

Wydział Farmaceutyczny



Aleksandra Marchwińska

Ocena udziału receptora wapniowego w mechanizmach pośredniczących w sekrecji insuliny u szczura

Rozprawa doktorska

Rozprawa doktorska wykonana w
Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry i Zakładu:
Prof. Dr hab. Apolonia Rybczyńska
Promotor pracy:
Prof. Dr hab. Apolonia Rybczyńska

Gdańsk, 2020

Składam serdeczne podziękowania Pani

Prof. Dr hab. Apolonii Rybczyńskiej za pomoc,

przekazaną wiedzę i wyrozumiałość okazaną mi
podczas pisania tej pracy.

Pragnę także podziękować Pracownikom Katedry
Patofizjologii za udzieloną pomoc i motywację do
działania.

Pracę tę dedykuję Mojemu Mężowi.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań zostały częściowo opublikowane w pracy:

Rybczyńska A., Marchwińska A., Dys A., Boblewski K., Lehmann A., Lewko B.:

Activity of the calcium-sensing receptor influences blood glucose and insulin levels in rats.

Pharmacological Reports 69, 709-713, 2017

Spis treści

Objaśnienia stosowanych skrótów i symboli	6
Streszczenie	7
Abstract	10
1. Wstęp.....	12
1.1. Cukrzyca.....	12
1.2. Mechanizm sekrecji insuliny	13
1.3. Receptor wapniowy	15
1.3.1. Charakterystyka receptora wapniowego.....	15
1.3.2. Regulacja aktywności receptora wapniowego.....	16
1.3.2.1. Kalcymimetyki	16
1.3.2.2. Kalcylityki	17
1.3.3. Występowanie receptora wapniowego	18
1.3.4. Hipoteza udziału receptora wapniowego w mechanizmach sekrecji insuliny.....	18
1.3.4.1. Doświadczenia wykonane na komórkach.....	19
2. Cel pracy.....	20
3. Materiały i metody	21
3.1. Procedura przygotowania szczura	21
3.2. Odczynniki	22
3.3. Aparatura.....	22
3.4. Analiza statystyczna	22
4. Grupy doświadczalne	23
5. Wyniki	26
5.1. Wpływ podania R-568 na stężenie glukozy, insuliny oraz Ca^{2+} u szczurów	26
5.2. Wpływ podania R-568 na stężenie glukozy, insuliny oraz Ca^{2+} u szczurów obciążonych glukozą	28
5.3. Wpływ podania NPS2143 na stężenie glukozy, insuliny i Ca^{2+} u szczurów	32
6. Dyskusja	35
7. Wnioski	38
8. Piśmiennictwo	39

Objaśnienia stosowanych skrótów i symboli

ATP - adozyno-5'-trifosforan

CaR - calcium receptor - receptor wapniowy

CDX - cyklodekstryna

NPS 2143 - chlorowodorek 1,1 - dimetylo-2-(2-naftylo)-etyloaminy

NPS R-568 - N-(3-[2-chlorofenylo]propylo)-(R)- α -metylo-3- metoksybenzylamina

PLC - phospholipase C - fosfolipaza c

PTH - parathormone - parathormon

Streszczenie

Cukrzyca jest schorzeniem społecznym, stanowi zbiór chorób metabolicznych, charakteryzujących się hiperglikemią wywołaną defektem wydzielania lub działania insuliny. Przyczynia się do powstania zmian patologicznych szczególnie w naczyniach krwionośnych wielu narządów wewnętrznych, takich jak nerki, serce a także narząd wzroku.

Znany jest mechanizm sekrecji insuliny, który warunkuje utrzymanie prawidłowych poziomów glukozy w organizmie. Gdy stężenie glukozy w jelicie cienkim przekroczy 30 mM, glukoza zostaje przetransportowana do komórek β trzustki. Transport odbywa się za pośrednictwem transportera GLUT2, który umożliwia transport ułatwiony, zgodnie z gradientem stężeń. We wnętrzu komórek trzustki glukoza podlega przemianom, których produktem jest ATP. Wzrost stężenia ATP powoduje zamykanie kanału potasowego czego konsekwencją jest wzrost stężenia jonów potasowych we wnętrzu komórki i w efekcie depolaryzacja błony. Depolaryzacja powoduje otwarcie zależnego od napięcia kanału wapniowego typu L, powodując napływ jonów wapnia do komórki. Wzrost stężenia jonów wapnia indukuje uwolnienie zawartości pęcherzyków magazynujących insulinę na drodze egzocytozy.

Receptor wapniowy (CaR), wykryty po raz pierwszy na powierzchni komórek przytarczyc, należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G, aktywującym fosfolipazę C i poprzez wpływ na sekrecję parathormonu reguluje stężenie wapnia w osoczu. CaR występuje również na powierzchni komórek innych narządów niezwiązanych z regulacją Ca^{2+} w osoczu, takich jak np. komórki β wysp trzustkowych. Badania *in vitro* na mysich komórkach trzustki linii C57BL/6 wykazały, że związek R-467 - kalcymimetyk powodujący aktywację receptora wapniowego, zwiększa uwalnianie insuliny z komórek stymulowanych glukozą. Jak dotychczas powyższa obserwacja nie została potwierdzona badaniami *in vivo*. Do tej pory nie badano również ani w warunkach *in vitro* ani *in vivo* wpływu hamowania aktywności CaR na poziom glukozy we krwi i sekrecję insuliny.

Powstało zatem pytanie czy również w warunkach *in vivo* CaR będzie pośredniczył w mechanizmie sekrecji insuliny i w ten sposób wpływał na stężenie glukozy oraz insuliny we krwi?

Celem przeprowadzonych doświadczeń było zbadanie wpływu agonisty CaR, kalcymimetyka R-568, oraz antagonisty tego receptora, kalcylicytki NPS 2143, na poziom glukozy i Ca^{2+} we krwi oraz insuliny w osoczu u szczurów.

Doświadczenia prowadzono na szczurach Wistar, głodzonych przez 14 godzin przed eksperymentem, które znieczulano inaktywną *i.p.* w dawce 100 mg/kg m.c.. Znieczulonym zwierzętom przeprowadzono tracheotomię aby zapewnić swobodne oddychanie, następnie wprowadzono dren polietylenowy do żyły, którym podawano płyn infuzyjny oraz kalcymimetyk/kalcylicytkę/*vehiculum*.

Za pomocą drenu wprowadzonego do tętnicy pobierano próbki krwi do oznaczeń. Wprowadzono również dren do pęcherza moczowego w celu umożliwienia swobodnego wypływu moczu.

W doświadczeniach z użyciem kalcymimetyka R-568 zwierzęta podzielono na dwie główne grupy. Zwierzęta z pierwszej grupy nie były obciążone glukozą. W drugiej grupie szczurom podawano dootrzewnowo roztwór glukozy w dawce 1g/kg m.c. W każdej z tych grup wydzielono podgrupy: badaną i kontrolną. Szczury z grupy badanej otrzymywały jednorazowo dożylnie R-568, rozpuszczany w 15% cyklodekstrynie, w dawce 1mg/kg m.c.. Grupa kontrolna otrzymała 15% roztwór cyklodekstryny. Szczury obciążone glukozą dodatkowo otrzymywały dootrzewnowo roztwór glukozy w dawce 1g/kg m.c.. Grupa kontrolna otrzymywała dootrzewnowo sól fizjologiczną. Pomiarów glukozy i Ca^{2+} dokonywano przed podaniem kalcymimetyka i iniekcją glukozy oraz w 20, 60, 120, 180 minucie po jej podaniu. Próbki krwi do oznaczeń insuliny były pobierane przed oraz w 20, 120 i 180 minucie po iniekcji glukozy.

W doświadczeniach z użyciem kalcylicytki NPS 2143 zwierzęta podzielono na dwie grupy: badaną i kontrolną. Szczury z grupy badanej otrzymywały jednorazowo dożylnie NPS 2143, rozpuszczany w 15% cyklodekstrynie, w dawce 2mg/kg m.c.. Grupa kontrolna otrzymała 15% roztwór cyklodekstryny. Pomiarów glukozy i Ca^{2+} dokonywano 10 minut przed podaniem kalcylicytki oraz w 60, 120, 180 i 210 min po podaniu NPS 2143. Próbki krwi do oznaczeń insuliny były pobierane w tym samym czasie, z wyjątkiem 60 minuty.

Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach *in vivo* zmiany aktywności receptora wapniowego mogą wpływać na poziom glukozy we krwi i sekrecję insuliny. Przedstawione wyniki doświadczeń wykazały po raz pierwszy, że w warunkach *in vivo* aktywacja CaR za pomocą kalcymimetyka R-568 zmniejsza stężenie glukozy we krwi oraz zwiększa wydzielanie

insuliny u szczurów. Natomiast hamowanie aktywności CaR za pomocą kalcylicyka NPS 2143, prowadzi do wzrostu stężenia glukozy we krwi oraz obniża sekrecję insuliny u szczurów.

Abstract

Diabetes is a social disease; it is a set of metabolic diseases characterized by hyperglycemia caused by a defect in insulin secretion or action. It contributes to the formation of pathological changes, especially in the blood vessels of many internal organs, such as the kidneys, heart, and also the organ of vision.

The mechanism of insulin secretion is known, which determines the maintenance of normal glucose levels in the body. When the glucose concentration in the small intestine exceeds 30 mM, glucose is transported to pancreatic β cells. Transport takes place via the GLUT2 transporter, which allows easier transport according to a concentration gradient. In the interior of pancreatic cells, glucose undergoes a transformation, the product of which is ATP. The increase in ATP concentration causes the potassium channel to close, resulting in an increase in potassium ions inside the cell and, as a result, membrane depolarization. Depolarization opens the voltage-dependent L-type calcium channel, causing calcium to flow into the cell. An increase in the concentration of calcium ions induces the release of insulin storage vesicles by exocytosis.

The calcium receptor (CaR), first detected on the surface of parathyroid cells, belongs to the family of G-protein coupled receptors that activate phospholipase C and regulates plasma calcium levels by affecting the secretion of parathyroid hormone. CaR also occurs on the surface of cells of other organs unrelated to plasma Ca^{2+} regulation, such as β -cells of the pancreas. *In vitro* studies on murine pancreatic cells of the C57BL / 6 line have shown that compound R-467 - calcimimetic causing calcium receptor activation, increases insulin release from glucose-stimulated cells. So far, the above observation has not been confirmed by *in vivo* tests. To date, the effects of CaR inhibition on blood glucose levels and insulin secretion have not been studied *in vitro* or *in vivo*.

Therefore, the question arose whether also *in vivo* CaR will mediate the mechanism of insulin secretion and thus affect the concentration of glucose and insulin in the blood?

The purpose of the experiments was to investigate the effect of the CaR agonist, calcimimetics R-568, and the receptor antagonist, NPS 2143 calcillitics, on blood glucose and Ca²⁺ levels, and plasma insulin in rats. The experiments were carried out on Wistar rats, fasted for 14 hours before the experiment, which were anesthetized with inactine *i.p.* at a dose of 100 mg/kg bw. Anesthetized animals were subjected to tracheotomy to ensure free breathing; then, a polyethylene drain was introduced into the vein, which was given infusion fluid and calcimimetics / calcilitic / *vehicle*. Blood samples were taken for determination using a drainage tube inserted into the artery. A bladder drain was also introduced to allow the free flow of urine.

In experiments using calcimimetics R-568, animals were divided into two main groups. The animals in the first group were not loaded with glucose. In the second group, rats were given intraperitoneal glucose solution at a dose of 1g/kg. There were subgroups in each of these groups: study and control. The rats in the study group received R-568 intravenously once, dissolved in 15% cyclodextrin, at a dose of 1mg/kg bw. The control group received a 15% solution of cyclodextrin. The glucose-laden rats additionally received intraperitoneal glucose solution at a dose of 1g/kg bw. The control group received physiological saline intraperitoneally in the same volume. Glucose and Ca²⁺ measurements were taken before calcimimetics and glucose injection, and at 20, 60, 120, 180 minutes after its administration. Blood samples for insulin determination were taken before and at 20,120 and 180 minutes after glucose injection.

In experiments using NPS 2143 calcillitics, the animals were divided into two groups: NPS2143 and control. The rats in the study group received NPS 2143 intravenously once, dissolved in 15% cyclodextrin, at a dose of 2mg / kg bw. The control group received a 15% solution of cyclodextrin. Glucose and Ca²⁺ measurements were taken 10 minutes before calcilitic administration and 60, 120, 180 and 210 min after NPS 2143 administration. Blood samples for insulin determination were taken at the same time except for 60 minutes.

The results obtained indicate that *in vivo* changes in calcium receptor activity may affect blood glucose levels and insulin secretion. The presented experimental results showed for the first time that *in vivo* activation of CaR with calcimimetics R-568 reduces blood glucose and increases insulin secretion in rats. In contrast, inhibition of CaR activity with NPS 2143 calcillitics leads to an increase in blood glucose and decreases insulin secretion in rats.

1. Wstęp

1.1. Cukrzyca

Cukrzyca jest chorobą metaboliczną charakteryzującą się występowaniem hiperglikemii spowodowanej defektem wydzielania lub działania insuliny. Choroba ta stanowi poważny problem społeczny, epidemiologiczny i ekonomiczny wśród ludzi na całym świecie [1]. Przewlekła hiperglikemia może prowadzić do niewydolności lub uszkodzenia wielu narządów w szczególności serca, naczyń krwionośnych, nerek i oczu [2,3].

Wyróżnia się 2 główne typy cukrzycy: cukrzycę typu I oraz cukrzycę typu II.

Cukrzyca typu I charakteryzuje się niszczeniem, odpowiadających za produkcję insuliny, komórek β trzustki na skutek procesu immunologicznego lub idiopatycznego. Prowadzi do utraty zdolności organizmu do wydzielania insuliny. Osoby chore na cukrzycę tego typu leczone są poprzez podskórne podawanie insuliny [4]. Etiologia cukrzycy typu I nie jest do końca znana. Zakłada się, że jest ona skutkiem wspólnej zależności czynników genetycznych i środowiskowych [5].

Cukrzyca typu II spowodowana jest zaburzeniami wydzielania i działania docelowego insuliny. W początkowym stadium choroby dominuje insulinooporność, która początkowo kompensowana jest większym wydzielaniem insuliny. W końcowym stadium choroby dochodzi jednak do hipoinsulinemii spowodowanej wyczerpaniem możliwości wydzielniczych komórek β trzustki. W etiopatogenezie kluczową rolę odgrywają dwa zjawiska: oddziaływanie pomiędzy czynnikami środowiskowymi a czynnikami genetycznymi [6] oraz obwodowa insulinooporność i różnie natężone upośledzanie wydzielania insuliny [7]. Czynnikiemami środowiskowymi, które odpowiadają za gwałtowne zwiększenie zachorowalności na cukrzycę typu II są:

- otyłość [8] przede wszystkim wiscelarna. Trzewna tkanka tłuszczowa odpowiada za zwiększoną produkcję wolnych kwasów tłuszczowych, co prowadzi do zwiększenia oksydacji tłuszczów w wątrobie i mięśniach. Skutkuje to zmniejszeniem aktywności heksokinazy, a tym samym hamowaniem metabolizmu glukozy [9],
- nadciśnienie tętnicze [10],
- mała aktywność fizyczna [11],

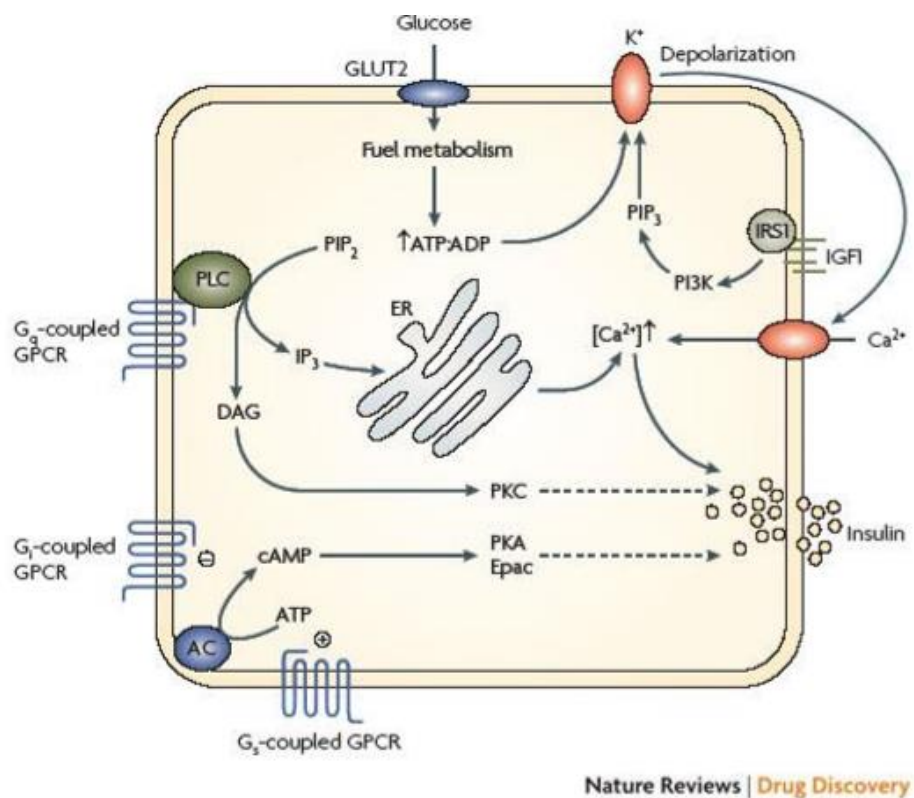
- zespół policystycznych jajników [12],
- przebyta cukrzyca ciążowa [13].

1.2. Mechanizm sekrecji insuliny

Insulina to hormon peptydowy, wytwarzany w komórkach β trzustki, biorący udział w metabolizmie węglowodanów ale także białek i tłuszczu. Sekrecja insuliny uzależniona jest od stężenia glukozy we krwi. Ta zależność zapobiega zarówno hipo jak i hiperglikemii w organizmie [14]. U zdrowego człowieka, po 30 minutach od doustnego przyjęcia 75 g glukozy, następuje wzrost stężenia insuliny we krwi z podstawowego poziomu 20 - 30 pmol/L do 250 - 300 pmol/L [15].

Znany jest mechanizm sekrecji insuliny, który warunkuje utrzymanie prawidłowych poziomów glukozy w organizmie. Gdy stężenie glukozy w jelicie cienkim przekroczy 30 mM, glukoza zostaje przetransportowana do komórek β trzustki. Komórki β trzustki nie posiadają receptorów błonowych, które wiążą glukozę. Transport do komórki odbywa się za pośrednictwem transportera GLUT2, który umożliwia transport ułatwiony, zgodnie z gradientem stężeń glukozy [16]. W komórce glukoza ulega procesowi fosforylacji, przy pomocy glukokinazy przekształcana jest do glukozy-6-fosforanu. Proces ten przeciwdziała wyrównywaniu się stężeń glukozy między przestrzenią pozakomórkową i wewnątrzkomórkową oraz pozwala na nieprzerwany transport glukozy do komórki. Następnie glukoza transportowana jest do mitochondrium, gdzie podlega szeregowi przemian w cyklu Krebsa oraz łańcuchu oddechowym [17]. We wnętrzu komórek trzustki glukoza podlega przemianom, których produktem jest adenozyno-5'-trifosforan (ATP). Wzrost stężenia ATP powoduje zamknięcie kanału potasowego czego konsekwencją jest wzrost stężenia jonów potasowych we wnętrzu komórki i w efekcie depolaryzacja błony. Depolaryzacja powoduje otwarcie zależnego od napięcia kanału wapniowego typu L, w następstwie powodując napływ jonów wapnia do komórki. Powstały w tym procesie wzrost jonów wapnia w komórce indukuje uwolnienie zawartości pęcherzyków magazynujących insulinę na drodze egzocytozy [18].

Wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu komórki może być także wynikiem uwolnienia jonów wapnia pochodzących z zasobów wewnątrzkomórkowych, np.: reticulum endoplazmatycznego. Proces taki może być efektem aktywacji receptorów na powierzchni komórek β trzustki, związanych z białkiem G, takich jak np. receptor wapniowy (Rys. 1) [19].



Nature Reviews | Drug Discovery

Rys. 1. Schemat procesów wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w mechanizm sekrecji insuliny przez komórki β trzustki [19].

1.3. Receptor wapniowy

1.3.1. Charakterystyka receptora wapniowego

Doświadczenia z zastosowaniem metod biologii molekularnej potwierdziły istnienie receptora wapniowego (CaR). Dzięki poznaniu mRNA dla CaR poznano jego budowę. Białko receptora należy do III klasy podrodziny białek G. Zbudowane jest z trzech domen strukturalnych, tj. dużej, zewnątrzkomórkowej, N-końcowej, złożonej z 613 reszt aminokwasowych - wiążącej wapń i inne ligandy, błonowej, składającej się z 250 reszt aminokwasowych i podzielonej na 7 segmentów oraz C-końcowego regionu wewnątrzkomórkowego, składającego się z 222 reszt aminokwasowych [20].

CaR zlokalizowany na powierzchni komórek przytarczyc, wrażliwy na zmiany stężenia jonów wapnia we krwi, pełni kluczową rolę w regulacji parathormonu [21,22]. Podwyższone stężenie Ca^{2+} we krwi wpływa na aktywację receptora CaR, który połączony jest z fosfolipazą C (PLC). Aktywacja PLC prowadzi do uwolnienia jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych poprzez szlaki metaboliczne diacyloglicerolu oraz bisfosforanu fosfatydyloinozytolu. Rezultatem jest zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i zahamowanie wydzielania parathormonu przez komórki przytarczyc [23].

W komórkach nerek wynikiem aktywacji receptorów wapniowych jest zmniejszona reabsorpcja jonów wapnia, sodu, magnezu oraz wody [24].

1.3.2. Regulacja aktywności receptora wapniowego

Aktywność receptora wapniowego może być zwiększana przez jego agonistów - kalcymimetyki lub hamowana poprzez antagonistów CaR - kalcylicyki [25].

1.3.2.1. Kalcymimetyki

Kalcymimetyki są związkami, które naśladują działanie jonów wapnia na CaR. Aktywują one ten receptor na skutek czego doprowadzają do obniżenia sekrecji parathormonu przez komórki przytarczyc. Są grupą substancji, które obniżają stężenie wapnia we krwi. Kalcymimetyki typu I działają na CaR tak jak podwyższone stężenie wapnia zewnątrzkomórkowego, agonistycznie, naśladując efekt działania podwyższonego stężenia zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} [22].

Dalsze badania doprowadziły do wykrycia kalcymimetyków typu II. Ten typ kalcymimetyków powoduje zmianę konformacji domeny pozakomórkowej receptora wapniowego i prowadzi do obniżenia progu wrażliwości CaR na jony wapnia obecne na zewnątrz komórki. Tak więc, taka allosteryczna modulacja CaR zwiększa wrażliwość receptora na wapń zewnątrzkomórkowy. W rezultacie efektywniej hamuje on syntezę i wydzielanie parathormonu przez komórki przytarczyc, zmniejszając tym samym stężenie wapnia we krwi [26]. Obecnie, kalcymimetyki jako leki stosowane są w leczeniu pierwotnej nadczynności przytarczyc oraz wtórnej nadczynności przytarczyc, która rozwija się np. w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek [27]. W obu tych zaburzeniach mamy do czynienia z podwyższoną sekrecją PTH oraz skutkami tej nadmiernej sekrecji. Preparatami kalcymimetyków stosowanymi w praktyce klinicznej, obniżającymi stężenie PTH, są Cinacalcet oraz Mimpara [28, 29].

W pracach badawczych natomiast, najczęściej stosowane kalcymimetyki to:

NPS - R568 i NPS R - 467 [30].

1.3.2.2. Kalcylicyki

Kalcylicyki są to substancje działające na receptor wapniowy przeciwstawnie do kalcylicymimetyków. Odpowiadają za hamowanie aktywności CaR, co w przypadku komórek przytarczyc, prowadzi do zwiększenia sekrecji PTH i w następstwie do podwyższenia stężenia wapnia we krwi. Najczęściej używanym w badaniach kalcylicykiem jest NPS 2143, który działa jako selektywny antagonist receptoru wapniowego (CaR) [31]. Kalcylicylik ten działa specyficznym w stosunku do receptora wapniowego, gdyż nie hamuje on odpowiedzi innych receptorów, GABA-ergicznym i metabotropowym [32].

Właściwości hamowania aktywności CaR przez kalcylicyki potwierdzone zostały w wielu publikacjach. W doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro* przy użyciu technik biologii molekularnej, NPS2143 hamował, zależny od zewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} , wzrost stężenia jonów wapnia wewnątrz komórek linii HEK 293 - wykazujących ekspresję ludzkiego, przytarczycznego receptora wapniowego. W badaniach tych zaobserwowano również, że NPS 2143 stymulował sekrecję PTH przez wołowe komórki przytarczyc i znosił działanie kalcylicymimetyka NPS R-467 [32].

Odkrycie i poznanie mechanizmu działania kalcylicylików dawało nadzieję na zahamowanie i leczenie osteoporozy [33,34]. Choroba ta charakteryzuje się zaburzonym metabolizmem kości co prowadzi do utraty masy kostnej. W ciągu ostatnich lat pojawiło się sporo prac, które wykazywały, że pulsacyjne, podskórne podanie niewielkich dawek egzogennej PTH lub fragmentu 1-34 PTH ma właściwości anaboliczne i stymuluje procesy prowadzące do kościotworzenia [35,36]. Preparatem PTH posiadającym właściwości anaboliczne, obecnie stosowanym w terapii osteoporozy jest Preparat Forteo - Teriparatide i Abaloparatide, do podawania podskórnego codziennie [37].

1.3.3. Występowanie receptora wapniowego

Receptor wapniowy (CaR) został po raz pierwszy wykryty na powierzchni komórek przytarczyc, które poprzez sekrecję parathormonu regulują stężenie wapnia w osoczu [20,21].

Dalsze badania wykazały, że CaR występuje również na powierzchni innych komórek, które nie są bezpośrednio zaangażowane w regulację poziomu Ca^{2+} we krwi, takich jak np; fibroblasty [38], komórki nerwowe [39], ludzkie komórki śródbłonna aorty [40], komórki przewodu piersiowego [41], komórki nabłonkowe soczewki [42] a także komórki β trzustki [43].

1.3.4. Hipoteza udziału receptora wapniowego w mechanizmach sekrecji insuliny

Metabolizm glukozy przez komórki β wysp trzustkowych doprowadza do napływu jonów wapnia zewnątrzkomórkowego do tych komórek. Konsekwencją tego procesu wzrost stężenia Ca^{2+} w ich wnętrzu oraz aktywacja znajdujących się w błonie pęcherzyków magazynujących insulinę i sekrecję uwolnionej insuliny do krwi [18].

Do wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytozolu komórki, może także doprowadzić uwolnienie wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych, np.: z reticulum endoplazmatycznego w wyniku aktywacji receptorów na powierzchni komórek β trzustki, związanych z białkiem G, takich jak np. receptor wapniowy [44].

Powstało więc pytanie czy receptor wapniowy obecny na powierzchni komórek β trzustki może pośredniczyć w procesie wydzielania insuliny?

1.3.4.1. Doświadczenia wykonane na komórkach

Hipoteza ta w części została potwierdzona w eksperymentach *in vitro* przy użyciu agonistów receptora CaR R-568 i R-467, które stymulowały wydzielanie insuliny przez komórki β wysp trzustki [45].

Badania *in vitro* na mysich komórkach trzustki linii C57BL/6 wykazały, że kalcymimetyk R-467 zwiększa uwalnianie insuliny z komórek stymulowanych glukozą [46]. Jak dotychczas powyższa informacja nie została potwierdzona badaniami *in vivo*. Nie badano też wpływu hamowania receptora wapniowego na poziom glukozy i insuliny we krwi.

Kolejne eksperymenty *in vitro* przeprowadzone na ludzkich komórkach wysp Langerhansa oraz linii komórek MIN6 wydzielających inulinę wykazały, że aktywacja CaR za pomocą kalcymimetyka R 568, przy jednoczesnym stymulowaniu komórek glukozą, powodowała wyraźną odpowiedź wydzielania insuliny zarówno przez ludzkie komórki wysp trzustkowych jak i linii MIN6 [47].

Wyniki tych eksperymentów pokazały, że aktywacja CaR znajdującego się na powierzchni izolowanych komórek beta trzustki zwiększa sekrecję insuliny przez te komórki [47]. Jednakże, jak do tej pory, nie badano czy w warunkach *in vivo*, a więc w warunkach naturalnie istniejących, efekt ten będzie zachowany.

Powstało zatem kolejne pytanie, czy również w warunkach *in vivo*, CaR może pośredniczyć w mechanizmie sekrecji insuliny i w ten sposób wpływać na stężenie glukozy we krwi? Co więcej, do tej pory nie znany jest wpływ hamowania CaR ani w warunkach *in vitro* ani *in vivo* na sekrecję insuliny i poziom glukozy we krwi.

2. Cel pracy

Celem przeprowadzonych doświadczeń było zbadanie wpływu aktywacji receptora wapniowego za pomocą agonisty CaR, kalcymimetyka R-568, oraz hamowania aktywności tego receptora za pomocą antagonisty, kalcylityka NPS 2143, na poziom glukozy i Ca^{2+} we krwi oraz insuliny w osoczu u szczurów.

3. Materiały i metody

3.1. Procedura przygotowania szczura

Doświadczenia zostały przeprowadzone na samcach szczurów szczepu Wistar, ważących 250-280g. Zwierzęta pochodziły z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej - Centrum Badawczo-Usługowe. Szczury przebywały w klimatyzowanym pomieszczeniu o stałej temperaturze 20°C, wilgotności powietrza 70% i dwunastogodzinnym oświetleniem, bez dostępu światła dziennego. Zwierzęta miały stały dostęp do pokarmu i wody. Zwierzęta były karmione komercyjną paszą dla gryzoni Labofeed-B, Warszawa, Polska.

Zgodę na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano od Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Gdańsku - Uchwała Nr 50/2015 .

Na 14 godzin przed rozpoczęciem doświadczenia szczury były głodzone, tzn. przenoszone do klatek ze stałym dostępem do wody, lecz bez pokarmu.

W dniu doświadczenia zwierzęta znieczulano dootrzewnowo inaktywną (Inactin hydrate C-III SIGMA) w dawce 100mg/kg masy ciała. Znieczulone szczury przenoszono na stół utrzymujący stałą temperaturę 37°C. Następnie wykonywano tracheotomię umożliwiającą zwierzęciu swobodne oddychanie. W dalszej kolejności, do żyły szyjnej, wprowadzano dren polietylenowy, przez który podawano płyn infuzyjny oraz substancje badane w dawkach jednorazowych. Płyn infuzyjny stanowił 0,9% roztwór NaCl (Baxter) z dodatkiem heparyny (Heparinum natricum, Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa) w stężeniu 1/U/mL płynu infuzyjnego. Podawano go za pomocą pomp infuzyjnych: Orion Model M361 i KDS Scientific z prędkością 1,2 mL/h. Miało to na celu powstrzymanie powstawania zakrzepów w układzie krwionośnym i wyrównanie ewentualnej hipowolemii.

Kolejnym etapem doświadczenia było izolowanie tętnicy szyjnej, do której wprowadzano dren polietylenowy umożliwiający pobranie krwi do oznaczeń.

Ostatni etap polegał na wykonaniu nacięcia powłok i mięśni brzusznych, wypreparowaniu pęcherza moczowego i umieszczeniu w nim drenu umożliwiającego swobodne wypływanie moczu do probówek typu Eppendorf. Po zakończeniu etapu przygotowawczego wszystkie grupy zwierząt przez kolejne 30 minut otrzymywały płyn infuzyjny - okres wyrównawczy.

3.2. Odczynniki

Do doświadczeń użyto następujących odczynników:

Do znieczulenia zwierząt użyto Inactin hydrate CIII, Sigma, St. Louis, MO, USA,;

Do przygotowania płynu infuzyjnego użyto: 0,9% roztworu NaCl (Baxter) i heparyny (Heparinum natricum, Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa)

NPS2143 i R-568 użyte do doświadczeń zakupiono w Tocris Bioscience, Bristol, Wielka Brytania.

Oznaczeń stężeń insuliny dokonywano z 10-25 μ l osocza przy użyciu testów immunoenzymatycznych ELISA: ultrasensitive Rat Insulin ELISA oraz DRG Insulin (Rat) ELISA (DRG International, Inc., Springfield, NJ, USA).

Pozostałe odczynniki pochodziły z Sigma - Aldrich, Poznań, Polska.

3.3. Aparatura

Pomiarów glukozy dokonywano używając glukometru ACCU-CHECK Active, model: GC ACCU-CHEK, Roche, Mannheim, Germany. Stężenie Ca^{2+} we krwi mierzono za pomocą analizatora Roche 9180 Electrolyte Analyser, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Niemcy.

Płyn infuzyjny podawano za pomocą pomp infuzyjnych: Orion Model M361 i KDS Scientific z prędkością 1,2 mL/h.

3.4. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wyników została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta dla wyników niesparowanych w programie Primer. Wartość $p < 0.05$ uznawano za istotną statystycznie.

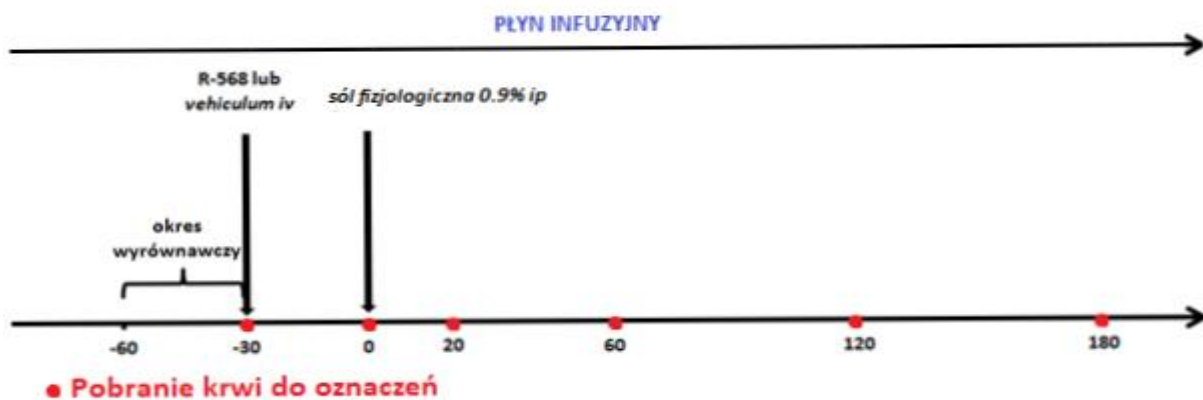
4. Grupy doświadczalne

Doświadczenia zostały przeprowadzone na sześciu grupach zwierząt:

Grupa 1: R -568 (n=4)

Grupa 2: kontrola (n= 4)

Po 30 minutach okresu wyrównawczego szczury z grupy badanej otrzymywały jednorazowo dożylnie R-568, rozpuszczony w 15% cyklodekstrynie, w dawce 1mg/kg m.c.. Grupa kontrolna otrzymała 15% roztwór cyklodekstryny. 30 minut po podaniu kalcymimetyka lub *vehiculum* zwierzętom z obu grup podawano dootrzewnowo roztwór soli fizjologicznej. Pomiarów stężenia glukozy i Ca^{2+} dokonywano przed podaniem kalcymimetyka i iniekcją soli fizjologicznej oraz w 20, 60, 120, 180 minucie po jej podaniu. Krew do oznaczania poziomu wapnia zjonizowanego pobierano do specjalnych kapilar z heparyną litową. Próbki krwi do oznaczeń insuliny były pobierane przed podaniem kalcymimetyka oraz w 20,120 i 180 minucie po iniekcji soli fizjologicznej. Schemat doświadczenia przedstawiono na Rys. nr 2.



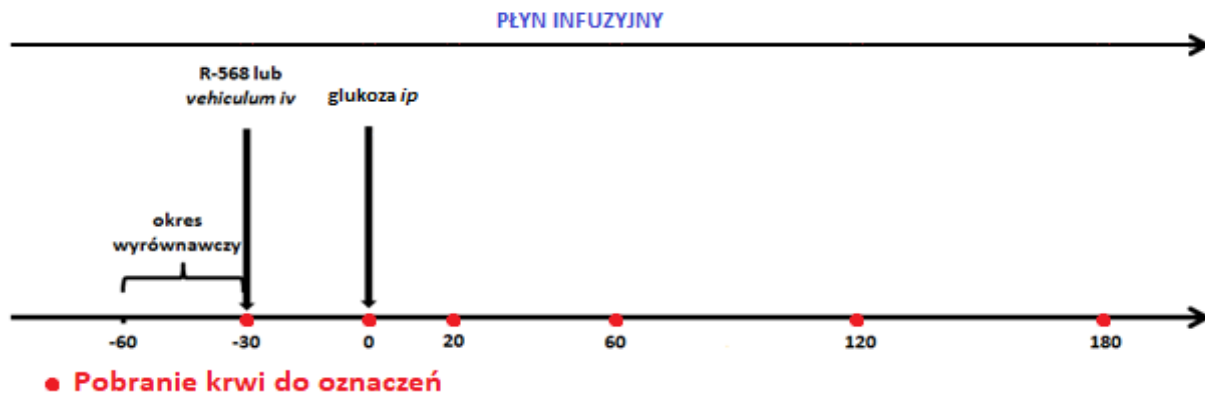
Rys. 2. Schemat przeprowadzonych doświadczeń z podaniem kalcymimetyka R-568 lub *vehiculum*

Grupa 3: R- 568, z obciążeniem glukozą (n=11)

Grupa 4: kontrola z obciążeniem glukozą (n=11)

W obu grupach zwierząt obciążonych glukozą protokół postępowania, pomiary i oznaczenia były prowadzone identycznie jak z grupach 1 i 2. Jedynie w czasie 0, zamiast soli fizjologicznej, podawano szczurom dootrzewnowo roztwór glukozy w dawce 1g/kg/ m.c..

Schemat doświadczenia przedstawiono na Rys. nr 3.



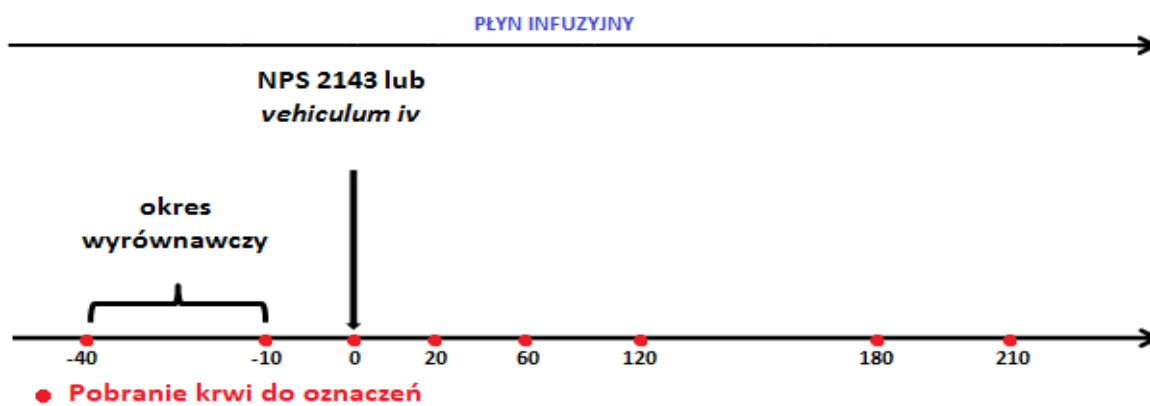
Rys. 3. Schemat doświadczeń z podaniem kalcyminy R-568 lub *vehiculum* z obciążeniem glukozą

Grupa 5: NPS 2143 (n=7)

Grupa 6: kontrola (n=9)

W grupie zwierząt, której podawano NPS 2143, po 30 minutowym okresie wyrównawczym, szczurom podawano jednorazowo dożylnie NPS 2143, rozpuszczony w 15% cyklodekstrynie, w dawce 2mg/kg m.c.. Grupa kontrolna otrzymała 15% roztwór cyklodekstryny. Czas podania kalcyminy oznaczono w schemacie eksperymentu jako czas 0. Pomiarów stężenia glukozy i Ca^{2+} dokonywano 10 minut przed podaniem kalcyminy oraz w 60, 120, 180 i 210 min po podaniu NPS 2143. Próbkę krwi do oznaczeń insuliny były pobierane w tym samym czasie, z wyjątkiem 60 minuty.

Schemat doświadczenia przedstawiono na Rys. nr 4.



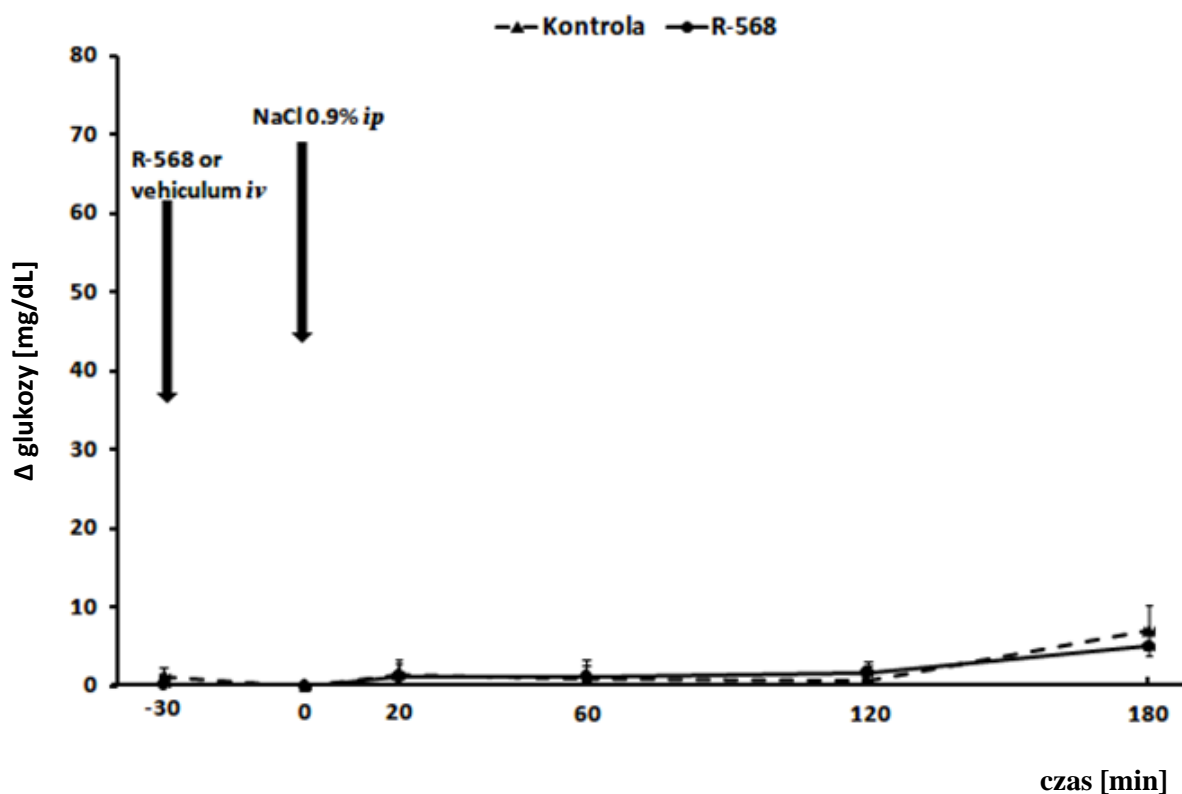
Rys. 4. Schemat doświadczeń z podaniem kalcylika NPS 2143 lub *vehiculum*

5. Wyniki

5.1. Wpływ podania R-568 na stężenie glukozy, insuliny oraz Ca^{2+} u szczurów

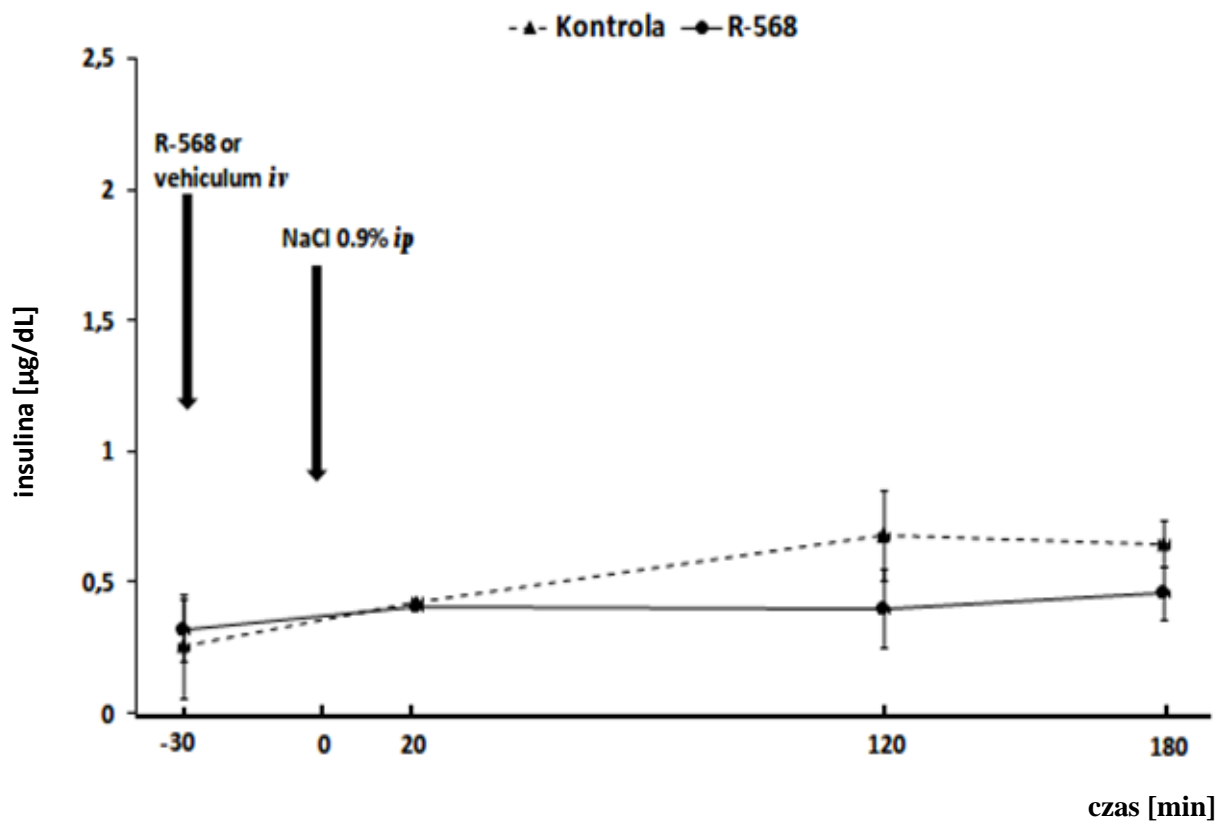
Wyjściowe poziomy glukozy we krwi u szczurów użytych do doświadczeń wynosiły 84 ± 1.5 i 80 ± 1.8 mg/dL, odpowiednio w grupie kontrolnej i grupie R-568.

Wpływ podania kalcymimetyka R-568 na stężenie glukozy u szczurów pokazano na Wykresie nr 1. Zmiany stężenia glukozy zostały przedstawione jako Δ glukozy, czyli różnica stężeń między kolejnymi pomiarami glukozy podczas eksperymentu a poziomem glukozy w czasie 0, tuż przed dootrzewnowym podaniem soli fizjologicznej. Po podaniu R-568 nie zaobserwowano zmian w stężeniu glukozy w porównaniu do grupy kontrolnej.



Wykres 1. Wpływ podania *i.v.* R-568 na poziom glukozy w osoczu szczurów. Zmiany stężenia glukozy są przedstawione w postaci Δ glukozy, obliczonej z różnicy stężeń kolejnych pomiarów glukozy podczas eksperymentu a poziomem glukozy w czasie 0, tuż przed dootrzewnowym podaniem soli fizjologicznej. Grupa kontrolna $n=4$, grupa badana $n=4$; analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

Po podaniu R-568 również nie zaobserwowano zmian w poziomie insuliny. Wyniki tych doświadczeń przedstawione są na Wykresie nr 2.



Wykres 2. Wpływ podania *i.v.* R-568 na poziom insuliny w osoczu szczurów. Zmiany stężenia glukozy są przedstawione w postaci Δ glukozy, obliczonej z różnicy stężeń kolejnych pomiarów glukozy podczas eksperymentu a poziomem glukozy w czasie 0, tuż przed dootrzewnowym podaniem soli fizjologicznej. Grupa kontrola n=4, grupa badana n=4; analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

W Tabeli nr 1 przedstawiono wyniki pomiaru stężenia Ca^{2+} we krwi u szczurów. 20 minut po podaniu R-568 zaobserwowano znaczący spadek stężenia Ca^{2+} w porównaniu z grupą kontrolną jak i okresem początkowym. Efekt ten utrzymywał się do końca trwania eksperymentu.

Tabela 1. Wpływ podania R-568 na poziom Ca^{2+} we krwi szczurów

Czas [min]	Ca^{2+} [mmol/L]	
	Kontrola(n=4)	R-568 (n=4)
-30	1.35±0.02	1.36±0.01
	<i>15% CDX</i>	<i>R-568 1mg/kg m.c. i.v.</i>
0	<i>sól fizjologiczna ip</i>	
20	1.39±0.02*#	1.09±0.04*#
120	1.39±0.02*#	1.29±0.02*#
180	1.38±0.02*#	1.31±0.02#

* $p < 0.05$ vs okres kontrolny; # $p < 0.05$ vs grupa kontrolna; n- liczba zwierząt. Analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

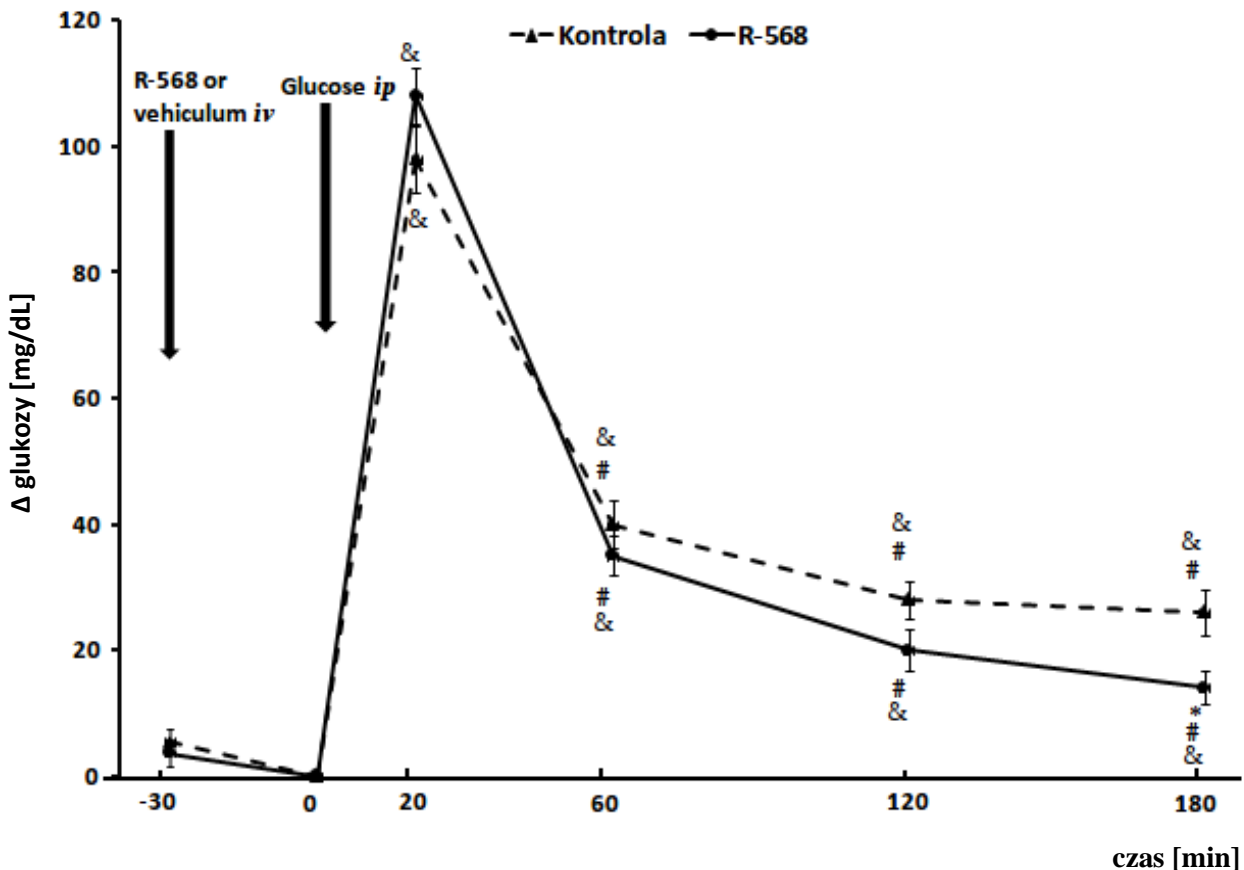
5.2. Wpływ podania R-568 na stężenie glukozy, insuliny oraz Ca^{2+} u szczurów obciążonych glukozą

U szczurów obciążonych glukozą początkowe stężenia glukozy wynosiły $96 \pm 3,5$ i $93 \pm 2,8$ mg / dL, odpowiednio w grupie kontrolnej i grupie R-568. Wartości te nie uległy istotnym zmianom po 30 minach po podaniu kalcymimetyka R-568 i wynosiły $90 \pm 2,6$ vs. $88 \pm 2,1$ mg/dL.

Wpływ podania kalcymimetyka R-568 na stężenie glukozy u szczurów obciążonych glukozą pokazano na Wykresie nr 3. Zmiany stężenia glukozy zostały przedstawiona jako Δ glukozy, czyli różnica stężeń między kolejnymi pomiarami glukozy podczas eksperymentu a poziomem glukozy w czasie 0, tuż przed dootrzewnowym podaniem roztworu glukozy.

20 minut po dootrzewnowym podaniu glukozy jej poziom w obu grupach, kontrolnej i R-568 wzrósł podobnie. Wyraźny spadek stężenia glukozy w grupie R-658 zaobserwowano w 60

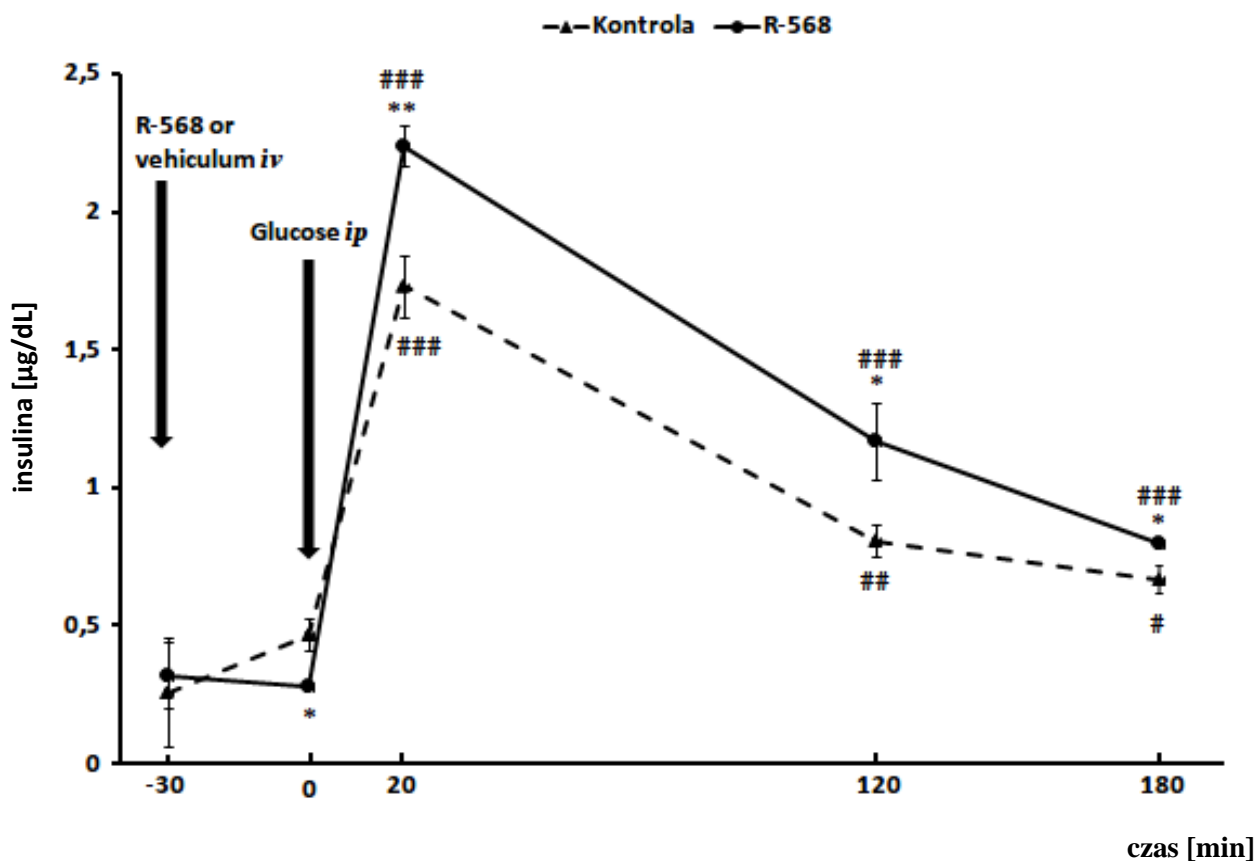
minucie eksperymentu w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak różnice istotne statystycznie między tymi grupami odnotowano dopiero w 180 minucie eksperymentu.



Wykres 3. Wpływ podania *i.v.* R-568 na stężenie glukozy w osoczu szczurów obciążonych glukozą. Zmiany stężenia glukozy, Δ glukozy została przedstawiona jako różnica stężeń kolejnych pomiarów glukozy podczas eksperymentu a poziomem glukozy w czasie 0, tuż przed dootrzewnowym podaniem roztworu glukozy. Grupa kontrola n=11, grupa badana n=11. *p<0,01, vs grupa kontrolna; #p,0,001 vs. czas 20 min; &p<0,001 vs. czas 0; analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

W grupie badanej u zwierząt obciążonych glukozą kalcyminetyk R-568 obniża stężenie glukozy w 120 i 180 min eksperymentu w porównaniu z grupą kontrolną.

Stężenie insuliny wzrosło po 20 minutach od momentu podania glukozy *ip.* (czas 0 min). Natomiast w 120 i 180 minucie eksperymentu zaobserwowano spadek poziomu insuliny zarówno w grupie kontrolnej jak i R-568. Jednakże u szczurów w grupie R-568 obciążonych glukozą poziom insuliny był istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną szczurów obciążonych glukozą po 20, 120 i 180 minutach eksperymentu (Wykres 4).



Wykres 4. Wpływ podania *i.v.* R-568 stężenie insuliny w osoczu szczurów obciążonych glukozą. Grupa kontrolna n=4, grupa badana n=4; *p<0,05, **p<0,008 vs. grupa kontrolna; #p<0,04, ###p<0,007, ####p<0,001 vs. czas 0; analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

Podanie R-568 zwiększa stężenie insuliny w 20, 120 i 180 min eksperymentu w porównaniu z grupą kontrolną.

Wpływ podania zwierzętom R-568 obciążonym glukozą na stężenie jonów wapnia przedstawia Tabela 2. U szczurów obciążonych glukozą 20 minut po podaniu R-568 zaobserwowano znaczny spadek Ca^{2+} w porównaniu z grupą kontrolną jak i okresem początkowym. Efekt ten trwał do końca trwania eksperymentu.

R-568 obniża stężenie Ca^{2+} we krwi z 1.39 ± 0.02 [mmol/L] w okresie kontrolnym do 1.27 ± 0.01 [mmol/L] w 180 min eksperymentu. W grupie kontrolnej stężenie to pozostawało na niezmiennym poziomie podczas trwania całego eksperymentu.

Tabela 2. Efekt podania R-568 na poziom Ca²⁺ we krwi szczurów obciążonych glukozą

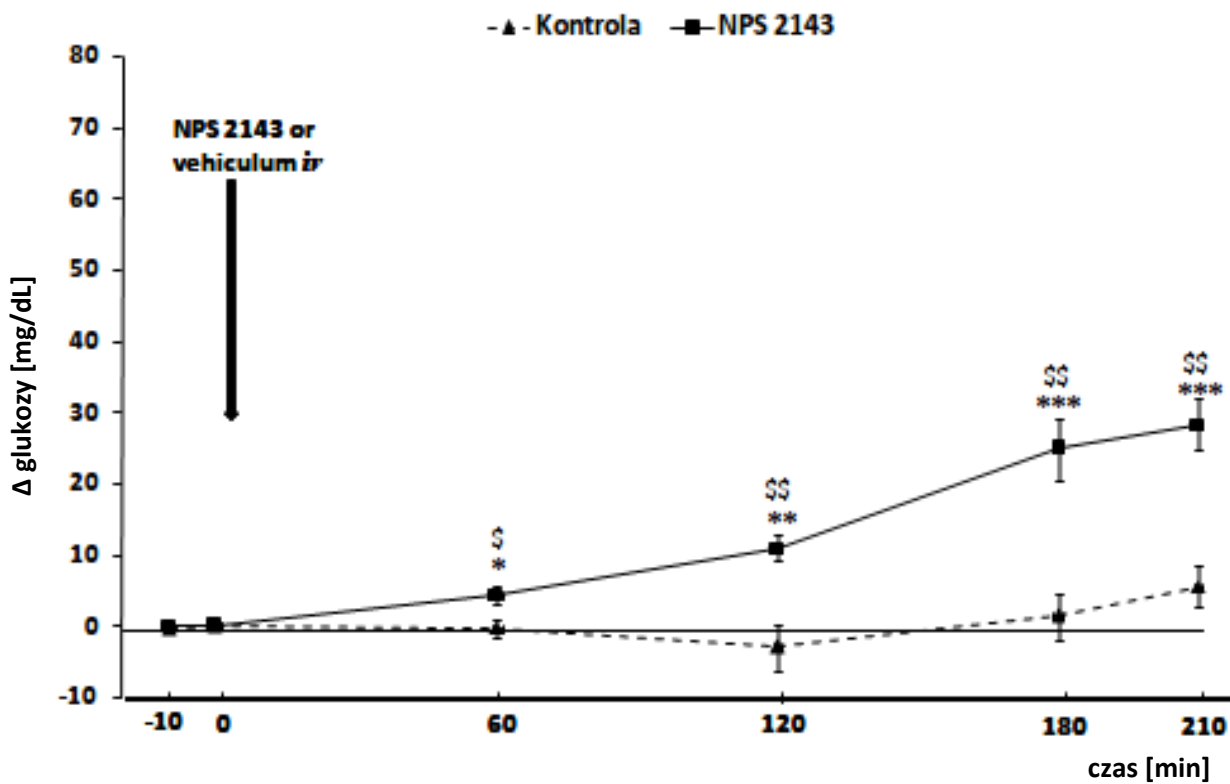
Czas [min]	Ca ²⁺ [mmol/L]	
	Kontrola (n=6)	R-568 (n=8)
-30	1.37±0.02	1.39±0.02
0	<i>15% CDX i.v.</i>	<i>R-568 1mg/kg m.c. i.v.</i>
	<i>Glukoza 1g/kg m.c. ip</i>	
20	1.39±0.01*#	1.22±0.03*#
120	1.39±0.01*#	1.25±0.01*#
180	1.37±0.01*#	1.27±0.01*#

*p<0.05 vs okres kontrolny; #p<0.05 vs grupa kontrolna; n- liczba zwierząt. Analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

5.3. Wpływ podania NPS2143 na stężenie glukozy, insuliny i Ca²⁺u szczurów

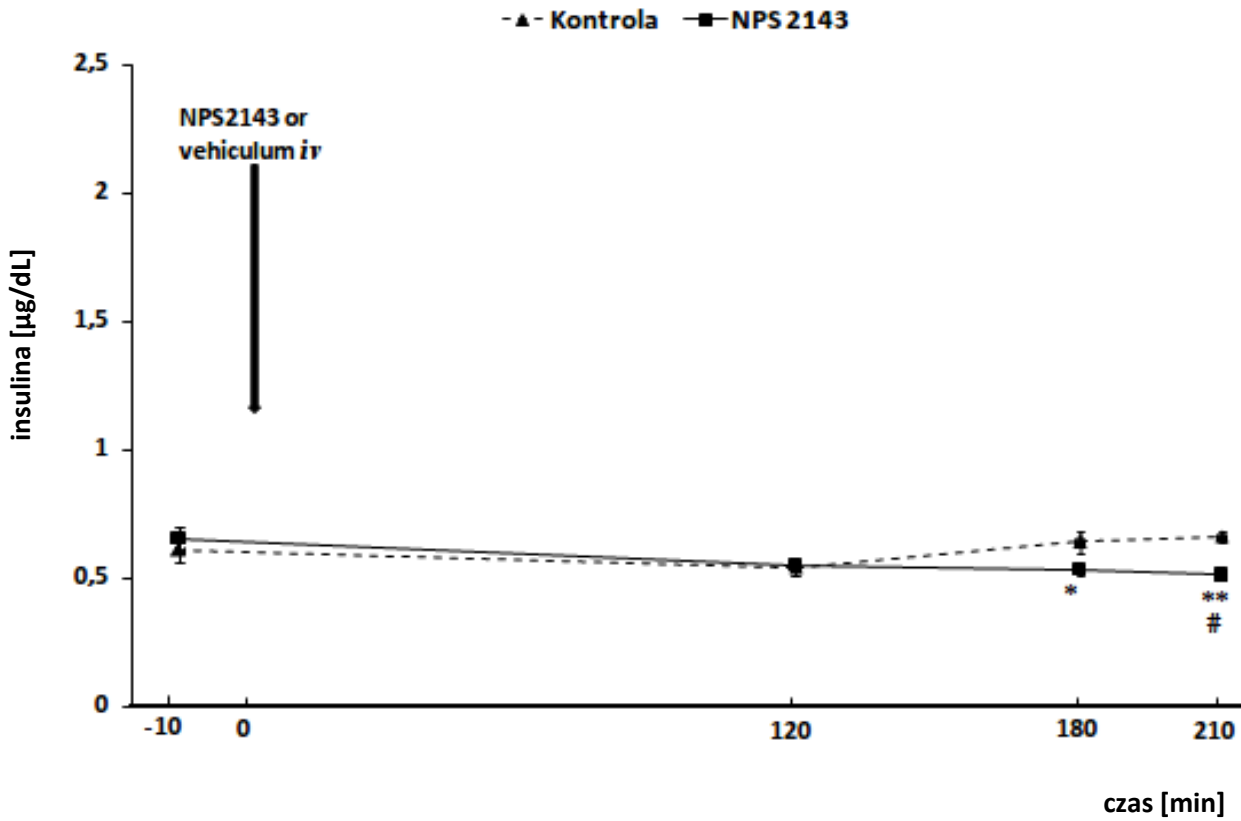
Wpływ podania kalcylityka NPS2143 na stężenie glukozy u szczurów przedstawiono na Wykresie nr 5. Zmiany stężenia glukozy zostały przedstawiona jako Δ glukozy, czyli różnica stężeń między kolejnymi pomiarami glukozy podczas eksperymentu a poziomem glukozy w czasie 0.

Jak wynika, z poniższych oznaczeń, podanie szczurom NPS 2143 istotnie zwiększa stężenie glukozy w 180 i 210 min eksperymentu w porównaniu z grupą kontrolną.



Wykres 5. Wpływ podania *i.v.* NPS 2143 na stężenie glukozy we krwi szczurów. Zmiany stężenia glukozy Δ glukozy została przedstawiona jako różnica stężeń kolejnych pomiarów glukozy podczas eksperymentu a poziomem glukozy w czasie 0 przed podaniem roztworu NPS2143 lub *vehiculum*. Grupa kontrolna n=7, grupa badana n=9; *p<0,02, **p<0,03, ***p<0,001 vs. grupa kontrolna; \$p<0,003, \$\$p<0,01 vs. czas 0; analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

Zestawione na Wykresie 6 wyniki pomiaru insuliny wskazują, że podanie szczurom jednorazowej dawki NPS 2143 obniża stężenie insuliny w 180 i 210 min eksperymentu w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt.



Wykres 6. Wpływ podania *i.v.* NPS 2143 na stężenie insuliny w osoczu szczurów. Grupa kontrolna n=4, grupa badana n= 4, *p<0,05, **p<0,002 vs. grupa kontrolna, #p<0,04 vs. czas początkowy, analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

W Tabeli poniżej zestawiono wyniki pomiarów stężenia Ca^{2+} w grupie zwierząt, które otrzymały NPS 2143. Kalcylityk podwyższa stężenie Ca^{2+} we krwi z wartości 1.44 ± 0.01 w okresie kontrolnym do 1.52 ± 0.02 mmol/L w końcowym okresie doświadczenia. W grupie kontrolnej wartości Ca^{2+} we krwi pozostawały niezmiennione przez cały czas eksperymentu.

Tabela 3. Wpływ podania NPS 2143 na stężenie Ca^{2+} we krwi u szczurów

Czas [min]	Ca^{2+} [mmol/L]	
	Kontrola(n=5)	NPS 2143 (n=5)
-10	1.36±0.01	1.44±0.01#
0	15% CDX i.v.	NPS 2143 2mg/kg m.c. i.v.
60	1.36±0.01	1.54±0.01*#
180	1.37±0.01	1.54±0.02*#
210	1.36±0.02	1.52±0.02*#

* $p < 0.05$ vs okres kontrolny; # $p < 0.05$ vs grupa kontrolna; n- liczba zwierząt. Analiza statystyczna została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta.

6. Dyskusja

Prezentowane w mojej dysertacji wyniki wykazały po raz pierwszy, że w warunkach *in vivo* zmiany aktywności receptora wapniowego wpływają na poziom glukozy i insuliny we krwi u szczurów. Aktywacja CaR za pomocą kalcymimetyka R-568 zmniejsza stężenie glukozy we krwi czemu towarzyszy zwiększone wydzielanie insuliny u szczurów. Wykazano ponadto, że hamowanie aktywności CaR za pomocą kalcylicytki NPS 2143, zwiększa stężenie glukozy we krwi oraz powoduje spadek stężenia insuliny w osoczu u szczurów.

Zgodnie z dotychczasowym stanem wiedzy w wyniku metabolizmu glukozy w komórkach wzrasta stosunek ATP/ADP, zamykają się zależne od ATP kanały potasowe doprowadzając do depolaryzacji błony komórkowej. W efekcie depolaryzacji dochodzi do zwiększonego napływu Ca^{2+} poprzez otwarcie, zależnych od napięcia, kanałów wapniowych. Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu komórki prowadzi do wydzielania insuliny.

Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , może być również efektem uwalniania Ca^{2+} z reticulum endoplazmatycznego poprzez receptory powierzchniowe związane z aktywacją enzymu fosfolipazy C (PLC) i dalej, aktywację szlaków metabolicznych *via* diacylglicerol i inozytolotrójfosforany. Opisany proces może być spowodowany stymulacją CaR, którego obecność potwierdzono na powierzchni β komórek trzustki [45, 48]. W zgodzie z taką hipotezą pozostają przeprowadzone wcześniej eksperymenty *in vitro* wykonane na mysich komórkach β trzustki, C57BL, które wykazały, że aktywacja CaR znajdującego się na powierzchni tych komórek, za pomocą R-467, zwiększa sekrecję insuliny [46]. Ponadto, aktywacja CaR przez innego agonistę, R-568, również powodowała wzrost sekrecji tego hormonu przez ludzkie komórki wysp Langerhansa [47].

Powstało zatem pytanie czy opisany wyżej wzrost sekrecji insuliny, wywołany aktywacją CaR, przez komórki β trzustki, wyizolowane ze swojego naturalnego środowiska, będzie występował również na modelu całego organizmu, w warunkach *in vivo*, najbardziej zbliżonych do fizjologicznych? Co więcej, czy hamowanie aktywności CaR w warunkach *in vivo* wywoła efekt przeciwny, czyli będzie zmniejszało sekrecję insuliny. Tym bardziej, że ten rodzaj zależności nie był dotychczas badany ani w warunkach „*in vivo*” ani „*in vitro*”. W przeprowadzonych doświadczeniach obok zmian stężenia insuliny we krwi śledzono również zmiany poziomu glukozy.

Eksperymenty *in vivo* przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, które w celu uzyskania stabilnego, bazowego poziomu glukozy i insuliny, przed eksperymentem głodzono. Stanowi to powszechną procedurę w badaniach *in vivo* na myszach i szczurach [49,50].

Ponieważ z badań *in vitro*, które przeprowadzono na mysich komórkach β trzustki, wynikało, iż aktywacja CaR zwiększa sekrecję insuliny tylko w komórkach wcześniej eksponowanych na podwyższone stężenie glukozy [46], w moich doświadczeniach, wpływ aktywacji receptora w warunkach „*in vivo*” badałam u szczurów obciążonych wcześniej dootrzewnowym podaniem glukozy. Wybór dootrzewnowego sposobu podania glukozy, ogólnie przyjęty jako prostszy, podyktowany był dobrostanem zwierząt. Podanie dootrzewnowe stanowi mniej stresującą i mniej obciążającą procedurę niż podanie doustne, za pomocą zgłębnika [50,51].

U szczurów obciążonych glukozą, którym podano R-568 zaobserwowano istotny wzrost stężenia insuliny w osoczu w porównaniu z obciążoną glukozą grupą kontrolną. Ponadto, zaobserwowano znaczący spadek poziomu glukozy we krwi w porównaniu z grupą kontrolną. Co ciekawe, takiego efektu nie odnotowano u zwierząt nieobciążonych glukozą, którym również podano R- 568. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że w warunkach *in vivo* mechanizm odpowiedzialny za zwiększenie wydzielania insuliny, w części, w której pośredniczy CaR, staje się aktywny tylko w obecności podwyższonego stężenia glukozy.

W przeprowadzonych przeze mnie eksperymentach aktywacja CaR, doprowadzała do spadku poziomu glukozy we krwi i wzrostu stężenia insuliny w osoczu. Dlatego też spodziewałam się, iż zahamowanie aktywności CaR wywoła przeciwstawny efekt. I rzeczywiście, w odpowiedzi na podanie NPS2143, antagonisty CaR, począwszy od 60 min zaobserwowano znaczący wzrost stężenia glukozy w porównaniu z grupą kontrolną, Równocześnie zaobserwowano spadek poziomu insuliny w porównaniu z grupą kontrolną. Największy spadek odnotowano w 180 minucie eksperymentu. Uzyskane wyniki eksperymentów pozostają w zgodzie z wynikami badań przeprowadzonych na ludzkiej linii komórek śródbłonna, które wykazały, że poziom białka CaR został zahamowany w obecności NPS2143 [52].

Przedstawione w dysertacji wyniki wspierają hipotezę udziału CaR w mechanizmie sekrecji insuliny poprzez PLC-zależne zmiany stężenia Ca^{2+} wewnątrz komórek przytarczyc. Niemniej jednak, ponieważ aktywność CaR jest związana z regulacją stężenia Ca^{2+} we krwi [20, 22] nie można wykluczyć, że zmiany stężenia tego jonu we krwi mogą wpływać *per se* na sekrecję insuliny [20,22]. Dotychczas opublikowane wyniki eksperymentów, wykonane w

naszym laboratorium [53-55] jak i doniesienia innych autorów [22, 26, 56] wskazują, że podawanie R-568, w dawkach podobnych do zastosowanych w niniejszej pracy, obniżają poziom wapnia, podczas gdy podanie NPS2143 powoduje zwiększenie poziomu wapnia we krwi w zakresie wartości fizjologicznych. W przeprowadzonych w tej pracy eksperymentach podawano zwierzętom stosowane we wcześniejszych pracach modyfikatory aktywności CaR, R-568 oraz NPS2143, i uzyskano oczekiwane zmiany wartości Ca^{2+} we krwi, co potwierdziło zasadność zastosowanych dawek tych związków. Ponadto, wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych na ludzkich komórkach wysp trzustkowych wykazały, że ekspozycja tych komórek na wzrastające stężenia Ca^{2+} (0,2-1,2 mM) nie miała wpływu na sekrecję insuliny [47]. Stąd wydaje się, iż zmiany sekrecji insuliny w odpowiedzi na fizjologiczne wahania poziomu Ca^{2+} są mało prawdopodobne.

Podsumowując w niniejszych eksperymentach wykazałam, iż aktywacja CaR w warunkach *in vivo* za pomocą R-568 zwiększa poziom insuliny w osoczu i zmniejsza poziom glukozy we krwi u szczurów. Ponadto odwrotny efekt, zwiększenie poziomu glukozy we krwi oraz zmniejszenie poziomu insuliny w osoczu zaobserwowano po zahamowaniu aktywności CaR poprzez podanie kalcyliptyka - NPS2143.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, iż aktywność receptora wapniowego może mieć wpływ na mechanizmy pośredniczące w sekrecji insuliny.

7. Wnioski

1. Prezentowane wyniki wskazują, że w warunkach *in vivo* zmiany aktywności receptora wapniowego mogą brać udział w mechanizmach pośredniczących w sekrecji insuliny.
2. Przedstawione wyniki doświadczeń wykazały po raz pierwszy, że aktywacja CaR za pomocą kalcymimetyka R-568 zwiększa wydzielanie insuliny i zmniejsza stężenie glukozy u szczurów.
3. Natomiast hamowanie aktywności CaR za pomocą kalcylicytki NPS 2143, obniża sekrecję insuliny i zwiększa stężenie glukozy we krwi u szczurów, co również wykazano po raz pierwszy.

8. Piśmiennictwo

1. Bianchi L., Zuliani G., Volpato S., Physical Disability in the Elderly with Diabetes: Epidemiology and Mechanisms, *Curr Diab Rep*, 13:824–830,2013
2. Silbert R., Salcido-Montenegro A., Rodriguez-Gutierrez R., Katabi A., McCo R. G, Hypoglycemia Among Patients with Type 2 Diabetes: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention Strategies, *Current Diabetes Reports*, 52,2018
3. Vieira-Potter VJ, Karamichos D, Lee DJ, Ocular Complications of Diabetes and Therapeutic Approaches. *Biomed Res Int.*,3801570, 2016
4. Awoniyi O, Rehman R, Dagogo-Jack S., Hypoglycemia in Patients with Type 1 Diabetes: Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention, *Curr Diab Rep*, 13:669–678, 2013
5. Bianchi L., Zuliani G., Volpato S., Physical Disability in the Elderly with Diabetes: Epidemiology and Mechanisms, *Curr Diab Rep*, 13:824–830, 2013
6. Ostrowska L., Witczak K., Adamska E., Czy istnieją środowiskowe uwarunkowania otyłości? *Forum zaburzeń metabolicznych*, 3(3):85-93, 2012
7. LeRoith D., Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am J Med*, 113 Suppl 6A: 3S–11, 2002
8. Dağdeviren M, Altay M, Yildiz Z; Şimşek G, Çitirik M, Ateş İ, Dağdeviren TS, Yildiz C, Şahin T, *Turk Patoloji Dergisi [Turk Patoloji Derg]*, The Relationship Between Obesity, Insulin Resistance, and Conjunctival Impression Cytology., *Turk Patoloji Dergis*, Vol. 35 (2), 119-127, 2019
9. Pendergrass M, Koval J, Vogt C, Yki-Jarvinen H, Iozzo P, Pipek R, Ardehali H, Printz R, Granner D, DeFronzo RA, Mandarino LJ. Insulin-induced hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM. *Diabetes*, 47(3):387-94, 1998,
10. Bernard M. Y. Cheung, Chao Li. Diabetes and Hypertension: Is There a Common Metabolic Pathway? *Curr Atheroscler Rep.*, 14(2): 160–166, 2012,
11. Hamasaki H. Daily physical activity and type 2 diabetes: A review. *World J Diabetes.*, 25; 7(12): 243–251, 2016
12. Dean HJ, Sellers E. Type 2 diabetes, polycystic ovary syndrome and the insulin resistance syndrome in adolescents: Are they one big iceberg? *Paediatr Child Health.*, 7(5): 333–336, 2002
13. Noctor E, Dunne FP., Type 2 diabetes after gestational diabetes: The influence of changing diagnostic criteria, *World J Diabetes*, 15; 6(2): 234–244, 2015

- 14.** Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev.*, 2005, 26(2): 19–39
- 15.** Zhuo Fu, Elizabeth R. Gilbert, Dongmin Liu. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev.*, 9(1): 25–53, 2013
- 16.** Naftalin RJ. Does apical membrane GLUT2 have a role in intestinal glucose uptake? Version 1. *F1000Res.*, 3: 30, 2014
- 17.** Jitrapakdee S., Wutthisathapornchai A., Wallace J.C., MacDonald M. J., Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia*; 53(6): 1019–1032, 2010
- 18.** Thurmond DC. Regulation of Insulin Action and Insulin Secretion by SNARE-Mediated Vesicle Exocytosis. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013
- 19.** Ahren B. Islets G-protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 369-38, 2009
- 20.** Brown EM., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger MA., Lytton., Hebert S.C., Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} sensing receptor from bovine parathyroid, *Nature* 366: 575-580, 1993
- 21.** Brown EM., Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers, *Physiological Review* 71: 371-411, 1991,
- 22.** Brown EM., MacLeod RJ, Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling, *Physiological Review* 81: 239-291: 2001
- 23.** D'Souza-Li L. The calcium-sensing receptor and related diseases. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.50,4, 2006
- 24.** Riccardi D, Brown EM. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 298(3): F485–F499,2010
- 25.** Steddon SJ, Cunningham J., Calcimimetics and calcilytics-fooling the calcium receptor., 365(9478):2237-9, 2005
- 26.** Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BC, Van Wagenen BC, DelMar EG, et al. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci.*,95(7):4040–5, 1998
- 27.** Bover J, Ureña P, Ruiz-García C, daSilva I, Lescano P, del Carpio J, Ballarín J, Cozzolino M., Clinical and Practical Use of Calcimimetics in Dialysis Patients With Secondary Hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol.*, 11(1): 161–174, 2016

28. Iqbal J., Zaidi M., Scheider AE., Cinacalcet hydrochloride (Amgen), *I Drugs* 6 (6):587-92,2003,
29. Zwiech R; Dryja P; Łacina D; Nykiel P; Sek-Szczepanowska K; Bratkowska K; Pietrzak B; Chrul S, Alm, De Francisco; P., Evenepoel; H.S., Brink; G., Mellotte; J.D., Barata; V., Zani; S., Hutton; P., Klassen; E., Ritz. In, New aspects of calcium and phosphate regulating hormones: M030 Cinacalcet (Mimpara/sensipar, effectively reduced intact parathyroid hormone (iPTH)and serum calcium (CA) regardless of serum calcium level in patients with secondary hyperparathyroidism (HPT), *Nephrology Dialysis Transplantation.*, 20 Suppl 5:v197-v198, 2005
30. Nemeth EF,Steffey ME, Hammerland LG, Hung B.C.P, Van Wagenen BC, DelMar EG, Balandrin MF. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,95(7): 4040–4045,1998
31. Nemeth EF. The search for calcium receptor antagonists (calcilytics). *J Mol Endocrinol.* 29(1):15-21, 2002
32. Nemeth EF., DelMar EG., Heaton WL., Miller MA., Lambert LD., Conklin RL., Gowen M., Gleason JG., Bhatnagar PK., Fox J., Calcilytic compounds: potent and selective Ca²⁺ receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone, *Pharmacol Exp Ther* 299: 323, 2001
33. Melton LJ., Riggs BL., *Epidemiology of fractures, Osteoporosis etiology, diagnosis and management* 2nd edition, IIIeditors, 225-247, Lippincott Williams and Wilkins Publishers, Philadelphia, Pennsylvania, 1995
34. Rybczyńska A., Hoppe A., Kalcymimetyki i kalcylicytki: nowe perspektywy korekcji zaburzonej sekrecji parathormonu (PTH), *Przegląd lekarski*, 60,6, 418- 423, 2003
35. Dempster DW., Cosman F., Parisien M., Shen V., Lindsay R., Anabolic effect of parathyroid hormone on bone, *Endocr Rev* 14 (6),690-709, 1993
36. ShenV., Birchmn R., Wu DD., Lindsay R., Skeletal effects of parathyroid hormone infusion in ovariectomized rats with or without estrogen repletion, *J Bone Min Res* 15 (4), 740-746, 2000
37. Haas A., V., Meryl S. LeBoff: Osteoanabolic Agents for Osteoporosis, *Journal of the Endocrine Society*, Vol 2 922–932, 2018
38. McNeil SE, Hobson SA, Nipper V, Rodland KD. Functional calcium-sensing receptors on rat fibroblasts are required for activation of SRC kinase and mitogen-activated protein kinase in response to extracellular calcium. *J Biol Chem*, 273:1114–20, 1998

39. Chattopadhyay N, Ye C, Kifor O, Yamaguchi T, Vassilev PM, Nishimura R, et al. Expression of extracellular calcium-sensing receptor in rat oligodendrocytes: expression and potential role in regulation of cellular proliferation and an outward K⁺ channel. *Glia*, 24:449–58, 1998
40. Ziegelstein RC, Xiong Y, He C, Hu Q. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 342:153–63, 2006
41. Cheng I, Klingensmith MK, Chattopadhyay N, Butters RR, Soybel DI, Brown EM. Identification and localization of the extracellular calcium-sensing receptor in human breast. *J Clin Endocrinol Metab*;83:703–7, 1998
42. Chattopadhyay N, Ye C, Singh DP, Kifor O, Vassilev PM, Shinohara T, et al. Expression of extracellular calcium-sensing receptor by human lens. *Biochem Biophys Res Commun*, 233:801–5, 1997
43. Kato M, Doi R, Imamura M, Furutani M, Hosotani R, Shimada Y. Calcium-evoked insulin release from insulinoma cells is mediated via calcium-sensing receptor. *Surgery* 122(6):1203–11, 1997
44. Ahren B. Islets G-protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 369-385, 2009
45. Jonnalagadda VG, Allam Venkata Sita Ram Raju, Pittala S, Shaik A, Selkar NA. The Prelude on Novel Receptor and Ligand Targets Involved in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Adv Pharm Bull.*, 4(3): 209–217, 2014
46. Straub SG, Kornreich B, Oswald RE, Nemeth EF, Sharp GW. The calcimimetic R467 potentiates insulin secretion in pancreatic beta cells by activation of a nonspecific cation channel. *J Biol Chem*, 275(25):18777–84, 2000
47. Gray E, Muller D, Squires PE, Asare-Anane H, Huang GC, Amiel S, et al. Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of Langerhans: involvement of protein kinases. *J Endocrinol* 2006;190(3):703–10
48. Mears D. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca²⁺ channels. *J Membr Biol*, 200(2):57–66, 2004
49. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294(1):E15–26, 2008

50. Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol* 222(3):G13–25, 2014
51. Savontaus E, Fagerholm V, Rahkonen O, Scheinin M. Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in alpha2Aadrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol*, 578(2-3):359–64, 2008
52. Lu JP, Ren JH, Chen L, Li X, Chen HL. Involvement of CaSR in hyperglycemia-induced macroangiopathy and related mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 35(1):42–7, 2015
53. Rybczyńska A, Boblewski K, Lehmann A, Orlewska C, Foks H, Drewnowska K, et al. Calcimimetic NPS R-568 induces hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 18(3):364–71, 2005
54. Rybczyńska A, Boblewski K, Lehmann A, Orlewska C, Foks H. Pharmacological activity of calcimimetic NPS R-568 administered intravenously in rats: dose dependency. *Pharmacol Rep*, 58(4):533–9, 2006
55. Rybczynska A, Lehmann A, Jurska-Jasko A, Boblewski K, Orlewska C, Foks H, et al. Hypertensive effect of calcilytic NPS 2143 administration in rats. *J Endocrinol* 191(1):189–95, 2006
56. Gowen M, Stroup GB, Dodds RA, James IE, Votta BJ, Smith BR, Antagonizing the parathyroid calcium receptor stimulates parathyroid hormone secretion and bone formation in osteopenic rats. *J Clin Invest*, 105(11):1595–604, 2000