

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

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, kalcylicyka 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/kalcylicyk/*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 kalcylicyka 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 kalcylicyka 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, calcimetimetics 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 calcimetimetics 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 calcimetimetics 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.

