mM)</b>	42,90±7,80 <sup>**</sup>	80,70±12,80 <sup>*</sup>
<b>Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (nmole/min/mg białka)</b>		
<b>Kontrola</b>	85,80±5,90	104,20±4,60 <sup>+</sup>
<b>BMOV (0,50 mM)</b>	30,10±5,20 <sup>**</sup>	42,70±7,40 <sup>**</sup>
<b><math>VCl_3</math> (0,50 mM)</b>	40,40±5,90 <sup>**</sup>	56,30±8,60 <sup>**</sup>
<b>Akonitaza (nmole/min/mg białka)</b>		
<b>Kontrola</b>	6,04±0,30	7,70±0,10 <sup>+</sup>
<b>BMOV (0,50 mM)</b>	1,68±0,20 <sup>***</sup>	3,18±0,30 <sup>**</sup>
<b><math>VCl_3</math> (0,50 mM)</b>	2,84±0,20 <sup>**</sup>	4,65±0,40 <sup>*</sup>
<b>Dehydrogenaza izocytrynianowa (nmole/min/mg białka)</b>		
<b>Kontrola</b>	36,90±1,10	29,90±0,60
<b>BMOV (0,50 mM)</b>	15,90±1,40 <sup>**</sup>	14,20±2,20 <sup>**</sup>
<b><math>VCl_3</math> (0,50 mM)</b>	19,70±2,20 <sup>**</sup>	20,50±1,60 <sup>*</sup>

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 5-6 powtórzeń. Krwinki płytkowe ( $3 \times 10^8$ /ml) były preinkubowane przez 20 min w 37°C z RGDS (0,20 mM), następnie inkubowane przez 2 minuty, w warunkach kontrolnych albo z 0,50 mM BMOV lub 0,50 mM  $VCl_3$ , a następnie aktywowane trombiną (0,10 JM/ml). Wartości znamienne różnie od kontroli: <sup>\*</sup> $p < 0,05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0,005$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$ . Wartości znamienne różnie od grupy osób zdrowych: <sup>+</sup> $p < 0,05$ , <sup>++</sup> $p < 0,005$ .

Kolejnym istotnym etapem generowania energii jest cykl kwasu cytrynowego, którego jeden z enzymów, akonitaza, katalizuje przekształcenie cytrynianu w izocytrynan [149, 150].

Aktywacja krwinek płytkowych trombiną (0,10 JM/ml) powodowała wzrost aktywności akonitazy o 28% ( $p < 0,05$ ) w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do grupy osób zdrowych (Tab. 4). Organiczny BMOV (0,50 mM) obniżał aktywność akonitazy w płytkach krwi osób zdrowych o 72% ( $p < 0,001$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4). Podobnie,  $VCl_3$  (0,50 mM) hamował aktywność tego enzymu w płytkach krwi osób zdrowych o 53% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

BMOV (0,50 mM), hamował aktywność akonitazy w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 59% ( $p < 0,005$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Tab. 4). Podobnie  $VCl_3$  (0,50 mM) zmniejszał aktywność akonitazy w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 51% ( $p < 0,05$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

Dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH), katalizuje przekształcenie izocytrynianu do  $\alpha$ -ketoglutaranu w cyklu kwasów trikarboksylowych [149, 150].

Aktywność IDH w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) krwinkach płytkowych była podobna we wszystkich analizowanych grupach (Tab. 4). Organiczny BMOV (0,50 mM) istotnie zmniejszał aktywność IDH w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi osób zdrowych o 57% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4). W tych warunkach,  $VCl_3$  (0,50 mM) zmniejszał aktywność IDH w płytkach krwi osób zdrowych o 47% ( $p < 0,005$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

BMOV (0,50 mM) hamował również aktywność IDH w aktywowanych trombiną (0,10 JM/ml) płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 53% ( $p < 0,005$ ), względem kontroli bez związków wanadu (Tab. 4). Podobnie,  $VCl_3$  (0,50 mM) hamował aktywność IDH w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą o 33% ( $P < 0,05$ ), wobec kontroli bez związków wanadu (Tab. 4).

Podsumowując, aktywność heksokinazy w aktywowanych płytkach krwi była wyższa w cukrzycy. BMOV silniej hamował aktywność heksokinazy w badanych grupach w porównaniu do  $VCl_3$ .

Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej była wyższa w płytkach osób z cukrzycą. Zarówno BMOV, jak i  $VCl_3$  podobnie redukowały aktywność enzymu w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą.

Aktywność akonitazy był wyższa w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą. Jednocześnie, BMOV słabiej hamował aktywność akonitazy w płytkach krwi pacjentów z

cukrzycą. Podobnie,  $VCl_3$  słabiej redukował aktywność akonitazy w płytkach krwi pacjentów w cukrzycy.

Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej była podobna w obu badanych grupach. BMOV silniej hamował aktywność płytkowego IDH we wszystkich analizowanych grupach w porównaniu do  $VCl_3$ .

## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Charakterystyka modelu doświadczalnego

#### 5.1.1. Charakterystyka parametrów metabolicznych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą

Średni czas trwania cukrzycy typu 2 był dwukrotnie wyższy w porównaniu do podobnych badań wykonanych 10 lat wcześniej, co może sugerować, że na cukrzycę typu 2 zapadają coraz młodsi pacjenci (Tab. 3) [41, 135, 152]. Nasze obserwacje potwierdzają światowy trend zapadalności na cukrzycę typu 2 w coraz młodszym wieku, co zwiększa ryzyko rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych (Tab. 3) [152]. Jednak, z drugiej strony pacjenci są coraz lepiej wyedukowani, co skutkuje coraz lepszą kontrolą glikemii (Tab. 3) [152].

Średnia wartość glikemii na czczo obserwowana u pacjentów z cukrzycą była istotnie wyższa, w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych i wytycznych PTD i ADA z 2018 roku, co mogłoby sugerować trudności w kontroli glikemii, w grupie analizowanych pacjentów (Tab. 3, Ryc. 3, Supl. 1) [135, 153]. Około 20% pacjentów miało stężenie glukozy >180 mg/dl, zawyżając istotnie średnie jej stężenie w całej analizowanej populacji pacjentów z cukrzycą (Tab. 3). Jednocześnie obserwowana przez nas znamienna korelacja pomiędzy stężeniem glukozy a agregacją płytek krwi potwierdza istotną rolę glukozy w regulacji funkcji krwinek płytkowych (Ryc. 3, 4) [154, 155].

Średnie wartości HbA<sub>1c</sub> w grupie badanych pacjentów z cukrzycą były relatywnie wyrównane w porównaniu do wartości, uzyskanych w grupie badanej Michno i wsp, co może wiązać się z wyraźną retrospektywną poprawą kontroli glikemii, na przestrzeni ostatnich lat (Tab. 3, Ryc. 3, 4) [41, 156-159]. Fakt, że równocześnie różnice w agregacji krwinek płytkowych izolowanych od pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych były mniejsze w naszej pracy, w porównaniu do wyników uzyskanych przez nasz zespół 10 lat temu, może potwierdzać fakt, że płytki krwi pacjentów analizowanych w naszej pracy mogły być w mniejszym stopniu narażone na długotrwałą hiperglikemię, a w konsekwencji glikację białek (Tab. 3, Ryc. 3, 4) [43, 154, 155].

Jednakże, wciąż obserwowane statystycznie wyższe wartości parametrów retrospektywnej oceny glikemii, u pacjentów z cukrzycą względem osób zdrowych, świadczą o ekspozycji ich megakariocytów i krwinek płytkowych na długotrwałą i przewlekłą



hiperglikemię (Tab. 3, Ryc. 3-11) [37, 43]. A więc, proces nieenzymatycznej glikacji białek mógł przyczynić się do modyfikacji struktur receptorów powierzchniowych krwinek płytkowych i płytkowych szlaków sygnalizacyjnych, a w konsekwencji zmiany ich metabolizmu energetycznego i funkcji płytek krwi w analizowanej pracy, w populacji pacjentów z cukrzycą typu 2 (Tab. 3, Ryc. 3, 4) [37, 43].

U pacjentów z cukrzycą średnie wartości cholesterolu całkowitego były porównywalne do wartości obserwowanych u osób zdrowych, a także do zakresu normy, uznanej przez PTD i ADA z 2018 roku (Tab. 3, Supl. 1) [160].

Fracja cholesterolu LDL była również porównywalna u pacjentów z cukrzycą typu 2 do osób zdrowych, co może wiązać się ze standardowym stosowaniem statyn w tej grupie pacjentów, z uwagi na choroby współistniejące, czy też powikłania wynikające z długoletniego przebiegu cukrzycy (Tab. 3, Supl. 1) [160-162]. Shamir i wsp. zwracają także uwagę na fakt, że prawidłowy profil lipidowy u pacjentów z cukrzycą wiąże się z zadowalającą kontrolą glikemii (Tab. 3, Supl. 1) [163]. Potwierdzają to również doniesienia Wadwy i wsp., którzy obserwowali 30% niższe stężenie cholesterolu LDL u pacjentów z cukrzycą, względem osób zdrowych [164]. Mniej aterogenny profil lipidowy u tych pacjentów badacze tłumaczą zmniejszoną syntezą cholesterolu w wątrobie, jak również większą świadomością monitorowania profilu lipidowego (Tab. 3) [165].

Uzyskane wyniki pozostają jednak w sprzeczności z doniesieniami Guy'a i wsp., którzy u pacjentów z cukrzycą obserwowali podwyższone stężenie cholesterolu LDL o aterogennym charakterze i wiążą ten fakt z podwyższonym stężeniem glukozy w osoczu (Tab. 3) [166, 167].

Podobnie, frakcja cholesterolu HDL u pacjentów z cukrzycą była niższa względem zaleceń ustalonych przez ADA i PTD (Tab. 3, Supl. 1) [160, 168, 169]. Jednocześnie, wartości cholesterolu HDL były porównywalne do osób zdrowych, co może wynikać z nasilenia katabolizmu HDL u osób w wieku >50 lat (Tab. 3, Supl. 1) [160, 168, 169].

Fakt, że średnie stężenie triglicerydów (TG) było istotnie wyższe u pacjentów z cukrzycą typu 2, można tłumaczyć tym, że poprzedzająca rozwój cukrzycy insulinooporność może przyczyniać się do nasilenia lipolizy, zwiększenia syntezy triacylogliceroli w hepatocytach i prowadzić do hipertriglicerydemii (Tab. 3) [170, 171]. Hipertriglicerydemia przyczynia się do redukcji cząstek HDL we krwi, co stanowi czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy w cukrzycy (Tab. 3) [171-174].

## 5.2. Wpływ cukrzycy na funkcje płytek krwi

W patomechanizmie zaburzeń krzepnięcia u pacjentów z cukrzycą biorą udział płytki krwi, leukocyty, erytrocyty, jak również osoczowe czynniki krzepnięcia i fibrynolizy oraz śródbłonek naczyniowy. Elementy te podlegają wzajemnej interakcji, dlatego też w przedstawionej pracy stosowano izolowane krwinki płytkowe tak, aby opisane przez nas procesy obejmowały modyfikacje dotyczące samych płytek (Tab. 1, 2) [175].

U pacjentów z cukrzycą nie obserwowano zmian w adhezji i kształcie krwinek płytkowych (ang. spreading) na powierzchni kolagenu i fibrynogenu oraz agregacji indukowanej trombiną w początkowej fazie, w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 6, 7, 8, 11, 14).

Można to tłumaczyć faktem, że dłużej przebieg cukrzycy oraz choroby współistniejące mogą prowadzić do nadmiernego zużycia krwinek płytkowych jeszcze w naczyniach krwionośnych, wskutek incydentów zakrzepowych, dlatego też w warunkach *in vitro* nie możemy w pełni ocenić zdolności płytek krwi do aktywacji (Ryc. 6, 7, 8) [79, 176].

Z drugiej strony, obserwowany przez nas wzrost tworzenia agregatów płytek krwi na powierzchni kolagenu i fibrynogenu, w grupie pacjentów z cukrzycą jest zgodny z licznymi doniesieniami naukowymi (Ryc. 9, 10) [41, 43, 177]. Fakt istnienia korelacji pomiędzy stężeniem glukozy a agregacją płytek krwi wskazywałby na rolę glikacji płytkowych receptorów, w tym płytkowych integryn  $\alpha_2\beta_1$  i  $\alpha_2\beta_3$ , uczestniczących w ich aktywacji i utrzymywaniu w stanie aktywności podprogowej, przez co płytki krwi są bardziej podatne na działanie agonistów agregacji (Tab. 3, Ryc. 4, 6-10) [43, 177, 178].

Wzrost potencjału agregacyjnego płytek krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2 może wiązać się także z obserwowaną przez nas niższą produkcją wewnątrzpłytkowego cAMP i jednocześnie obniżoną fosforylacją białka VASP-Ser<sup>157</sup>, regulującego dynamikę cytoszkieletu płytkowego, w mechanizmie zależnym od cAMP (Ryc. 6, 14, 19) [177, 179]. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy obserwowali wzrost agregacji płytek krwi, w których hamowano fosforylację VASP [179].

W cukrzycy nie obserwowano zmiany pola powierzchni krwinek płytkowych mimo zwiększenia agregacji, co jest zgodne z pracami innych badaczy, którzy obserwowali istotną zmianę powierzchni płytek krwi jedynie u pacjentów z cukrzycą typu 2, powikłanych retinopatią (Ryc. 7, 8) [180, 181]. Powyższe dane są jednak sprzeczne z doniesieniami innych autorów, którzy w szczyrych neutrofilach, w warunkach hiperglikemii, obserwowali zwiększoną fosforylację białka RhoA, która indukuje zmianę kształtu szeregu komórek, w

tym płytek krwi (Ryc. 7, 8, 17, 18) [182-184]. Jednakże w naszych badaniach nie wykazaliśmy różnic w fosforylacji RhoA-Ser<sup>188</sup> czy też MLC-Ser<sup>20</sup>, zaangażowanych w proces zmiany kształtu aktywowanych płytek krwi pomiędzy płytkami izolowanymi od osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 2 (Ryc. 17, 18). Brak różnic mógłby wynikać ze względnie poprawnej, aczkolwiek niewystarczającej kontroli glikemii, obserwowanej w badanej grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 (Tab. 2, Ryc. 7, 8, 17, 18) [156, 157].

Natomiast wzrost tworzenia agregatów płytek krwi na powierzchni kolagenu i fibrynogenu u pacjentów z cukrzycą jest zgodny z doniesieniami innych autorów, którzy obserwowali zwiększenie reaktywności krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą i korelowali to ze zwiększeniem poziomu ekspresji płytkowych receptorów powierzchniowych GPIIb/IIIa oraz ze stężeniem HbA<sub>1c</sub> (Ryc. 3, 4, 9, 10) [43, 185, 186].

Dodatkowo, obserwowany w naszej pracy wzrost końcowej fazy agregacji indukowanej trombiną (0,10 JM/ml) w płytkach pacjentów z cukrzycą, względem grupy osób zdrowych, jest zgodny z licznymi doniesieniami innych autorów (Ryc. 11) [187-190].

Fakt istnienia silnej korelacji pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu a agregacją płytek krwi, wskazywałby na istotną rolę glukozy jako substratu energetycznego, niezbędnego do aktywacji płytek krwi (Ryc. 4, 11). Tłumaczyłoby to zwiększoną reaktywność płytek krwi w warunkach zwiększonej dostępności glukozy w hiperglikemii w cukrzycy [37, 43]. Aczkolwiek, na aktywację krwinek płytkowych bezpośredni wpływ może mieć także obserwowane w cukrzycy nasilenie stresu oksydacyjnego, przejawiające się nadprodukcją ROS i RNS oraz zwiększona podatność na procesy zapalne [43, 191, 192].

Dodatkowo, zwiększone wydzielanie ATP z ziarnistości płytek krwi pacjentów z cukrzycą może przyczyniać się do nasilenia ich aktywacji i następnie zwiększenia agregacji (Ryc. 6-10, 12) [21, 41, 62]. Można tłumaczyć to obserwowanym w hiperglikemii zaburzeniem struktury cytoszkieletu aktynowego i przyspieszeniem procesu degranulacji dlatego, że ziarnistości gęste ulegają wówczas znacznemu uwrażliwieniu na agonistów aktywacji płytek krwi (Ryc. 7, 9, 11, 12, 19) [193, 194]. Co więcej, insulinooporność mogłaby również prowadzić do zależnej od wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia, nasilonej degranulacji krwinek płytkowych, a w konsekwencji ich nadmiernej aktywacji i agregacji (Ryc. 7-12) [195].

### **5.3. Wpływ cukrzycy na produkcję tromboksanu A<sub>2</sub> i TBARS w płytkach krwi**

Brak wzrostu syntezy TXA<sub>2</sub> w aktywowanych płytkach krwi pacjentów z cukrzycą typu 2 jest niezgodny z danymi literaturowymi (Ryc. 13) [196-198]. Mianowicie w hiperglikemii obserwuje się wzrost produkcji TXA<sub>2</sub> w płytkach pacjentów z cukrzycą, który może być związany z zaburzeniami gospodarki lipidowej wśród tych pacjentów (Tab. 3). Obserwowana w naszej pracy hipertriglicydemia u pacjentów z cukrzycą mogłaby przyczyniać się do wzrostu VLDL, które zwiększają produkcję TXA<sub>2</sub> w aktywowanych płytkach krwi (Tab. 3, Ryc. 9-11 i 13) [196, 197, 199]. Mogłoby to prowadzić do zwiększonej reaktywności krwinek płytkowych, nasilenia procesu tworzenia agregatów płytkowych na powierzchni kolagenu i fibrynogenu, jak również zwiększonej agregacji po trombinie w grupie pacjentów z cukrzycą (Ryc. 9-11 i 13) [196, 197].

Z drugiej strony, powyższe dane pozostają jednak w zgodzie z wynikami innych autorów, w których udowodniono, że prawidłowa kontrola glikemii oraz wdrożona prawidłowa terapia insulinowa istotnie przyczyniała się do redukcji TXA<sub>2</sub> w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą (Tab. 3, Ryc. 13) [63, 72, 178].

Natomiast, wzrost akumulacji TBARS w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą jest zgodny z doniesieniami innych autorów, którzy obserwowali wzrost peroksydacji lipidów u pacjentów z cukrzycą, co mogło być spowodowane nasileniem stresu oksydacyjnego i utrzymywaniem się przewlekłego stanu zapalnego w warunkach hiperglikemii (Ryc. 20) [147, 148].

### **5.4. Wpływ cukrzycy na metabolizm glukozy w płytkach krwi**

Glukoza to podstawowy substrat energetyczny dla krwinek płytkowych, a jej zwiększony napływ do wnętrza megakariocytów i płytek krwi w warunkach hiperglikemii w cukrzycy może prowadzić do adaptacyjnych zmian aktywności płytkowych enzymów metabolizmu energetycznego (Tab. 3, 4) [41]. Obserwowany w naszej pracy wzrost aktywności heksokinazy i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, a także akonitazy w płytkach pacjentów z cukrzycą typu 2 potwierdzają doniesienia literaturowe innych badaczy (Tab. 3, 4). [41, 158]. Hiperglikemia w cukrzycy i obserwowany wzrost napływu glukozy do wnętrza płytek może wiązać się ze wzrostem płytkowej utylizacji glukozy i przyspieszeniem

płytkowej aktywności enzymatycznej (Ryc. 3, 4) [158]. Obserwowana w pracy zwiększona aktywność G-6-PDH w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą typu 2 potwierdza powyższą tezę oraz pośrednio może tłumaczyć nasilenie aktywności płytkowej reduktazy glutationu, obserwowanej w badaniach di Simplicio i wsp. (Tab. 4) [200]. Natomiast wzrost aktywności mitochondrialnej akonitazy w płytkach pacjentów z cukrzycą może wynikać z nasilenia płytkowego metabolizmu acetylo-CoA w cyklu Krebsa, który może być następnie utylizowany do syntezy płytkowych czynników aktywacji płytek krwi (Tab. 4) [159, 201].

Brak zmian w aktywności całkowitej IDH w płytkach osób z cukrzycą, może wskazywać, że ta droga metaboliczna nie podlega adaptacyjnym zmianom w warunkach hiperglikemii (Tab. 4). Z drugiej strony, enzym ten znajduje się w dwu kompartmentach komórkowych: aktywnym metabolicznie mitochondrialnym i w ziarnistościach  $\alpha$  (Tab. 4) [202]. Dlatego też wydaje się, że jedynie analiza IDH w izolowanych przedziałach płytek krwi umożliwiłaby prawidłową ocenę udziału dehydrogenazy izocytrynianowej w płytkowym metabolizmie energetycznym, w warunkach hiperglikemii w cukrzycy (Tab. 4) [202].

W warunkach hiperglikemii może dochodzić do zwiększonego napływu glukozy do wnętrza płytek krwi i zwiększenia ich aktywacji, a w konsekwencji agregacji i powikłań zakrzepowych (Ryc. 9, 10, 11) [41, 121, 159, 201]. Wiadomo, że w transporcie glukozy ze środowiska pozakomórkowego do wnętrza płytek krwi, przy udziale niezależnego od insuliny transportera GLUT3 i zależnego od insuliny GLUT4, ważną rolę odgrywa fosforylacja PKB-Ser<sup>473</sup> [35, 38]. W niniejszej pracy nie obserwowano istotnych różnic w fosforylacji PKB-Ser<sup>473</sup>, w aktywowanych trombiną płytkach krwi pomiędzy osobami zdrowymi i pacjentami z cukrzycą typu 2 (Ryc. 16) [35, 38]. Może to wynikać z faktu, że hiperaktywacja płytek krwi w hiperglikemii jest niezależna od fosforylacji PKB (Ryc. 11, 16) [35]. Dodatkowo, obserwowany przez nas brak wpływu insuliny (5  $\mu\text{mol/ml}$ ) na agregację płytek krwi indukowanej trombiną (0,10 JM/ml) mógłby wskazywać, że w aktywowanych płytkach krwi transport i utylizacja glukozy oraz ich aktywność są niezależne od insuliny (dane niepublikowane) (Ryc. 1) [37]. Co więcej, u pacjentów z cukrzycą typu 2, przyjmujących insulinę łącznie z doustnymi lekami hipoglikemizującymi, również nie obserwowaliśmy zmian w fosforylacji płytkowej PKB, co jest zgodne z danymi Rauchfuss i wsp., w których nie obserwowano zwiększenia fosforylacji PKB w płytkach krwi, po zastosowaniu insuliny (Ryc. 16, dane niepublikowane) [203].

Dane te potwierdzają, że transport glukozy w aktywowanych płytkach krwi jest niezależny od insuliny [37, 203].

## 5.5. Wpływ związków wanadu na metabolizm i funkcje płytek krwi w cukrzycy typu 2

### 5.5.1. Weryfikacją zakresu stężeń i toksyczności związków wanadu

Szereg doniesień literaturowych opisuje toksyczne lub nekrotyczne działanie związków wanadu na komórki, tkanki i narządy zarówno u zwierząt, jak i ludzi [85, 90, 124, 125]. Zastosowane w naszej pracy stężenia organicznego BMOV (0,50 mM) i nieorganicznego  $VCl_3$  (0,50 mM) były niższe, względem stężeń stosowanych w badaniach klinicznych ponieważ w zastosowanym modelu doświadczalnym stosowano izolowane płytki krwi, w warunkach *in vitro*, podczas gdy w badaniach klinicznych stosowano doustną suplementację związków wanadu (Ryc. 6-11) [90]. Z drugiej jednak strony, zastosowane stężenia przekraczały zakresy stężeń (10-30  $\mu M$ ), niezbędnych do aktywacji mitochondrialnych białkowych kinaz tyrozynowych PTP [204].

Fakt, że aktywność dehydrogenazy mleczanowej w środowisku pozakomórkowym, po zastosowaniu związków wanadu była porównywalna do warunków kontrolnych może sugerować, że związki wanadu, w stężeniach użytych w naszych doświadczeniach, nie powodują uszkodzenia błony komórkowej, co sugeruje, że nie powodowały nekrozy (Ryc. 5). Jest to zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów, którzy nie obserwowali cytotoksyczności po zastosowaniu jonów wanadanowych na linii psich nefronów typu MDCK (Ryc. 5) [205]. Poza tym, wybrane kompleksy związków wanadu, w tym organicznych związków wanadu, połączonych z maltolem w podobnych dawkach, były uznane za bezpieczne w doświadczeniach *in vivo* na szczurach (Ryc. 5) [90, 206-209]. Za bezpieczeństwem zastosowanych dawek przemawia także brak wpływu związków wanadu na wewnątrzkomórkową zawartość zredukowanego glutationu, co może też świadczyć o tym, że antyagregacyjne działanie związków wanadu na płytki krwi nie było wynikiem hamowania ich aktywności wskutek zaburzeń równowagi redukccyjnej i zwiększenia stresu oksydacyjnego (Ryc. 5, 6-11) [210-212]. Fakt, że analizowane przez nasz zespół stężenia związków wanadu nie miały wpływu na redukcję aktywności całkowitego SDH w teście MTT oraz aktywności fosfatazy kwaśnej, potwierdza, że nie wykazują one działania cytotoksycznego (Ryc. 2) [133]. Dodatkowo, antyagregacyjne działanie związków wanadu stosowanych w naszej pracy było silniejsze w początkowej fazie agregacji (2 minuta), w porównaniu do fazy końcowej (12 minuta), co może świadczyć o tym, że działanie związków wanadu jest częściowo lub całkowicie odwracalne (Ryc. 5, 11) [90, 133].

Brak wpływu związków wanadu na wewnątrzkomórkową równowagę oksydacyjno-redukcyjną pozostaje jednak w sprzeczności z doniesieniami Soaresa i wsp., którzy obserwowali zaburzenia mitochondrialnego potencjału transbłonowego, rozpad cytochromu c, a w konsekwencji apoptozę szczurzych hepatocytów, po doustnym podaniu zaledwie  $5,40 \pm 2,50 \mu\text{M}$  dawki dekawanadu (Ryc. 5) [94, 213-215]. Dodatkowo, dalszych weryfikacji metodycznych wymagają nasze dane, w których obserwowano istotnie nasilenie akumulacji TBARS w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą po zastosowaniu BMOV (Ryc. 20). Wiadomo jednak, że 12 i 24 godzinna ekspozycja hepatocytów na BMOV bądź dekawanad w warunkach *in vitro*, wywołała wzrost peroksydacji lipidów o odpowiednio 55% i 80% w mitochondriach tych komórek [214, 216]. Mogłyby to wskazywać na prooksydacyjne działanie związków wanadu na płytki krwi, w szczególności w hiperglikemii (Ryc. 20) [214, 216, 217].

Prawdopodobnie efekt toksyczny związków wanadu zależy nie tylko od ich stężenia, ale także od czasu ekspozycji, sposobu podania, analizowanej frakcji komórkowej, typu tkanki i gatunku zwierzęcia [214]. Dlatego też, wskazane jest, aby każdy związek wanadu był zweryfikowany pod względem cytotoksyczności, celem ustalenia optymalnych i bezpiecznych dawek związków wanadu, zarówno u osób zdrowych, jak i u pacjentów z cukrzycą.

Trudność w ustaleniu potencjalnie pro- bądź antyoksydacyjnego charakteru związków wanadu i różnic ich działania w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą sugeruje zachowanie ostrożności w stosowaniu suplementów związków wanadu (Ryc. 20).

### **5.5.2. Wpływ związków wanadu na funkcje płytek krwi pacjentów z cukrzycą**

Nieliczne doniesienia literaturowe opisują hamujący wpływ organicznego związku wanadu: BMOV, jak i szeregu nieorganicznych związków wanadu, w tym siarczanu wanadylu, ortowanadanu i metawanadanu na agregację płytek krwi, co tłumaczy się zmniejszeniem aktywacji receptorów płytkowych, tj. GP Ib, GP IIb/IIIa, GPVI czy P2Y<sub>12</sub>, [43, 93, 218, 219]. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają te obserwacje, ponieważ zastosowane: zarówno organiczny BMOV (0,50 mM), jak i nieorganiczny VCl<sub>3</sub> (0,50 mM), istotnie hamowały agregację płytek krwi indukowanych trombiną, co może świadczyć o tym, że działanie związków wanadu jest zależne od inaktywacji mechanizmów przekazywania sygnału zależnych od receptorów PAR 1 i 4 (Ryc. 9-11). W odpowiedzi na trombinę związki

wanadu regulują działanie białek  $G_{i\alpha}$  i  $G_{s\alpha}$  i mogą przyczyniać się do wzrostu cAMP przez inaktywację fosfodiesteraz płytkowych oraz jednocześnie hamowanie fosfolipazy C i hamowanie mobilizacji  $Ca^{2+}$  z magazynów wewnątrzpłytkowych, (Ryc. 1, 14, 20) [43, 90, 91, 133, 220, 221]. Brak wpływu związków wanadu na wydzielanie wewnątrzpłytkowego cAMP przy jednoczesnym znamienym nasileniu fosforylacji VASP mogłoby świadczyć o tym, że związki wanadu nasilają utylizację cAMP w aktywowanych płytkach krwi (Ryc. 14 i 19).

W przedstawionej pracy obserwowaliśmy redukcję adhezji, powierzchni (ang. spreading) i tworzenia agregatów płytkowych, aktywowanych kolagenem i fibrynogenem płytek krwi przez BMOV, zarówno w grupie osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą (Ryc. 6-11) [91, 93]. Dane te wskazują na istotne, anty-aktywacyjne właściwości organicznego BMOV na funkcje płytek krwi, w mechanizmie zależnym od hamowania integryn  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_3$  oraz  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Ryc. 6-11) [179, 222]. Co więcej fakt, że BMOV równocześnie redukuje fosforylację RhoA i MLC w aktywowanych płytkach krwi obu badanych grup może świadczyć, że mechanizm działania BMOV jest zależny od regulacji ścieżek sygnalizacyjnych, odpowiedzialnych za regulację kształtu płytek krwi i reorganizację ich cytoszkieletu (Ryc. 6-8, 17, 18). Jest to zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy obserwowali podobne zmiany morfologiczne w komórkach glejaka, raka prostaty i płytek krwi, w których zahamowano aktywność lub fosforylację RhoA [63, 242, 243, 244]. Jednocześnie obserwowany wzrost fosforylacji VASP w aktywowanych płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą, po zastosowaniu BMOV wskazuje, że hamowanie funkcji płytek krwi przez organiczne związki wanadu może być też regulowane w mechanizmie płytkowej sygnalizacji, zależnej od cAMP (Ryc. 1, 6, 7, 8, 14, 19, 20) [179, 222].

Z drugiej strony, nasilenie adhezji i zwiększenie powierzchni krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą, aktywowanych kolagenem przez  $VCl_3$ , sugeruje proaktywacyjne właściwości nieorganicznego związku wanadu we wstępnym etapie aktywacji płytek krwi, w warunkach hiperglikemii (Ryc. 6-8) [222]. Jednocześnie, obserwowany przez nas brak wpływu  $VCl_3$  na kształt krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą, aktywowanych fibrynogenem oraz na tworzenie agregatów płytek krwi może wskazywać, że  $VCl_3$  nie ma wpływu na ostateczny etap aktywacji krwinek płytkowych w mechanizmie aktywacji płytkowych integryn  $\alpha_2\beta_1$  i  $\alpha_2\beta_3$  bądź  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Ryc. 9, 10). Natomiast jednocześnie obserwowany w naszej pracy spadek fosforylacji RhoA i MLC w płytkach krwi obu badanych grup po zastosowaniu  $VCl_3$  może sugerować, że wewnątrzpłytkowy mechanizm przekazywania sygnałów poprzez RhoA i MLC nie odgrywa jednak istotnej roli w regulacji adhezji i zmiany kształtu płytek krwi (Ryc. 17, 18).



Natomiast jednoczesny brak zmian w fosforylacji VASP-Ser<sup>157</sup> w cukrzycowych płytkach krwi po zastosowaniu VCl<sub>3</sub>, może świadczyć o tym, że nieorganiczny związek wanadu nie ma wpływu na regulację ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od wewnątrzpłytkowego cAMP w warunkach hiperglikemii (Ryc. 1, 6, 7, 8 i 20). Dane te mogą też wskazywać, że wpływ VCl<sub>3</sub> na fosforylację VASP w warunkach hiperglikemii może być niewystraszający, aby hamować wstępny etap aktywacji płytek krwi (Ryc. 1, 6, 7, 8, 19) [222-224].

W naszych badaniach BMOV i VCl<sub>3</sub> miały odmienny wpływ na funkcje płytek krwi (Ryc. 6-11). Może to być związane z odmiennymi właściwościami chemicznymi, wynikającymi z ich odmiennej struktury przestrzennej, czy obecności tlenu, które mogą mieć istotne znaczenie w oddziaływaniu związków wanadu z receptorami krwinek płytkowych (Ryc. 6-11) [86, 210].

### **5.5.3. Wpływ związków wanadu na wydzielanie ATP z płytek pacjentów z cukrzycą**

Obserwowana w naszej pracy redukcja wydzielania ATP do przestrzeni zewnątrzkomórkowej z aktywowanych trombiną płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą, zarówno przez BMOV, jak i VCl<sub>3</sub> może świadczyć o tym, że związki wanadu mogą blokować wydzielanie ATP z ziarnistości płytkowych (Ryc. 11, 12, 14, 17, 18) [41, 91, 225]. Nasze obserwacje są zgodne z doniesieniami González-Villalva, gdzie obserwowano redukcję agregacji płytek krwi i wydzielania ATP, w mechanizmie zależnym od cAMP, w mysich płytkach krwi (Ryc. 11, 12, 14, 17, 18) [41, 91, 225]. Zmniejszenie uwalniania zawartości ziarnistości płytkowych, obserwowane po zastosowaniu zarówno organicznego BMOV, jak i nieorganicznego VCl<sub>3</sub>, może wynikać z ich wpływu na reorganizację cytoszkieletu komórkowego, zależnego między innymi od fosforylacji białka RhoA-Ser<sup>188</sup> i MLC-Ser<sup>20</sup>, niezbędnych w procesie degranulacji płytek krwi (Ryc. 1, 12, 17, 18) [226].

Co więcej, nasze obserwacje są zgodne z wcześniejszymi danymi innych autorów, którzy obserwowali zniesienie procesu adhezji i agregacji krwinek płytkowych oraz upośledzenie tworzenia skrzepu zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, u myszy pozbawionych ziarnistości gęstych (Ryc. 6, 9, 10, 11) [227]. A zatem, związki wanadu mogą być odpowiedzialne za regulację ścieżek sygnalizacyjnych, biorących udział w procesie degranulacji (Ryc. 1, 12, 17, 18) [225, 227].

Fakt, że związki wanadu prawie dwukrotnie słabiej redukowały płytkową fosforylację MLC-Ser<sup>20</sup>, w porównaniu do wydzielania ATP w obu badanych grupach może świadczyć o tym, że związki wanadu hamują degranulację w aktywowanych płytkach krwi również w mechanizmach niezależnych od fosforylacji MLC (Ryc. 12, 18) [48, 57, 139].

#### **5.5.4. Wpływ związków wanadu na produkcję tromboksanu A<sub>2</sub> i TBARS w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą**

Obserwowany przez nas wzrost uwalniania TXA<sub>2</sub> z aktywowanych płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą, po zastosowaniu BMOV i chlorku wanadu może świadczyć o proaktywacyjnych właściwościach badanych związków wanadu, co potwierdzają doniesienia Korbeckiego i wsp., opisujące zwiększenie ekspresji cyklooksygenazy 1, a więc pośrednio również syntezy tromboksanu A<sub>2</sub> w komórkach linii ludzkich monocytów (ang. monocytic line THP-1), po zastosowaniu nieorganicznego ortowanadanu sodu (Ryc. 13) [210, 228].

Co więcej, VCl<sub>3</sub> istotnie zwiększał akumulację TBARS w płytkach pacjentów z cukrzycą (Ryc. 20). Podobne wyniki obserwowano w osoczu u szczurów z cukrzycą wyindukowaną streptozotocyną, po zastosowaniu nieorganicznego siarczanu wanadylu [148]. Również inni autorzy obserwowali wzrost peroksydacji lipidów w mitochondriach hepatocytów, po zastosowaniu BMOV bądź dekawanadu w warunkach *in vitro* [214, 216]. Powyższe dane mogą wskazywać na prooksydacyjne działanie związków wanadu (Ryc. 20) [214, 216, 217].

Nasilenie produkcji TXA<sub>2</sub> i TBARS w aktywowanych płytkach krwi po zastosowaniu VCl<sub>3</sub>, przy jednoczesnej redukcji agregacji płytek krwi, jest niejasna i wymaga dalszych weryfikacji, w celu pełnego wyjaśnienia bezpieczeństwa stosowania związków wanadu, zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą (Ryc. 13, 20) [71, 214, 216].

### **5.5.5. Wpływ związków wanadu na przekazywanie sygnału zależnego od wewnątrzpłytkowego cAMP u pacjentów z cukrzycą**

W naszych badaniach poziom wewnątrzpłytkowego cAMP nie zmieniał się w obecności BMOV, dodatkowo inhibicja rozpadu cAMP nie wpływała na jego poziom przy jednoczesnym wzroście fosforylacji VASP (Ryc. 14, dane niepublikowane). Wyniki te świadczą o możliwym przyspieszonym zużyciu cAMP do fosforylacji białek regulatorowych, w tym VASP i PKA w aktywowanych płytkach krwi po zastosowaniu związków wanadu (Ryc. 14, 15, 19) [93, 122]. Co więcej, BMOV redukuje tworzenie agregatów płytek krwi, a więc hamował ich aktywność w mechanizmie zależnym od cAMP, a więc i fosforylacji PKA i VASP (Ryc. 9, 10, 14, 15, 19) (dane niepublikowane) [87, 116]. Pełne wyjaśnienie tej hipotezy wymaga użycia inhibitora fosforylacji VASP.

Fakt, że poziom fosforylacji VASP po zastosowaniu BMOV był znamienne wyższy w aktywowanych płytkach pacjentów z cukrzycą może świadczyć o tym, że w warunkach hiperglikemii BMOV może redukować aktywność płytek krwi w mechanizmie zależnym od cAMP (Ryc. 6-11, 14, 19).

Z drugiej strony, obserwowany przez nas spadek wewnątrzpłytkowego cAMP przy jednoczesnym zwiększeniu fosforylacji PKAc oraz hamowaniu agregacji płytek krwi pacjentów z cukrzycą po zastosowaniu nieorganicznego  $VCl_3$  może sugerować, że nieorganiczny związek wanadu hamuje funkcje płytek krwi poprzez bezpośredni wpływ na aktywność PKAc (Ryc. 14, 15).

Uzyskane wyniki wskazujące na przeciwpłytkowe właściwości związków wanadu, zależne od cAMP, pozostają w zgodzie z doniesieniami innych badaczy, którzy po zastosowaniu nieorganicznego związku wanadu (siarczanu wanadyłu) w szczurzych komórkach nadnercza obserwowali aktywację ścieżek sygnalizacyjnych regulowanych przez cAMP (Ryc. 14) [91, 229, 230].

### **5.6. Wpływ związków wanadu na aktywność enzymów metabolizmu glukozy w płytkach krwi u pacjentów z cukrzycą**

Zarówno organiczny BMOV, jak i nieorganiczny  $VCl_3$  hamowały aktywności enzymów metabolizmu glukozy i fosforylację PKB-Ser<sup>473</sup> w aktywowanych płytkach krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą (Tab. 4, Ryc. 16).

Nasze wyniki są sprzeczne z doniesieniami Hiromury i wsp. którzy obserwowali nasilenie fosforylacji PKB-Ser<sup>473</sup>, po doustnej terapii organicznymi związkami wanadu, u myszy z wyindukowaną streptozotocyną cukrzycą [119]. Również eksperymenty na adipocytach wskazały, że organiczne związki wanadu, w tym BMOV nasilały fosforylację PKB w pozycji 473 seryny [119, 231, 232].

Co więcej, doświadczenia *in vitro*, jak też badania na zwierzętach, wykazały nasilenie transportu glukozy i jej utylizację w mięśniach i tkance tłuszczowej oraz wzrost syntezy glikogenu w hepatocytach szczurów, po zastosowaniu nieorganicznych związków wanadu, w tym siarczanu wanadylu i ortowanadanu [85, 113]. Dodatkowo, zastosowanie nieorganicznego VO(alx)<sub>2</sub> u myszy z wyindukowaną streptozotocyną cukrzycą nasilało fosforylację PKB i GSK-3 w tkance mięśniowej, a tym samym redukowało stężenie glukozy we krwi, co wskazuje na kluczową rolę fosforylacji PKB w metabolizmie glukozy, w odpowiedzi na kompleksy wanadowe [105, 119].

Niezgodność uzyskanych przez nas wyników z danymi literaturowymi może być związana z faktem, że zastosowanie modelu zwierzęcego lub hodowli komórkowych umożliwia prowadzenie nawet kilkunastodniowej, przewlekłej obserwacji wpływu ekspozycji związków wanadu na komórki i zwierzęta doświadczalne [41, 85, 113, 159]. Natomiast w naszych doświadczeniach izolowane płytki krwi były poddane krótkiej ekspozycji na związki wanadu, gdyż zachowują one metabolizm energetyczny i funkcje do kilku godzin od ich izolacji z krwi pełnej (Tab. 4, Ryc. 16) [85, 113]. Rozbieżność ta może wynikać również z faktu, że przytoczone dane literaturowe dotyczyły komórek i tkanek insulinozależnych, podczas gdy płytki krwi są komórkami insulinoniezależnymi [41, 43, 85, 113, 159]. I tak, okazuje się, że obserwowany przez nas spadek płytkowego metabolizmu energetycznego po zastosowaniu związków wanadu jest zgodny z danymi innych autorów, w których metawanad redukował aktywności enzymów mitochondrialnych, w tym akonitazy w komórkach insulinoniezależnych typu neuroblastoma [233]. A zatem obserwowany w naszej pracy spadek aktywności płytek krwi po zastosowaniu BMOV może świadczyć o hamowaniu przez organiczny związek wanadu aktywności enzymów, odpowiedzialnych za utylizację, transport glukozy, jak również za produkcję lipidowych czynników aktywacji płytek krwi i uwalniania zawartości ziarnistości (Tab. 4, Ryc. 6-11, 13, 16). Silniejsza redukcja przez BMOV agregacji płytek krwi pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych, przy jednoczesnym podobnym hamowaniu aktywności enzymów, odpowiedzialnych za utylizację glukozy i produkcję energii ich metabolizmu energetycznego, w obu badanych grupach może jednak świadczyć o tym, że w warunkach hiperglikemii związki wanadu hamują aktywność płytek

krwi jeszcze w innych mechanizmach niezależnych od redukcji ich metabolizmu energetycznego (Tab. 4, Ryc. 11) [41]. Świadczy o tym działanie  $VCl_3$ , który istotnie hamował metabolizm energetyczny płytek krwi w obu badanych grupach, aczkolwiek wykazywał słabsze właściwości antyagregacyjne (Tab. 4, Ryc. 6-10, 11) [41, 201]. Niewykluczone, że przyczyną różnic w antypłytkowym działaniu nieorganicznego  $VCl_3$  i organicznego BMOV jest różny stopień nasilenia przez ten związek produkcji  $TXA_2$  albo też regulacji sygnalizacji płytkowej zależnej od cAMP, w tym fosforylacji VASP (Ryc. 11, 13, 14, 19). Tłumaczyłoby to znamienne wzrost fosforylacji VASP i syntezy  $TXA_2$  przy znacznej redukcji aktywności płytek krwi przez BMOV i jednoczesny brak zmian w fosforylacji VASP, a także nasilenie akumulacji  $TXA_2$  przy nieznacznym działaniu antyagregacyjnym po zastosowaniu  $VCl_3$  (Ryc. 7-10, 13, 19).

Powyższe obserwacje potwierdzają tezę, że obserwowany wzrost aktywności płytek krwi i powikłań zakrzepowych, obserwowanych w cukrzycy typu 2 jest związany przede wszystkim z zmniejszoną dostępnością cAMP do fosforylacji kluczowych enzymów, niezbędnych do hamowania nadmiernej aktywności płytek krwi w warunkach hiperglikemii w krążeniu (Ryc. 1, 9-11, 13, 19) [37, 43, 60].

Epidemia cukrzycy wciąż stanowi istotny problem cywilizacyjny, skłaniający do poszukiwania rozwiązań poprawiających skuteczność jej leczenia. Związki wanadu jako suplementy, z uwagi na ich właściwości insulinomimetyczne, potencjalnie mogłyby znacząco wspomóc istniejące terapie (Ryc. 1, 6, 14, 16, 19) [85, 96, 99, 100, 108]. Nasze dane porównawcze w płytkach krwi dla dwu różnych związków wanadu wskazują na to, że byłyby one użyteczne jako terapia wspomagająca w redukcji częstości powikłań zakrzepowych. Należy jednak zachować ostrożność szczególnie w stosowaniu nieorganicznych związków wanadu. Dodatkowo, wciąż nie znamy długoterminowych efektów leczenia wanadem.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy, wskazujące na różnice w działaniu związków wanadu na płytki osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą, wydają się stanowić argument za tym, że niezbędne są dalsze badania dotyczące bezpieczeństwa, odstępów terapeutycznych i dawek toksycznych u różnych grup pacjentów.

## 6. WNIOSKI

Przedstawione wyniki wskazują na udział związków wanadu w regulacji metabolizmu i funkcji płytek krwi u osób zdrowych oraz pacjentów z cukrzycą typu 2.

1. Przewlekła hiperglikemia i zaburzenia gospodarki lipidowej w cukrzycy typu 2 prowadzą do nadmiernej aktywności enzymów związanych z metabolizmem glukozy, akumulacji TBARS oraz do zaburzeń mechanizmów sygnalizacji zależnej od cAMP. Może to prowadzić do zwiększonej degranulacji płytek krwi i uwalniania czynników proplatekcyjnych, a w konsekwencji do nadmiernej aktywności płytek krwi u pacjentów z cukrzycą.
2. Organiczny związek wanadu BMOV oraz chlorek wanadu hamują aktywność enzymów odpowiedzialnych za utylizację i transport glukozy, jak również redukują aktywność płytek krwi zarówno osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą, prawdopodobnie poprzez blokowanie integryn  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_3$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  oraz receptorów PAR, w mechanizmie zależnym od redukcji fosforylacji enzymów RhoA i MLC, odpowiedzialnych za kształt płytek krwi, reorganizację ich cytoszkieletu i degranulację.
3. Zahamowanie przez BMOV agregacji aktywowanych płytek krwi, przy jednoczesnym wzroście fosforylacji białka VASP, może wskazywać na udział w tym procesie sygnalizacji zależnej od cAMP.
4. BMOV silniej hamuje agregację płytek krwi u pacjentów z cukrzycą, nasilając jednocześnie aktywację płytkowej sygnalizacji zależnej do cAMP. Może to świadczyć o tym, że w warunkach hiperglikemii, przeciwplatekowe działanie BMOV wynika z przyspieszonego zużycia cAMP do fosforylacji białka VASP-Ser<sup>157</sup>.
5. Nasilenie produkcji TXA<sub>2</sub> i TBARS w aktywowanych płytkach krwi po zastosowaniu VCl<sub>3</sub>, przy jednoczesnej redukcji agregacji płytek krwi, jest niejasne i wymaga dalszych weryfikacji, w celu pełnego wyjaśnienia bezpiecznego stosowania tego związku, zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą.
6. BMOV i VCl<sub>3</sub> wykazują odmienny wpływ na funkcje płytek krwi. Może to być związane z ich właściwościami chemicznymi, które mogą mieć istotne znaczenie w oddziaływaniu związków wanadu z receptorami oraz enzymami krwinek płytkowych. Co więcej, wpływ BMOV bądź VCl<sub>3</sub> zależy od ekspozycji płytek krwi na przewlekłą hiperglikemię.

Suplement 1. Cele wyrównania gospodarki węglowodanowo-lipidowej u pacjentów chorych na cukrzycę.

<b>Parametr</b>	<b>Cele</b>	<b>Komentarz</b>
<b>Hemoglobina glikowana HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	$\leq 7\%$	- cel ogólny
	$\leq 6,50\%$	- u pacjentów z cukrzycą typu 1, gdy nie ma ryzyka hipoglikemii,
	$\leq 8,00\%$	- u pacjentów z krótkotrwałą cukrzycą typu 2, - u pacjentów w zaawansowanym wieku i/lub z makroangiopatią i/lub chorobami towarzyszącymi,
<b>Cholesterol całkowity (mg/dl)</b>	$< 175$ mg/dl	
<b>Cholesterol LDL (mg/dl)</b>	$< 70$ mg/dl	
	$< 100$ mg/dl	- dopuszczalne u młodych pacjentów ( $< 40$ r. ż.) z cukrzycą typu 1,
<b>Cholesterol HDL (mg/dl)</b>	$> 50$ mg/dl	- u kobiet
	$> 40$ mg/dl	- u mężczyzn
<b>Triglicerydy (mg/dl)</b>	$< 150$ mg/dl	

Przedstawione wyniki pochodzą z „Zaleceń klinicznych dotyczących postępowania u chorych na cukrzycę 2018”, opublikowanych przez Polskie Towarzystwo Diabetologiczne w 2018 roku.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res* 2007;31(10):1339-41.
- [2] Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:781857.
- [3] Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res* 2013;6(3):299-309.
- [4] Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* 2010;191(4):861-74.
- [5] Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 2013;201(6):785-96.
- [6] Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 2005;106(13):4066-75.
- [7] Machlus KR, Thon JN, Italiano JE. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol* 2014;165(2):227-36.
- [8] Hartwig J, Italiano J. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1580-6.
- [9] Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, Wu S, Mazutis L, Deschmann E, et al. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* 2015;125(5):860-8.
- [10] Italiano JE, Bergmeier W, Tiwari S, Falet H, Hartwig JH, Hoffmeister KM, et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* 2003;101(12):4789-96.
- [11] Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* 2009;113(2):458-61.
- [12] Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol* 2001;11(8):579-86.
- [13] Michelson A. *Platelets*. Third edition. ed. Amsterdam: Academic Press; 2013.
- [14] Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation



Journal of Thrombosis and Haemostasis Volume 1, Issue 7. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1. 2003:1602-12.

- [15] Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(12):2341-9.
- [16] Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med (Berl)* 2011;89(2):109-21.
- [17] Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost* 2009;7 Suppl 1:206-9.
- [18] Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005;106(7):2417-23.
- [19] Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007;100(12):1673-85.
- [20] Woulfe DS. Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert Rev Hematol* 2010;3(1):81-91.
- [21] Shen B, Delaney MK, Du X. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol* 2012;24(5):600-6.
- [22] Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost* 2013;11(4):605-14.
- [23] Ozaki Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O. Platelet receptors activated via multimerization: glycoprotein VI, GPIb-IX-V, and CLEC-2. *J Thromb Haemost* 2013;11 Suppl 1:330-9.
- [24] Ding N, Chen G, Hoffman R, Loughran PA, Sodhi CP, Hackam DJ, et al. Toll-like receptor 4 regulates platelet function and contributes to coagulation abnormality and organ injury in hemorrhagic shock and resuscitation. *Circ Cardiovasc Genet* 2014;7(5):615-24.
- [25] Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 2005;83(2):196-8.
- [26] Luttrell LM. Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 2006;332:3-49.
- [27] Luttrell LM. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 2008;39(3):239-64.
- [28] Hechler B, Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal* 2011;7(3):293-303.

- [29] Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000;102(16):1931-6.
- [30] Drickamer K, Taylor ME. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr Opin Struct Biol* 2015;34:26-34.
- [31] Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y. Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects. *J Thromb Haemost* 2011;9 Suppl 1:44-55.
- [32] Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2010;8(7):1456-67.
- [33] Craik JD, Stewart M, Cheeseman CI. GLUT-3 (brain-type) glucose transporter polypeptides in human blood platelets. *Thromb Res* 1995;79(5-6):461-9.
- [34] Heijnen HF, Oorschot V, Sixma JJ, Slot JW, James DE. Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol* 1997;138(2):323-30.
- [35] Ferreira IA, Mocking AI, Urbanus RT, Varlack S, Wnuk M, Akkerman JW. Glucose uptake via glucose transporter 3 by human platelets is regulated by protein kinase B. *J Biol Chem* 2005;280(38):32625-33.
- [36] Fidler TP, Middleton EA, Rowley JW, Boudreau LH, Campbell RA, Souvenir R, et al. Glucose Transporter 3 Potentiates Degranulation and Is Required for Platelet Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37(9):1628-39.
- [37] Ferreira JL, Gómez-Hospital JA, Angiolillo DJ. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 2010;7(4):251-9.
- [38] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414(6865):799-806.
- [39] Hwang DL, Yen CF, Nadler JL. Insulin increases intracellular magnesium transport in human platelets. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(3):549-53.
- [40] Hers I. Insulin-like growth factor-1 potentiates platelet activation via the IRS/PI3K pathway. *Blood* 2007;110(13):4243-52.
- [41] Michno A, Bielarczyk H, Pawelczyk T, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska J, Szutowicz A. Alterations of adenine nucleotide metabolism and function of blood platelets in patients with diabetes. *Diabetes* 2007;56(2):462-7.
- [42] Bashan N, Burdett E, Gumà A, Sargeant R, Tumiati L, Liu Z, et al. Mechanisms of adaptation of glucose transporters to changes in the oxidative chain of muscle and fat cells. *Am J Physiol* 1993;264(2 Pt 1):C430-40.

- [43] Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. *Int J Endocrinol* 2011;2011:742719.
- [44] Dütting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci* 2012;33(11):583-90.
- [45] Boulaftali Y, Hess PR, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res* 2014;114(7):1174-84.
- [46] Aslan JE, McCarty OJ. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost* 2013;11(1):35-46.
- [47] McGarrigle D, Huang XY. GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Sci STKE* 2007;2007(392):pe35.
- [48] Goggs R, Williams CM, Mellor H, Poole AW. Platelet Rho GTPases-a focus on novel players, roles and relationships. *Biochem J* 2015;466(3):431-42.
- [49] Li Z, Zhang G, Liu J, Stojanovic A, Ruan C, Lowell CA, et al. An important role of the SRC family kinase Lyn in stimulating platelet granule secretion. *J Biol Chem* 2010;285(17):12559-70.
- [50] Ren Q, Ye S, Whiteheart SW. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol* 2008;15(5):537-41.
- [51] Sandmann R, Köster S. Topographic Cues Reveal Two Distinct Spreading Mechanisms in Blood Platelets. *Sci Rep* 2016;6:22357.
- [52] Lemons PP, Chen D, Bernstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW. Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood* 1997;90(4):1490-500.
- [53] Lang F, Münzer P, Gawaz M, Borst O. Regulation of STIM1/Orai1-dependent Ca<sup>2+</sup> signalling in platelets. *Thromb Haemost* 2013;110(5):925-30.
- [54] Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2009;7(7):1057-66.
- [55] Mahaut-Smith MP. A role for platelet TRPC channels in the Ca<sup>2+</sup> response that induces procoagulant activity. *Sci Signal* 2013;6(281):pe23.
- [56] Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2010;8(3):454-62.
- [57] Aburima A, Wraith KS, Raslan Z, Law R, Magwenzi S, Naseem KM. cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change

- through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway. *Blood* 2013;122(20):3533-45.
- [58] Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost* 2016;14(5):918-30.
- [59] Aloui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, et al. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *Int J Mol Sci* 2014;15(12):22342-64.
- [60] Kubisz P, Stančíaková L, Staško J, Galajda P, Mokáň M. Endothelial and platelet markers in diabetes mellitus type 2. *World J Diabetes* 2015;6(3):423-31.
- [61] Chudý P, Kotuličová D, Staško J, Kubisz P. The relationship among TAFI, t-PA, PAI-1 and F1 + 2 in type 2 diabetic patients with normoalbuminuria and microalbuminuria. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011;22(6):493-8.
- [62] Santilli F, Simeone P, Liani R, Davì G. Platelets and diabetes mellitus. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2015;120:28-39.
- [63] Brown AS, Hong Y, de Belder A, Beacon H, Beeso J, Sherwood R, et al. Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(4):802-7.
- [64] Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 2010;110(6):911-16.e12.
- [65] Geraldès P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 2010;106(8):1319-31.
- [66] Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 2004;95(3):233-8.
- [67] Greifenhagen U, Frolov A, Blüher M, Hoffmann R. Plasma Proteins Modified by Advanced Glycation End Products (AGEs) Reveal Site-specific Susceptibilities to Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes. *J Biol Chem* 2016;291(18):9610-6.
- [68] Yngen M, Ostenson CG, Hu H, Li N, Hjemdahl P, Wallén NH. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 Ligand in patients with Type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 2004;47(3):537-40.

- [69] Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003;92(9):1041-8.
- [70] Watala C, Boncer M, Golański J, Koziółkiewicz W, Trojanowski Z, Walkowiak B. Platelet membrane lipid fluidity and intraplatelet calcium mobilization in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Haematol* 1998;61(5):319-26.
- [71] Alexandru N, Popov D, Sbarcea A, Amuzescu M. Platelet free cytosolic calcium concentration during ageing of type 2 diabetic patients. *Platelets* 2007;18(7):473-80.
- [72] Kim JH, Bae HY, Kim SY. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 2013;37(6):423-8.
- [73] Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C, Davì G. Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res* 2012;129(3):371-7.
- [74] Assert R, Scherk G, Bumbure A, Pirags V, Schatz H, Pfeiffer AF. Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets in vivo and in vitro. *Diabetologia* 2001;44(2):188-95.
- [75] Lemkes BA, Hermanides J, Devries JH, Holleman F, Meijers JC, Hoekstra JB. Hyperglycemia: a prothrombotic factor? *J Thromb Haemost* 2010;8(8):1663-9.
- [76] Boden G, Vaidyula VR, Homko C, Cheung P, Rao AK. Circulating tissue factor procoagulant activity and thrombin generation in patients with type 2 diabetes: effects of insulin and glucose. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(11):4352-8.
- [77] Vaidyula VR, Rao AK, Mozzoli M, Homko C, Cheung P, Boden G. Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD40 ligand. *Diabetes* 2006;55(1):202-8.
- [78] Ferreira IA, Mocking AI, Feijge MA, Gorter G, van Haefen TW, Heemskerk JW, et al. Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(2):417-22.
- [79] Knebel SM, Sprague RS, Stephenson AH. Prostacyclin receptor expression on platelets of humans with type 2 diabetes is inversely correlated with hemoglobin A1c levels. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2015;116-117:131-5.
- [80] Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113(15):1888-904.

- [81] Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol* 2008;19(4):378-84.
- [82] Soran H, Durrington PN. Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(4):254-61.
- [83] Ferretti G, Rabini RA, Bacchetti T, Vignini A, Salvolini E, Ravaglia F, et al. Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(5):2180-4.
- [84] Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon MV, Schoenwaelder SM, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation* 2009;120(21):2095-104.
- [85] Srivastava AK, Mehdi MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabet Med* 2005;22(1):2-13.
- [86] Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim Pol* 2012;59(2):195-200.
- [87] Sanchez-Gonzalez C, Bermudez-Peña C, Guerrero-Romero F, Trenzado CE, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, et al. Effect of bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *Br J Nutr* 2012;108(5):893-9.
- [88] Sánchez-González C, López-Chaves C, Trenzado CE, Aranda P, López-Jurado M, Gómez-Aracena J, et al. Changes in iron metabolism and oxidative status in STZ-induced diabetic rats treated with bis(maltolato) oxovanadium (IV) as an antidiabetic agent. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:706074.
- [89] Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium--an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett* 2004;150(2):135-43.
- [90] Thompson KH, Lichter J, LeBel C, Scaife MC, McNeill JH, Orvig C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future. *J Inorg Biochem* 2009;103(4):554-8.
- [91] González-Villalva A, Piñón-Zárate G, De la Peña Díaz A, Flores-García M, Bizarro-Nevarés P, Rendón-Huerta EP, et al. The effect of vanadium on platelet function. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011;32(3):447-56.
- [92] Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger HW. Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutat Res* 2002;519(1-2):25-35.

- [93] Suenaga A, Ueki H. Effect of orthovanadate on platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Biol Pharm Bull* 2004;27(11):1859-63.
- [94] Gruzewska K, Michno A, Pawelczyk T, Bielarczyk H. Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology. *J Physiol Pharmacol* 2014;65(5):603-11.
- [95] Ozturk N, Olgar Y, Ozdemir S. Trace elements in diabetic cardiomyopathy: An electrophysiological overview. *World J Diabetes* 2013;4(4):92-100.
- [96] Domingo JL, Gómez M. Vanadium compounds for the treatment of human diabetes mellitus: A scientific curiosity? A review of thirty years of research. *Food Chem Toxicol* 2016;95:137-41.
- [97] Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, Chang CJ, Shamon H, Rossetti L. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1995;95(6):2501-9.
- [98] Halberstam M, Cohen N, Shlimovich P, Rossetti L, Shamon H. Oral vanadyl sulfate improves insulin sensitivity in NIDDM but not in obese nondiabetic subjects. *Diabetes* 1996;45(5):659-66.
- [99] Goldfine AB, Patti ME, Zuberi L, Goldstein BJ, LeBlanc R, Landaker EJ, et al. Metabolic effects of vanadyl sulfate in humans with non-insulin-dependent diabetes mellitus: in vivo and in vitro studies. *Metabolism* 2000;49(3):400-10.
- [100] Cusi K, Cukier S, DeFronzo RA, Torres M, Puchulu FM, Redondo JC. Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):1410-7.
- [101] Missaoui S, Ben Rhouma K, Yacoubi MT, Sakly M, Tebourbi O. Vanadyl sulfate treatment stimulates proliferation and regeneration of beta cells in pancreatic islets. *J Diabetes Res* 2014;2014:540242.
- [102] Goldwasser I, Gefel D, Gershonov E, Fridkin M, Shechter Y. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *J Inorg Biochem* 2000;80(1-2):21-5.
- [103] Marzban L, Rahimian R, Brownsey RW, McNeill JH. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium(IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Endocrinology* 2002;143(12):4636-45.
- [104] Gao LH, Liu WP, Wang BL, Li L, Xie MJ, Li YR, et al. Effects of bis(alpha-furancarboxylato)oxovanadium(IV) on non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2006;368(1-2):173-8.

- [105] Niu Y, Liu W, Tian C, Xie M, Gao L, Chen Z, et al. Effects of bis(alpha-furancarboxylato)oxovanadium(IV) on glucose metabolism in fat-fed/streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2007;572(2-3):213-9.
- [106] Marzban L, McNeill J. Insulin-like actions of vanadium: Potential as a therapeutic agent. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 2003;16(4):253-67.
- [107] Li SH, McNeill JH. In vivo effects of vanadium on GLUT4 translocation in cardiac tissue of STZ-diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2001;217(1-2):121-9.
- [108] Mohammad A, Sharma V, McNeill JH. Vanadium increases GLUT4 in diabetic rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 2002;233(1-2):139-43.
- [109] Treviño S, Velázquez-Vázquez D, Sánchez-Lara E, Diaz-Fonseca A, Flores-Hernandez J, Pérez-Benítez A, et al. Metforminium Decavanadate as a Potential Metallopharmaceutical Drug for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:6058705.
- [110] Treviño S, Sánchez-Lara E, Sarmiento-Ortega VE, Sánchez-Lombardo I, Flores-Hernández J, Pérez-Benítez A, et al. Hypoglycemic, lipid-lowering and metabolic regulation activities of metforminium decavanadate (H<sub>2</sub>Metf)<sub>3</sub> [V<sub>10</sub>O<sub>28</sub>]·8H<sub>2</sub>O using hypercaloric-induced carbohydrate and lipid deregulation in Wistar rats as biological model. *J Inorg Biochem* 2015;147:85-92.
- [111] Smith DM, Pickering RM, Lewith GT. A systematic review of vanadium oral supplements for glycaemic control in type 2 diabetes mellitus. *QJM* 2008;101(5):351-8.
- [112] Lapenna D, Ciofani G, Bruno C, Pierdomenico SD, Giuliani L, Giamberardino MA, et al. Vanadyl as a catalyst of human lipoprotein oxidation. *Biochem Pharmacol* 2002;63(3):375-80.
- [113] Thompson KH, Orvig C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J Inorg Biochem* 2006;100(12):1925-35.
- [114] Bandeira SeM, Guedes GaS, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, et al. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:819310.
- [115] Crans DC. Antidiabetic, Chemical, and Physical Properties of Organic Vanadates as Presumed Transition-State Inhibitors for Phosphatases. *J Org Chem* 2015;80(24):11899-915.
- [116] Aureliano M, Henao F, Tiago T, Duarte RO, Moura JJ, Baruah B, et al. Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase is inhibited by organic vanadium coordination compounds:



- pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an amavadin analogue. *Inorg Chem* 2008;47(13):5677-84.
- [117] Lu L, Gao X, Zhu M, Wang S, Wu Q, Xing S, et al. Exploration of biguanido-oxovanadium complexes as potent and selective inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Biometals* 2012;25(3):599-610.
- [118] Bose S, Farah MA, Jung HC, Lee JH, Kim Y. Molecular mechanism of bis(maltolato)oxovanadium(IV)-induced insulin signaling in 3T3-L1 and IM9 cells: impact of dexamethasone. *J Mol Endocrinol* 2007;38(6):627-49.
- [119] Vardatsikos G, Mehdi MZ, Srivastava AK. Bis(maltolato)-oxovanadium (IV)-induced phosphorylation of PKB, GSK-3 and FOXO1 contributes to its glucoregulatory responses (review). *Int J Mol Med* 2009;24(3):303-9.
- [120] Li J, Elberg G, Sekar N, bin He Z, Shechter Y. Antilipolytic actions of vanadate and insulin in rat adipocytes mediated by distinctly different mechanisms. *Endocrinology* 1997;138(6):2274-9.
- [121] Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 2001;492(3):199-203.
- [122] Watanabe T, Satoo H, Kohara K, Takami R, Motoyashiki T, Morita T, et al. Orthovanadate stimulates cAMP phosphodiesterase 3 activity in isolated rat hepatocytes through mitogen-activated protein kinase activation dependent on cAMP-dependent protein kinase. *Biol Pharm Bull* 2004;27(6):789-96.
- [123] D'Onofrio F, Le MQ, Chiasson JL, Srivastava AK. Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation. *FEBS Lett* 1994;340(3):269-75.
- [124] Villani P, Cordelli E, Leopardi P, Siniscalchi E, Veschetti E, Fresegna AM, et al. Evaluation of genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium in vivo. *Toxicol Lett* 2007;170(1):11-8.
- [125] Tang H, Sun Y, Xiu Q, Lu H, Han H. Cyclooxygenase-2 induction requires activation of nuclear factor of activated T-cells in Beas-2B cells after vanadium exposure and plays an anti-apoptotic role. *Arch Biochem Biophys* 2007;468(1):92-9.
- [126] Costa Pessoa J. Thirty years through vanadium chemistry. *J Inorg Biochem* 2015;147:4-24.
- [127] D'Cruz OJ, Uckun FM. Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11(12):1829-36.

- [128] Ferrer EG, Salinas MV, Correa MJ, Naso L, Barrio DA, Etcheverry SB, et al. Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes. *J Biol Inorg Chem* 2006;11(6):791-801.
- [129] Leon IE, Di Virgilio AL, Porro V, Muglia CI, Naso LG, Williams PA, et al. Antitumor properties of a vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin [VO(chrysin)2EtOH]2 in a human osteosarcoma model: the role of oxidative stress and apoptosis. *Dalton Trans* 2013;42(33):11868-80.
- [130] Kim JD, Liu L, Guo W, Meydani M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J Nutr Biochem* 2006;17(3):165-76.
- [131] Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, Fedyk CG, Aden JK, Ramasubramanian AK, et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. *Shock* 2014;41 Suppl 1:54-61.
- [132] Tynngård N, Trinks M, Berlin G. In vitro properties of platelets stored in three different additive solutions. *Transfusion* 2012;52(5):1003-9.
- [133] Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Aguilar LF, Sotomayor CP, Jemiola-Rzeminska M, et al. Human erythrocytes and neuroblastoma cells are in vitro affected by sodium orthovanadate. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(9):2260-70.
- [134] Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, et al. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA* 2014;311(17):1778-86.
- [135] Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2017;40(Suppl 1):S11-S24.
- [136] Aureliano M, Gândara RM. Decavanadate effects in biological systems. *J Inorg Biochem* 2005;99(5):979-85.
- [137] Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 2013;979:65-70.
- [138] Essex DW, Li M, Feinman RD, Miller A. Platelet surface glutathione reductase-like activity. *Blood* 2004;104(5):1383-5.
- [139] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9(1):59-71.
- [140] Kirk RI, Sanderson MR, Lerea KM. Threonine phosphorylation of the beta 3 integrin cytoplasmic tail, at a site recognized by PDK1 and Akt/PKB in vitro, regulates Shc binding. *J Biol Chem* 2000;275(40):30901-6.

- [141] Girouard MP, Pool M, Alchini R, Rambaldi I, Fournier AE. RhoA Proteolysis Regulates the Actin Cytoskeleton in Response to Oxidative Stress. *PLoS One* 2016;11(12):e0168641.
- [142] Hadas K, Randriamboavonjy V, Elgheznawy A, Mann A, Fleming I. Methylglyoxal induces platelet hyperaggregation and reduces thrombus stability by activating PKC and inhibiting PI3K/Akt pathway. *PLoS One* 2013;8(9):e74401.
- [143] Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets* 2003;14(6):381-90.
- [144] Begonja AJ, Gambaryan S, Schulze H, Patel-Hett S, Italiano JE, Hartwig JH, et al. Differential roles of cAMP and cGMP in megakaryocyte maturation and platelet biogenesis. *Exp Hematol* 2013;41(1):91-101.e4.
- [145] Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Hönig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, et al. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1998;273(32):20029-35.
- [146] Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, et al. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. *N Am J Med Sci* 2013;5(3):213-9.
- [147] Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost* 2004;2(8):1282-91.
- [148] Tas S, Sarandol E, Ayvalik SZ, Serdar Z, Dirican M. Vanadyl sulfate, taurine, and combined vanadyl sulfate and taurine treatments in diabetic rats: effects on the oxidative and antioxidative systems. *Arch Med Res* 2007;38(3):276-83.
- [149] Karpatkin S. Studies on human platelet glycolysis. Effect of glucose, cyanide, insulin, citrate, and agglutination and contraction on platelet glycolysis. *J Clin Invest* 1967;46(3):409-17.
- [150] Rafalski VA, Mancini E, Brunet A. Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 23):5597-608.
- [151] Wang XT, Chan TF, Lam VM, Engel PC. What is the role of the second "structural" NADP<sup>+</sup>-binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? *Protein Sci* 2008;17(8):1403-11.

- [152] Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2(1):56-64.
- [153] Association AD. 6. Glycemic Targets. *Diabetes Care* 2017;40(Suppl 1):S48-S56.
- [154] Yngen M, Norhammar A, Hjendahl P, Wallén NH. Effects of improved metabolic control on platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus following coronary angioplasty. *Diab Vasc Dis Res* 2006;3(1):52-6.
- [155] Singer J, Weissler Snir A, Leshem-Lev D, Rigler M, Kornowski R, Lev EI. Effect of intensive glycemic control on platelet reactivity in patients with long-standing uncontrolled diabetes. *Thromb Res* 2014;134(1):121-4.
- [156] Vijayakumar P, Nelson RG, Hanson RL, Knowler WC, Sinha M. HbA1c and the Prediction of Type 2 Diabetes in Children and Adults. *Diabetes Care* 2017;40(1):16-21.
- [157] Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* 2011;8(4):228-36.
- [158] Skibowska A, Raszeja-Specht A, Szutowicz A. Platelet function and acetyl-coenzyme A metabolism in type 1 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(9):1136-43.
- [159] Michno A, Raszeja-Specht A, Jankowska-Kulawy A, Pawelczyk T, Szutowicz A. Effect of L-carnitine on acetyl-CoA content and activity of blood platelets in healthy and diabetic persons. *Clin Chem* 2005;51(9):1673-82.
- [160] Association AD. 9. Cardiovascular Disease and Risk Management. *Diabetes Care* 2017;40(Suppl 1):S75-S87.
- [161] Chogtu B, Magazine R, Bairy KL. Statin use and risk of diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2015;6(2):352-7.
- [162] Maki KC, Dicklin MR, Baum SJ. Statins and diabetes. *Cardiol Clin* 2015;33(2):233-43.
- [163] Shamir R, Kassis H, Kaplan M, Naveh T, Shehadeh N. Glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus improves lipid serum levels and oxidative stress. *Pediatr Diabetes* 2008;9(2):104-9.
- [164] Maahs DM, Hokanson JE, Wang H, Kinney GL, Snell-Bergeon JK, East A, et al. Lipoprotein subfraction cholesterol distribution is proatherogenic in women with type 1 diabetes and insulin resistance. *Diabetes* 2010;59(7):1771-9.
- [165] Wadwa RP, Kinney GL, Maahs DM, Snell-Bergeon J, Hokanson JE, Garg SK, et al. Awareness and treatment of dyslipidemia in young adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28(5):1051-6.

- [166] Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care* 2009;32(3):416-20.
- [167] Kuryan RE, Jacobson MS, Frank GR. Non-HDL-cholesterol in an adolescent diabetes population. *J Clin Lipidol* 2014;8(2):194-8.
- [168] Abbasi A, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL, Stolk RP, et al. Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(8):E1352-9.
- [169] Barter PJ. The causes and consequences of low levels of high density lipoproteins in patients with diabetes. *Diabetes Metab J* 2011;35(2):101-6.
- [170] Subramanian S, Chait A. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(5):819-25.
- [171] Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia* 2015;58(5):886-99.
- [172] Quispe R, Martin SS, Jones SR. Triglycerides to high-density lipoprotein-cholesterol ratio, glycemic control and cardiovascular risk in obese patients with type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2016;23(2):150-6.
- [173] Wu L, Parhofer KG. Diabetic dyslipidemia. *Metabolism* 2014;63(12):1469-79.
- [174] Quispe R, Manalac RJ, Faridi KF, Blaha MJ, Toth PP, Kulkarni KR, et al. Relationship of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol (TG/HDL-C) ratio to the remainder of the lipid profile: The Very Large Database of Lipids-4 (VLDL-4) study. *Atherosclerosis* 2015;242(1):243-50.
- [175] Heptinstall S, Johnson A, Glenn JR, White AE. Adenine nucleotide metabolism in human blood--important roles for leukocytes and erythrocytes. *J Thromb Haemost* 2005;3(10):2331-9.
- [176] Stolla MC, Li D, Lu L, Woulfe DS. Enhanced platelet activity and thrombosis in a murine model of type I diabetes are partially insulin-like growth factor 1-dependent and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *J Thromb Haemost* 2013;11(5):919-29.
- [177] Mylotte D, Kavanagh GF, Peace AJ, Tedesco AF, Carmody D, O'Reilly M, et al. Platelet reactivity in type 2 diabetes mellitus: a comparative analysis with survivors of myocardial infarction and the role of glycaemic control. *Platelets* 2012;23(6):439-46.
- [178] Natarajan A, Zaman AG, Marshall SM. Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of antiplatelet agents. *Diab Vasc Dis Res* 2008;5(2):138-44.

- [179] Benz PM, Laban H, Zink J, Günther L, Walter U, Gambaryan S, et al. Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP)-dependent and -independent pathways regulate thrombin-induced activation of Rap1b in platelets. *Cell Commun Signal* 2016;14(1):21.
- [180] Porta M, O'Brien ME, Kohner EM. Platelet abnormalities as related to diabetic retinopathy (with special reference to platelet shape change). *Horm Metab Res Suppl* 1981;11:50-4.
- [181] Porta M, Hilgard P, Kohner EM. Platelet shape change abnormalities in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1980;18(3):217-21.
- [182] Iwasaki H, Okamoto R, Kato S, Konishi K, Mizutani H, Yamada N, et al. High glucose induces plasminogen activator inhibitor-1 expression through Rho/Rho-kinase-mediated NF-kappaB activation in bovine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2008;196(1):22-8.
- [183] Arita R, Hata Y, Nakao S, Kita T, Miura M, Kawahara S, et al. Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes* 2009;58(1):215-26.
- [184] Lu QY, Chen W, Lu L, Zheng Z, Xu X. Involvement of RhoA/ROCK1 signaling pathway in hyperglycemia-induced microvascular endothelial dysfunction in diabetic retinopathy. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(10):7268-77.
- [185] Li W, Sigley J, Pieters M, Helms CC, Nagaswami C, Weisel JW, et al. Fibrin Fiber Stiffness Is Strongly Affected by Fiber Diameter, but Not by Fibrinogen Glycation. *Biophys J* 2016;110(6):1400-10.
- [186] Pieters M, Covic N, van der Westhuizen FH, Nagaswami C, Baras Y, Toit Loots D, et al. Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes - a purified fibrinogen model. *Thromb Haemost* 2008;99(4):691-700.
- [187] Sobol AB, Watala C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50(1):1-16.
- [188] Watala C, Boncler M, Gresner P. Blood platelet abnormalities and pharmacological modulation of platelet reactivity in patients with diabetes mellitus. *Pharmacol Rep* 2005;57 Suppl:42-58.
- [189] Wright RJ, Frier BM. Vascular disease and diabetes: is hypoglycaemia an aggravating factor? *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24(5):353-63.

- [190] Gajos G, Konieczynska M, Zalewski J, Undas A. Low fasting glucose is associated with enhanced thrombin generation and unfavorable fibrin clot properties in type 2 diabetic patients with high cardiovascular risk. *Cardiovasc Diabetol* 2015;14:44.
- [191] Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(3):s11-6.
- [192] Jardín I, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Endogenously generated reactive oxygen species reduce PMCA activity in platelets from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Platelets* 2006;17(5):283-8.
- [193] Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood* 2005;105(10):3879-87.
- [194] Graham GJ, Ren Q, Dilks JR, Blair P, Whiteheart SW, Flaumenhaft R. Endobrevin/VAMP-8-dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo. *Blood* 2009;114(5):1083-90.
- [195] Rollini F, Franchi F, Muñiz-Lozano A, Angiolillo DJ. Platelet function profiles in patients with diabetes mellitus. *J Cardiovasc Transl Res* 2013;6(3):329-45.
- [196] Demirtunc R, Duman D, Basar M, Bilgi M, Teomete M, Garip T. The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2009;23(2):89-94.
- [197] El Haouari M, Rosado JA. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41(1):119-23.
- [198] Davì G, Catalano I, Averna M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattoni G, et al. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990;322(25):1769-74.
- [199] Englyst NA, Taube JM, Aitman TJ, Baglin TP, Byrne CD. A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation. *Diabetes* 2003;52(5):1248-55.
- [200] Di Simplicio P, de Giorgio LA, Cardaioli E, Lecis R, Miceli M, Rossi R, et al. Glutathione, glutathione utilizing enzymes and thioltransferase in platelets of insulin-dependent diabetic patients: relation with platelet aggregation and with microangiopathic complications. *Eur J Clin Invest* 1995;25(9):665-9.
- [201] Michno A, Skibowska A, Raszeja-Specht A, Cwikowska J, Szutowicz A. The role of adenosine triphosphate citrate lyase in the metabolism of acetyl coenzyme a and function of blood platelets in diabetes mellitus. *Metabolism* 2004;53(1):66-72.

- [202] Chamberlain KG, Tong M, Chiu E, Penington DG. The relationship of human platelet density to platelet age: platelet population labeling by monoamine oxidase inhibition. *Blood* 1989;73(5):1218-25.
- [203] Rauchfuss S, Geiger J, Walter U, Renne T, Gambaryan S. Insulin inhibition of platelet-endothelial interaction is mediated by insulin effects on endothelial cells without direct effects on platelets. *J Thromb Haemost* 2008;6(5):856-64.
- [204] Fedorova EV, Buryakina AV, Zakharov AV, Filimonov DA, Lagunin AA, Poroikov VV. Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel vanadium-containing complexes as antidiabetic agents. *PLoS One* 2014;9(7):e100386.
- [205] Capella MA, Capella LS, Valente RC, Gefé M, Lopes AG. Vanadate-induced cell death is dissociated from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Cell Biol Toxicol* 2007;23(6):413-20.
- [206] Kiss T, Jakusch T, Hollender D, Enyedy EA, Horváth L. Comparative studies on the biospeciation of antidiabetic VO(IV) and Zn(II) complexes. *J Inorg Biochem* 2009;103(4):527-35.
- [207] Pessoa JC, Tomaz I. Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. *Curr Med Chem* 2010;17(31):3701-38.
- [208] Bordbar AK, Creagh AL, Mohammadi F, Haynes CA, Orvig C. Calorimetric studies of the interaction between the insulin-enhancing drug candidate bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) and human serum apo-transferrin. *J Inorg Biochem* 2009;103(4):643-7.
- [209] Sanna D, Micera G, Garribba E. On the transport of vanadium in blood serum. *Inorg Chem* 2009;48(13):5747-57.
- [210] Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Vanadium Compounds as Pro-Inflammatory Agents: Effects on Cyclooxygenases. *Int J Mol Sci* 2015;16(6):12648-68.
- [211] Crans DC, Zhang B, Gaidamauskas E, Keramidas AD, Willsky GR, Roberts CR. Is vanadate reduced by thiols under biological conditions? Changing the redox potential of V(V)/V(IV) by complexation in aqueous solution. *Inorg Chem* 2010;49(9):4245-56.
- [212] Meng FG, Zhang ZY. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase activity by hydroxyl radical. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834(1):464-9.
- [213] Soares SS, Gutiérrez-Merino C, Aureliano M. Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption. *J Inorg Biochem* 2007;101(5):789-96.



- [214] Aureliano M. Decavanadate Toxicology and Pharmacological Activities: V10 or V1, Both or None? *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:6103457.
- [215] Bhanot S, Bryer-Ash M, Cheung A, McNeill JH. Bis(maltolato)oxovanadium(IV) attenuates hyperinsulinemia and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Diabetes* 1994;43(7):857-61.
- [216] Aureliano M, Ohlin CA. Decavanadate in vitro and in vivo effects: facts and opinions. *J Inorg Biochem* 2014;137:123-30.
- [217] Aureliano M. Recent perspectives into biochemistry of decavanadate. *World J Biol Chem* 2011;2(10):215-25.
- [218] Willisky GR, Goldfine AB, Kostyniak PJ, McNeill JH, Yang LQ, Khan HR, et al. Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J Inorg Biochem* 2001;85(1):33-42.
- [219] Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009;94(5):700-11.
- [220] Raslan Z, Naseem KM. The control of blood platelets by cAMP signalling. *Biochem Soc Trans* 2014;42(2):289-94.
- [221] Jensen MS, Larsen OH, Christiansen K, Fenger-Eriksen C, Ingerslev J, Sørensen B. Platelet activation and aggregation: the importance of thrombin activity--a laboratory model. *Haemophilia* 2013;19(3):403-8.
- [222] Massberg S, Grüner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, et al. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood* 2004;103(1):136-42.
- [223] Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 1999;18(1):37-48.
- [224] Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol* 2001;62(9):1153-61.
- [225] Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets *Journal of Thrombosis and Haemostasis* Volume 10, Issue 2. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 10. 2012:167-76.
- [226] Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost* 2015;13(12):2141-51.

- [227] Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 2015;29(3):153-62.
- [228] Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Piotrowska K, Chlubek D. Cyclooxygenase-1 as the main source of proinflammatory factors after sodium orthovanadate treatment. *Biol Trace Elem Res* 2015;163(1-2):103-11.
- [229] Hayashi Y, Kimura T. The effects of vanadium compounds on the activation of adenylate cyclase from rat adrenal membrane. *Biochim Biophys Acta* 1986;869(1):29-36.
- [230] Motoyashiki T, Miyake M, Yoshida A, Morita T, Ueki H. A vanadyl sulfate-bovine serum albumin complex stimulates the release of lipoprotein lipase activity from isolated rat fat pads through an increase in the cellular content of cAMP and myo-inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biol Pharm Bull* 1999;22(8):780-6.
- [231] Ou H, Yan L, Mustafi D, Makinen MW, Brady MJ. The vanadyl (VO<sub>2</sub><sup>+</sup>) chelate bis(acetylacetonato)oxovanadium(IV) potentiates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor. *J Biol Inorg Chem* 2005;10(8):874-86.
- [232] Mehdi MZ, Srivastava AK. Organo-vanadium compounds are potent activators of the protein kinase B signaling pathway and protein tyrosine phosphorylation: mechanism of insulinomimesis. *Arch Biochem Biophys* 2005;440(2):158-64.
- [233] Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, et al. Effects of sodium metavanadate on in vitro neuroblastoma and red blood cells. *Arch Biochem Biophys* 2013;535(2):248-56.