

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny



Farmakologiczna modyfikacja stężenia czynnika
wzrostu śródbłónka naczyń A (VEGF-A)
w przebiegu cukrzycy typu 1; potencjalna strategia
terapeutyczna ograniczająca rozwój nefropatii
cukrzycowej

Rozprawa doktorska

Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Klinicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

mgr Gabriela Chyła-Danił

Promotor: prof. dr hab. Maciej Jankowski

Kierownik Zakładu Chemii Klinicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 2023

***Z całego serca pragnę podziękować wszystkim osobom,
dzięki którym powstanie niniejszej pracy stało się możliwe.***

*Serdeczne podziękowania i wyrazy uznania pragnę złożyć
mojemu Promotorowi,*

*Panu Profesorowi Maciejowi Jankowskiemu
za poświęcony czas, wyrozumiałość, zaangażowanie
oraz wszechstronną pomoc i opiekę merytoryczną
okazane mi przy realizacji niniejszej pracy.*

*Szczególne podziękowania kieruję
do Pani Doktor hab. Agnieszki Kuchty za niezliczone
dyskusje, pomoc, wsparcie oraz ciągłą motywację do pracy.*

*Pragnę również podziękować wszystkim współautorom
za współpracę, która przyczyniła się do powstania
przedstawionego w rozprawie doktorskiej cyklu publikacji.*

*Dziękuję całemu Zespołowi z Zakładu Chemii Klinicznej
za wszelaką pomoc, wyrozumiałość oraz wspaniałą
atmosferę pracy.*

*Za okazane wsparcie, pomoc i wyrozumiałość dziękuję
mojemu Mężowi oraz Rodzicom.*

*Niniejszą pracę dedykuję
moim Rodzicom
Mamie i Tacie*

Spis treści

1.	Finansowanie badań	6
2.	Zgoda Komisji Bioetycznej	6
3.	Wykaz skrótów używanych w rozprawie doktorskiej	7
4.	Streszczenie	9
5.	Abstract	11
6.	Innowacyjność rozprawy	13
7.	Wstęp	14
7.1.	Cukrzyca	14
7.2.	Nefropatia cukrzycowa	14
7.3.	Nefropatia cukrzycowa w kontekście funkcjonowania śródbłonka naczyń	17
7.4.	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyń A – VEGF-A	19
7.5.	VEGF-A w cukrzycy	21
7.6.	Suramina	23
8.	Cel pracy	25
9.	Materiały i metody	26
9.1.	Charakterystyka grup badanych i materiału biologicznego	26
9.1.1.	Badana grupa	26
9.1.2.	Materiał biologiczny	27
9.2.	Metody <i>in vitro</i>	28
9.2.1.	Oznaczenie stężenia VEGF-A	28
9.2.2.	Oznaczenie stężenia albumin	28
9.2.3.	Oznaczenie stężenia białka całkowitego	28
9.2.4.	Oznaczenie aktywności metaloproteinaz	28
9.2.5.	Oznaczenie stężenia kompleksu trombina-antytrombina	28
9.2.6.	Oznaczenie stężenia kreatyniny	28
9.2.7.	Oznaczenie stężenia mocznika	28
9.2.8.	Oznaczenie stężenia cząsteczek adhezyjnych	29
9.2.9.	Analiza Western Blot	29
9.2.10.	Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym	29
9.2.11.	Analiza immunofluorescencji	29
9.3.	Metody <i>ex vivo</i>	30
9.3.1.	Izolacja tętnic międzypłatowych nerek	30
9.3.2.	Pomiary rozkurczu tętnic międzypłatowych nerek	30

9.4.	Analiza eGFR	31
9.5.	Analiza zmiennych żywieniowych.....	31
9.6.	Analiza statystyczna	31
10.	Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	32
11.	Wyniki.....	33
11.1.	Wyniki badań w cukrzycy długoterminowej	33
11.2.	Zestawienie wyników.....	45
12.	Podsumowanie wyników	49
13.	Wnioski	50
14.	Piśmiennictwo	51
15.	Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	62

1. Finansowanie badań

1. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego projektu POWER 2019-2023, Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, POWER 3, nr projektu POWER.03.02.00-00-I014/17-00, projekt pt.: „Międzynarodowe Studia Doktoranckie WF z OML GUMeD ukierunkowane na transfer wiedzy do przemysłu” (mgr Gabriela Chyła-Danił).
2. Ministerstwo Edukacji i Nauki dla Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przeznaczanego dla Młodych Naukowców, numer grantu 01-50022/643-0003381, mgr Gabriela Chyła-Danił.
3. Narodowe Centrum Nauki, grant OPUS 12, nr 2016/23/B/NZ5/02632, realizowany w latach 2017-2021 (prof. Maciej Jankowski).

2. Zgoda Komisji Bioetycznej

Protokół badania na zwierzętach został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Etyczną do spraw doświadczeń na zwierzętach w Bydgoszczy (Zgoda nr 44/2019, 12 grudnia 2019 r.).

3. Wykaz skrótów używanych w rozprawie doktorskiej

ACR – (*ang. albumin-to-creatinine ratio*), wskaźnik albumina/kreatynina

AGE – (*ang. advanced glycation end-products*), zaawansowane produkty glikacji

Cy3 – (*ang. cyanine 3*), barwnik cyjaninowy 3

EDTA – (*ang. ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt*), sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego

EFU_{BW} – (*ang. efficiency of food utilization for body weight*), efektywność wykorzystania pokarmu w stosunku do masy ciała

eGFR – (*ang. estimated glomerular filtration rate*), szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej

eNOS – (*ang. endothelial nitric oxide synthase*), śródbłonkowa syntaza tlenku azotu

FER – (*ang. feed efficiency ratio*), współczynnik efektywności żywienia

GFB – (*ang. glomerular filtration barrier*), kłębuszkowa bariera filtracyjna

GLUT-1 – (*ang. glucose transporter 1*), transporter glukozy typu 1

HEPES – (*ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*), kwas 4-(2-hidroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy

HIF-1 α – (*ang. hypoxia-inducible factor 1*), czynnik indukowany hipoksją 1 α

ICAM-1 – (*ang. intercellular adhesion molecule – 1*), międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna typu 1

IL-18 – (*ang. interleukin – 18*), interleukina – 18

m. c. – masa ciała

MMP – (*ang. matrix metalloproteinases*), metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

MMP-9 – (*ang. matrix metalloproteinase – 9*), metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej – 9

MUP – (*ang. major urinary proteins*), główne białka moczu

P2R – receptory purynergiczne P2

PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

RAGE – (*ang. receptor for advanced glycation endproducts*), receptor zaawansowanych produktów glikacji

RT-PCR – (*ang. reverse-transcription polymerase chain reaction*), reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

SE – (*ang. standard error*), błąd standardowy średniej

sICAM-1 – (*ang. soluble intercellular adhesion molecule – 1*), rozpuszczalna międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna typu 1

sVCAM-1 – (*ang. soluble vascular cell adhesion molecule – 1*), rozpuszczalna naczyniowa cząsteczka adhezyjna typu 1

TAT – (*ang. thrombin–antithrombin complex*), kompleks trombina-antytrombina

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

VCAM-1 – (*ang. vascular cell adhesion molecule – 1*), naczyniowa cząsteczka adhezyjna typu 1

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

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

VEGFR – (*ang. vascular endothelial growth factor receptor*), receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego A

VEGFR-1 – (*ang. vascular endothelial growth factor receptor 1*), receptor typu 1 dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego A

VEGFR-2 – (*ang. vascular endothelial growth factor receptor 2*), receptor typu 2 dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego A

4. Streszczenie

Nefropatia cukrzycowa jest najczęstszym przewlekłym powikłaniem u pacjentów z cukrzycą typu 1 i występuje u około 30% chorych. Na poziomie komórkowym charakteryzuje się dysfunkcją komórek śródbłonna naczyń i podocytów, które wraz z błoną podstawną budują barierę filtracyjną kłębuszka nerkowego (GFB). GFB charakteryzuje się selektywną przepuszczalnością regulowaną m.in. przez czynniki wzrostu, do których należy czynnik wzrostu śródbłonna naczyń A (VEGF-A), będący jednym z głównych czynników regulujących proliferację, różnicowanie i przeżycie komórek śródbłonna. W nerkach VEGF-A jest produkowany głównie przez podocyty, następnie dyfunduje w kierunku światła kapilar, gdzie dociera do komórek śródbłonna kłębuszków nerkowych. Badania molekularne i genetyczne sugerują, że synteza VEGF-A ulega znacznym modyfikacjom w rozwoju i przebiegu nefropatii cukrzycowej. Zrozumienie znaczenia zmian ekspresji i syntezy VEGF-A w nerce może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów prowadzących do rozwoju nefropatii cukrzycowej i wskazać nowe potencjalne kierunki terapii nefroprotektoryjnej modyfikującej stężenia VEGF-A.

Celem naukowym prezentowanej rozprawy doktorskiej było zbadanie czy modyfikacja stężenia VEGF-A stanowi mechanizm opisywanego w literaturze nefroprotektoryjnego działania przeciwpasożytniczej pochodnej naftylomocznika – suraminy. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem szczurzego modelu krótkoterminowej (3 tygodnie) i długoterminowej (12 tygodni) cukrzycy typu 1 indukowanej streptozotocyną.

W prezentowanych badaniach wykazano wzrost wydalania VEGF-A z moczem zarówno w krótko- jak i długoterminowej cukrzycy. Podaż suraminy w krótkotrwałej cukrzycy wywołała dalszy wzrost wydalania oraz zmniejszenie ekspresji VEGF-A w kłębuszkach nerkowych. Dodatkowo zaobserwowana zwiększona ekspresja VEGFR-2 w cukrzycy krótkoterminowej została zmniejszona przez suraminę do poziomów obserwowanych u zwierząt bez cukrzycy. Podobnych efektów podania suraminy nie zaobserwowano w długoterminowym modelu cukrzycy. Jak pokazały przeprowadzone badania, suramina nie miała wpływu na stężenie VEGF-A w surowicy w obu modelach doświadczalnych. Nie wykazano także wpływu suraminy na stężenie rozpuszczalnych form cząstek adhezyjnych (sVCAM-1 oraz sICAM-1).

W celu sprawdzenia funkcjonalności naczyń nerkowych w badanych grupach doświadczalnych oceniono relaksację tętnic na zwężonych fenylefryną tętnicach międzypłatowych nerek za pomocą miografii drutowej. Badania wskazały istotnie mniejszą zdolność relaksacji międzypłatowych tętnic nerkowych izolowanych od szczurów z krótko- oraz długoterminową cukrzycą w porównaniu do szczurów niecukrzycowych. Jednocześnie, podanie suraminy w cukrzycy przywróciło właściwości relaksacyjne tętnic do poziomu stwierdzonego u zwierząt bez cukrzycy. Dodatkowo podanie suraminy doprowadziło do zmniejszenia białkomoczu w trakcie przebiegu długoterminowego modelu cukrzycy.

Podsumowując, oba badane modele cukrzycy potwierdziły nefroprotektoryjne działanie suraminy. Stosowany preparat pozytywnie wpływał na zależną od śródbłoka relaksację międzypłatowych tętnic nerkowych i zmniejszał wydalanie białka całkowitego z moczem w cukrzycy długoterminowej. Jednocześnie wykazano, że oddziaływanie na nerkową oś sygnalizacyjną VEGF-A/VEGFR może stanowić istotny mechanizm nefroprotektoryjnego działania suraminy. W wyniku prowadzonych badań można stwierdzić, że suramina może być potencjalnym środkiem farmakologicznym przywracającym funkcję naczyń krwionośnych nerek, co pozwoli na zastosowanie terapii spowalniającej postęp nefropatii cukrzycowej, a w konsekwencji wpłynie na jakość i długość życia pacjentów z cukrzycą typu 1.

5. Abstract

Diabetic nephropathy is the most common chronic complication in patients with type 1 diabetes and occurs in approximately 30% of patients. At the cellular level, it is characterised by dysfunction of vascular endothelial cells and podocytes, which, together with the basement membrane, build the glomerular filtration barrier (GFB). The GFB is characterised by selective permeability regulated by, among other things, growth factors, that include vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), which is one of the main constituents regulating endothelial cell proliferation, their differentiation and survival. In the kidney, VEGF-A is mainly produced by podocytes, later diffuses towards the capillary lumen, where it reaches glomerular endothelial cells. Molecular and genetic studies suggest that VEGF-A synthesis is significantly modified in the development and progression of diabetic nephropathy. Understanding the importance of changes in VEGF-A expression and synthesis in the kidney may contribute to a better understanding of the mechanisms leading to the development of diabetic nephropathy and identify new potential directions for nephroprotective therapy modifying VEGF-A levels.

The scientific aim of the presented dissertation was to investigate whether modification of VEGF-A concentration is a mechanism for the antiparasitic nephroprotective effect of the naphthylurea derivative suramin described in the literature. Experiments were performed using a rat model of short-term (3 weeks) and long-term (12 weeks) streptozotocin-induced type 1 diabetes.

The present study showed an increase in urinary excretion of VEGF-A in both short- and long-term diabetes. Suramin supply in short-term diabetes induced a further increase in excretion and a decrease in VEGF-A expression in the glomeruli. In addition, the observed increased expression of VEGFR-2 in short-term diabetes was reduced by suramin to levels observed in non-diabetic animals. Similar effects of suramin administration were not observed in the long-term diabetes model. As shown in the study, suramin had no effect on serum VEGF-A levels in both experimental models. There was also no effect of suramin on the concentration of soluble forms of adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1).

To investigate renal vascular function in the experimental groups, arterial relaxation on phenylephrine-constricted renal interlobar arteries was assessed by wire myography. The study indicated significantly lower relaxation capacity of renal interlobar arteries isolated from rats with short- and long-term diabetes compared to non-diabetic rats. Simultaneously, the administration of suramin in diabetes restored the relaxation properties of the arteries to the levels found in non-diabetic animals. In addition, suramin administration led to a reduction in proteinuria during the course of the long-term diabetes model.

In conclusion, both studied diabetes models confirmed the nephroprotective effects of suramin. The applied therapeutic positively affected endothelium-dependent relaxation of interlobar renal arteries and reduced urinary total protein excretion in long-term diabetes. At the same time, it was shown that effects on the renal VEGF-A/VEGFR signalling axis may be an important mechanism for the nephroprotective effects of suramin. As a result of the current study, it can be concluded that suramin may be a potential pharmacological

agent for restoring renal vascular function, which will allow the use of therapy to slow the progression of diabetic nephropathy, and consequently affect the quality and length of life of patients with type 1 diabetes.

6. Innowacyjność rozprawy

Niniejsza dysertacja przedstawia wyniki badań dotyczących:

- ◆ Zastosowania suraminy jako czynnika wpływającego na metabolizm osi VEGF-A/VEGFR w krótko- i długotrwałej cukrzycy.
- ◆ Potencjalnie nefroprotekcynowego działania suraminy w rozwoju nefropatii cukrzycowej.
- ◆ Działania suraminy poprawiającego funkcję śródbłónka tętnic w nerkach.

7. Wstęp

7.1. Cukrzyca

Cukrzyca stanowi grupę zaburzeń metabolicznych charakteryzujących się hiperglikemią będącą poważnym obciążeniem dla funkcjonowania całego organizmu. W krajach wysokorozwiniętych cukrzyca jest istotnym i narastającym problemem epidemicznym. W roku 2019 w badaniach dla Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej oszacowano, że globalna częstość występowania cukrzycy wśród osób dorosłych wzrosła z 9,3% (463 mln) w roku 2019 do 10,2% (578 mln) w roku 2030 oraz do 10,9% (700 mln) w roku 2045 [1]. Natomiast dane pochodzące z roku 2021 wskazują, że na całym świecie zaburzenie to występuje z częstością wynoszącą 10,5%, wskazując na większe, niż zakładano obciążenie populacji ludzi tą chorobą [2].

Cukrzyca pod względem etiologicznym nie jest chorobą jednorodną a główne jej typy to typ 1 oraz typ 2. Cukrzyca typu 1 ma podłoże autoimmunologiczne i charakteryzuje się bezwzględным niedoborem insuliny, który jest wynikiem utraty komórek β wysp trzustkowych. W większości przypadków objawy cukrzycy typu 1 pojawiają się w okresie dzieciństwa lub dojrzewania, ale odnotowuje się również przypadki zachorowania na cukrzycę o podłożu immunologicznym u osób w wieku dorosłym. Mimo że etiologia cukrzycy typu 1 nie jest do końca poznana, wskazuje się na udział limfocytów T. Ponadto powstające w przebiegu cukrzycy typu 1 autoprzeciwciała są ukierunkowane na antygeny znajdujące się w komórkach β wysp trzustkowych – insulinę, dekarboksylazę kwasu glutaminowego, białko 2 związane z insulinomą oraz transporter cynku 8 i mogą być wykorzystywane do oceny ryzyka rozwoju cukrzycy typu 1 [3].

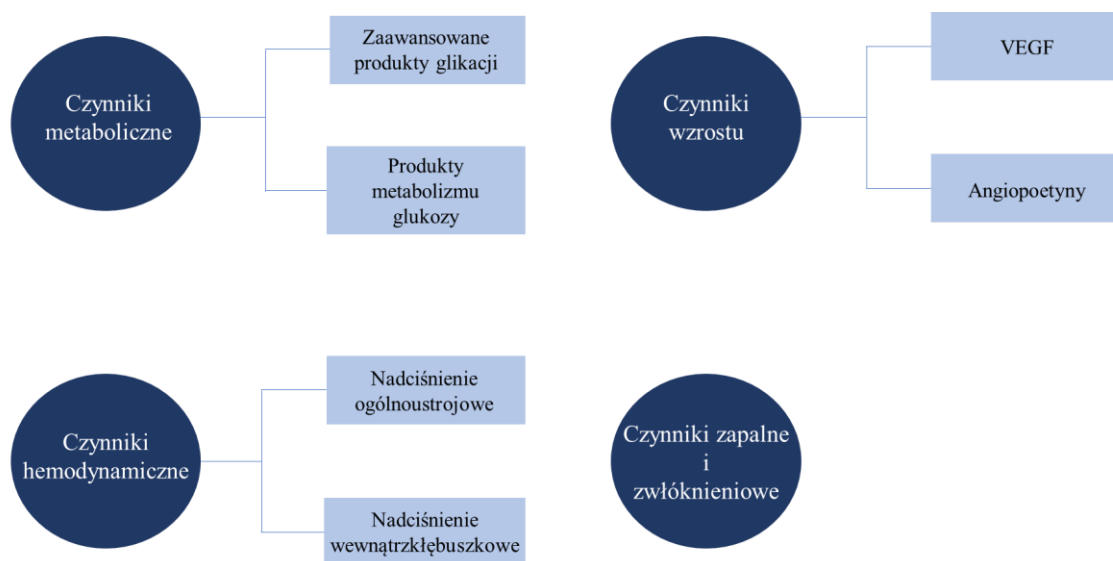
Patogeneza cukrzycy typu 2 związana jest z występowaniem insulinooporności i w znacznym stopniu łączy się z czynnikami środowiskowymi – otyłością, nieprawidłową dietą oraz niewielką aktywnością fizyczną. Do występowania cukrzycy typu 2 przyczyniają się również czynniki genetyczne [4]. Typ 2 cukrzycy odpowiada za około 80% całkowitej liczby przypadków cukrzycy [5].

Cukrzyca związana jest z wysokim ryzykiem występowania powikłań mikronaczyniowych (np. nefropatia i retinopatia cukrzycowa) oraz makronaczyniowych (np. choroba niedokrwienna serca) [6].

7.2. Nefropatia cukrzycowa

Nefropatia cukrzycowa jest najczęstszym przewlekłym powikłaniem cukrzycy rozwijającym się u około 30% chorych z cukrzycą typu 1 oraz u około 50% chorych z cukrzycą typu 2 [7]. Jest główną przyczyną schyłkowej niewydolności nerek wymagającej leczenia nerkozastępczego [8,9]. Do głównych czynników ryzyka rozwoju nefropatii cukrzycowej należą: albuminuria, nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, otyłość oraz palenie tytoniu [10]. Charakteryzuje się zmniejszoną gęstością kapilar w kłębuszkach nerkowych oraz zwiększoną objętością kłębuszków nerkowych. Według Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego nefropatię cukrzycową rozpoznaje się na podstawie zwiększonego wydalania albuminy z moczem, wzrostu stężenia kreatyniny w surowicy krwi oraz zmniejszenia szacowanej wartości przesączania kłębuszkowego [11].

Uważa się, że nefropatia cukrzycowa jest inicjowana i podtrzymywana przez cztery grupy czynników: metaboliczne, hemodynamiczne, wzrostowe, zapalno-zwłóknieniowe (ryc. 1) [12].



Rycina 1. Podział czynników patogennych nefropatii cukrzycowej. Zmodyfikowano na podstawie: [12].

Udział poszczególnych czynników patogenetycznych u chorych jest zróżnicowany, zmienny w czasie i zależny od umiejscowienia w nerce. Dodatkowo czynniki genetyczne i środowiskowe mogą modyfikować rozwijające się zmiany w nerkach. Grupy różnych cząsteczek, receptorów, enzymów i czynników transkrypcyjnych uczestniczą w procesach, które prowadzą do rozrostu macierzy zewnątrzkomórkowej kłębuszków nerkowych i ich stwardnienia, hialinizacji naczyń krwionośnych oraz zwłóknienia śródmiąższowego [12]. Najwcześniejsze zmiany patogenetyczne wywoływane są przez grupę czynników metabolicznych związanych z hiperglikemią, która na drodze nieenzymatycznej prowadzi do glikacji białek, a w konsekwencji do powstania zaawansowanych produktów glikacji, AGE (ang. *Advanced Glycation End-Products*), które aktywując receptor RAGE (ang. *Receptor for Advanced Glycation End Products*) zwiększają wytwarzanie reaktywnych form tlenu inicjując stres oksydacyjny [13]. Inny mechanizm, leżący u podłoża zaburzenia funkcji komórek, prowadzący do rozwoju nefropatii cukrzycowej związany jest z aktywacją szlaku polioliowego katalizowanego przez reduktazę aldozową i dehydrogenazę sorbitolową w warunkach zwiększonego stężenia glukozy. Efektem aktywacji tego szlaku jest stres oksydacyjny wynikający ze zwiększenia stężenia NADH przy jednoczesnym zmniejszeniu stężenia NAD^+ . Kolejnym efektem aktywacji szlaku polioliowego jest również wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia sorbitolu, co może prowadzić do stresu osmotycznego komórek oraz wzrostu stężenia fruktozy będącej kolejnym substratem dla procesu glikacji [14]. Komórkami szczególnie podatnymi na uszkodzenia wywołane hiperglikemią są te, do których należą między innymi komórki śródbłonna, które charakteryzują się wysokim poziomem transportera glukozy 1 (GLUT-1) w błonie komórkowej, co uniemożliwia regulację przezbłonowego transportu glukozy. W związku z czym w hiperglikemii do komórek tych napływają znaczne ilości glukozy [15].

Następnym szlakiem metabolicznym zaangażowanym w rozwój powikłań cukrzycy jest szlak heksozamin, w którym fruktozo-6-fosforan powstający w zwiększonej ilości w warunkach hiperglikemii na drodze glikolitycznej jest substratem dla amidotransferazy glutamina:fuktozo-6-fosforan. Powstający glukozamino-6-fosforan w kolejnej reakcji przekształcany jest do UDP-N-acetyl-glukozaminy, której zwiększone stężenie przyczynia się do posttranslacyjnej modyfikacji białek, a to z kolei wiedzie do zwiększonej ekspresji genów dla cytokin np. TGF- β , czego efektem jest, między innymi, zwiększenie ilości kolagenu w błonie podstawnej filtru kłębuszkowego, co wpływa na przepuszczalność tej struktury dla albuminy i innych białek [12,16]. Kolejny mechanizm zaangażowany w rozwój powikłań naczyniowych cukrzycy związany jest z aktywacją kinazy białkowej C, która wynika ze zwiększenia produkcji i akumulacji diacyloglicerolu w komórkach. W efekcie aktywacji kinazy białkowej C dochodzi do zwiększonej produkcji rodników tlenowych w reakcjach katalizowanych przez NADPH, lipo- oraz cyklo-/oksygenazy [12,17].

Rozwój nefropatii cukrzycowej powiązany jest również ze zmianami hemodynamicznymi w nerkach polegającymi na zwiększonym ciśnieniu hydrostatycznym w naczyniach kapilarnych kłębuszków nerkowych. Zmiany te prowadzą we wczesnej fazie cukrzycy do zwiększania szybkości przesączania kłębuszkowego, co w konsekwencji doprowadza do przerostu kłębuszków i kanalików nerkowych, negatywnie wpływając na ich fizjologiczne funkcje [18]. Wzrost ciśnienia hydrostatycznego w kapilarach kłębuszka nerkowego wywołany jest zwiększonym napięciem tętniczek odprowadzających i/lub zmniejszonym napięciem tętniczek doprowadzających. Wzrost oporu tętniczek odprowadzających może zostać wywołany przez oddziaływanie czynników para-/autokrynych ze swoistymi receptorami zlokalizowanymi na komórkach tętniczki odprowadzającej. Do takich czynników należą, między innymi, angiotensyna II, tromboksan A₂, endoteliny oraz przedsionkowy czynnik natriuretyczny. Z kolei zmniejszenie oporu tętniczek doprowadzających może wynikać z oddziaływania następujących czynników: prostaglandyny E₂, bradykininy, angiotensyny 1-7, insuliny, jak również przedsionkowego czynnika natriuretycznego [12,19]. Ponadto we wczesnym okresie rozwoju cukrzycy, w wyniku zwiększenia aktywności transportu zwrotnego glukozy oraz jonów sodu w kanaliku bliższym i w konsekwencji zmniejszenia ilości jonów sodu w płynie kanalika dalszego w okolicy plamki gęstej, dochodzi do aktywacji sprzężenia kanalikowo-kłębuszkowego, a także zmniejszenia oporu tętniczki doprowadzającej [12,20].

Kolejną grupą czynników patogenetycznych są czynniki wzrostu. Stwierdzono, że ilość czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) w nerkach ulega zwiększeniu we wczesnej fazie cukrzycy. W konsekwencji naczynia krwionośne ulegają rozszerzeniu, co wpływa na dynamikę przepływu krwi przez nerki. Sieć naczyń krwionośnych nerek podlega również modyfikacji poprzez angiogenne działanie VEGF [21]. Również inne czynniki wzrostu – angiopoetyny wpływają na podocyty i śródbłonek kłębuszków nerkowych, a nie zrównoważona sygnalizacja angiopoetyny przyczynia się do rozwoju nefropatii cukrzycowej. Co ważne, działanie biologiczne angiopoetyn *in vivo* zależy także od poziomu VEGF [22].

Do kolejnej grupy czynników patogenetycznych nefropatii cukrzycowej należą czynniki zapalno-zwłóknieniowe. Dysfunkcja i uszkodzenie komórek śródbłonna

stymulują wytwarzanie śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych (cząsteczki adhezji międzykomórkowej – 1; ICAM-1 oraz naczyniowej cząsteczki adhezyjnej – 1; VCAM-1), które ułatwiają przezśródbłonkową migrację makrofagów. Ponadto uszkodzenie i aktywacja podocytów, komórek mezangialnych oraz komórek kanalikowych powoduje wydzielanie chemokin np. CCL2, CXCL9, które również ułatwiają wewnątrznerkową infiltrację makrofagów [23]. W kolejnym etapie, między innymi, za pośrednictwem wolnych rodników tlenowych, następuje aktywacja makrofagów do fenotypu prozapalnego. Aktywowane makrofagi uwalniając profibrotyczne cytokiny np. TGF- β zwiększają proliferację komórek i objętość macierzy pozakomórkowej, a także indukują proces włóknienia [12]. Rozważając rolę czynników zapalno-zwłóknieniowych w patogenezie nefropatii cukrzycowej należy mieć na uwadze fakt toczącej się dyskusji, której tematem są wątpliwości wyrażone w pytaniu – czy czynniki te stanowią przyczynę, czy też są odpowiedzią na występujące już uszkodzenie. Należy jednak zauważyć, że istnieje silny związek między stopniem infiltracji makrofagów, a późniejszym występowaniem śródmiąższowego zwłóknienia nerek oraz progresją nefropatii cukrzycowej [24,25].

7.3. Nefropatia cukrzycowa w kontekście funkcjonowania śródbłonka naczyń

Nefropatia cukrzycowa na poziomie komórkowym charakteryzuje się dysfunkcją komórek śródbłonka naczyniowego, podocytów oraz pogrubieniem błony podstawnej kłębuszków nerkowych. Dysfunkcja śródbłonka w cukrzycy charakteryzuje się upośledzoną odpowiedzią naczyń na NO pochodzący ze śródbłonka. Chociaż mechanizm, w wyniku którego cukrzyca prowadzi do dysfunkcji śródbłonka, nie jest w pełni poznany, wspólną cechą dysfunkcji śródbłonka jest zmniejszona biodostępność NO pochodzącego ze śródbłonka i w konsekwencji upośledzenie zależnego od śródbłonka rozkurczu naczyń. Postuluje się, że występuje kilka mechanizmów dysfunkcji śródbłonka, w tym upośledzenie przekazywania sygnału lub dostępności substratu, upośledzone uwalnianie NO, zwiększenie aktywności reakcji konkurujących o substrat – NO, wzmożone uwalnianie czynników obkurczających naczynia pochodzących ze śródbłonka i zmniejszoną wrażliwość mięśni gładkich naczyń na NO. Zaburzenia te są wynikiem aktywacji szeregu szlaków i procesów metabolicznych w tym kinazy białkowej C, szlaku poliolowego, glikacji białek i stresu oksydacyjnego [26].

W kłębuszkach nerkowych ze względu na fakt wzajemnego czynnościowego powiązania poszczególnych elementów bariery filtracyjnej, uszkodzenie jednego elementu bariery przenosi się na drugi, przyspieszając, a także pogłębiając zaburzenia budowy i czynności kłębuszków nerkowych [27,28]. Uważa się, że w początkowym okresie rozwoju powikłań naczyniowych w cukrzycy występujące zaburzenia związane są ze zmniejszoną przeżywalnością komórek śródbłonka i układową dysfunkcją śródbłonka naczyń, wpływając, poza regulacją napięcia naczyń krwionośnych, na ich przepuszczalność. Zaburzenia te odgrywają kluczową rolę w progresji przewlekłej choroby nerek [29–31]. Jednym z czynników mającym wpływ na uszkodzenie komórek śródbłonka, a przez to na selektywność bariery filtracyjnej, jest występująca w kłębuszku nerkowym zaburzona równowaga pomiędzy ekspresją a stężeniem VEGF-A, głównej formy VEGF. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na hiperglikemię jako czynnik stymulujący

syntezę i wydzielanie czynników wzrostu, w tym VEGF-A, przyczyniając się do inicjowania mikronaczyniowych powikłań w cukrzycy [32–35]. Znaczenie VEGF-A w patogenezie nefropatii cukrzycowej nie jest jednak jednoznaczne. Część wyników badań wskazuje na ochronną rolę podwyższonego stężenia VEGF-A na kłębuszki nerkowe. Zmiany stężenia VEGF-A stanowią składową odpowiedzi kompensacyjnej, w stosunku do działania czynników patologicznych, prowadzącą w rezultacie do ograniczenia uszkodzenia i dysfunkcji śródbłonka [36]. Dostępne są również wyniki badań, będące podstawą do wysunięcia domniemania dotyczącego zmniejszenia syntezy VEGF-A przez podocyty w wyniku zmniejszania ich liczebności w przebiegu cukrzycy, co ma negatywny wpływ na przeżywalność komórek śródbłonka oraz pogłębia dysfunkcję naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego [37].

Do kolejnych przyczyn zaburzonej funkcji śródbłonka należą zmiany związane z ekspresją lub też aktywnością receptorów błonowych oraz zaburzenia sygnałowania czynników angiogennych [38,39], które są badane przez nasz Zespół. Pośród receptorów, na których zmianę ekspresji lub aktywności wpływa hiperglikemia, znajdują się receptory P2 aktywowane przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy. Należy do nich, między innymi, receptor P2X7, którego ekspresja w kłębuszkach nerkowych szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą ulega zwiększeniu, implikując zaburzenia funkcji kłębuszków nerkowych [40,41]. Mechanizmy angażujące receptory P2 są złożone i nie do końca poznane. Wpływają one m.in. na aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP), które należą do kluczowych enzymów w metabolizmie macierzy pozakomórkowej. MMP wpływają na aktywność cytokin np. czynnika martwicy nowotworów α , transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$, przez co mogą oddziaływać na procesy dojrzewania komórek, przebudowy tkanek, reakcji zapalnych i proliferacji komórek [42]. Wykazano, że aktywacja receptora P2X7 zwiększa uwalnianie metaloproteinazy – 9 macierzy (MMP-9) do krążenia systemowego [43]. U chorych z nefropatią cukrzycową wykazano ekspresję MMP-9 w podocytach i jej zwiększone stężenie w moczu [44]. Ponadto wyniki badań przeprowadzonych w ciągu ostatnich lat dostarczyły przesłanek wskazujących na wpływ MMP na biodostępność czynników wzrostu śródbłonka naczyń, co również może mieć wpływ na funkcjonowanie komórek śródbłonka [45]. Wykazano, że MMP-9 uwalnia z macierzy pozakomórkowej związany z nią VEGF-A i tym samym wpływa na jego lokalne stężenie a w konsekwencji wpływa na procesy modyfikowane przez VEGF-A. Z drugiej strony VEGF, poprzez domenę wiążącą heparynę, oddziałuje z siarczanem heparanu, składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej.

Oprócz zaburzeń rozkurczu naczyń krwionośnych, proliferacji i przeżywalności komórek bariery filtracyjnej, hiperglikemia doprowadza do wzrostu aktywności płytek krwi i upośledza ich fizjologiczną reakcję na antyagregacyjne działanie śródbłonkowych czynników, do których należą NO oraz prostacyklina I₂. Prowadzi to do nadkrzepliwości, a jednym z markerów tego stanu u chorych jest stężenie kompleksu trombina-antytrombina [46]. Ponadto ogólnoustrojowa aktywacja komórek śródbłonka obserwowana u chorych z cukrzycą prowadzi do zwiększonej ekspresji cytokin i cząsteczek adhezyjnych, których stężenie we krwi wykorzystywane jest jako marker aktywacji śródbłonka. Progresja nefropatii cukrzycowej wiąże się ze wzrostem stężenia m.in. transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ oraz rozpuszczalnej międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej – 1, sICAM-1

[47,48]. Wcześniejsze badania wykazały również, że stężenia IL-18 w surowicy i moczu są dodatnio skorelowane z występowaniem albuminurii u chorych z cukrzycą typu 2, co może sugerować udział inflamasyonu NLRP3 w patogenezie nefropatii cukrzycowej [49].

7.4. Czynniki wzrostu śródbłoka naczyń A – VEGF-A

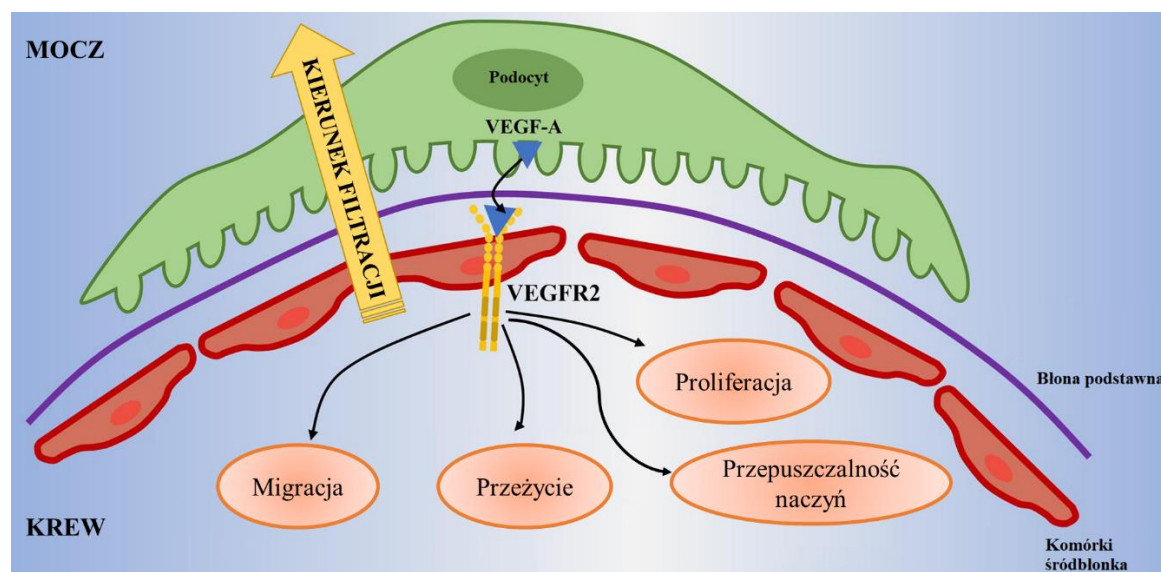
VEGF-A jest głównym członkiem rodziny cytokin VEGF współtworzonej wraz z VEGF-B, -C, -D i -E oraz łożyskowym czynnikiem wzrostu (PlGF) [50]. Jest to homodimerska glikoproteina o masie cząsteczkowej około 45 kDa i charakterze zasadowym. VEGF-A przekazuje informację biochemiczną do komórek, wiążąc się z błonowymi receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej [45]. Oddziaływanie z receptorami jest modyfikowane przez wiązanie cząsteczki VEGF-A za pośrednictwem domeny wiążącej heparynę z glikozaminoglikanami glikokaliksu lub egzogenną heparynę, lub siarczanem heparanu [51].

Produkt transkrypcji genu *Vefga* podlega alternatywnemu składaniu powodując w konsekwencji powstawanie kilku izoform, mających unikalne funkcje biologiczne, których znaczenie jest nadal badane [50]. Jak do tej pory zidentyfikowano 16 różnych izoform VEGF-A, spośród których najpowszechniej występuje sześć: VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆, a spośród nich dominuje VEGF₁₆₅. Izoformy te u gryzoni są krótsze o jeden aminokwas, tj. VEGF₁₁₀, odpowiednio [52]. Wykazano, że izoformy VEGF-A różnią się właściwościami biochemicznymi, takimi jak powinowactwo do receptorów i proteoglikanów siarczanu heparanu. Ponadto różne miejsca alternatywnego składania jednego z egzonów skutkuje powstaniem dwóch rodzin VEGF-A, czyli VEGF_{xxx_a} oraz VEGF_{xxx_b} o całkowicie odmiennych właściwościach. Izoformy VEGF_{xxx_a} uważa się za „proangiogenne” jako główne mediatory przepuszczalności naczyń, proliferacji komórek, przeżycia i migracji oraz angiogenezy [52,53], a izoformy VEGF_{xxx_b} wykazują właściwości „antyangiogenne” [54] oraz mogą wywierać wpływ na komórki jako regulatory i inhibitory indukowanej przez VEGF_{xxx_a} aktywności proangiogennej [55].

VEGF-A jest wydzielany przez wiele typów komórek, takich jak komórki śródbłoka, podocyty, fibroblasty, miocyty, płytki krwi, neutrofile, makrofagi i około 60% wszystkich nowotworów. Głównymi czynnikami indukującymi ekspresję VEGF-A w warunkach patofizjologicznych są niedotlenienie, działające poprzez szlak zależny od czynnika indukowanego niedotlenieniem 1α (HIF-1α), insulina oraz hiperglikemia [56–58]. Część izoform VEGF (VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) nie są magazynowane wewnątrzkomórkowo, ale zamiast tego są związane na powierzchni komórki lub w macierzy zewnątrzkomórkowej. Inna izoforma, tj. VEGF₁₆₅, jest wydzielana, ale około 50-70% może być związane z macierzą pozakomórkową [59]. Fakt, że niektóre izoformy VEGF są związane z macierzą pozakomórkową i mogą zostać z niej uwolnione, np. pod wpływem heparyny lub innych związków, stwarza możliwości oddziaływania farmakologicznego na lokalne stężenie VEGF.

W nerkach VEGF-A jest wytwarzany w kłębuszkach nerkowych głównie przez podocyty i dyfunduje do światła naczyń włosowatych, w kierunku przeciwnym do przepływu przesączu kłębuszkowego, gdzie dociera do komórek śródbłoka

kłębuszków nerkowych, wpływając między innymi na przepuszczalność filtru kłębuszkowego dla wody (ryc. 2) [60–62]. Stwierdzono również, że ekspresja i wydzielanie VEGF-A przez podocyty jest niezbędna do prawidłowego rozwoju nerek [52].

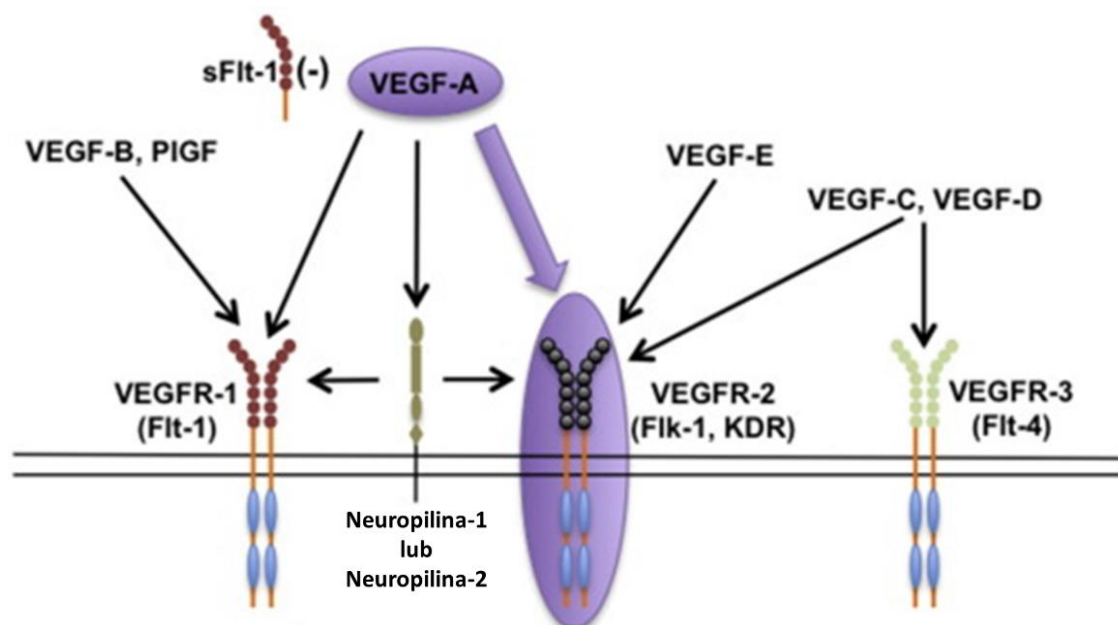


Rycina 2. Mechanizm sygnalizacji VEGF-A/VEGFR2 w kłębuszkowej barierze filtracyjnej oraz jego rola. Zmodyfikowano na podstawie: [63].

VEGF-A jest silnym angiogennym czynnikiem auto-, para-/krynnym wpływającym na przeżycie, proliferację i migrację komórek śródbłónka oraz warunkującym prawidłową funkcję naczynioruchową naczyń tętniczych [52,64,65]. Odpowiednie stężenie VEGF-A jest konieczne do utrzymania homeostazy naczyń [66]. Dodatkowo VEGF-A prowadzi do utrzymania zróżnicowanego fenotypu komórek śródbłónka i tworzenia fenestracji w śródbłónku naczyń kapilarnych kłębuszków nerkowych [67]. Prawidłowa i unikalna budowa komórek śródbłónka kłębuszkowego, charakteryzująca się zwiększoną porowatością, odpowiada za selektywną przepuszczalność kłębuszkowej bariery filtracyjnej, a ocena obrazowa budowy śródbłónka naczyniowego może być czynnościowym markerem lokalnej bioaktywności VEGF-A [68,69].

Receptory dla VEGF (VEGFR) należą do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych klasy IV. Istnieją trzy podtypy VEGFR, które są kodowane przez oddzielne geny. Są to strukturalnie podobne do siebie VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (Flk-1; KDR) oraz VEGFR-3 (Flt-4), który charakteryzuje się proteolitycznie zmienioną domeną zewnątrzkomórkową. Geny dla VEGFR ulegają ekspresji w komórkach śródbłónka, makrofagach oraz miocytach [55]. Sygnalizacja komórkowa związana z VEGF-A odbywa się poprzez wiązanie z receptorami VEGFR-1 oraz VEGFR-2, przy czym największe znaczenie ma wiązanie z VEGFR-2 [70,71], a także przez dwa koreceptory: neuropilinę-1 i neuropilinę-2 (ryc. 3) [52]. VEGFR-1 wykazuje większe powinowactwo do VEGF-A niż VEGFR-2, ale cechuje się niższą aktywnością kinazy tyrozynowej, co wskazuje, że równowaga między tymi receptorami może determinować wielkość odpowiedzi komórkowej na czynnik wzrostu [55]. Wiązanie VEGF-A z VEGFR-1 zapobiega interakcji

czynnika wzrostu z VEGFR-2, co stwarza możliwość ujemnej modulacji aktywności VEGFR-2 [55,72].



Rycina 3. Mechanizm sygnalizacji VEGF-A/VEGFR. Kolor fioletowy wskazuje główną oś sygnalizacji VEGF-A. Zmodyfikowano na podstawie: [52].

W nerkach receptory dla VEGF-A ulegają ekspresji głównie na komórkach śródbłonna kłębuszków nerkowych, tętniczkach przed- i pozakłębuszkowych, komórkach mezangialnych oraz komórkach kanalików [73]. Badania nad sygnalizacją VEGF wykazały, że VEGFR-2 jest przede wszystkim odpowiedzialny za odpowiedź proliferacyjną komórek śródbłonna, a VEGFR-1 jest głównym receptorem odpowiedzialnym za stymulację aktywności syntazy tlenku azotu [74]. Powstały NO negatywnie reguluje ilość VEGF-A produkowanego przez podocyty, co opisywane jest jako oś VEGF-NO, której przypisuje się istotną rolę w utrzymaniu funkcji komórek śródbłonna [75]. Zatem VEGF działa na komórki śródbłonna poprzez dwa szlaki wzajemnie na siebie oddziałujące. Indukujący syntezę NO receptor VEGFR-1 negatywnie reguluje odpowiedź proliferacyjną, w której pośredniczy VEGFR-2 [76].

VEGF-A działa również jako cytokina prozapalna poprzez indukcję cząsteczek adhezyjnych, w tym ICAM-1 i VCAM-1, które wiążą leukocyty z komórkami śródbłonna [77]. Odrębne mechanizmy transdukcji sygnału, dzięki którym VEGF-A indukuje przeżycie, proliferację, migrację i wytwarzanie NO w komórkach śródbłonna są nadal przedmiotem badań [75].

7.5. VEGF-A w cukrzycy

Rola VEGF-A w patomechanizmach nefropatii cukrzycowej jest złożona i niejednoznaczna [52]. Wykazano, że VEGF-A i VEGFR-2 ulegają zwiększonej ekspresji w nerkach szczurów we wczesnych stadiach nefropatii cukrzycowej [78]. Stwierdzono również zwiększone stężenia VEGF-A we krwi dorosłych i dzieci chorych na cukrzycę [79]. Badania przeprowadzone na mysich modelach cukrzycowych wskazały, że VEGF-A w cukrzycy zwiększa ekspresję genu dla eNOS oraz produkcję NO. Jednakże, ze względu na jednoczesną zwiększoną produkcję wolnych rodników, zmniejszeniu ulega

biodostępność NO. W konsekwencji prowadzi to do rozprężenia osi VEGF-NO w wyniku czego dochodzi do zmiany, zależnej od śródbłonna, reaktywności tętnic wewnątrznerkowych, albuminurii, przerostu kłębuszków nerkowych, nieprawidłowej angiogenezy oraz nadmiernej proliferacji komórek śródbłonna [75,80]. Na istotną rolę VEGF, powstającego w podocytach, w rozwoju i progresji nefropatii cukrzycowej wskazują także obserwacje przeprowadzone u myszy z normoglikemią oraz narządową nadekspresją VEGF-A w podocytach, u których wykazano zwiększenie objętości kłębuszków nerkowych, hiperfiltrację, pogrubienie błony podstawnej, a także uszkodzenie podocytów będące zmianami podobnymi do tych, jakie występują we wczesnej fazie nefropatii cukrzycowej [81]. Podobnie myszy transgeniczne z nadekspresją VEGF-A i indukowaną cukrzycą prezentowały nieselektywny białkomocz, zaawansowane guzkowe stwardnienie kłębuszków nerkowych i mniejszą ekspresję nefryny – białka budującego błonę szczelinową podocytów odpowiedzialną za selektywność filtru kłębuszkowego [82]. Przedstawione wyniki badań stały się podstawą dla wysunięcia hipotezy dotyczącej negatywnej roli VEGF w rozwoju nefropatii cukrzycowej. Należy jednak zaznaczyć, że część wyników uzyskanych z badań przeprowadzonych na zwierzętach, jak również danych klinicznych, nie potwierdzają negatywnej roli VEGF-A. Zahamowanie aktywności VEGF poprzez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko odpowiednim receptorom u chorych z cukrzycowym obrzękiem płamki żółtej w retinopatii cukrzycowej, z jednej strony przyniosło oczekiwane efekty w obrębie narządu wzroku, ale z drugiej strony doprowadziło do progresji upośledzenia funkcji nerek i konieczności włączenia leczenia nerkozastępczego [83]. Badania przeprowadzone na mysim modelu doświadczalnym dostarczyły przesłanek wskazujących, że zarówno selektywna dla podocytów nadekspresja, ale również i deplecja VEGF-A doprowadza do uszkodzenia kłębuszków nerkowych [84]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem transgenicznych mysich modeli zwierzęcych. Wykazano, że delecja wszystkich izoform VEGF-A z podocytów przyspieszała progresję nefropatii cukrzycowej. Myszy z cukrzycą pozbawione *Vegfa* w podocytach, w porównaniu z kontrolnymi myszami z cukrzycą lub myszami z delecją *Vegfa* bez cukrzycy, wykazywały znacznie większy białkomocz z towarzyszącym głębokim bliznowaceniem kłębuszków nerkowych oraz zwiększoną apoptozą komórek kłębuszków nerkowych. Na mysim modelu cukrzycy typu 1 zaobserwowano również, że zmniejszona synteza kłębuszkowego VEGF-A sprzyjała uszkodzeniu śródbłonna, przyspieszając postęp uszkodzenia kłębuszków nerkowych [36]. Ponadto na mysim modelu z doświadczalnie wywołaną cukrzycą wykazano, że znacznie obniżony poziom podocytarnego VEGF-A indukuje rozsiane stwardnienie kłębuszków nerkowych, zanik wyrostków stopowatych podocytów oraz pogrubienie błony podstawnej [85].

Utrzymanie prawidłowej funkcji kłębuszków nerkowych nie zależy tylko od ilości, ale także od rodzaju VEGF-A. Potwierdzają to wyniki badań wskazujące na potencjalną rolę izoform VEGF_{xxx}b w rozwoju nefropatii cukrzycowej. Wykazano bowiem, że ekspresja izoformy VEGF_{165b} była wyższa w nerkach chorych w początkowym okresie nefropatii cukrzycowej, ale u chorych z zaawansowaną nefropatią nie zaobserwowano takich zmian [86]. Stwierdzono również, że specyficzna dla podocytów nadekspresja VEGF_{165b} lub podanie rekombinowanego ludzkiego VEGF_{165b} prowadzi do zmniejszenia albuminurii u myszy z cukrzycą. W hodowlach komórkowych podocytów i komórek

śródbłónka izoforma VEGF_{165b}, za pośrednictwem VEGFR-2 zmniejszała apoptozę komórek indukowaną wysokim stężeniem glukozy [86]. Badania nad potencjalnym ochronnym działaniem izoformy VEGF_{165b} objęły swoim zakresem kwestię wpływu VEGF_{165b} na tworzenie glikokaliksu śródbłónka. U myszy z cukrzycą stwierdzono zmniejszenie warstwy glikokaliksu komórek śródbłónka, natomiast nadekspresja VEGF_{165b} oraz terapia rekombinowanym ludzkim VEGF_{165b} prowadziła do zwiększonej fosforylacji VEGFR-2 w kłębuszkach nerkowych oraz zachowania prawidłowej grubości warstwy glikokaliksu [86].

Złożony mechanizm działania VEGF-A w cukrzycy związany jest dodatkowo ze zmianą ekspresji jego receptorów. Badania na mysim modelu nefropatii cukrzycowej wykazały, że w cukrzycy dochodzi do wzrostu ekspresji fosforylowanego VEGFR-2 sugerując negatywną w skutkach aktywację szlaku sygnalizacyjnego VEGF-A/VEGFR-2. Zastosowanie inhibitora dla VEGFR-2 spowodowało poprawę czynności nerek oraz zmniejszenie uszkodzenia kłębuszków nerkowych [87]. Stwierdzono również złagodzenie uszkodzenia kłębuszków nerkowych w cukrzycy u zwierząt z nadekspresją VEGFR-1 w podocytach [88].

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, rola VEGF-A nie jest jednoznaczna i istnieje potrzeba dalszych badań w tym zakresie obejmujących ocenę pożądaných poziomów VEGF-A w cukrzycy wykorzystując do tego celu oceny: budowy morfologicznej kłębuszków nerkowych, sprawności bariery filtracyjnej oraz funkcjonalności tętnic nerkowych w warunkach zmodyfikowanej biodostępności VEGF-A w nerkach na różnych etapach rozwoju cukrzycy.

7.6. Suramina

Suramina to heksasulfonowana pochodna naftylomocznika. Została zsyntetyzowana (1916 r.) podczas badań nad farmaceutykiem przeznaczonym do leczenia śpiączki afrykańskiej powodowanej przez wiciowce – *Trypanosoma brucei* i wprowadzono ją jako lek przeciwpasożytniczy w 1921 roku [89]. Od tego czasu wachlarz zastosowań suraminy bardzo się poszerzył i oprócz chorób pasożytniczych stosowana jest jako lek w chorobach z zakresu onkologii, psychiatrii oraz stanach zapalnych układu sercowo-naczyniowego [90]. W osoczu suramina wiąże się z białkami w 99,7% i nie wykryto w nim jej metabolitów [91]. Związek ten akumuluje się w nerkach, a wydalanie suraminy z moczem odpowiada za eliminację większości leku z organizmu [91,92]. Należy zaznaczyć, że dane kliniczne wskazują na możliwość nefrotoksycznego działania suraminy, ale stosowanej w wysokiej dawce i przez dłuższy okres [93].

W modelach doświadczalnych suramina jest wykorzystywana jako nieselektywny antagonist receptorów purynergiczných P2 – P2X i P2Y [90], który wykazuje większe powinowactwo do receptorów P2X [94]. Suramina hamuje interakcję wielu cytokin lub czynników wzrostu z ich receptorami [95]. Wyniki badań przeprowadzonych u myszy z cukrzycą dostarczyły wyników wskazujących na hamujące działanie suraminy w stosunku do inflamasomu NLRP3 oraz jej ochronnego działania [96]. Zatem jest prawdopodobne, że inflamasom NLRP3 może być aktywowany w nerce w cukrzycy oraz to, że zmniejszenie jego aktywności przez suraminę działa ochronnie na struktury nerek we wczesnym okresie cukrzycy. W związku z tym suraminę można rozważać jako

potencjalny lek mogący znaleźć zastosowanie w leczeniu nefropatii cukrzycowej [97]. Ponadto ostatnio stwierdzono, że suramina wywiera efekt ochronny na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych uszkodzonych endo- i egzogennymi histonami. Mianowicie, w hodowanych komórkach śródbłonka suramina znacząco zmniejszała indukowane histonami wytwarzanie trombiny, a w izolowanych mysich naczyniach krwionośnych suramina znosiła nieprawidłowe sygnały wapniowe komórek śródbłonka i korzystnie wpływała na zależne od śródbłonka rozszerzenie naczyń. Dodatkowo znacząco zmniejszała ekspresję ICAM-1 w komórkach śródbłonka płuc i rekrutację neutrofili spowodowaną egzogennymi histonami [98].

Mechanizm działania suraminy w nefropatii cukrzycowej nie jest poznany. Wykazano, że jako antagonist receptorów P2 może ona pośrednio wpływać na zwiększoną ekspresję MMP, powodując zmniejszenie wskazanej aktywności w kłębuszku nerkowym i przyczyniać się do zmiany biodostępności VEGF-A [44,45]. Suramina wpływa na działanie czynników wzrostu, w tym VEGF-A, poprzez konkurencyjne wiązanie się z jego receptorami [99]. Ponadto związek ten wykazuje silne działanie hamujące angiogenezę poprzez hamowanie VEGF, łącząc się z tym czynnikiem wzrostu przez jego domenę wiążącą heparynę [99]. Dodatkowo suramina uwalnia niektóre izoformy VEGF (VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ oraz VEGF₁₆₅) z macierzy pozakomórkowej i w ten sposób może modyfikować lokalne stężenie izoform VEGF [100]. Te właściwości powodują, że suramina może być traktowana jako narzędzie służące do modyfikacji stężenia VEGF w różnorodnych modelach doświadczalnych, w tym cukrzycy.

Liczne prace doświadczalne pokazują, że podanie suraminy w przewlekłej chorobie nerek prowadzi do zmniejszenia stanu zapalnego, zwłóknienia oraz poprawy funkcji nerek, skutkującej zmniejszeniem białkomoczu w cukrzycy [101–103]. Wykazano również, że suramina hamuje aktywację i proliferację śródmiąższowych fibroblastów nerkowych oraz łagodzi rozwój śródmiąższowego włóknienia nerek [101,104]. Wykorzystując model nefrektomii 5/6 masy nerki wykazano, że cotygodniowe podawanie suraminy korzystnie wpływało na stwardnienie kłębuszków nerkowych, a także istniejący stan zapalny. Dodatkowo zaobserwowano, że suramina hamuje infiltrację makrofagów oraz ekspresję chemokin, a także doprowadza do inaktywacji czynników transkrypcyjnych. Sugeruje to, że suramina może osłabiać uszkodzenie kłębuszków nerkowych i naczyń krwionośnych oraz zmniejszać reakcje zapalne poprzez osłabienie profibrotycznych szlaków sygnałowych, w których pośredniczą receptory dla czynników wzrostu.

Zastosowanie suraminy jako multipotencjalnego czynnika, który może również wpływać na metabolizm VEGF-A, wydaje się uzasadnionym podejściem eksperymentalnym, mającym zastosowanie w kwestiach związanych ze znaczeniem VEGF-A w utrzymaniu prawidłowej funkcji śródbłonka zarówno w fizjologii oraz przebiegu nefropatii cukrzycowej.

8. Cel pracy

Cel główny

Celem pracy było zbadanie czy działanie suraminy na nerki w cukrzycy może mieć charakter nefroprotekcyjny i jaki jest mechanizm tego działania.

Cele szczegółowe

Postawiono cele szczegółowe, które obejmowały zbadanie wpływu suraminy w doświadczalnie wywołanej krótko- i długoterminowej cukrzycy na:

- ◆ ekspresję VEGF-A oraz receptorów dla VEGF-A w nerkach, oraz stężenie VEGF-A we krwi i moczu,
- ◆ funkcję wydalniczą nerek,
- ◆ stymulowany acetylocholiną rozkurcz tętnic wewnątrznerkowych.

9. Materiały i metody

9.1. Charakterystyka grup badanych i materiału biologicznego

9.1.1. Badana grupa

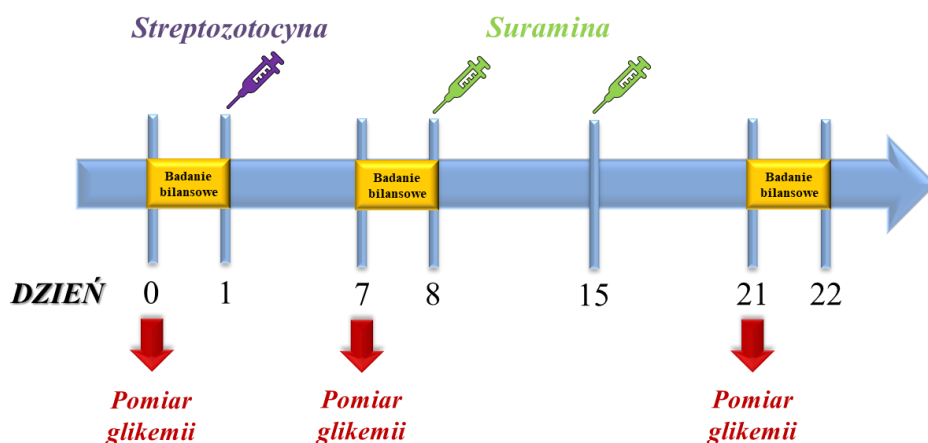
Grupę badaną stanowiło 56 szczurów stada Wistar, samców, pochodzących z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętni Doświadczalnej – Centrum Badawczo-Usługowego w Gdańsku. Zwierzęta w chwili rozpoczęcia badań były w wieku 8-10 tygodni i o masie ciała wynoszącej około 250 g. W trakcie doświadczeń szczury przebywały w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze powietrza i stałym cyklu świetlnym: 12 godzin jasno / 12 godzin ciemno, żywione były standardową paszą bytową *Labofeed B* (Wytwórnia Pasz „Morawski”, Żurawia) i miały zapewniony ciągły dostęp do wody wodociągowej.

Szczury zostały losowo przydzielone do dwóch grup doświadczalnych: grupy krótkoterminowej ($n = 28$) oraz grupy długoterminowej ($n = 28$). Czas trwania doświadczeń zwierząt przydzielonych do grupy krótkoterminowej wynosił 3 tygodnie a długoterminowej 12 tygodni.

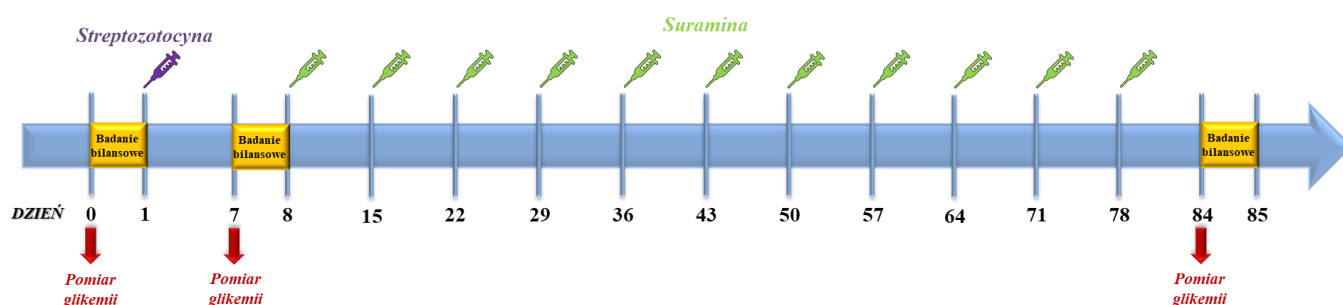
W obu grupach doświadczalnych wyodrębniono cztery podgrupy:

- I. szczury zdrowe, ($n = 7$),
- II. szczury zdrowe, którym podawano suraminę, ($n = 7$),
- III. szczury z cukrzycą indukowaną streptozotocyną, ($n = 7$),
- IV. szczury z cukrzycą indukowaną streptozotocyną, którym podawano suraminę, ($n = 7$).

Streptozotocynę (60 mg/kg m. c.) rozpuszczoną w 500 μ l buforu cytrynianowego i suraminę (10 mg/kg m. c.) w 500 μ l 0,9% NaCl wstrzykiwano zwierzętom dootrzewnowo. W siódmym dniu po podaniu streptozotocyny dokonywano kwalifikacji zwierząt do dalszych badań; doświadczenia kontynuowano na szczurach, u których stężenie glukozy we krwi pobranej z żyły ogonowej było większe niż 11 mM. Skuteczność indukcji hiperglikemii wynosiła 87,5%. Szczegółowe protokoły doświadczeń przedstawione zostały na rycinie 4 (grupa krótkoterminowa) oraz na rycinie 5 (grupa długoterminowa).



Rycina 4. Schemat przedstawiający protokół doświadczeń in vivo w grupie krótkoterminowej; każde 24-godzinne badanie bilansowe odbywało się w klatce metabolicznej; strzykawka oznacza iniekcję dootrzewnową.



Rycina 5. Schemat przedstawiający protokół doświadczeń in vivo w grupie długoterminowej; każde 24-godzinne badanie bilansowe odbywało się w klatce metabolicznej; strzykawka oznacza iniekcję dootrzewnową.

9.1.2. Materiał biologiczny

- Mocz z dobowej zbiórki; mocz zbierano do pojemników zawierających następujące związki o przybliżonym stężeniu końcowym: leupeptyna (10^{-6} M), azydek sodu (3×10^{-3} M) oraz fluorek fenylo-metylosulfonowy (5×10^{-4} M). Objętość zebranego moczu oceniano grawimetrycznie. Zebrany mocz wirowano (15 minut, $2500 \times g$, temperatura pokojowa), supernatant przenoszono do probówek typu Eppendorf (500 μ l), umieszczano w temperaturze -80°C i przechowywano do chwili wykonania oznaczeń parametrów biochemicznych.
- Krew żylna, pobranie przyżyciowe; w 2. godzinie fazy jasnej cyklu świetlnego szczurom, w warunkach krótkotrwałego, wziewnego znieczulenia ogólnego (2,5% izofluran, przepływ 0,5 l/min), dezynfekowano skórę ogona i pobierano ok. 50 μ l krwi z żyły ogonowej przy użyciu kaniuli dożylniej 24 G w celu oznaczenia stężenia glukozy. Miejsce pobrania krwi zabezpieczono aseptycznym opatrunkiem.
- Krew żylna-tętnicza, pobranie pośmiertne; w 2. godzinie fazy jasnej cyklu świetlnego szczurom, w warunkach krótkotrwałego, wziewnego znieczulenia ogólnego (2,5% izofluran, przepływ 0,5 l/min) i po dootrzewnowym podaniu letalnej dawki pentobarbitalu (120 mg/kg m. c.) otwierano klatkę piersiową i nakłuwano serce, aspirując

krw do strzykawki. Po wykrzepieniu krwi izolowano surowicę, którą zamrażano i przechowywano w temperaturze -80 °C.

- Nerki; po pobraniu krwi z nakłucia serca wykonano obustronną nefrektomię. Fragmenty nerek umieszczono w odpowiednich środowiskach w zależności od dalszych planowanych badań: immunofluorescencyjnych (roztwór formaliny, buforowany obojętnie, 10%; Sigma; HT501128), molekularnych (TRIzol Reagent; GIBCO BRL, Life Technologies; 15596-018) oraz izolacji naczyń tętniczych (w mM: 146 NaCl, 4,5 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 1,0 MgSO₄, 5,5 glukozy, 0,025 EDTA-Na, 5 HEPES, 0,1 CaCl₂) i kłębuszków nerkowych (w mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 8,1 Na₂HPO₄, 1,47 KH₂PO₄, 0,9 CaCl₂, 0,49 MgCl, 5,56 glukoza).

9.2. Metody *in vitro*

9.2.1. Oznaczenie stężenia VEGF-A

Do pomiaru stężenia VEGF-A w surowicy i moczu pochodzącym z dobowej zbiórki zastosowano dedykowany test immunoenzymatyczny firmy Thermo Scientific, USA, ERVEGFA.

9.2.2. Oznaczenie stężenia albumin

Do pomiaru stężenia albumin w moczu zastosowano dedykowany test immunoenzymatyczny firmy AssayPro, USA, ERA3201-1.

9.2.3. Oznaczenie stężenia białka całkowitego

Oznaczenie stężenia białka całkowitego w moczu oraz lizatach kłębuszków nerkowych zostało wykonane za pomocą metody Lowr'ego.

9.2.4. Oznaczenie aktywności metaloproteinaz

Do pomiaru całkowitej aktywności metaloproteinaz (MMP) oraz metaloproteinazy – 9 (MMP-9) w moczu zastosowano testy fluorometryczne firmy AnaSpec, USA, MMP – AS-71158, MMP-9 – AS-71155.

9.2.5. Oznaczenie stężenia kompleksu trombina-antytrombina

Oznaczenie stężenia kompleksu trombina-antytrombina (TAT) w surowicy zostało wykonane za pomocą dedykowanego testu immunoenzymatycznego firmy Novus Biologicals, USA, NBP2-68132.

9.2.6. Oznaczenie stężenia kreatyniny

Do pomiaru stężenia kreatyniny w surowicy i moczu wykorzystano metodę enzymatyczną (z użyciem: kreatyninazy, kreatynazy, oksydazy sarkozynowej oraz peroksydazy), z zastosowaniem zestawu produkcji firmy Wiener lab., Argentyna, 1260362.

9.2.7. Oznaczenie stężenia mocznika

Stężenie mocznika w surowicy oznaczono za pomocą metody enzymatycznej (z użyciem: ureazy oraz nitroprusydku sodu), z zastosowaniem zestawu produkcji firmy BioSystems, Hiszpania, 11536.

9.2.8. Oznaczenie stężenia cząsteczek adhezyjnych

Oznaczenie stężenia rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych (sVCAM-1 oraz sICAM-1) w surowicy przeprowadzono przy użyciu testów immunoenzymatycznych firmy MyBioSource, USA, sVCAM-1 – MBS762680, sICAM-1 – MBS266128.

9.2.9. Analiza Western Blot

Kłębuszki nerkowe izolowano techniką przesiewową, homogenizowano przez 30 min w buforze lizującym (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA-Na, 10% glicerol, 0,5% Triton X-100 i koktajl inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, Merck, P8340)). Lizat poddawano denaturacji (98 °C, 5 min), a następnie rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), po czym rozdzielone białka przenoszono na aktywowaną błonę PVDF – Immobilon-P (2 godziny, prąd zmienny o natężeniu 200 mA). Następnie błonę inkubowano przez noc w temperaturze 4 °C z przeciwciałami pierwszorzędowymi (królicze anty-VEGF-A, 1:500; Merck KGaA, #AB1876-I; królicze anty- β -aktyna, 1:1000, Sigma-Aldrich, A2066), a po jej przepłukaniu, z antykróliczymi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (BD Pharmingen, 554021). Wizualizacji kompleksu immunologicznego dokonywano stosując zestaw Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, 34577. Analizę ilościową wielkości sygnału chemiluminescencyjnego i archiwizacji materiału badawczego dokonywano przy zastosowaniu GelDoc-It Imaging System (UVP).

9.2.10. Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym

RNA izolowano z kory nerkowej stosując zmodyfikowaną procedurę Chomczyńskiego [105]. Stężenie wyizolowanego RNA oznaczano metodą fluorymetryczną. Do pomiaru poziomu ekspresji genów *Vegfr1*, *Vegfr2* oraz β -aktyny stosowano zestaw *Path-ID™ Multiplex One-Step RT-PCR* i termocykler Light Cycler® 480 II firmy Roche. Sekwencje starterów i sond dla *Vegfr1*, *Vegfr2* oraz β -aktyny przedstawiono w dołączonej publikacji. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w temperaturze 48 °C przez 10 min, a następnie w 95 °C przez 10 min. Następnie przeprowadzono 45 cykli amplifikacji w 95 °C przez 10 s, a potem w 60 °C przez 40 s. Poziomy transkryptów genów docelowych znormalizowano do poziomu referencyjnego genu β -aktyny (*Actb*).

9.2.11. Analiza immunofluorescencji

Utrwalone w buforowanej formalinie fragmenty nerek płukano w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS), a następnie pozostawiono w 25% sacharozie na 24 godziny w temperaturze 4°C. Zatopione fragmenty tkanek zamrażano w ciekłym azocie i skrawano przy użyciu kriostatu, a w dalszej kolejności po serii płukań inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej z przeciwciałami króliczymi anty-VEGF-A (Merck, 1:100, AB1876-I). Po kolejnych płukaniach skrawki inkubowano przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z Cy3 (1:500). Analizę immunofluorescencji przeprowadzono na skrawkach nerek od pięciu szczurów z każdej grupy, a każde barwienie powtórzono trzykrotnie. Analizy dokonywano za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 710 przy użyciu obiektywu $\times 40$ i oprogramowania Zeiss ZEN.

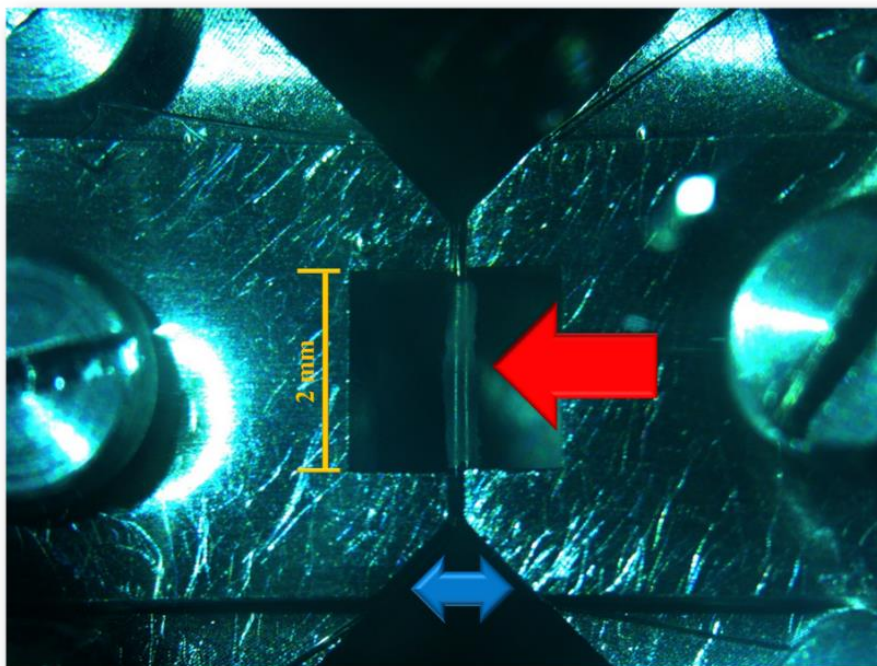
9.3. Metody *ex vivo*

9.3.1. Izolacja tętnic międzypłatowych nerek

Z pobranych nerek umieszczonych w buforze o pH 7,4 i składzie (w mM): 146 NaCl, 4,5 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 1,0 MgSO₄, 5,5 glukoza, 0,025 EDTA-Na, 5 HEPES, 0,1 CaCl₂, izolowano pod mikroskopem tętnice międzypłatowe nerek, które oczyszczano i fragmentowano na odcinki o długości około 2 mm.

9.3.2. Pomiary rozkurczu tętnic międzypłatowych nerek

Wyizolowane fragmenty tętnic międzypłatowych nerek mocowano w wielokomorowym miografie, na stalowych drutach zanurzonych w buforze o pH 7,4 oraz składzie (mM): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 5,5 glukoza, 25 NaHCO₃, 2,5 CaCl₂, 0,03 EDTA-Na i temperaturze 37 °C, który wcześniej został napowietrzony mieszaniną gazów o składzie 95% O₂ i 5% CO₂ (rycina 6). Po przeprowadzonej procedurze normalizacji weryfikowano reaktywność tętnic, stosując bufor o wysokim stężeniu jonów potasu – 123,7 mM KCl. Indukowany acetylocholiną (10⁻⁹–10⁻⁵ M) rozkurcz tętnic zależny od śródbłonna badano na tętnicach stabilnie obkurczonych fenylefryną do 50–70% wartości obkurczenia uzyskanego pod wpływem buforu o wysokim stężeniu jonów potasu. Otrzymane dane podlegały digitalizacji przy użyciu systemu LabChart 8.



Rycina 6. Tętnica międzypłatowa nerek szczurów Wistar podczas miografii drutowej; powiększenie 20×; czerwona strzałka – tętnica na drucie, niebieska strzałka – kierunek rozsuwania szczęk w celu zwiększenia napięcia ściany tętnicy; zdjęcie autorskie, Zakład Chemii Klinicznej GUMed.

9.4. Analiza eGFR

GFR szacowano (eGFR, $\mu\text{l}/\text{min}$) na podstawie poniżej przedstawionej zależności dla stężeń kreatyniny $<52 \mu\text{mol}/\text{l}$ w surowicy wykorzystując wzór [106]:

$$\text{eGFR} = 880 \times W^{0,695} \times C^{-0,660} \times U^{-0,391}$$

gdzie, W – masa ciała (g), C – stężenie kreatyniny ($\mu\text{mol}/\text{l}$), a U – stężenie mocznika (mmol/l).

9.5. Analiza zmiennych żywieniowych

Parametry żywieniowe zostały obliczone przy użyciu następujących wzorów [107]:

$$\text{współczynnik efektywności żywienia} = \left(\frac{\text{przyrost masy ciała}}{\text{masa spożytego pokarmu}} \right) \times 100$$

$$\text{efektywność wykorzystania pokarmu} = \frac{\text{przyrost masy ciała}}{\text{dobowo spożyte kalorie}}$$

$$\text{specyficzny wskaźnik przyrostu masy ciała} = \frac{(\text{końcowa masa ciała} - \text{początkowa masa ciała})}{\text{początkowa masa ciała}}$$

9.6. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 13.3 oraz GraphPad Prism 5.0. Do badania normalności rozkładu zmiennych zastosowano test Shapiro-Wilka; wartości zmiennych wyrażono jako średnia \pm SE (błąd standardowy średniej) lub medianę oraz 25. i 75. percentyl. Istotność statystyczną różnic między grupami określono za pomocą niesparowanego testu t-Studenta lub testu U Manna-Whitneya. Do porównania wartości dwóch powiązanych prób użyto sparowanego testu t-Studenta lub testu Wilcoxon. Istotność statystyczną między grupami określono za pomocą jedno- lub dwukierunkowej ANOVA, testu Kruskala-Wallisa i wielokrotnych porównań post hoc Tukey'a lub Dunna. Różnice uznano za istotne dla $p < 0,05$.

10. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Chyła G, Sałaga-Zaleska K, Dąbkowski K, Kuchta A, Jankowski M. **Suramin enhances the urinary excretion of VEGF-A in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats.** Pharmacol Rep. 2021 Jun;73(3):841-846. doi: 10.1007/s43440-021-00236-0. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33635529; PMCID: PMC8180480.
2. Chyła-Danił G, Sałaga-Zaleska K, Kreft E, Krzesińska A, Herman S, Kuchta A, Sakowicz-Burkiewicz M, Lenartowicz M, Jankowski M. **Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes.** Pharmaceuticals (Basel). 2023 Mar 22;16(3):470. doi: 10.3390/ph16030470. PMID: 36986570; PMCID: PMC10053825.

11. Wyniki

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie oryginalne prace opublikowane w międzynarodowych czasopismach indeksowanych na liście Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego o łącznym IF 8,519 oraz MEiN 240,000. Tematyka tych prac dotyczy badań nad efektami działania suraminy w krótkoterminowej cukrzycy indukowanej streptozotocyną. Ponadto na rozprawę składają się również wyniki, które zostaną zamieszczone w trzeciej oryginalnej pracy obecnie znajdującej się w trakcie procesu publikacyjnego i dotyczą efektów działania suraminy w długoterminowej cukrzycy indukowanej streptozotocyną.

11.1. Wyniki badań w cukrzycy długoterminowej

Zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 9. w badaniach dotyczących cukrzycy długoterminowej trwającej 12 tygodni (85 dni), szczury zostały losowo przydzielone do 4 grup badanych po 7 osobników. Indukcję cukrzycy przeprowadzono 1. dnia doświadczenia poprzez dootrzewnową iniekcję streptozotocyny (60 mg/kg). Część zwierząt otrzymywała od 8. dnia doświadczenia cotygodniowo (11 dawek) iniekcję dootrzewnową suraminy (10 mg/kg).

Suraminę, pochodną naftylomocznika, stosowano przez wiele lat w leczeniu trypanosomatozy i onchocerciasis, ale obecnie jest również wykorzystywana podczas leczenia nowotworów, autyzmu oraz chorób zapalnych układu sercowo-naczyniowego [90]. Ulega akumulacji głównie w nerkach i posiada długi okres półtrwania, przez co wymaga cotygodniowego podawania [92]. Jest również stosowana w badaniach jako antagonist receptorów błonowych o szerokim spektrum działania dla zewnątrzkomórkowych nukleotydów, ale także jako czynnik hamujący polimerazy DNA i RNA, odwrotne transkryptazy oraz terminalną transferazę deoksynukleotydylową. Dodatkowo suramina oddziałuje z czynnikami wzrostu, które wiążą się z heparyną, w tym z płytkowym czynnikiem wzrostu, naskórkowym czynnikiem wzrostu, czynnikiem wzrostu fibroblastów, insulinopodobnym czynnikiem wzrostu i transformującym czynnikiem wzrostu β , co z kolei blokuje ich interakcję ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórki. Warto zauważyć, że VEGF-A jest czynnikiem wzrostu wiążącym heparynę, co pozwala mu na interakcję z suraminą [108].

Doświadczenia in vivo

W tabeli 1. przedstawiono dane dotyczące masy ciała, spożycia płynów, wydalania moczu, stężenia glukozy we krwi a w tabeli 2. parametry żywieniowe. Szczury niecukrzycowe cechowały się 1,5-krotnym przyrostem masy ciała w ciągu okresu doświadczenia. U szczurów cukrzycowych nie stwierdzono przyrostu masy ciała pomimo 2-krotnie większego spożycia pokarmu. Znajduje to potwierdzenie w niskich wartościach parametrów żywieniowych – wskaźnika przyrostu masy ciała, FER i EFU_{BW}. Suramina nie wpływała na analizowane parametry zarówno u szczurów cukrzycowych jak i u szczurów nieobciążonych cukrzycą.

Tabela 1. Wpływ suraminy (10 mg/kg m. c., i.p., co 7 dni) na masę ciała, stężenie glukozy oraz bilans wody u szczurów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą długoterminową.

Parametry	Dzień	Grupa eksperymentalna			
		KON	SUR	STZ	STZ+SUR
Masa ciała (g)	1	266 ± 10	277 ± 10	301 ± 12	282 ± 15
	8	290 ± 9*	302 ± 10*	279 ± 11	278 ± 9
	85	416 ± 6*#	420 ± 12*#	268 ± 14* ^Δ	297 ± 25
Diureza (ml/24h)	1	5,8 <4,3; 9,2>	7,5 <6,6; 8,4>	5,1 <4,7; 6,5>	6,9 <6,1; 8,3>
	8	8,4 ± 1,5*	7,1 ± 0,6	93,5 ± 11,2* ^Δ	90,6 ± 12,2*
	85	9,3 ± 0,6	8,5 ± 0,6 [#]	119,5 ± 10,2* ^Δ	130,8 ± 11,6*#
Spożycie wody (ml)	1	21,0 <20,6; 25,4>	21,3 <19,0; 24,7>	21,2 <16,1; 25,9>	26,1 <22,8; 26,7>
	8	26,5 ± 1,8*	22,8 ± 3,9	101,9 ± 9,9* ^Δ	107,0 ± 11,5*
	85	21,0 ± 1,3 [#]	20,4 ± 3,5	128,2 ± 10,9* ^Δ	142,0 ± 11,4*#
Stężenie glukozy we krwi (mg/dl)	1	123 ± 3	125 ± 7	116 ± 5	123 ± 5
	8	116 ± 1*	125 ± 2	486 ± 33* ^Δ	484 ± 24*
	85	115 <106; 122>	126 <109; 134>	600 <525; 600>* ^Δ	586 <551; 600>*#

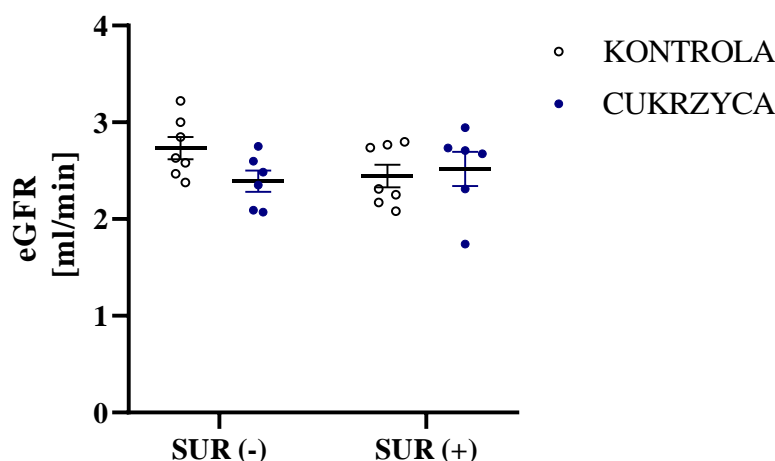
KON – grupa niecukrzycowa, SUR – grupa niecukrzycowa otrzymująca suraminę, STZ – grupa cukrzycowa, STZ + SUR – grupa cukrzycowa otrzymująca suraminę. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy średniej lub wartość mediany i 25-75 percentyl, N = 7 w każdej grupie. Istotność statystyczna: *p < 0,05 vs. dzień 1 w tej samej grupie (sparowany test t/Wilcoxon), #p < 0,05 vs. dzień 8 w tej samej grupie (sparowany test t/Wilcoxon), ^Δp < 0,05 vs. KON w tym samym dniu eksperymentu (niesparowany test t/test U Manna Whitney).

Tabela 2. Wpływ suraminy (10 mg/kg m. c., i.p., co 7 dni) na parametry żywieniowe u szczurów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą długoterminową.

Parametr	Dzień	Grupa eksperymentalna			
		KON	SUR	STZ	STZ+SUR
Spożycie pokarmu (g)	1	18,5 <17,0; 21,0>	20,3 <17,9; 22,5>	19,3 <18,4; 29,8>	26,3 <24,8; 28,1>
	85	16,2 ± 1,1	18,1 ± 2,0	31,9 ± 1,7* ^Δ	34,5 ± 1,4*
Specyficzny wskaźnik przyrostu masy ciała (g/kg)	85	443,0 ± 42,6	396,1 ± 54,2	-40,4 ± 25,7 ^{&}	80,6 ± 111,1
Współczynnik efektywności żywienia (FER)	85	52,61 ± 5,03	45,55 ± 5,71	-3,15 ± 1,95 ^{&}	4,42 ± 6,86
Efektywność wykorzystania pokarmu w stosunku do masy ciała (EFU _{BW}) (g/cal)	85	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,02	-0,01 ± 0,01 ^{&}	0,02 ± 0,02

KON – grupa niecukrzycowa, SUR – grupa niecukrzycowa otrzymująca suraminę, STZ – grupa cukrzycowa, STZ + SUR – grupa cukrzycowa otrzymująca suraminę. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy średniej lub wartość mediany i 25-75 percentyl, N = 7 w każdej grupie. Istotność statystyczna: *p < 0,05 vs. dzień 1 w tej samej grupie (sparowany test t/Wilcoxon), ^Δp < 0,05 vs. KON (niesparowany test t), [&]p < 0,0001 vs. KON (niesparowany test t).

W celu zbadania potencjalnego wpływu suraminy w długotrwałej cukrzycy na wielkość filtracji kłębuszkowej, oszacowano wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR) na podstawie stężenia kreatyniny i mocznika w surowicy oraz masy ciała (rycina 7). Przeprowadzona analiza nie wykazała istotnych zmian eGFR pod wpływem cukrzycy ($2,46 \pm 0,10$ ml/min vs. $2,60 \pm 0,10$ ml/min, $p = 0,316$) oraz suraminy ($2,46 \pm 0,11$ ml/min vs. $2,60 \pm 0,10$ ml/min, $p = 0,545$).

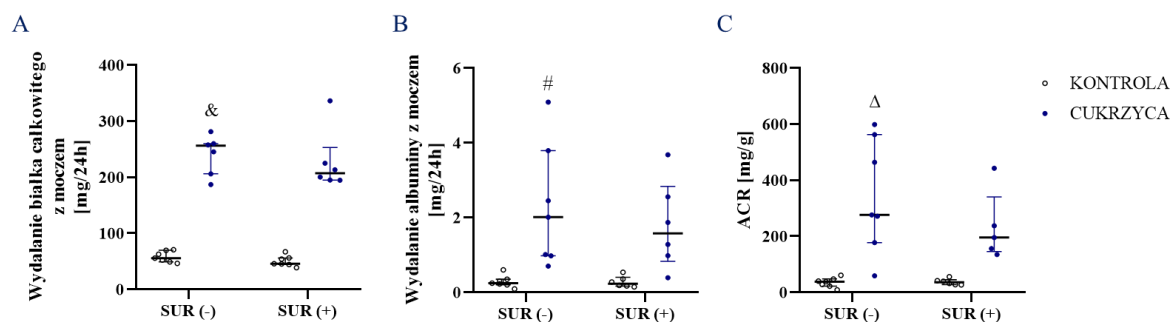


Rycina 7. Wpływ suraminy na szacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR) u szczurów bez cukrzycy i szczurów z cukrzycą.

Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR (+)) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i szczurom z cukrzycą (CUKRZYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Wyniki z 85. dnia przedstawiono jako pojedyncze punkty danych z wartościami średnimi \pm błęd standardowy średniej.

Otrzymane wyniki dotyczące eGFR znajdują potwierdzenie w danych z piśmiennictwa, np. stwierdzono, że szczury z cukrzycą typu 2 trwającą 12-tygodni charakteryzowały się tylko nieznacznie niższym wskaźnikiem GFR [109]. Fakt niestwierdzenia zmian eGFR wskazuje, że suramina w zastosowanej dawce, okresie i częstotliwości podawania nie wykazuje działania nefrotoksycznego w zakresie hemodynamiki związanej z procesem filtracji kłębuszkowej.

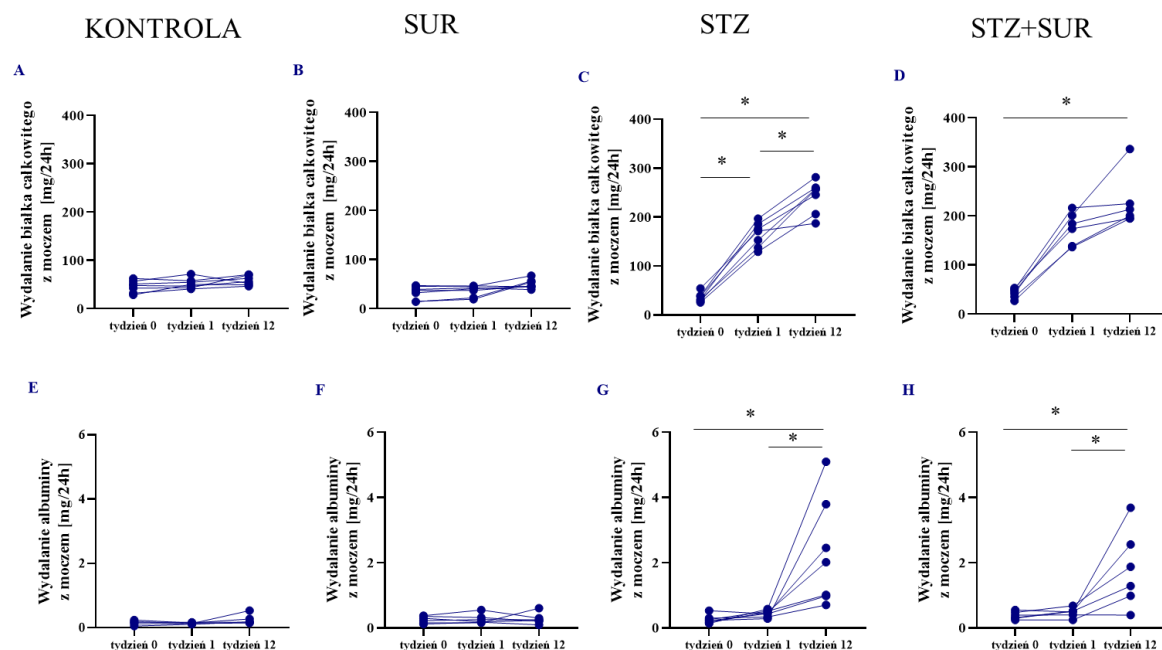
Kontynuując badania dotyczące funkcji i potencjalnego uszkodzenia nerek określono wielkość wydalania z moczem białka całkowitego (rycina 8 A) i albuminy (rycina 8 B), a także obliczono stosunek albuminy do kreatyniny (ACR) (rycina 8 C). Nie stwierdzono istotnej różnicy w wydalaniu białka całkowitego (rycina 8 A) i albuminy z moczem (rycina 8 B) oraz stosunku albuminy do kreatyniny (rycina 8 C) pomiędzy zwierzętami otrzymującymi i nieotrzymującymi suraminę zarówno w grupie niecukrzycowej jak i cukrzycowej. Długotrwała cukrzyca charakteryzowała się około 5-krotnym wzrostem wydalania białka całkowitego ($256 <206 - 260>$ mg/24 h vs. $56 <49 - 70>$ mg/24 h, $p = 0,0164$), 8-krotnym wzrostem wydalania albuminy ($2,01 <0,97 - 3,83>$ mg/24 h vs. $0,25 <0,20 - 0,35>$ mg/24 h, $p = 0,0088$) i 7-krotnym wzrostem stosunku albuminy do kreatyniny ($276 <179 - 563>$ mg/g vs. $38 <23 - 48>$ mg/g, $p = 0,0038$).



Rycina 8. Wpływ suraminy na wydalenie z moczem białka całkowitego (A), albuminy (B) oraz stosunek albuminy do kreatyniny w moczu, ACR (C) u szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą.

Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i szczurom z cukrzycą (CUKRZYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Wyniki z 85. dnia przedstawiono jako pojedyncze punkty danych z wartością mediany i 25.-75. percentylem. Istotność statystyczna: $^{\&p} = 0,0164$ vs. kontrola SUR (-), $^{\#p} = 0,0088$ vs. kontrola SUR (-), $^{\Delta p} = 0,0038$ vs. kontrola SUR (-) (testy wielokrotnych porównań Dunna).

Dane ze szczegółowej analizy wydalenia białka całkowitego i albuminy w trzech punktach czasowych doświadczenia przedstawiono na rycinie 9. Nie stwierdzono istotnych zmian w wydalaniu albuminy i białka całkowitego z moczem u szczurów bez cukrzycy, zarówno w grupie nieotrzymującej (ryciny 9 A, 9 E), jak i otrzymującej suraminę (ryciny 9 B, 9 F). W pierwszym tygodniu doświadczenia (dzień 8.) u szczurów z cukrzycą doszło do znacznego zwiększenia wydalenia z moczem białka całkowitego (ryciny 9 C, 9 D), takiego efektu nie zaobserwowano w wydalaniu albuminy (ryciny 9 G, 9 H). Kolejne 11 tygodni cukrzycy (tydzień 12. – dzień 85.) spowodowało dalsze znaczące zwiększenie wydalenia białka całkowitego z moczem tylko w grupie nieotrzymującej suraminy (ryciny 9 C, 9 D). Wydalanie albuminy z moczem było znacznie wyższe po 12 tygodniach cukrzycy zarówno u szczurów otrzymujących jak i nieotrzymujących suraminę (ryciny 9 G, 9 H).

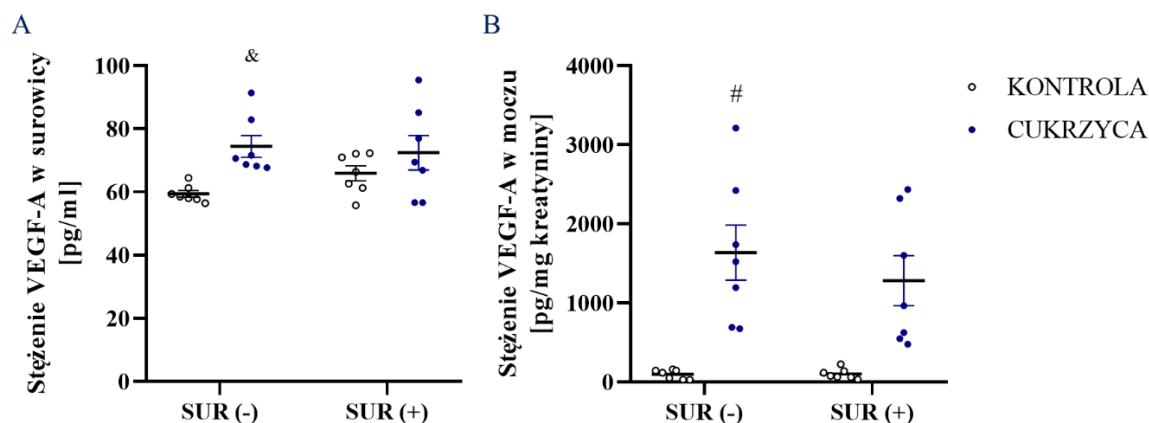


Rycina 9. Wpływ suraminy na wydalenie białka całkowitego z moczem u szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą. Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną podawano szczurom bez cukrzycy i z cukrzycą.

co tydzień przez 11 tygodni. A, E – szczury niecukrzycowe (KONTROLA); B, F – szczury niecukrzycowe otrzymujące suraminę (SUR); C, G – szczury cukrzycowe (STZ); D, H – szczury cukrzycowe otrzymujące suraminę (STZ+SUR). Wyniki przedstawiono jako pojedyncze punkty danych uzyskane w tygodniach 0 (dzień 1), 1 (dzień 8) i 12 (dzień 85). Istotność: * $p < 0,05$ vs. wskazany tydzień (test post hoc Tukeya).

Postęp nefropatii cukrzycowej jest skorelowany z ilością białka wydalanego z moczem. Zaobserwowano, że cukrzyca wiąże się ze zwiększonym wydalaniem białka całkowitego i albuminy z moczem. Zwiększone wydalanie albuminy sugeruje uszkodzenie kłębuszków nerkowych z powodu zwiększonej przepuszczalności filtra kłębuszkowego, co z kolei jest najprawdopodobniej spowodowane utratą podocytów. Jednak całkowite białka moczu, których główną frakcję stanowią białka o masie cząsteczkowej 18–19 kDa zwane głównymi białkami moczu (MUP), są syntetyzowane w wątrobie, wiążą feromony we krwi, a około 60% z nich przechodzi przez filtr kłębuszkowy i jest ponownie wchłaniane w kanalik proksymalnym. Podawanie suraminy szczurom z cukrzycą przez 11 tygodni spowodowało zmniejszenie wydalania MUP, ale nie albuminy. Wyniki te sugerują, że suramina może wpływać na nerkowy obrót białkami na poziomie kanalików, ale wydaje się, że nie na poziomie kłębuszków nerkowych. Odpowiedź na pytanie o mechanizm działania suraminy i zmiany w ilości MUP wymaga dalszych badań. Można jednak przypuszczać, że zmniejszenie ilości białka wydalanego z moczem może chronić nerki i spowolnić rozwój nefropatii cukrzycowej. Nasze obecne wyniki dotyczące suraminy znajdują potwierdzenie z obserwacjami, w których wykazano, że suramina podawana dootrzewnowo w dawce 10 mg/kg raz w tygodniu przez dwa tygodnie zapobiega białkomoczowi, zmniejsza poziom zwłóknienia nerek i uszkodzenia kłębuszków nerkowych w krótkotrwałym modelu przewlekłej choroby nerek [110].

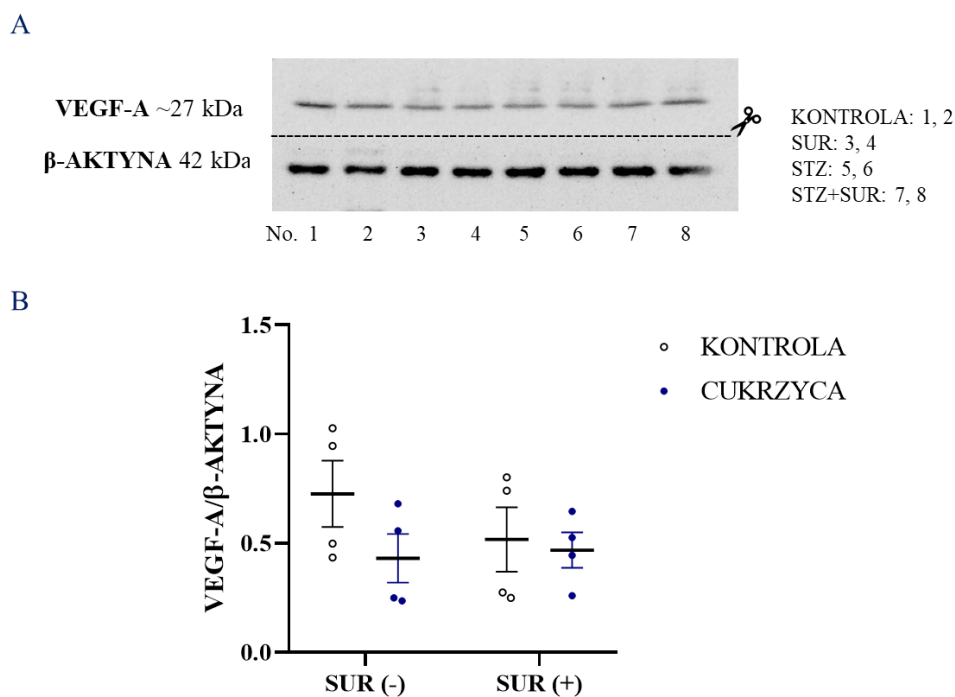
W kolejnym etapie zmierzono stężenie VEGF-A w surowicy i wydalanie VEGF-A z moczem (rycina 10), ekspresję białka VEGF-A w izolowanych kłębuszkach nerkowych (rycina 11) oraz ekspresję mRNA receptorów dla VEGF-A (*Vegfr1* i *Vegfr2*) w korze nerek (rycina 12). Stwierdzono, że stężenie VEGF-A w surowicy szczurów cukrzycowych było o 15% wyższe w porównaniu ze szczurami niecukrzycowymi ($73,44 \pm 3,11$ pg/ml vs. $62,67 \pm 1,54$ pg/ml, $p = 0,005$, rycina 10 A). Zgodnie z danymi przedstawionymi na rycinie 10 B, wydalanie VEGF-A z moczem u szczurów z cukrzycą było około 15-krotnie wyższe w porównaniu ze szczurami z grupy niecukrzycowej ($1459,0 \pm 232,0$ pg/mg kreatyniny vs. $100,3 \pm 15,8$ pg/mg kreatyniny, $p < 0,0001$). Nie stwierdzono, aby podawanie suraminy wpływało na poziom powyższych parametrów oraz na różnice między grupami szczurów niecukrzycowych a cukrzycowych (stężenie VEGF-A w surowicy $p = 0,234$, wydalanie VEGF-A z moczem $p = 0,453$).



Rycina 10. Wpływ suraminy na stężenie VEGF-A w surowicy (A) i wydalenie VEGF-A z moczem (B) u szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą.

Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i z cukrzycą (CUKRZYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Wyniki z 85. dnia przedstawiono jako pojedyncze punkty danych z wartościami średnimi \pm błąd standardowy średniej. Istotność statystyczna: $^{\&}p = 0,005$ szczury z cukrzycą vs. szczury bez cukrzycy, $^{\#}p < 0,0001$ szczury z cukrzycą vs. szczury bez cukrzycy (dwukierunkowa ANOVA).

Analizując ekspresję białka VEGF-A w izolowanych kłębuszkach nerkowych nie stwierdzono różnicy w poziomach VEGF-A pomiędzy kłębuszkami szczurów niecukrzycowych i cukrzycowych (VEGF-A/ β -aktyna: $0,62 \pm 0,11$ vs. $0,45 \pm 0,06$, $p = 0,199$). Ponadto nie zaobserwowano wpływu suraminy na poziom VEGF-A w izolowanych kłębuszkach nerkowych (VEGF-A/ β -aktyna: $0,58 \pm 0,10$ vs. $0,49 \pm 0,08$, $p = 0,509$) (rycina 11).

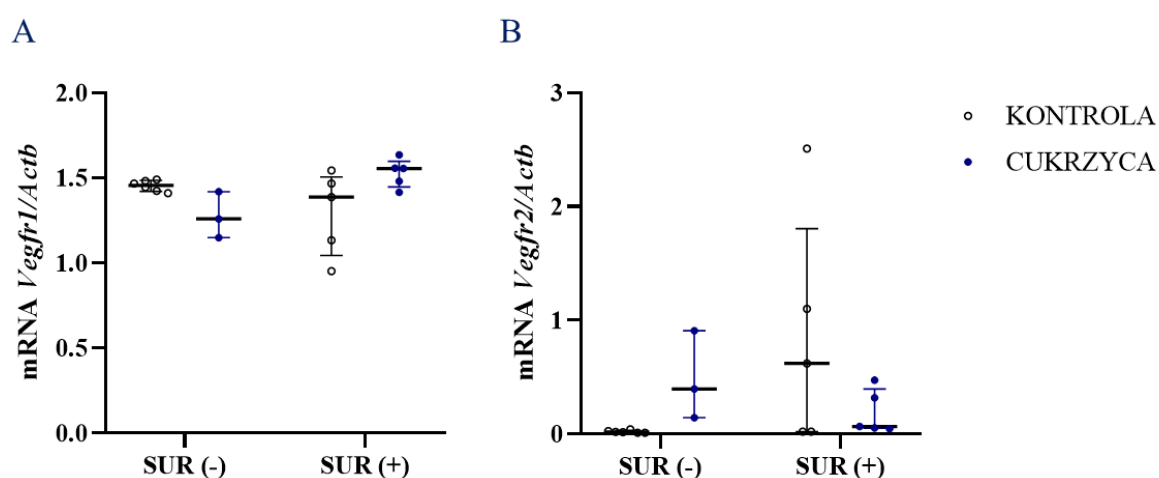


Rycina 11. Wpływ suraminy na ekspresję białka VEGF-A w kłębuszkach nerkowych izolowanych od szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą.

Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i z cukrzycą (CUKRZYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Przedstawiono wyniki z 85. dnia

doświadczenia. A. Reprezentatywny immunoblot białka VEGF-A w izolowanych kłębuszkach nerkowych; ścieżki – 1, 2: szczury niecukrzycowe nieotrzymujące suraminy (KONTROLA); ścieżki – 3, 4: szczury niecukrzycowe otrzymujące suraminę (SUR); ścieżki – 5, 6: szczury cukrzycowe nieotrzymujące suraminy (STZ); ścieżki – 7, 8: szczury cukrzycowe otrzymujące suraminę (STZ+SUR). B. Skany densytometryczne: względna gęstość optyczna wyrażona jako stosunek VEGF-A/ β -aktyna. Wyniki ekspresji VEGF-A/ β -aktyny przedstawiono jako pojedyncze punkty danych z wartościami średnimi \pm błęd standardowy średniej.

Ekspresja mRNA receptorów dla VEGF-A (*Vegfr1* i *Vegfr2*) w korze nerek została określona ilościowo za pomocą RT-PCR (rycina 12 A i 12 B). Nie stwierdzono wpływu cukrzycy na poziom mRNA dla receptorów *Vegfr1* ($1,26 < 1,15 - 1,42 >$ vs. $1,46 < 1,42 - 1,49 >$, $p = 0,7895$) oraz *Vegfr2* ($0,395 < 0,143 - 0,908 >$ vs. $0,017 < 0,011 - 0,031 >$, $p = 0,0637$). Ponadto nie stwierdzono również wpływu suraminy na poziom mRNA dla *Vegfr1* ($1,39 < 1,04 - 1,50 >$ vs. $1,46 < 1,42 - 1,49 >$, $p > 0,9999$) oraz *Vegfr2* ($0,622 < 0,022 - 1,806 >$ vs. $0,017 < 0,011 - 0,031 >$, $p = 0,0677$).



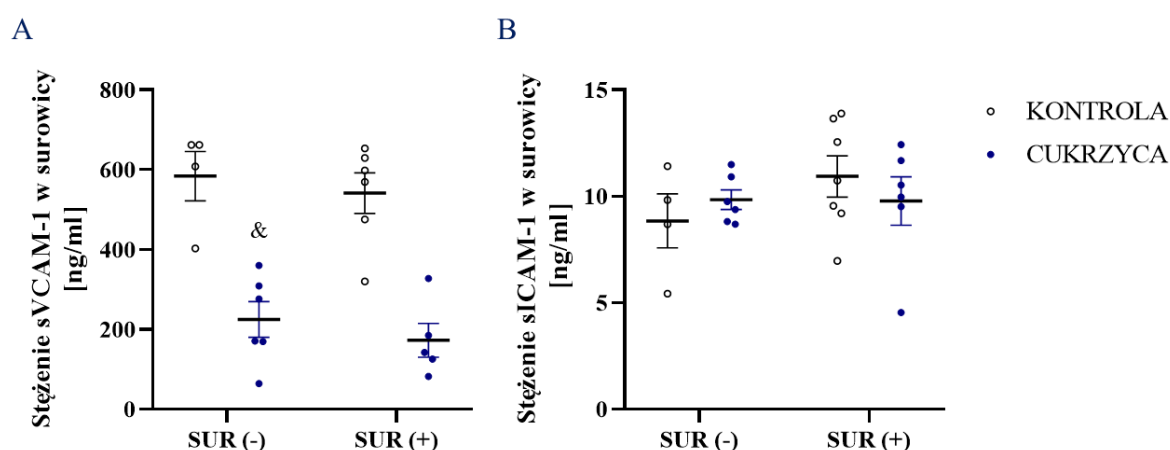
Rycina 12. Wpływ suraminy na ekspresję mRNA *Vegfr1* (A) i *Vegfr2* (B) w korze nerek szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą.

Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i z cukrzycą (CUKRZYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Wyniki z 85. dnia przedstawiono jako pojedyncze punkty danych z wartością mediany i 25.-75. percentylem. Ekspresję mRNA znormalizowano do referencyjnego transkryptu genu β -aktyny (*Actb*).

Postuluje się, że VEGF-A jest zaangażowany w patogenezę nefropatii cukrzycowej, jednak jego rzeczywista rola jest niejasna, wskazując na ich niekorzystny wpływ na przepuszczalność filtra kłębuszkowego dla albuminy i korzystny wpływ na inne [52]. Ze względu na niepełne zrozumienie późnych zdarzeń w patogenezie nefropatii cukrzycowej, zdecydowano się wykorzystać długoterminowy model cukrzycy indukowanej streptozotocyną do zbadania roli VEGF-A w późnych stadiach choroby. Przeprowadzone badania wykazały, że w długoterminowej cukrzycy dochodzi do wzrostu stężenia VEGF-A we krwi oraz zwiększonego wydalania VEGF-A z moczem. Podwyższone stężenie VEGF we krwi obserwowano wcześniej w długotrwałej cukrzycy [111]. Ponadto przegląd systematyczny i metaanaliza danych wykazały, że hiperglikemia w cukrzycy jest silnie związana z podwyższonym stężeniem VEGF-A [79]. Ze względu na to, że VEGF-A w moczu i jego ogólnoustrojowy poziom nie koreluje z ekspresją VEGF-A oraz z nasileniem zmian w kłębuszkach nerkowych [112], oceniono poziomy

białka VEGF-A w kłębuszkach nerkowych. Nie wykryto znaczących zmian w poziomie białka VEGF-A w kłębuszkach wyizolowanych od 12-tygodniowych szczurów z cukrzycą. Ponadto nie zaobserwowano znaczącego wpływu suraminy na poziom białka VEGF-A w kłębuszkach wyizolowanych od szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą. Możliwe efekty biologiczne VEGF-A należy rozważać na podstawie ekspresji białka VEGF-A i poziomów specyficznych receptorów oraz czasu trwania cukrzycy [113]. Z tego powodu zmierzono ekspresję mRNA w korze nerek dla dwóch receptorów: *Vegfr1* i *Vegfr2*. Nie zaobserwowano statystycznie znaczących zmian w ekspresji mRNA dla obu receptorów w cukrzycy lub pod wpływem suraminy. Uzyskane dotychczas dane eksperymentalne i kliniczne wskazują jednak, że kierunek działania VEGF-A nie jest jednoznacznie określony i jest zależny od czasu trwania cukrzycy oraz nasilenia nefropatii cukrzycowej. Wykazano, że VEGF-A i VEGFR-2 ulegają zwiększonej ekspresji w nerkach szczurów we wczesnych stadiach nefropatii cukrzycowej [78]. Kluczowym wydaje się więc moment wprowadzenia potencjalnej terapii nefroprotektoryjnej.

W związku z tym, że VEGF-A może wpływać na ekspresję cząsteczek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1), przeprowadzono dalsze doświadczenia mające na celu określenie stężenia w surowicy rozpuszczalnych form tych cząsteczek (sVCAM-1, sICAM-1). Stwierdzono 48% niższe stężenia sVCAM-1 u szczurów cukrzycowych ($525,9 \pm 83,8$ ng/ml vs. $1010,0 \pm 64,9$ ng/ml, $p < 0,0001$) (rycina 13 A). Podawanie suraminy nie wpływało na zmiany stężenia sVCAM-1 (rycina 13 A) ($p = 0,9242$). Ponadto nie stwierdzono zmian stężenia sICAM-1 w surowicy w cukrzycy ($10,18 \pm 0,80$ ng/ml vs. $9,81 \pm 0,58$ ng/ml, $p = 0,9361$), ani pod wpływem suraminy ($9,44 \pm 0,55$ ng/ml vs. $10,40 \pm 0,72$ ng/ml, $p = 0,3205$) (rycina 13 B).



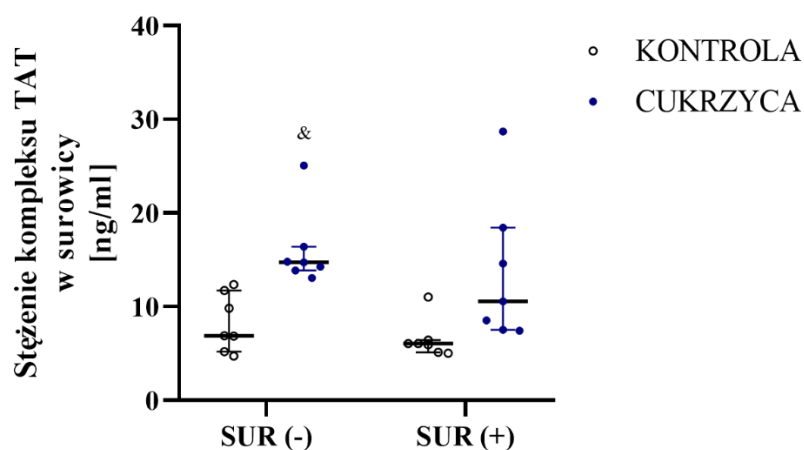
Rycina 13. Wpływ suraminy na stężenie w surowicy rozpuszczalnej cząsteczki adhezji śródbłonka naczyń – 1, sVCAM-1 (A) i rozpuszczalnej cząsteczki adhezji międzykomórkowej – 1, sICAM-1 (B) u szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą.

Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i z cukrzycą (CUKRZYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Wyniki z 85. dnia przedstawiono jako pojedyncze punkty danych z wartościami średnimi \pm błąd standardowy średniej. Istotność statystyczna: $^{\&}p < 0,0001$ szczury z cukrzycą vs. szczury bez cukrzycy (dwukierunkowa ANOVA).

Fizjologicznie, komórki śródbłonka charakteryzują się niskim poziomem cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1 i VCAM-1) [114]. Jednak ich dysfunkcja, np. w cukrzycy, prowadzi

do podwyższenia poziomu tych cząsteczek, co sprzyja adhezji leukocytów do komórek śródbłónka [115,116]. Uwolnienie ektodomeny cząsteczek adhezyjnych z powierzchni komórek śródbłónka indukuje powstawanie rozpuszczalnych form, sICAM-1 i sVCAM-1, a szybkość tego procesu jest związana ze zwiększoną ekspresją białek błonowych [117]. VEGF-A stymuluje ekspresję ICAM-1 i VCAM-1 [77]. W niniejszym badaniu nie zaobserwowano znaczących zmian w sICAM-1 i sVCAM-1 we krwi szczurów z cukrzycą. Wyniki te sugerują, że ogólnoustrojowe zapalenie śródbłónka jest mało prawdopodobne w zastosowanym modelu badawczym długotrwałej cukrzycy indukowanej streptozotocyną. Ponadto w przedstawionych doświadczeniach suramina nie wpływała na stężenie sICAM-1 lub sVCAM-1 u szczurów niecukrzycowych i cukrzycowych. Uprzednio wykazano zwiększoną ekspresję białka ICAM-1 w korze nerek w cukrzycy, a suramina całkowicie blokowała zwiększoną ekspresję ICAM-1. Jednak należy zauważyć, że stężenia sICAM-1 i sVCAM-1 we krwi nie zostały zmierzone we wskazanym badaniu [102].

Hiperglikemia wiąże się ze zwiększonym tworzeniem trombiny i aktywacją płytek krwi [118]. Potencjalna aktywność trombiny jest hamowana przez wiązanie z antytrombiną, tworząc stabilny kompleks trombina-antytrombina (TAT). W związku z tym, kompleksy TAT są uważane za marker wewnątrznaczyniowego wytwarzania trombiny *in vivo* [119]. Ze względu na zwiększone tworzenie trombiny w cukrzycy i występującym zwiększonym ryzykiem wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, zmierzono stężenie TAT we krwi, którego wyniki przedstawiono na rycinie 14 jako wartość mediany oraz 25. i 75. percentyl. Długotrwała cukrzyca charakteryzowała się około 2-krotnym wzrostem stężenia TAT w porównaniu ze szczurami bez cukrzycy (14,76 <13,87 – 16,40> ng/ml vs. 6,91 <5,21 – 11,75> ng/ml, $p = 0,031$), natomiast nie stwierdzono wpływu suraminy na stężenie TAT (6,08 <5,15 – 6,46> ng/ml vs. 6,91 <5,21 – 11,75> ng/ml, $p > 0,999$).



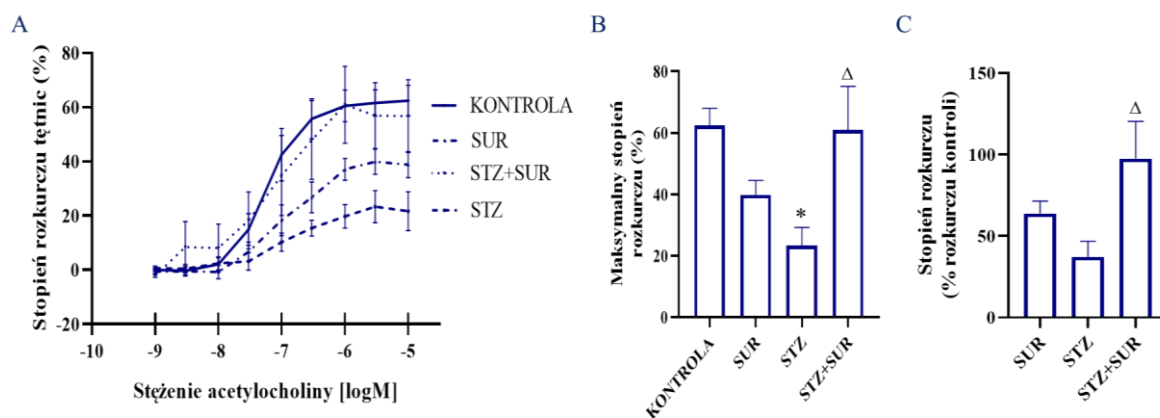
Rycina 14. Wpływ suraminy na stężenie kompleksu trombina-antytrombina w surowicy u szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą.

Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i z cukrzycą (CUKRZYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Wyniki z 85. dnia przedstawiono jako pojedyncze punkty danych z wartością mediany i 25.-75. percentylem. Istotność statystyczna: & $p = 0,031$ vs. kontrola SUR (-) (testy wielokrotnych porównań Dunna).

W przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano podwyższony poziom TAT we krwi u szczurów z długotrwałą cukrzycą, jednocześnie nie stwierdzając wpływu suraminy na ten parametr u szczurów niecukrzycowych i cukrzycowych.

Doświadczenia ex vivo

Komórki śródbłónka produkują i wydzielają czynniki wazoaktywne, takie jak NO oraz prostacykliny, które wpływają na napięcie mięśni gładkich naczyń, a tym samym regulują przepływ krwi. Zmniejszona funkcjonalność NO jest charakterystyczną cechą choroby mikrokrążenia w cukrzycy i wydaje się dominującym czynnikiem w dysfunkcji rozkurczu naczyń krwionośnych zależnego od śródbłónka naczyń [120,121]. W kolejnym etapie zbadano wpływ suraminy na zdolność acetylocholino do rozkurczu mięśniówki gładkiej tętnic izolowanych z nerek. W tym celu przeprowadzono doświadczenia przy pomocy miografii drutowej tętnic międzypłatowych nerek, oceniając wpływ acetylocholino (10^{-9} – 10^{-5} M) na uprzednio obkurczone fenylefryną tętnice izolowane od szczurów niecukrzycowych i cukrzycowych, którym podawano suraminę (rycina 15). Zależne od stężenia działanie acetylocholino zaobserwowano we wszystkich grupach doświadczalnych (rycina 15 A), a maksymalne wartości rozkurczu przedstawiono na rycinie 15 B. W grupie kontrolnej (szczury niecukrzycowe, nieotrzymujące suraminy) minimalny efekt rozkurczu wynoszący około 42% ($p < 0,0001$) występował przy stężeniu acetylocholino 10^{-7} M, natomiast maksymalny – około 62% ($p < 0,001$) przy stężeniu 10^{-5} M. Podanie suraminy szczurom niecukrzycowym przesunęło minimalne skuteczne stężenie do wartości 10^{-6} M z efektem około 37% ($p = 0,0119$) a maksymalny efekt około 39% ($p = 0,0197$) zaobserwowano przy stężeniu $10^{-5,5}$ M. U szczurów cukrzycowych minimalne skuteczne stężenie acetylocholino wynosiło 10^{-6} M, które indukowało rozkurcz około 19% ($p = 0,0109$), a maksymalny efekt wynoszący około 23% ($p = 0,0042$) obserwowano przy stężeniu $10^{-5,5}$ M. Efekt acetylocholino w grupie szczurów cukrzycowych był statystycznie niższy od odnotowanego w grupie szczurów niecukrzycowych ($p = 0,0110$, rycina 15 B). Podawanie suraminy szczurom cukrzycowym wywołało maksymalny efekt rozkurczający acetylocholino do około 61% ($p = 0,0105$) przy stężeniu 10^{-6} M a minimalne skuteczne stężenie acetylocholino wynosiło $10^{-6,5}$ M. Wartość maksymalnego efektu rozkurczu tętnicy u szczurów cukrzycowych otrzymujących suraminę nie różniła się znacząco od wartości maksymalnego rozkurczu obserwowanego u szczurów niecukrzycowych. Podawanie suraminy szczurom cukrzycowym przywróciło rozkurczające właściwości acetylocholino do poziomu obserwowanego u szczurów niecukrzycowych (rycina 15 C).



Rycina 15. Efekt suraminy na rozkurczające działanie acetylocholino na tętnice międzypłatowe izolowane od szczurów bez cukrzycy i z cukrzycą.

Zależny od stężenia wpływ acetylocholino na rozkurcz tętnic międzypłatowych obkurczonych fenylefryną (A), maksymalny efekt acetylocholino (B) i względny efekt acetylocholino – % kontroli przyjętej jako wartość 100% (C). Suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., SUR) lub sól fizjologiczną (SUR (-)) podawano szczurom bez cukrzycy (KONTROLA) i z cukrzycą (CUKRYCA) co tydzień przez 11 tygodni. Wyniki z 85. dnia przedstawiono jako wartości średnie \pm błąd standardowy średniej. Istotność statystyczna: B. * $p = 0,0110$ vs. kontrola, ^Δ $p = 0,0204$ vs. STZ, dwukierunkowa ANOVA ($p = 0,0017$) z testem post hoc Tukeya. C. ^Δ $p = 0,0257$ vs. STZ, jednokierunkowa ANOVA ($p = 0,0325$) z testem post hoc Tukeya.

Stwierdzono, że zależny od śródbłónka rozkurcz indukowany acetylocholiną w długotrwałej cukrzycy był osłabiony do jednej trzeciej poziomu odpowiedzi obserwowanej u szczurów niecukrzycowych [122,123]. Mechanizm indukowanego cukrzycą osłabienia działania acetylocholino jest związany ze zmniejszoną biodostępnością NO i rozprężeniem śródbłónkowej syntazy tlenu azotu, co prowadzi do powstawania anionu ponadtlenkowego zamiast NO [124]. Z przedstawionych wyników badań wynika, że suramina w długotrwałej cukrzycy przywraca zdolność do zależnego od śródbłónka rozkurczu tętnic międzypłatowych nerek. Zaobserwowany efekt działania suraminy może wynikać z jej właściwości przeciwutleniających, bowiem takie działanie wykazano w badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem suraminy w celu przeciwdziałania zapalenia stawów wywołanego kolagenem [125]. Działanie suraminy prawdopodobnie nie zależy od czasu trwania cukrzycy, ponieważ wcześniej wykazaliśmy podobny efekt w cukrzycy krótkotrwałej [126]. Mechanizm działania suraminy nie jest w pełni poznany, ale może być związany z osią VEGF-A/VEGFR, ponieważ jej przewlekłe podawanie zachowuje odpowiedź naczyniową indukowaną acetylocholiną u szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną, a efektowi temu towarzyszy normalizacja poziomu anionu ponadtlenkowego i NO oraz ekspresji śródbłónkowej syntazy NO [127].

Przedstawione badania wykazały, że długoterminowa (12 tygodni) cukrzyca indukowana streptozotocyną u szczurów wiąże się ze zwiększonym stężeniem VEGF-A i kompleksu trombina-antytrambina we krwi, zwiększonym wydalaniem VEGF-A, białka całkowitego i albuminy z moczem, zmniejszonym stężeniem rozpuszczalnej cząsteczki adhezyjnej komórek naczyniowych – 1 (sVCAM-1) we krwi, osłabieniem zależnego od śródbłónka rozkurczu naczyń tętniczych nerek. Nie zaobserwowano jednak istotnych zmian w ekspresji białka VEGF-A w kłębuszkach nerkowych, mRNA w korze nerek dla *Vegfr1* i *Vegfr2* oraz stężeniu rozpuszczalnej cząsteczki adhezji międzykomórkowej – 1

(sICAM-1). Na podstawie zaprezentowanych wyników, można stwierdzić, że podawanie suraminy ma korzystny wpływ na całkowite wydalanie białka z moczem i zależny od śródbłónka rozkurcz naczyń tętniczych u szczurów w długotrwałej cukrzycy indukowanej streptozotocyną. Potwierdza to nasze wcześniejsze obserwacje, które wykazały, że suramina może działać ochronnie na funkcjonalność komórek śródbłónka naczyń nerek.

11.2. Zestawienie wyników

W poniższych tabelach zestawiono wyniki badań uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej dotyczącej efektów działania suraminy w cukrzycy krótkoterminowej i długoterminowej. W skład pracy doktorskiej wchodzi dwie oryginalne prace opublikowane w międzynarodowych czasopismach indeksowanych na liście Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego o łącznym IF 8,519 oraz MEiN 240,000. Artykuły skupiają się na tematyce związanej z farmakoterapią w nefropatii cukrzycowej w krótkoterminowym modelu cukrzycy. Dodatkowo, trzecia praca oryginalna znajduje się w trakcie procesu publikacyjnego i dotyczy długotrwałego modelu cukrzycy (wyniki zaprezentowane w rozdziale 11.1.).

Tabela 3. Wpływ suraminy (10 mg/kg m. c., i.p., co 7 dni) na parametry biochemiczne (stężenie białek, związków azotu oraz aktywność enzymatyczna), parametry molekularne (poziom białka i mRNA) oraz szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej u szczurów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą krótkoterminową (3 tygodnie) i długoterminową (12 tygodni).

Parametr		Cukrzyca krótkoterminowa (3 tygodnie)		Cukrzyca długoterminowa (12 tygodni)		Publikacja, numer ryciny		
		Efekt cukrzycy	Efekt suraminy (2 x 10 mg/m. c.)	Efekt cukrzycy	Efekt suraminy (11 x 10 mg/m. c.)	#1	#2	&
VEGF-A	Stężenie w surowicy	nie stwierdzono	nie stwierdzono	zwiększenie o 15%	nie stwierdzono	2A	-	10A
	Wydalenie z moczem	6× zwiększenie	zwiększenie o 76%	15× zwiększenie	nie stwierdzono	2B	-	10B
	Ekspresja białka VEGF-A w kłębuszkach nerkowych	zmniejszenie o 54%	nie stwierdzono	nie stwierdzono	nie stwierdzono	-	3A, 3B	11A, 11B
	Ekspresja białka VEGF-A w skrawkach kory nerek	nie stwierdzono	zmniejszenie o 40% w kłębuszkach nerkowych, zmiana wewnątrz-kłębuszkowej lokalizacji	nie badano	nie badano	-	4, 5	-
Receptory VEGF	Ekspresja <i>Vegfr1</i> mRNA w korze nerek	nie stwierdzono	nie stwierdzono	nie stwierdzono	nie stwierdzono	-	6A	12A

	Ekspresja <i>Vegfr2</i> mRNA w korze nerek	19× zwiększenie	zmniejszenie o 84%	nie stwierdzono	nie stwierdzono	-	6B	12B
Cząsteczki adhezyjne, formy rozpuszczalne	Stężenie sVCAM-1 w surowicy	zmniejszenie o 52%	nie stwierdzono	zmniejszenie o 48%	nie stwierdzono	-	7A	13A
	Stężenie sICAM-1 w surowicy	nie stwierdzono	nie stwierdzono	nie stwierdzono	nie stwierdzono	-	7B	13B
Białko całkowite	Wydalanie z moczem	nie badano	nie badano	5× zwiększenie	hamowanie progresji	-	-	8A
Albumina	Wydalanie z moczem	3× zwiększenie	nie stwierdzono	8× zwiększenie	nie stwierdzono	4	-	8B
Kreatynina	Stężenie w surowicy	nie stwierdzono	nie stwierdzono	zmniejszenie o 40%	nie stwierdzono	-	2A	-
Mocznik	Stężenie w surowicy	zwiększenie o 11%	nie stwierdzono	zwiększenie o 24%	nie stwierdzono	-	2B	-
eGFR	Szacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej	zmniejszenie o 13%	nie stwierdzono	nie stwierdzono	nie stwierdzono	-	2C	7
Metaloproteinazy (MMP)	Całkowita aktywność MMP w moczu	6,5× zwiększenie	nie stwierdzono	nie badano	nie badano	5A	-	-
	Aktywność MMP-9 w moczu	8× zwiększenie	nie stwierdzono	nie badano	nie badano	5B	-	-
Kompleks trombina-antytrambina (TAT)	Stężenie w surowicy	nie badano	nie badano	2× zwiększenie	nie stwierdzono	-	-	14

#1 Chyla G, Sałaga-Zaleska K, Dąbkowski K, Kuchta A, Jankowski M. Suramin enhances the urinary excretion of VEGF-A in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Rep.* 2021 Jun

#2 Chyla-Danił G, Sałaga-Zaleska K, Kreft E, Krześcińska A, Herman S, Kuchta A, Sakowicz-Burkiewicz M, Lenartowicz M, Jankowski M. Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Mar 22

& wyniki opisane w podrozdziale 11.1., aktualnie znajdują się w procesie publikacyjnym

Tabela 4. Wpływ suraminy (10 mg/kg m. c., i.p., co 7 dni) na stężenie glukozy, bilans wody oraz parametry żywieniowe u szczurów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą krótkoterminową (3 tygodnie) i długoterminową (12 tygodni).

Parametr	Cukrzyca krótkoterminowa (3 tygodnie)		Cukrzyca długoterminowa (12 tygodni)		Publikacja, numer ryciny/tabeli	
	Efekt cukrzycy	Efekt suraminy (2 x 10 mg/kg m. c.)	Efekt cukrzycy	Efekt suraminy (11 x 10 mg/kg m. c.)	#2	&
Masa ciała	1,4× zmniejszenie	nie stwierdzono	1,5× zmniejszenie	nie stwierdzono	1A	Tab. 1
Stężenie glukozy we krwi	5× zwiększenie	nie stwierdzono	5× zwiększenie	nie stwierdzono.	1D	Tab. 1
Diureza	12× zwiększenie	nie stwierdzono	13× zwiększenie	nie stwierdzono	1B	Tab. 1
Spożycie wody	5× zwiększenie	nie stwierdzono	6× zwiększenie	nie stwierdzono	1C	Tab. 1
Spożycie pokarmu	1,5× zwiększenie	nie stwierdzono	nie stwierdzono	nie stwierdzono	Tab. 1	Tab. 2
Specyficzny wskaźnik przyrostu masy ciała	zmniejszenie	zwiększenie	zmniejszenie	zwiększenie	Tab. 1	Tab. 2
Współczynnik efektywności żywienia	zmniejszenie	nie stwierdzono	zmniejszenie	nie stwierdzono	Tab. 1	Tab. 2
Efektywność wykorzystania pożywienia dla masy ciała	zmniejszenie	nie stwierdzono	zmniejszenie	nie stwierdzono	Tab. 1	Tab. 2

#2 Chyla-Danił G, Salaga-Zaleska K, Kreft E, Krzezińska A, Herman S, Kuchta A, Sakowicz-Burkiewicz M, Lenartowicz M, Jankowski M. Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes. *Pharmaceuticals* (Basel). 2023 Mar 22

& wyniki opisane w podrozdziale 11.1., aktualnie znajdują się w procesie publikacyjnym

Termin „zmniejszenie/zwiększenie” oznacza istotną statystycznie, odpowiednią zmianę wartości badanego parametru na poziomie istotności mniejszej od 0,05.

Tabela 5. Stymulowany acetylocholiną rozkurcz tętnic międzypłatowych izolowanych z nerek szczurów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą krótkoterminową (3 tygodnie) i długoterminową (12 tygodni) otrzymujących suraminę (10 mg/kg m. c., i.p., co 7 dni).

Parametr	Cukrzyca krótkoterminowa (3 tygodnie)				Cukrzyca długoterminowa (12 tygodni)				Publikacja i numer ryciny	
	Kontrola	Kontrola + suramina	Cukrzyca	Cukrzyca + suramina	Kontrola	Kontrola + suramina	Cukrzyca	Cukrzyca + suramina	#2	&
Stężenie acetylocholiny powodujące minimalny rozkurcz (mol/l)	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}	$10^{-6,5}$	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}	$10^{-6,5}$	8	15
Stopień minimalnego rozkurczu	40%	42%	19%	53%	42%	37%	19%	48%		
Stężenie acetylocholiny powodujące maksymalny rozkurcz (mol/l)	10^{-6}	$10^{-5,5}$	10^{-6}	$10^{-6,5}$	10^{-5}	$10^{-5,5}$	$10^{-5,5}$	10^{-6}		
Stopień maksymalnego rozkurczu	50%	45%	19%	53%	62%	39%	23%	61%		

#2 Chyla-Danił G, Salaga-Zaleska K, Kreft E, Krzesińska A, Herman S, Kuchta A, Sakowicz-Burkiewicz M, Lenartowicz M, Jankowski M. Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes. *Pharmaceuticals* (Basel). 2023 Mar 22

& wyniki opisane w podrozdziale 11.1., aktualnie znajdują się w procesie publikacyjnym

Fragmety tętnic międzypłatowych obkurczano fenylefryną do 50–70% wartości uzyskiwanych pod wpływem buforu o wysokim stężeniu jonów potasu (123,7 mM) przyjmując tę wartość jako bazową, względem której wyliczano wielkość rozkurczu wywołanego przez acetylocholinę (rozkurcz 0%).

12. Podsumowanie wyników

- ◆ W obu badanych modelach doświadczalnej cukrzycy zaobserwowano zmniejszenie zdolności relaksacyjnych międzypłatowych tętnic nerkowych. Natomiast podanie suraminy przywracało właściwości relaksacyjne tętnic do poziomów obserwowanych u zwierząt kontrolnych.
- ◆ Suramina nie miała wpływu na wydalanie albuminy z moczem, jednak w cukrzycy długoterminowej hamowała rozwój białkomoczu.
- ◆ W krótkoterminowej cukrzycy suramina powodowała zwiększone wydalanie VEGF-A z moczem oraz zmniejszenie ekspresji tego białka w kłębuszkach nerkowych. Ponadto zaobserwowany wzrost ekspresji VEGFR-2 w cukrzycy krótkoterminowej ulegał spadkowi po podaniu suraminy. Podobnych efektów podania suraminy nie zaobserwowano w długoterminowym modelu cukrzycy.
- ◆ W obu modelach doświadczalnej cukrzycy nie zaobserwowano wpływu suraminy na zmiany stężeń badanych rozpuszczalnych form cząsteczek adhezji (sVCAM-1 oraz sICAM-1) oraz aktywności metaloproteinaz (całkowite MMP oraz MMP-9).

13. Wnioski

- ◆ Przewlekłe powikłanie cukrzycy, jakim jest dysfunkcja komórek śródbłónka prowadząca do mikroangiopatii, występuje już we wczesnych fazach choroby.
- ◆ Podanie suraminy prowadzi do poprawy funkcji śródbłónka naczyń tętniczych nerek, a pozytywny efekt jest niezależny od czasu trwania cukrzycy, co sugeruje możliwość rozszerzenia zakresu terapeutycznego leku.
- ◆ W perspektywie długoterminowej, suramina hamuje ulegający progresji wraz z czasem trwania cukrzycy białkomocz, aczkolwiek bez hamowania progresji albuminurii, co może wynikać z przedłużonego i selektywnego efektu działania leku.
- ◆ Wpływ suraminy w cukrzycy krótkoterminowej na oś sygnalizacyjną VEGF-A/VEGFR-2 prawdopodobnie prowadzi do zmiany fenotypu komórek kłębuszkowej bariery filtracyjnej, co może mieć istotne znaczenie dla jej funkcjonowania.
- ◆ Prawdopodobne jest, że mechanizm działania suraminy związany z osią sygnalizacyjną VEGF-A/VEGFR-2 pozostaje aktywny tylko w początkowej fazie trwania cukrzycy. Sugeruje to, że suramina wspomaga wczesne efekty kompensacyjne.

14. Piśmiennictwo

1. Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K.; et al. Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition. *Diabetes Res Clin Pract* **2019**, *157*, doi:10.1016/j.diabres.2019.107843.
2. Sun, H.; Saeedi, P.; Karuranga, S.; Pinkepank, M.; Ogurtsova, K.; Duncan, B.B.; Stein, C.; Basit, A.; Chan, J.C.N.; Mbanya, J.C.; et al. IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* **2022**, *183*, 2022.
3. Katsarou, A.; Gudbjörnsdóttir, S.; Rawshani, A.; Dabelea, D.; Bonifacio, E.; Anderson, B.J.; Jacobsen, L.M.; Schatz, D.A.; Lernmark, A. Type 1 Diabetes Mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3*, doi:10.1038/nrdp.2017.16.
4. Kim, D.S.; Gloyne, A.L.; Knowles, J.W. Genetics of Type 2 Diabetes: Opportunities for Precision Medicine: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol* **2021**, *78*, 496–512, doi:10.1016/J.JACC.2021.03.346.
5. Forouhi, N.G.; Wareham, N.J. Epidemiology of Diabetes. *Medicine* **2010**, *38*, 602–606, doi:10.1016/J.MPMED.2010.08.007.
6. DeFronzo, R.A.; Ferrannini, E.; Groop, L.; Henry, R.R.; Herman, W.H.; Holst, J.J.; Hu, F.B.; Kahn, C.R.; Raz, I.; Shulman, G.I.; et al. Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, doi:10.1038/nrdp.2015.19.
7. Krolewski, A.S. Progressive Renal Decline: The New Paradigm of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 954–962, doi:10.2337/dc15-0184.
8. Gewin, L.; Zent, R.; Pozzi, A. Progression of Chronic Kidney Disease: Too Much Cellular Talk Causes Damage. *Kidney Int* **2017**, *91*, 552–560.
9. Tervaert, T.W.C.; Mooyaart, A.L.; Amann, K.; Cohen, A.H.; TerenceCook, H.; Drachenberg, C.B.; Ferrario, F.; Fogo, A.B.; Haas, M.; Heer, E.; et al. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**.
10. Hussain, S.; Chand Jamali, M.; Habib, A.; Hussain, M.S.; Akhtar, M.; Najmi, A.K. Diabetic Kidney Disease: An Overview of Prevalence, Risk Factors, and Biomarkers. *Clin Epidemiol Glob Health* **2021**, *9*, 2–6, doi:10.1016/J.CEGH.2020.05.016.
11. Czupryniak, L.; Demska, M. *Zalecenia Kliniczne Dotyczące Postępowania u Chorych Na Cukrzycę 2022 Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego*; 2022;
12. Arya, A.; Aggarwal, S.; Yadav, H.N. Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Compendia* **2021**, *2021*, 2–7, doi:10.2337/DB20211-2.
13. Taguchi, K.; Fukami, K. RAGE Signaling Regulates the Progression of Diabetic Complications. *Front Pharmacol* **2023**, *14*.

14. Yan, L. jun Redox Imbalance Stress in Diabetes Mellitus: Role of the Polyol Pathway. *Animal Model Exp Med* 2018, *1*.
15. Wu, W.Z.; Bai, Y.P. Endothelial GLUTs and Vascular Biology. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2023, *158*.
16. Schleicher, E.D.; Weigert, C. Role of the Hexosamine Biosynthetic Pathway in Diabetic Nephropathy. *Kidney Int Suppl* **2000**, *77*, doi:10.1046/J.1523-1755.2000.07703.X.
17. Schrijvers, B.F.; De Vriese, A.S.; Flyvbjerg, A. From Hyperglycemia to Diabetic Kidney Disease: The Role of Metabolic, Hemodynamic, Intracellular Factors and Growth Factors/Cytokines. *Endocr Rev* **2004**, *25*, 971–1010, doi:10.1210/ER.2003-0018.
18. Chagnac, A.; Zingerman, B.; Rozen-Zvi, B.; Herman-Edelstein, M. Consequences of Glomerular Hyperfiltration: The Role of Physical Forces in the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease in Diabetes and Obesity. *Nephron* 2019, *143*.
19. Tonneijck, L.; Muskiet, M.H.A.; Smits, M.M.; Van Bommel, E.J.; Heerspink, H.J.L.; Van Raalte, D.H.; Joles, J.A. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol* **2017**, *28*, 1023–1039, doi:10.1681/ASN.2016060666.
20. Vallon, V.; Komers, R. Pathophysiology of the Diabetic Kidney. *Compr Physiol* **2011**, *1*, 1175–1232, doi:10.1002/CPHY.C100049.
21. Ahmad, A.; Nawaz, M.I. Molecular Mechanism of VEGF and Its Role in Pathological Angiogenesis. *J Cell Biochem* 2022, *123*.
22. Gnudi, L. Angiopietins and Diabetic Nephropathy. *Diabetologia* 2016, *59*.
23. Chang, T.T.; Chen, J.W. The Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci* 2020, *21*.
24. Yonemoto, S.; Machiguchi, T.; Nomura, K.; Minakata, T.; Nanno, M.; Yoshida, H. Correlations of Tissue Macrophages and Cytoskeletal Protein Expression with Renal Fibrosis in Patients with Diabetes Mellitus. *Clin Exp Nephrol* **2006**, *10*, 186–192, doi:10.1007/S10157-006-0426-7.
25. Nguyen, D.; Ping, F.; Mu, W.; Hill, P.; Atkins, R.C.; Chadban, S.J. Macrophage Accumulation in Human Progressive Diabetic Nephropathy. *Nephrology (Carlton)* **2006**, *11*, 226–231, doi:10.1111/J.1440-1797.2006.00576.X.
26. Vanhoutte, P.M.; Shimokawa, H.; Feletou, M.; Tang, E.H.C. Endothelial Dysfunction and Vascular Disease – a 30th Anniversary Update. *Acta Physiologica* 2017, *219*.
27. Daehn, I.S. Glomerular Endothelial Cell Stress and Cross-Talk With Podocytes in Early Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)* **2018**, *5*, 76, doi:10.3389/FMED.2018.00076.
28. Mahtal, N.; Lenoir, O.; Tharaux, P.L. Glomerular Endothelial Cell Crosstalk With Podocytes in Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)* 2021, *8*, 659013.

29. Hempel, A.; Maasch, C.; Heintze, U.; Lindschau, C.; Dietz, R.; Luft, F.C.; Haller, H. High Glucose Concentrations Increase Endothelial Cell Permeability via Activation of Protein Kinase α . *Circ Res* **81**, doi:10.1161/01.RES.81.3.363.
30. Varma, S.; Lal, B.K.; Zheng, R.; Breslin, J.W.; Saito, S.; Pappas, P.J.; Hobson, R.W.; Durán, W.N. Hyperglycemia Alters PI3k and Akt Signaling and Leads to Endothelial Cell Proliferative Dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, doi:10.1152/ajpheart.01088.2004.
31. Sun, Y.B.Y.; Qu, X.; Zhang, X.; Caruana, G.; Bertram, J.F.; Li, J. Glomerular Endothelial Cell Injury and Damage Precedes That of Podocytes in Adriamycin-Induced Nephropathy. *PLoS One* **2013**, *8*, e55027, doi:10.1371/journal.pone.0055027.
32. Hanefeld, M.; Appelt, D.; Engelmann, K.; Sandner, D.; Bornstein, S.R.; Ganz, X.; Henkel, E.; Haase, R.; Birkenfeld, A.L. Serum and Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factors in Relation to Quality of Glucose Control, Biomarkers of Inflammation, and Diabetic Nephropathy. *Hormone and Metabolic Research* **2016**, *48*, 529–534, doi:10.1055/s-0042-106295.
33. Kim, N.H.; Oh, J.H.; Seo, J.A.; Lee, K.W.; Kim, S.G.; Choi, K.M.; Baik, S.H.; Choi, D.S.; Kang, Y.S.; Han, S.Y.; et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Soluble VEGF Receptor FLT-1 in Diabetic Nephropathy. *Kidney Int* **2005**, *67*, 167–177, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00067.x.
34. Kanesaki, Y.; Suzuki, D.; Uehara, G.; Toyoda, M.; Katoh, T.; Sakai, H.; Watanabe, T. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression Is Correlated with Glomerular Neovascularization in Human Diabetic Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases* **2005**, *45*, 288–294, doi:10.1053/j.ajkd.2004.09.020.
35. Day, R.T.; C, C.R.; Tabatabaie, H.; Mantravadi, V.; Lee, M.J.; Barnes, J.L.; Kasinath, B.S.; Feliers, D. Acute Hyperglycemia Rapidly Stimulates VEGF mRNA Translation in the Kidney. In *Role of angiotensin type 2 receptor (AT2)*. *Cell Signal* **22**.
36. Sivaskandarajah, G.A.; Jeansson, M.; Maezawa, Y.; Eremina, V.; Baelde, H.J.; Quaggin, S.E. Vegfa Protects the Glomerular Microvasculature in Diabetes. *Diabetes* **2012**, *61*, 2958–2966, doi:10.2337/DB11-1655.
37. Baelde, H.J.; Eikmans, M.; Lappin, D.W.P.; Doran, P.P.; Hohenadel, D.; Brinkkoetter, P.T.; Van Der Woude, F.J.; Waldherr, R.; Rabelink, T.J.; De Heer, E.; et al. Reduction of VEGF-A and CTGF Expression in Diabetic Nephropathy Is Associated with Podocyte Loss. *Kidney Int* **2007**, *71*, 637–645, doi:10.1038/sj.ki.5002101.
38. Fu, H.; Liu, S.; Bastacky, S.I.; Wang, X.; Tian, X.J.; Zhou, D. Diabetic Kidney Diseases Revisited: A New Perspective for a New Era. *Mol Metab* **2019**, *30*, 250–263, doi:10.1016/J.MOLMET.2019.10.005.
39. Alicic, R.Z.; Rooney, M.T.; Tuttle, K.R. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol* **2017**, *12*, 2032–2045, doi:10.2215/CJN.11491116.
40. Kasztan, M.; Piwkowska, A.; Kreft, E.; Rogacka, D.; Audzeyenka, I.; Szczepanska-Konkel, M.; Jankowski, M. Extracellular Purines' Action on Glomerular Albumin

- Permeability in Isolated Rat Glomeruli: Insights into the Pathogenesis of Albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol* **2016**, *311*, F103–F111, doi:10.1152/AJPRENAL.00567.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH20111679250008.JPEG.
41. Vonend, O.; Turner, C.M.; Chan, C.M.; Loesch, A.; Dell’Anna, G.C.; Srai, K.S.; Burnstock, G.; Unwin, R.J. Glomerular Expression of the ATP-Sensitive P2X7 Receptor in Diabetic and Hypertensive Rat Models. *Kidney Int* **2004**, *66*, 157–166, doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00717.x.
 42. Wozniak, J.; Floege, J.; Ostendorf, T.; Ludwig, A. Key Metalloproteinase-Mediated Pathways in the Kidney. *Nat Rev Nephrol* **2021**, *17*, 513–527, doi:10.1038/S41581-021-00415-5.
 43. Gu, B.J.; Wiley, J.S. Rapid ATP-Induced Release of Matrix Metalloproteinase 9 Is Mediated by the P2X7 Receptor. *Blood* **2006**, *107*, 4946–4953, doi:10.1182/BLOOD-2005-07-2994.
 44. Li, S.Y.; Huang, P.H.; Yang, A.H.; Tarng, D.C.; Yang, W.C.; Lin, C.C.; Chen, J.W.; Schmid-Schönbein, G.; Lin, S.J. Matrix Metalloproteinase-9 Deficiency Attenuates Diabetic Nephropathy by Modulation of Podocyte Functions and Dedifferentiation. *Kidney Int* **2014**, *86*, 358–369, doi:10.1038/ki.2014.67.
 45. Bartlett, C.S.; Jeansson, M.; Quaggin, S.E. Vascular Growth Factors and Glomerular Disease. *Annu Rev Physiol* **78**, 2016.
 46. Li, X.; Weber, N.C.; Cohn, D.M.; Hollmann, M.W.; Devries, J.H.; Hermanides, J.; Preckel, B. Effects of Hyperglycemia and Diabetes Mellitus on Coagulation and Hemostasis. *Journal of Clinical Medicine* **2021**, *Vol. 10*, Page 2419 **2021**, *10*, 2419, doi:10.3390/JCM10112419.
 47. Roy, M.S.; Janal, M.N.; Crosby, J.; Donnelly, R. Markers of Endothelial Dysfunction and Inflammation Predict Progression of Diabetic Nephropathy in African Americans with Type 1 Diabetes. *Kidney Int* **2015**, *87*, 427–433, doi:10.1038/ki.2014.212.
 48. Chen, S.; Jim, B.; Ziyadeh, F.N. Diabetic Nephropathy and Transforming Growth Factor- β : Transforming Our View of Glomerulosclerosis and Fibrosis Build-Up. *Semin Nephrol* **2003**, *23*, 532–543, doi:10.1053/S0270-9295(03)00132-3.
 49. Nakamura, A.; Shikata, K.; Hiramatsu, M.; Nakatou, T.; Kitamura, T.; Wada, J.; Itoshima, T.; Makino, H. Serum Interleukin-18 Levels Are Associated With Nephropathy and Atherosclerosis in Japanese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2005**, *28*, 2890–2895, doi:10.2337/DIACARE.28.12.2890.
 50. Vempati, P.; Popel, A.S.; Gabhann, F. Extracellular Regulation of VEGF: Isoforms, Proteolysis, and Vascular Patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* **25**, 2014.
 51. Barańska, P.; Jerczyńska, H.; Pawłowska, Z. Vascular Endothelial Growth Factor-Structure and Functions. *Postepy Biochem* **2005**, *51*, 12–21.

52. Majumder, S.; Advani, A. VEGF and the Diabetic Kidney: More than Too Much of a Good Thing. *J Diabetes Complications* **2017**, *31*, 273–279, doi:10.1016/J.JDIACOMP.2016.10.020.
53. Olsson, A.K.; Dimberg, A.; Kreuger, J.; Claesson-Welsh, L. VEGF Receptor Signalling - in Control of Vascular Function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 359–371, doi:10.1038/NRM1911.
54. Catena, R.; Larzabal, L.; Larrayoz, M.; Molina, E.; Hermida, J.; Agorreta, J.; Montes, R.; Pio, R.; Montuenga, L.M.; Calvo, A. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} Are Weakly Angiogenic Isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* **2010**, *9*, doi:10.1186/1476-4598-9-320.
55. Peach, C.J.; Mignone, V.W.; Arruda, M.A.; Alcobia, D.C.; Hill, S.J.; Kilpatrick, L.E.; Woolard, J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, Vol. 19, Page 1264 **2018**, *19*, 1264, doi:10.3390/IJMS19041264.
56. Mayer, G. Capillary Rarefaction, Hypoxia, VEGF and Angiogenesis in Chronic Renal Disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2011**, *26*, 1132–1137.
57. Brogi, E. Hypoxia-Induced Paracrine Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression. *J Clin Invest* **1996**, *97*, 469, doi:10.1172/JCI118437.
58. Hale, L.J.; Hurcombe, J.; Lay, A.; Santamaría, B.; Valverde, A.M.; Saleem, M.A.; Mathieson, P.W.; Welsh, G.I.; Coward, R.J. Insulin Directly Stimulates VEGF-A Production in the Glomerular Podocyte. *Am J Physiol Renal Physiol* **2013**, *305*, F182, doi:10.1152/ajprenal.00548.2012.
59. Houck, K.A.; Leung, D.W.; Rowland, A.M.; Winer, J.; Ferrara, N. Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, doi:10.1016/s0021-9258(18)35712-0.
60. Salmon, A.H.J.; Neal, C.R.; Bates, D.O.; Harper, S.J. Vascular Endothelial Growth Factor Increases the Ultrafiltration Coefficient in Isolated Intact Wistar Rat Glomeruli. *Journal of Physiology* **2006**, *570*, 141–156, doi:10.1113/JPHYSIOL.2005.099184.
61. P, K.; P, K. VEGF Inhibition and Renal Thrombotic Microangiopathy. *N Engl J Med* **2008**, *359*, 205–207, doi:10.1056/NEJMC080770.
62. Sison, K.; Eremina, V.; Baelde, H.; Min, W.; Hirashima, M.; Fantus, I.G.; Quaggin, S.E. Glomerular Structure and Function Require Paracrine, Not Autocrine, VEGF-VEGFR-2 Signaling. *Journal of the American Society of Nephrology* **2010**, *21*, 1691–1701, doi:10.1681/ASN.2010030295.
63. Zhang, A.; Fang, H.; Chen, J.; He, L.; Chen, Y. Role of VEGF-A and LRG1 in Abnormal Angiogenesis Associated With Diabetic Nephropathy. *Front Physiol* **2020**, *11*.
64. Darland, D.C.; Massingham, L.J.; Smith, S.R.; Piek, E.; Saint-Geniez, M.; D'Amore, P.A. Pericyte Production of Cell-Associated VEGF Is Differentiation-Dependent and Is Associated with Endothelial Survival. *Dev Biol* **2003**, *264*, 275–288, doi:10.1016/j.ydbio.2003.08.015.

65. Apte, R.S.; Chen, D.S.; Ferrara, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* **2019**, *176*, 1248, doi:10.1016/J.CELL.2019.01.021.
66. Lee, S.; Chen, T.T.; Barber, C.L.; Jordan, M.C.; Murdock, J.; Desai, S.; Ferrara, N.; Nagy, A.; Roos, K.P.; Iruela-Arispe, M.L. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell* **2007**, *130*, 691, doi:10.1016/J.CELL.2007.06.054.
67. Kamba, T.; Tam, B.Y.Y.; Hashizume, H.; Haskell, A.; Sennino, B.; Mancuso, M.R.; Norberg, S.M.; O'Brien, S.M.; Davis, R.B.; Gowen, L.C.; et al. VEGF-Dependent Plasticity of Fenestrated Capillaries in the Normal Adult Microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, doi:10.1152/ajpheart.00133.2005.
68. Kuppe, C.; Rohlf, W.; Grepl, M.; Schulte, K.; Veron, D.; Elger, M.; Sanden, S.K.; Saritas, T.; Andrae, J.; Betsholtz, C.; et al. Inverse Correlation between Vascular Endothelial Growth Factor Back-Filtration and Capillary Filtration Pressures. *Nephrol Dial Transplant* **2018**, *33*, 1514–1525, doi:10.1093/NDT/GFY057.
69. McMahon, A.P. Development of the Mammalian Kidney. In *Current Topics in Developmental Biology*; Academic Press Inc., 2016; Vol. 117, pp. 31–64.
70. Yang, X.; Yang, Q.; Ma, B.; Wang, X.; Bove, A.M.; Simone, G. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role.
71. Ferrara, N.; Gerber, H.P.; LeCouter, J. The Biology of VEGF and Its Receptors. *Nature Medicine* **2003**, *9*, 669–676, doi:10.1038/nm0603-669.
72. Bussolati, B.; Dunk, C.; Grohman, M.; Kontos, C.D.; Mason, J.; Ahmed, A. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Modulates Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Angiogenesis via Nitric Oxide. *American Journal of Pathology* **159**, doi:10.1016/S0002-9440(10)61775-0.
73. Simon, M.; Röckl, W.; Hornig, C.; Gröne, E.F.; Theis, H.; Weich, H.A.; Fuchs, E.; Yayon, A.; Gröne, H.J. Receptors of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) in Fetal and Adult Human Kidney: Localization and [125I]VEGF Binding Sites. *Journal of the American Society of Nephrology* **9**, doi:10.1681/asn.v9i61032.
74. Nakagawa, T.; Sato, W.; Sautin, Y.Y.; Glushakova, O.; Croker, B.; Atkinson, M.A.; Tisher, C.C.; Johnson, R.J. Uncoupling of Vascular Endothelial Growth Factor with Nitric Oxide as a Mechanism for Diabetic Vasculopathy. *J Am Soc Nephrol* **2006**, *17*, 736–745, doi:10.1681/ASN.2005070759.
75. Nakagawa, T. Uncoupling of the VEGF-Endothelial Nitric Oxide Axis in Diabetic Nephropathy: An Explanation for the Paradoxical Effects of VEGF in Renal Disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, 2007.
76. Nakagawa, T.; Sato, W.; Kosugi, T.; Johnson, R.J. Uncoupling of VEGF with Endothelial NO as a Potential Mechanism for Abnormal Angiogenesis in the Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* **2013**, *2013*.
77. Kim, I.; Moon, S.O.; Kim, S.H.; Kim, H.J.; Koh, Y.S.; Koh, G.Y. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular

- Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-Selectin through Nuclear Factor-KB Activation in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, doi:10.1074/jbc.M009705200.
78. Cooper, M.E.; Vranes, D.; Youssef, S.; Stackner, S.A.; Cox, A.J.; Rizkalla, B.; Casley, D.J.; Bach, L.A.; Kelly, D.J.; Gilbert, R.E. Increased Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor VEGFR-2 in Experimental Diabetes. *Diabetes* **1999**, 48, 2229–2239, doi:10.2337/DIABETES.48.11.2229.
 79. Zafar, M.I.; Mills, K.; Ye, X.; Blakely, B.; Min, J.; Kong, W.; Zhang, N.; Gou, L.; Regmi, A.; Hu, S.Q.; et al. Association between the Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Metabolic Syndrome or Its Components: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetol Metab Syndr* 10, doi:10.1186/s13098-018-0363-0.
 80. Nakagawa, T.; Sato, W.; Glushakova, O.; Heinig, M.; Clarke, T.; Campbell-Thompson, M.; Yuzawa, Y.; Atkinson, M.A.; Johnson, R.J.; Croker, B. Diabetic Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice Develop Advanced Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **2007**, 18, 539–550, doi:10.1681/ASN.2006050459.
 81. Veron, D.; Reidy, K.J.; Bertuccio, C.; Teichman, J.; Villegas, G.; Jimenez, J.; Shen, W.; Kopp, J.B.; Thomas, D.B.; Tufro, A. Overexpression of VEGF-A in Podocytes of Adult Mice Causes Glomerular Disease. *Kidney Int* **2010**, 77, 989–999, doi:10.1038/KI.2010.64.
 82. Veron, D.; Bertuccio, C.A.; Marlier, A.; Reidy, K.; Garcia, A.M.; Jimenez, J.; Velazquez, H.; Kashgarian, M.; Moeckel, G.W.; Tufro, A. Podocyte Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf164) Overexpression Causes Severe Nodular Glomerulosclerosis in a Mouse Model of Type 1 Diabetes. *Diabetologia* **2011**, 54, 1227–1241, doi:10.1007/S00125-010-2034-Z.
 83. Yang, S.F.; Su, Y.C.; Lim, C.C.; Huang, J.Y.; Hsu, S.M.; Wu, L.W.; Chang, Y.S.; Hung, J.H. Risk of Dialysis in Patients Receiving Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment: A Population-Based Cohort Study. *Aging (Albany NY)* **2022**, 14, 5116, doi:10.18632/AGING.204133.
 84. Eremina, V.; Sood, M.; Haigh, J.; Nagy, A.; Lajoie, G.; Ferrara, N.; Gerber, H.P.; Kikkawa, Y.; Miner, J.H.; Quaggin, S.E. Glomerular-Specific Alterations of VEGF-A Expression Lead to Distinct Congenital and Acquired Renal Diseases. *Journal of Clinical Investigation* 111, doi:10.1172/JCI17423.
 85. Veron, D.; Aggarwal, P.K.; Li, Q.; Moeckel, G.; Kashgarian, M.; Tufro, A. Podocyte VEGF-A Knockdown Induces Diffuse Glomerulosclerosis in Diabetic and in ENOS Knockout Mice. *Front Pharmacol* 12, doi:10.3389/fphar.2021.788886.
 86. Oltean, S.; Qiu, Y.; Ferguson, J.K.; Stevens, M.; Neal, C.; Russell, A.; Kaura, A.; Arkill, K.P.; Harris, K.; Symonds, C.; et al. Vascular Endothelial Growth Factor-A165b Is Protective and Restores Endothelial Glycocalyx in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 26, doi:10.1681/ASN.2014040350.
 87. Lavozy, C.; Rodriguez-diez, R.R.; Plaza, A.; Carpio, D.; Egido, J.; Ruiz-ortega, M.; Mezzano, S. VEGFR2 Blockade Improves Renal Damage in an Experimental Model of

Type 2 Diabetic Nephropathy. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol. 9, Page 302 **2020**, 9, 302, doi:10.3390/JCM9020302.

88. Ku, C.H.; White, K.E.; Cas, A.D.; Hayward, A.; Webster, Z.; Bilous, R.; Marshall, S.; Viberti, G.; Gnudi, L. Inducible Overexpression of SFlt-1 in Podocytes Ameliorates Glomerulopathy in Diabetic Mice. *Diabetes* **2008**, 57, 2824–2833, doi:10.2337/DB08-0647.
89. Tan, S.; Li, J.Q.; Cheng, H.; Li, Z.; Lan, Y.; Zhang, T.T.; Yang, Z.C.; Li, W.; Qi, T.; Qiu, Y.R.; et al. The Anti-Parasitic Drug Suramin Potently Inhibits Formation of Seminal Amyloid Fibrils and Their Interaction with HIV-1. *J Biol Chem* **2019**, 294, 13740, doi:10.1074/JBC.RA118.006797.
90. Wiedemar, N.; Hauser, D.A.; Mäser, P. 100 Years of Suramin. *Antimicrob Agents Chemother* **2020**, 64, doi:10.1128/AAC.01168-19.
91. PhD, J.M.C.; Klecker, R.W.; Yarchoan, R.; Lane, H.C.; Fauci, A.S.; Redfield, R.R.; Broder, S.; Myers, C.E. Clinical Pharmacokinetics of Suramin in Patients with HTLV-III/LAV Infection. *J Clin Pharmacol* **1986**, 26, 22–26, doi:10.1002/J.1552-4604.1986.TB02897.X.
92. McNally, W.P.; DeHart, P.D.; Lathia, C.; Whitfield, L.R. Distribution of [¹⁴C]suramin in tissues of male rats following a single intravenous dose. *Life Sci* 67, doi:10.1016/S0024-3205(00)00767-0.
93. Voogd, T.E.; Vansterkenburg, E.L.M.; Wilting, J.; Janssen, L.H.M. Recent Research on the Biological Activity of Suramin. *Pharmacol Rev* 1993, 45.
94. North, R.A.; Jarvis, M.F. P2X Receptors as Drug Targets. *Mol Pharmacol* **2013**, 83, 759, doi:10.1124/MOL.112.083758.
95. Liu, N.; He, S.; Tolbert, E.; Gong, R.; Bayliss, G.; Zhuang, S. Suramin Alleviates Glomerular Injury and Inflammation in the Remnant Kidney. *PLoS One* **2012**, 7, e36194, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0036194.
96. Oda, K.; Miyamoto, S.; Kodera, R.; Wada, J.; Shikata, K. Suramin Prevents the Development of Diabetic Kidney Disease by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation in KK-Ay Mice. *J Diabetes Investig* **2023**, 14, doi:10.1111/jdi.13930.
97. Oda, K.; Miyamoto, S.; Kodera, R.; Wada, J.; Shikata, K. Suramin Prevents the Development of Diabetic Kidney Disease by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation in KK-Ay Mice. *J Diabetes Investig* **2023**, 14, 205–220, doi:10.1111/JDI.13930.
98. Villalba, N.; Sackheim, A.M.; Lawson, M.A.; Haines, L.; Chen, Y.-L.; Sonkusare, S.K.; Ma, Y.-T.; Li, J.; Majumdar, D.; Bouchard, B.A.; et al. The Polyanionic Drug Suramin Neutralizes Histones and 1 Prevents Endotheliopathy 2., doi:10.1101/2021.12.09.469611.
99. Waltenberger, J.; Mayr, U.; Frank, H.; Hombach, V. Suramin Is a Potent Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor. A Contribution to the Molecular Basis of Its Antiangiogenic Action. *J Mol Cell Cardiol* 28, doi:10.1006/jmcc.1996.0142.

100. Ferrara, N. RETROSPECTIVE Binding to the Extracellular Matrix and Proteolytic Processing: Two Key Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Action. *Mol Biol Cell* **2010**, *21*, 687–690, doi:10.1091/mbc.E09.
101. Liu, N.; Tolbert, E.; Pang, M.; Ponnusamy, M.; Yan, H.; Zhuang, S. Suramin Inhibits Renal Fibrosis in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **2011**, *22*, 1064–1075, doi:10.1681/ASN.2010090956.
102. Korrapati, M.C.; Shaner, B.E.; Neely, B.A.; Alge, J.L.; Arthur, J.M.; Schnellmann, R.G. Diabetes-Induced Renal Injury in Rats Is Attenuated by Suramin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2012**, *343*, 34–43, doi:10.1124/JPET.112.196964.
103. Korrapati, M.C.; Howell, L.H.; Shaner, B.E.; Megyesi, J.K.; Siskind, L.J.; Schnellmann, R.G. Suramin: A Potential Therapy for Diabetic Nephropathy. *PLoS One* **2013**, *8*, e73655, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0073655.
104. Liu, N.; Tolbert, E.; Ponnusamy, M.; Yan, H.; Zhuang, S. Delayed Administration of Suramin Attenuates the Progression of Renal Fibrosis in Obstructive Nephropathy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2011**, *338*, 758–766, doi:10.1124/JPET.111.181727.
105. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* **1987**, *162*, 156–159, doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2.
106. Besseling, P.J.; Pieters, T.T.; Nguyen, I.T.N.; de Bree, P.M.; Willekes, N.; Dijk, A.H.; Bovee, D.M.; Hoorn, E.J.; Rookmaaker, M.B.; Gerritsen, K.G.; et al. A Plasma Creatinine- And Urea-Based Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate in Rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **2021**, *320*, F518–F524, doi:10.1152/AJPRENAL.00656.2020.
107. Ghasemi, A.; Jeddi, S.; Kashfi, K. The Laboratory Rat: Age and Body Weight Matter. *EXCLI J* **2021**, *20*, 1431, doi:10.17179/EXCLI2021-4072.
108. Forsten, K.E.; Fannon, M.; Nugent, M.A. Potential Mechanisms for the Regulation of Growth Factor Binding by Heparin. *J Theor Biol* **2000**, *205*, 215–230, doi:10.1006/JTBI.2000.2064.
109. Su, Z.; Widomski, D.; Ma, J.; Namovic, M.; Nikkel, A.; Leys, L.; Olson, L.; Salte, K.; Donnelly-Roberts, D.; Esbenshade, T.; et al. Longitudinal Changes in Measured Glomerular Filtration Rate, Renal Fibrosis and Biomarkers in a Rat Model of Type 2 Diabetic Nephropathy. *Am J Nephrol* **2016**, *44*, 339–353, doi:10.1159/000449324.
110. Liu, N.; Tolbert, E.; Pang, M.; Ponnusamy, M.; Yan, H.; Zhuang, S. Suramin Inhibits Renal Fibrosis in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* **2011**, *22*, 1064, doi:10.1681/ASN.2010090956.
111. Chen, B.; He, T.; Xing, Y.; Cao, T. Effects of Quercetin on the Expression of MCP-1, MMP-9 and VEGF in Rats with Diabetic Retinopathy. *Exp Ther Med* **2017**, *14*, 6022, doi:10.3892/ETM.2017.5275.

112. Carranza, K.; Veron, D.; Cercado, A.; Bautista, N.; Pozo, W.; Tufro, A.; Veron, D. Aspectos Celulares y Moleculares de La Nefropatía Diabética, Rol Del VEGF-A. *Nefrología* **2015**, *35*, 131–138, doi:10.1016/j.nefro.2015.05.013.
113. Hohenstein, B.; Hausknecht, B.; Boehmer, K.; Riess, R.; Brekken, R.A.; Hugo, C.P.M. Local VEGF Activity but Not VEGF Expression Is Tightly Regulated during Diabetic Nephropathy in Man. *Kidney Int* **69**, doi:10.1038/sj.ki.5000294.
114. Oates, J.C.; Russell, D.L.; Beusecum, J.P. Endothelial Cells: Potential Novel Regulators of Renal Inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* **322**, 2022.
115. Marfella, R.; Esposito, K.; Giunta, R.; Coppola, G.; Angelis, L.; Farzati, B.; Paolisso, G.; Giugliano, D. Circulating Adhesion Molecules in Humans: Role of Hyperglycemia and Hyperinsulinemia. *Circulation* **101**, doi:10.1161/01.CIR.101.19.2247.
116. Gu, H.F.; Ma, J.; Gu, K.T.; Brismar, K. Association of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) with diabetes and diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**, 2013.
117. Leeuwenberg, J.F.; Smeets, E.F.; Neefjes, J.J.; Shaffer, M.A.; Cinek, T.; Jeunhomme, T.M.; Ahern, T.J.; Buurman, W.A. E-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 Are Released by Activated Human Endothelial Cells in Vitro. *Immunology* **77**.
118. Undas, A.; Wiek, I.; Stêpień, E.; Zmudka, K.; Tracz, W. Hyperglycemia Is Associated with Enhanced Thrombin Formation, Platelet Activation, and Fibrin Clot Resistance to Lysis in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Diabetes Care* **2008**, *31*, 1590–1595, doi:10.2337/DC08-0282.
119. Chen, Q.; Shou, W.; Wu, W.; Wang, G.; Cui, W. Performance Evaluation of Thrombomodulin, Thrombin-Antithrombin Complex, Plasmin-A2-Antiplasmin Complex, and t-PA: PAI-1 Complex. *J Clin Lab Anal* **2019**, *33*, doi:10.1002/JCLA.22913.
120. Maric-Bilkan, C.; Flynn, E.R.; Chade, A.R. Microvascular Disease Precedes the Decline in Renal Function in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Am J Physiol Renal Physiol* **2012**, *302*, F308, doi:10.1152/ajprenal.00421.2011.
121. Edgley, A.J.; Tare, M.; Evans, R.G.; Skordilis, C.; Parkington, H.C. In Vivo Regulation of Endothelium-Dependent Vasodilation in the Rat Renal Circulation and the Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, doi:10.1152/ajpregu.00861.2007.
122. Johnstone, M.T.; Creager, S.J.; Scales, K.M.; Cusco, J.A.; Lee, B.K.; Creager, M.A. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Insulin- Dependent Diabetes Mellitus. *Circulation* **88**, doi:10.1161/01.CIR.88.6.2510.
123. Kamata, K.; Miyata, N.; Kasuya, Y. Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation and Changes in Levels of Cyclic GMP in Aorta from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Br J Pharmacol* **97**, doi:10.1111/j.1476-5381.1989.tb11993.x.

124. Jourde-Chiche, N.; Fakhouri, F.; Dou, L.; Bellien, J.; Burtey, S.; Frimat, M.; Jarrot, P.A.; Kaplanski, G.; Quintrec, M.; Pernin, V.; et al. Endothelium Structure and Function in Kidney Health and Disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 2019.
125. Sahu, D.; Saroha, A.; Roy, S.; Das, S.; Srivastava, P.S.; Das, H.R. Suramin Ameliorates Collagen Induced Arthritis. *Int Immunopharmacol* **2012**, 12, 288–293, doi:10.1016/J.INTIMP.2011.12.003.
126. Chyła-Danił, G.; Sałaga-Zaleska, K.; Kreft, E.; Krzesińska, A.; Herman, S.; Kuchta, A.; Sakowicz-Burkiewicz, M.; Lenartowicz, M.; Jankowski, M. Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes. *Pharmaceuticals* 2023, Vol. 16, Page 470 **2023**, 16, 470, doi:10.3390/PH16030470.
127. Bardal, S.; Misurski, D.; Qiu, X.; Desai, K.; McNeill, J.R. Chronic treatment with vascular endothelial growth factor preserves agonist-evoked vascular responses in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetologia* 49, doi:10.1007/s00125-006-0151-5.

15. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej



Suramin enhances the urinary excretion of VEGF-A in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats

Gabriela Chył¹ · Kornelia Sałaga-Zaleska¹ · Kamil Dąbkowski¹ · Agnieszka Kuchta¹ · Maciej Jankowski¹ 

Received: 21 December 2020 / Revised: 11 February 2021 / Accepted: 13 February 2021 / Published online: 26 February 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Background Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and P2-receptors (P2Rs) are involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. The processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases (MMP) regulates its bioavailability. Since the ATP-induced release of MMP-9 is mediated by P2Rs, we investigated the effect of suramin on VEGF-A excretion in urine and the urinary activity of total MMP and MMP-9.

Methods The effect of suramin (10 mg/kg, *ip*) on VEGF-A concentration in serum and its excretion in urine was investigated in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats over a 21-day period. The rats received suramin 7 and 14 days after a single STZ injection (65 mg/kg, *ip*). A 24-h collection of urine was performed on the day preceding the administration of STZ and the first administration of suramin and on the day before the end of the experiment. The VEGF-A in serum and urine, albumin in urine, and total activity of MMP and MMP-9 in urine were measured using immunoassays.

Results Diabetic rats are characterized by a sixfold higher urinary excretion of VEGF-A. Suramin potentiates VEGF-A urinary excretion by 36% ($p=0.046$) in non-diabetic and by 75% ($p=0.0322$) in diabetic rats but it did not affect VEGF-A concentration in the serum of non-diabetic and diabetic rats. Urinary albumin excretion as well as total MMP and MMP-9 activity was increased in diabetic rats, but these parameters were not affected by suramin.

Conclusion Suramin increases the urinary excretion of VEGF-A in normoglycemia and hyperglycaemia, possibly without the involvement of MMP-9. Suramin may be used as a pharmacological tool enhancing VEGF-A urinary secretion.

Keywords Diabetes · Glomerulus · Kidney · P2-receptors · Streptozotocin · Vascular endothelial growth factor A

Introduction

Diabetic nephropathy is a major complication of diabetes leading to end-stage renal disease and is currently a major cause of morbidity and mortality in diabetic patients. It is characterized, at the organ level, by progressive kidney damage reflected by an increase in albumin excretion in urine and a decline in glomerular filtration. Moreover, at a cellular level, it is characterized by the dysfunctions of vascular endothelial cells and glomerular visceral epithelial cells called podocytes [1]. These conditions may be related to changes in membrane receptor expression/activity and the dysregulation of angiogenic factors [2, 3]. Since glomerular endothelial cells and podocytes cross-talk, a

disturbance occurring in one of them may be transmitted to the other, thus aggravating and accelerating the damage to the glomerulus [4]. Among the receptors whose expression/activity is altered are those activated by the extracellular nucleotides called P2-receptors (P2Rs). One of the P2Rs that may be relevant is the P2X7 receptor (P2X7R). For example, the increased glomerular expression of the ATP-sensitive P2X7R in a diabetic rat model has been shown [5], and we have previously shown that glomerular microvasculature reactivity to an agonist of P2X7R is increased in streptozotocin (STZ)-induced diabetes [6]. While it has been shown that P2Rs are involved in intraglomerular extracellular matrix protein accumulation in diabetic glomeruli [7], diabetic nephropathy is associated with both systemic and local renal inflammation with the participation of crucial inflammatory cells expressing P2Rs influencing the release of cytokines, which further act via the nuclear transcription of factor-kappa B [8]. On the other hand, P2Rs influence the activity of the matrix metalloproteinases (MMPs),

✉ Maciej Jankowski
maciej.jankowski@gumed.edu.pl

¹ Department of Clinical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Dębinki 7, 80-210 Gdańsk, Poland

key enzymes in the extracellular matrix metabolism, as shown by studies in which the ATP-induced rapid release of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is mediated by P2X7R [9]. MMP-9 expression in human podocytes and enhanced MMP-9 urinary concentrations in patients with diabetic nephropathy have also been reported [10]. In turn, MMPs regulate the bioavailability of the vascular endothelial growth factors family (VEGF), major angiogenesis and vascular permeability factors [11]. VEGF members, among which VEGF-A plays a key role, facilitate cellular responses by binding to tyrosine kinase receptors on a cell's surface [11]. VEGF-A is produced in glomeruli by podocytes and diffuses towards capillary lumens, where it reaches the glomerular endothelial cells and causes an increase in glomerular permeability to water [12, 13]. The genetic-based study has provided evidence that increased local renal VEGF levels affect the glomerular endothelium fenestration, which is a surrogate marker for local VEGF-A bioactivity [14]. Importantly, elevated VEGF-A levels are associated with glomerular pathologies in diabetic nephropathy [15]. On the other hand, the results of the genetic-based studies suggest that VEGF-A in diabetic kidneys may play protective role [16].

Thus, we hypothesized that VEGF-A bioavailability in glomeruli may be regulated by P2Rs. To reach the study's aim, non-toxic suramin, a broad-spectrum P2R antagonist, was used in STZ-induced diabetic rats, and the urinary excretion of VEGF-A and activities of MMP and MMP-9 in urine were measured.

Materials and methods

Ethical approval

The experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes and approved by the local Bioethics Commission in Bydgoszcz, Poland (Approval no 35/2017).

Animals

The studies were performed on male Wistar rats (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Gdańsk, Poland), weighing 200–250 g, aged 8–10 weeks, housed under a 12-h light/12-h dark cycle, and fed a standard pellet diet (Labofeed B, Kcynia, Poland) and water ad libitum. The rats were divided into four groups ($n = 7$ for each group):

- (1) control, citrate buffer injected at day +1, CON;
- (2) control + suramin (10 mg/kg b.w., *ip*), injected at days +7 and +14 after the citrate buffer injection, SUR;
- (3) streptozotocin (65 mg/kg b.w., *ip*), injected at day +1, STZ;
- (4) streptozotocin + suramin (10 mg/kg b.w., *ip*), injected at days +7 and +14 after STZ injection, STZ + SUR.

The experiments were performed on rats with tail blood glucose concentrations greater than 11.1 mmol/l measured at day +6 after STZ injection. The effectiveness of hyperglycaemia induction was 87.5%. Twenty-four-hour urine samples were collected in metabolic cages (Tecniplast, Italy) at days +6 and +20 after the STZ injection. The urine was collected in tubes containing protease inhibitors (5×10^{-4} M PMSF, 10^{-6} M leupeptin) and 3×10^{-3} M NaN_3 . At the end of the experiment on day +21, all animals were overdosed with anaesthesia, their thoraxes were opened and blood was drawn by cardiac puncture to preserve the serum of each rat, which resulted in the death of the rats. A schematic of the procedure is depicted in Fig. 1.

Analytic methods

Blood glucose was determined with an Accu-Chek™ Performa glucometer (Roche, Basel, Switzerland), and urine volume was determined gravimetrically. Immunoenzymatic assays were used to measure the concentration of rat albumin (AssayPro, USA, Cat. No. ERA3201-1) and rat VEGF-A (Thermo Scientific, USA, Cat. No. ERVEGFA). A fluorometric assay was used to measure the activity of total MMP (AnaSpec, USA Cat. No. AS-71158) and MMP-9 (AnaSpec, USA Cat. No. AS-71155), while the creatinine concentration was measured by the enzymatic method (Wiener lab., Argentina).

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using Statistica 13.3 (TIBCO Software). A Shapiro–Wilk test was used to test the determined normality of the distribution of variables; continuous variables were expressed as mean \pm SE (standard error). Statistical significance between the groups was determined using two-way ANOVA and post hoc Tukey's multiple comparisons. A paired *t* test was used to assess changes in repeated measures. Univariate correlations were assessed

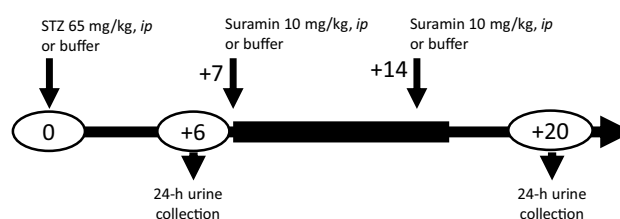


Fig. 1 Scheme of the experimental procedure

using standardized Pearson coefficients. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Materials

Leupeptin was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All other agents were purchased from Avantor™ Performance Material Poland S.A. (Gliwice, Poland).

Results

The serum concentrations of VEGF-A were CON, 24.4 ± 3.8 ng/l; SUR, 23.0 ± 1.7 ng/l; STZ, 23.6 ± 2.5 ng/l; and STZ + SUR: 25.8 ± 3.3 ng/l (Fig. 2a). The main effects of diabetes ($F_{1,12} = 0.1113$, $p = 0.744$) and suramin ($F_{1,12} = 0.0187$, $p = 0.893$) on VEGF-A concentration in serum were not significant. Figure 2b presents results of VEGF-A excretion in urine. Two-way ANOVA revealed the significant main effects of diabetes ($F_{1,19} = 453.25$, $p < 0.0001$), suramin ($F_{1,19} = 52.277$, $p < 0.0001$), and a diabetes-by-suramin interaction ($F_{1,19} = 39.095$, $p < 0.0001$). Post hoc comparisons showed a sixfold increased VEGF-A excretion in diabetic rats compared with non-diabetic rats (180 ± 14 pg/mg creatinine vs. 29 ± 5 pg/mg creatinine, $p < 0.0001$). It is noteworthy that suramin additionally increases the urinary excretion of VEGF-A by 76% in diabetic rats (180 ± 14 pg/mg creatinine vs. 316 ± 8 pg/mg creatinine, $p < 0.0001$). An intergroup data analysis of VEGF-A excretion in urine under the influence of suramin did not reveal a statistically significant effect of suramin in non-diabetic rats. However, as shown in Fig. 3a, b an intragroup analysis of urinary VEGF-A excretion using a paired samples t test shows that 2 weeks exposure to suramin leads to a statistically significant increase in urinary VEGF-A excretion of 36% in non-diabetic rats (28 ± 4 pg/mg creatinine vs. 38 ± 5 pg/mg creatinine, $p = 0.046$) (Fig. 3a) and of 75% in diabetic rats (181 ± 37 pg/mg creatinine vs. 316 ± 8 pg/mg creatinine, $p = 0.0322$) (Fig. 3b).

Figure 4 shows the results of urinary albumin excretion. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of diabetes ($F_{1,21} = 137.2$, $p < 0.0001$). No significant main effect of suramin or interaction was present. The albumin excretion in diabetic rats was threefold higher in diabetic rats compared with non-diabetic rats (6.8 ± 1.0 μ g/mg creatinine vs. 2.3 ± 0.2 μ g/mg creatinine, $p < 0.0001$). Of note, there was significant correlation between urinary excretion of albumin and VEGF-A in diabetic rats ($r = 0.8817$, $p < 0.048$).

The results of total MMP and MMP-9 activities in urine are presented in Fig. 5a, b. Two-way ANOVA revealed the significant main effects of diabetes on total MMP ($F_{1,24} = 231.0$, $p < 0.0001$) and MMP-9 activities ($F_{1,24} = 261.3$, $p < 0.0001$). Diabetic rats were characterized by a 6.5-fold higher activity

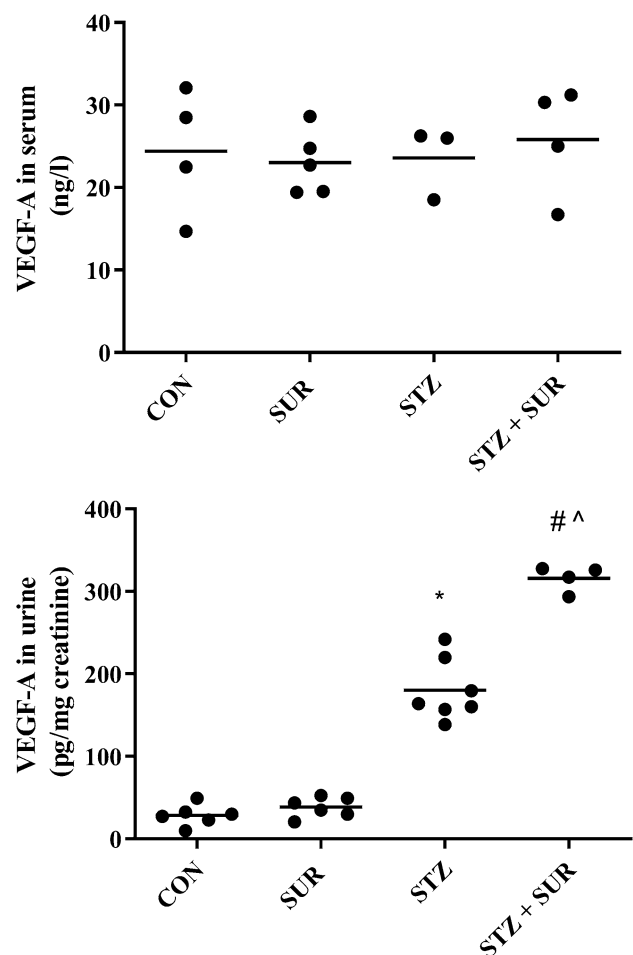


Fig. 2 The effects of suramin (10 mg/kg, *ip*) on VEGF-A concentration in serum (a) and urinary excretion of VEGF-A (b) in non-diabetic and streptozotocin-induced (65 mg/kg, *ip*) diabetic rats. Non-diabetic and 1-week diabetic rats were injected with PBS (CON and STZ) and suramin (SUR and STZ + SUR) once per week for 2 weeks. The results are presented as individual data points with means. Statistical significance was determined using two-way ANOVA with a Tukey post hoc test, * $p < 0.0001$ vs. CON, # $p < 0.0001$ vs. SUR, ^ $p < 0.0001$ vs. STZ.

of total MMP (5.25 ± 0.38 nmol/min vs. 0.81 ± 0.12 nmol/min, $p < 0.0001$, Fig. 5a) and about an eightfold higher activity of MMP-9 (4.69 ± 0.34 nmol/min vs. 0.59 ± 0.09 nmol/min, Fig. 5b) than non-diabetic rats.

The main effects of suramin on total MMP ($F_{1,24} = 0.3476$, $p = 0.561$) and MMP-9 activities ($F_{1,24} = 0.8143$, $p = 0.3758$) were not significant, nor were the diabetes-by-suramin interactions.

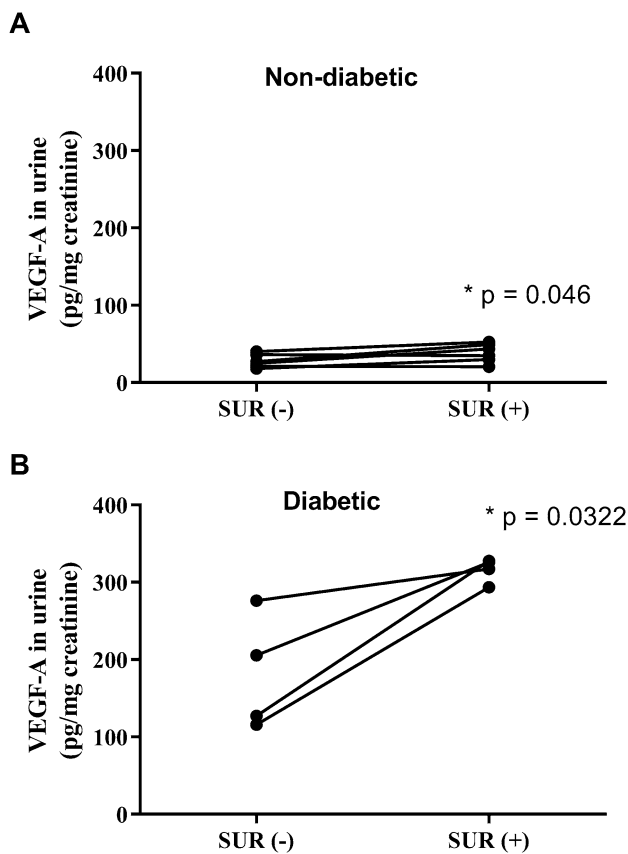


Fig. 3 The effects of suramin (10 mg/kg, *ip*) on VEGF-A urinary excretion in non-diabetic and streptozotocin-induced (65 mg/kg, *ip*) diabetic rats. The results are presented as individual data points before, SUR (–), and after 14 days of suramin exposition, SUR (+), in non-diabetic (a) and diabetic (b) rats. Statistical significance was determined using a paired samples *t* test, **p* as indicated

Discussion

The present study has provided evidence that the urinary excretion of VEGF-A may be pharmacologically modified by suramin. Polysulfonated naphthylurea is used in laboratories as a broad-spectrum antagonist of P2Rs and in clinics for a wide array of potential applications, from parasitic and viral diseases to cancer, snakebite and autism [17]. In our experiments, the administration of suramin (10 mg/kg, *ip*) once per week for 2 weeks leads to a significant enhancement of the urinary excretion of VEGF-A, both in normoglycemic (about 36%) and STZ-induced hyperglycaemic rats (about 60–70%). This finding seems to be of considerable importance for understanding the pathogenesis of diabetic nephropathy and perhaps extending the pharmacological possibilities of kidney protection in diabetic patients. VEGF-A is a key secreted glycoprotein of the VEGF family of heparin-binding growth factors that play an important role in the regulation of glomerular structure and function and may also influence the outcome

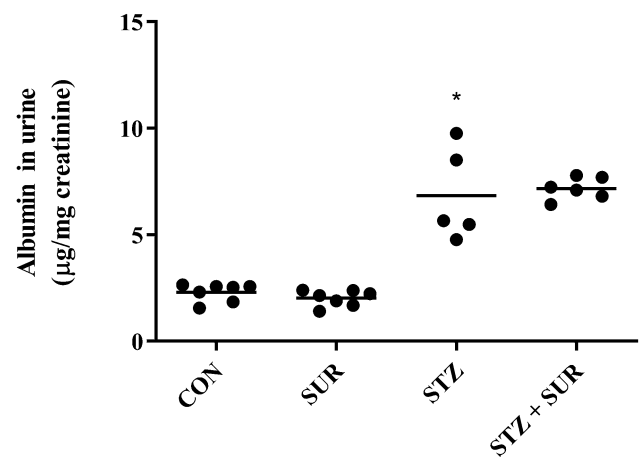


Fig. 4 The effect of suramin (10 mg/kg, *ip*) on urinary albumin excretion in non-diabetic and streptozotocin-induced (65 mg/kg, *ip*) diabetic rats. Non-diabetic and 1-week diabetic rats were injected with PBS (CON and STZ) and suramin (SUR and STZ+SUR) once per week for 2 weeks. The results are presented as individual data points with means. Statistical significance was determined using two-way ANOVA with Tukey post hoc test, * $p < 0.0001$ vs. CON, # $p < 0.0001$ vs. SUR

of diabetic kidney disease. The upregulation of VEGF-A in glomeruli is observed in the early stages of diabetes [15], and on this observation anti-VEGF-A therapy is based. In STZ-induced diabetic rats, treatment with monoclonal anti-VEGF antibodies decreased hyperfiltration, albuminuria and glomerular hypertrophy [18]. However, the outcomes of VEGF-A inhibition in experimental diabetes have been conflicting [19]. Regardless, there is strong evidence that VEGF-A plays a pivotal protective role in the pathogenesis of microangiopathic processes [20]. Moreover, the results of the genetic-based studies have provided evidence that the upregulation of VEGF-A in diabetic kidneys protects the microvasculature from injury [16].

To achieve significant therapeutic benefits, while at the same time taking into account the short half-life and high susceptibility to degradation of VEGF-A in vivo, therapeutic management may require intrarenal administration, which in clinical conditions seems unlikely to be achieved today. Thus, the therapeutic challenge is to find the agents that affect the renal/intraglomerular concentration of VEGF-A that could be administered to patients on an outpatient basis.

Suramin as reported is mostly accumulated in the kidneys and half-life allows it to be administered once per week [21]. It has been previously shown that suramin administered intraperitoneally twice at weekly intervals prevented the rise of 24-h proteinuria and attenuated renal fibrosis and glomerular damage in a remnant kidney model of chronic kidney disease [22]. In our experiment model of early stage diabetes, we have noticed not only significant changes in the urinary excretion of albumin in diabetic rats but also in

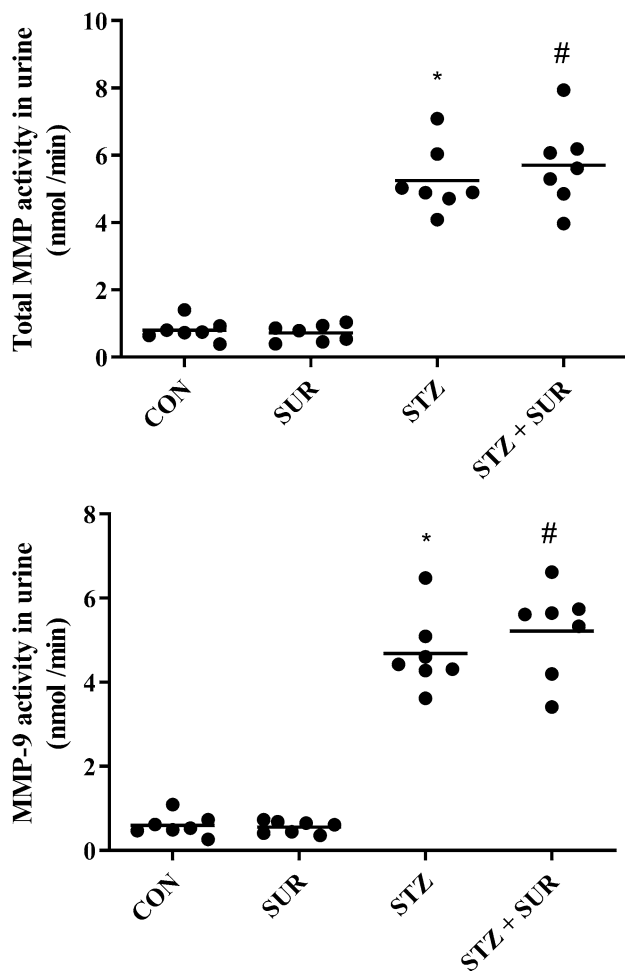


Fig. 5 The effects of suramin (10 mg/kg, *ip*) on urinary activities of total matrix metalloproteinases (MMP) (A) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (B) in non-diabetic and streptozotocin-induced (65 mg/kg, *ip*) diabetic rats. Non-diabetic and one-week diabetic rats were injected with PBS (CON and STZ) and suramin (SUR and STZ+SUR) once per week for 2 weeks. The results are presented as individual data points with means. Statistical significance was determined using two-way ANOVA with a Tukey post hoc test, * $p < 0.0001$ vs. CON, # $p < 0.0001$ vs. SUR

normoglycemic rats, both treated with suramin. Our observation is supported by results obtained from db/db mice in which delayed administration of a single dose of suramin did not affect protein excretion in 9- and 17-week mice, suggesting that suramin did not affect the number of podocytes or podocyte-specific proteins involved in the pathogenesis of albuminuria in this mice strain [23].

As VEGF-A is mainly produced in podocytes, the increased urinary excretion of VEGF-A indicates increased production of this cytokine in podocytes, from where it passes through the glomerular filter into the lumen of capillaries and interacts there with its receptors located on glomerular endothelial cells. Using a model of VEGF transport against glomerular filtration flow, it has

been calculated that about one-third of podocyte-derived VEGF-A reaches the glomerular endothelial cells via diffusion [13]. Moreover, the recent study has provided evidence of unexpected positive correlation between single-nephron glomerular filtration rate with VEGF-A back diffusion [14]. Taking into account that suramin enhances the urinary excretion of VEGF-A by 60–70% in diabetic rats, one may expect that local concentration in the glomerulus may be increased by about 20%. We measured the VEGF-A concentration in blood and did not find significant differences in this parameter between experimental groups. This suggests a possible effect of suramin on local intrarenal rather than systemic VEGF-A concentrations, which is consistent with the pharmacokinetic properties of suramin accumulation in the kidneys. One should also take into account the results of experiments carried out on cultured endothelial cells, the results of which may suggest that suramin may act as a factor limiting the process of angiogenesis stimulated by VEGF-A [24].

The mechanism of how suramin induces the elevation of VEGF-A excretion in urine is open to question. The bio-availability of VEGF-A is regulated by its processing by MMPs, especially MMP-9, expressed in podocytes and regulated by P2X7R upregulated in diabetes [5, 9, 25]. We observed increased activities of MMP and MMP-9 in diabetic rats, which are consistent with clinical studies in which, for example, the level of urinary MMP-9 is increased in patients with diabetic nephropathy, and positively correlates with the clinical stage of the disease [10]. The increase in MMP-9 activity may be responsible for diabetes-associated enhanced renal production of VEGF-A [10]. In our experiments, the urinary activities of MMP and MMP-9, both in normoglycemic and hyperglycaemic rats, were not affected by suramin. The pharmacology data for P2X7R suggest that the direct *in vivo* action of suramin on MMPs via P2X7R is hardly possible because of low potency, namely $IC_{50} \sim 70 \mu M$ at human P2X7R receptors and $IC_{50} > 300 \mu M$ at rat P2X7R receptors [26, 27]. It seems possible that the suramin concentration in the blood of our experimental rats may not reach adequate levels to block P2X7Rs because it has been shown that the administration of suramin at a dose of 10 mg/kg twice per week yields plasma concentrations below $50 \mu M$ [28].

In conclusion, our results show that suramin administered once per week enhanced already increased VEGF-A excretion in diabetic rats and is also able to increase the physiological level of VEGF-A excretion in normoglycemic rats. We believe that our observations may contribute to the extension of therapeutic possibilities in diabetic patients aimed at the protection of glomerular microcirculation. This, in turn, will result in slowing down the pathological processes underlying the development of diabetic kidneys.

Author contributions Conceptualization—M.J.; methodology—G.C., K.S.-Z.; validation—A.K.; formal analysis—G.C., K.S.-Z., A.K., M.J.; investigation—G.C., K.D.; writing—original draft preparation—G.C.; writing—review and editing—K.S.-Z., A.K., M.J.; supervision M.J.; project administration and funding acquisition M.J.

Funding This work was supported by the National Science Centre Poland Grants to MJ (2016/23/B/NZ5/02632).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declared that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2333–40.
- Fu H, Liu S, Bastacky SI, Wang X, Tian XJ, Zhou D. Diabetic kidney diseases revisited: a new perspective for a new era. *Mol Metab*. 2019;30:250–63.
- Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(12):2032–45.
- Daehn IS. Glomerular endothelial cell stress and cross-talk with podocytes in early [corrected] diabetic kidney disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:76.
- Vonend O, Turner CM, Chan CM, Loesch A, Dell'Anna GC, Srai KS, Burnstock G, Unwin RJ. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int*. 2004;66(1):157–66.
- Kasztan M, Piwkowska A, Kreft E, Rogacka D, Audzeyenka I, Szczepanska-Konkel M, Jankowski M. Extracellular purines' action on glomerular albumin permeability in isolated rat glomeruli: insights into the pathogenesis of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(1):F103–11.
- Solini A, Iacobini C, Ricci C, Chiozzi P, Amadio L, Pricci F, Di Mario U, Di Virgilio F, Pugliese G. Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: role in diabetic and other glomerular diseases. *Kidney Int*. 2005;67(3):875–85.
- Pérez-Morales RE, Del Pino MD, Valdivielso JM, Ortiz A, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Inflammation in diabetic kidney disease. *Nephron*. 2019;143(1):12–6.
- Gu BJ, Wiley JS. Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor. *Blood*. 2006;107(12):4946–53.
- Li SY, Huang PH, Yang AH, Tarng DC, Yang WC, Lin CC, Chen JW, Schmid-Schönbein G, Lin SJ. Matrix metalloproteinase-9 deficiency attenuates diabetic nephropathy by modulation of podocyte functions and dedifferentiation. *Kidney Int*. 2014;86(2):358–69.
- Bartlett CS, Jeansson M, Quaggin SE. Vascular growth factors and glomerular disease. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:437–61.
- Salmon AH, Neal CR, Bates DO, Harper SJ. Vascular endothelial growth factor increases the ultrafiltration coefficient in isolated intact Wistar rat glomeruli. *J Physiol*. 2006;570(Pt 1):141–56.
- Katavetin P, Katavetin P. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. 2008;359(2):205–6.
- Kuppe C, Rohlfes W, Grepl M, Schulte K, Veron D, Elger M, Sanden SK, Saritas T, Andrae J, Betsholtz C, Trautwein C, Hausmann R, Quaggin S, Bachmann S, Kriz W, Tufro A, Floege J, Moeller MJ. Inverse correlation between vascular endothelial growth factor back-filtration and capillary filtration pressures. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(9):1514–25.
- Carranza K, Veron D, Cercado A, Bautista N, Pozo W, Tufro A. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A. *Nefrologia*. 2015;35(2):131–8.
- Sivaskandarajah GA, Jeansson M, Maezawa Y, Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Vegfa protects the glomerular microvasculature in diabetes. *Diabetes*. 2012;61(11):2958–66.
- Wiedemar N, Hauser DA, Mäser P. 100 years of suramin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:3.
- de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(5):993–1000.
- Guise E, Chade AR. VEGF therapy for the kidney: emerging strategies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;315(4):F747–f751.
- Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1129–36.
- McNally WP, DeHart PD, Lathia C, Whitfield LR. Distribution of [¹⁴C] suramin in tissues of male rats following a single intravenous dose. *Life Sci*. 2000;67(15):1847–57.
- Liu N, Tolbert E, Pang M, Ponnusamy M, Yan H, Zhuang S. Suramin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(6):1064–75.
- Korrapati MC, Howell LA, Shaner BE, Megyesi JK, Siskind LJ, Schnellmann RG. Suramin: a potential therapy for diabetic nephropathy. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e73655.
- Waltenberger J, Mayr U, Frank H, Hombach V. Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(7):1523–9.
- Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*. 2005;169(4):681–91.
- Chessell IP, Michel AD, Humphrey PP. Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor. *Br J Pharmacol*. 1998;124(6):1314–20.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 2002;82(4):1013–67.
- Zhang Y, Song S, Yang F, Au JL, Wientjes MG. Nontoxic doses of suramin enhance activity of doxorubicin in prostate tumors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(2):426–33.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes

Gabriela Chyła-Danił^{1,*}, Kornelia Sałaga-Zaleska¹, Ewelina Kreft¹, Aleksandra Krzesińska¹, Sylwia Herman², Agnieszka Kuchta¹, Monika Sakowicz-Burkiewicz³, Małgorzata Lenartowicz² and Maciej Jankowski¹

¹ Department of Clinical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Dębinki 7, 80-210 Gdańsk, Poland

² Laboratory of Genetics and Evolutionism, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Kraków, Poland

³ Department of Molecular Medicine, Medical University of Gdańsk, Dębinki 7, 80-210 Gdańsk, Poland

* Correspondence: gabriela_chyla@gumed.edu.pl; Tel.: +48-58-349-2789

Abstract: Diabetic nephropathy (DN) accounts for approximately 50% of end-stage renal diseases. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is thought to be a critical mediator of vascular dysfunction in DN, but its role is unclear. The lack of pharmacological tools to modify renal concentrations further hinders the understanding of its role in DN. In this study, rats were evaluated after 3 weeks of streptozotocin-induced diabetes and two suramin treatments (10 mg/kg, *ip*). Vascular endothelial growth factor A expression was evaluated by western blot of glomeruli and immunofluorescence of the renal cortex. RT-PCR for receptors *Vegfr1* mRNA and *Vegfr2* mRNA quantitation was performed. The soluble adhesive molecules (sICAM-1, sVCAM-1) in blood were measured by ELISA and the vasoreactivity of interlobar arteries to acetylcholine was evaluated using wire myography. Suramin administration reduced the expression and intraglomerular localisation of VEGF-A. Increased VEGFR-2 expression in diabetes was reduced by suramin to non-diabetic levels. Diabetes reduced the sVCAM-1 concentrations. Suramin in diabetes restored acetylcholine relaxation properties to non-diabetic levels. In conclusion, suramin affects the renal VEGF-A/VEGF receptors axis and has a beneficial impact on endothelium-dependent relaxation of renal arteries. Thus, suramin may be used as a pharmacological agent to investigate the potential role of VEGF-A in the pathogenesis of renal vascular complications in short-term diabetes.

Keywords: VEGF-A; vascular endothelial growth factor A; VEGFR1; VEGFR2; diabetes mellitus; diabetic nephropathy; suramin; streptozotocin



Citation: Chyła-Danił, G.; Sałaga-Zaleska, K.; Kreft, E.; Krzesińska, A.; Herman, S.; Kuchta, A.; Sakowicz-Burkiewicz, M.; Lenartowicz, M.; Jankowski, M.

Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes.

Pharmaceuticals **2023**, *16*, 470.

<https://doi.org/10.3390/ph16030470>

ph16030470

Academic Editor: Sylvain Broussy

Received: 21 February 2023

Revised: 15 March 2023

Accepted: 20 March 2023

Published: 22 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterised by hyperglycaemia and is becoming a global health burden, with a 10.5% prevalence worldwide, as estimated in 2021 [1]. Hyperglycaemia stimulates the synthesis and secretion of growth factors, including vascular endothelial growth factors (VEGF), and triggers a number of interrelated metabolic and haemodynamic effects that contribute to an increase in growth factors and lead to diabetic microvascular complications, including diabetic nephropathy (DN) [2]. Diabetic nephropathy is morphologically manifested by glomerular hypertrophy, podocyte and endothelial cell damage [3]. These pathological abnormalities result in the decline of the glomerular filtration rate (GFR) and the increase of glomerular filter permeability to albumin, resulting in increased albumin excretion in the urine [4]. Affecting up to 40% of patients with diabetes, DN may lead to end-stage renal disease, which is one of the leading causes of premature death [4]. Importantly, decreased endothelial cell survival and systemic vascular endothelial dysfunction, affecting vascular tone adjustment and permeability status, are the initiating stages of microvascular complications in diabetes [5,6]. The dysfunction of endothelial cells promotes the progression of DN [7].

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is a major member of the VEGF family of cytokines, along with VEGF-B, -C, -D and -E and placental growth factor (PlGF). The *VEGF-A* gene can be alternatively spliced to encode several isoforms that have unique biological functions, and the biological relevance of this is being investigated [8]. Vascular endothelial growth factor A is a potent angiogenic paracrine factor, whose activities include endothelial cell survival, proliferation, migration and tube formation [9]. In addition, autocrine VEGF-A signalling is required for vascular homeostasis [10]. It has also been shown to be required for the maintenance of the differentiated phenotype in endothelial cells, for example, the presence of endothelial fenestrations in glomeruli [11]. Vascular endothelial growth factor A also acts as a proinflammatory cytokine by increasing endothelial permeability and inducing adhesion molecules, including the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), which bind leukocytes to endothelial cells [12]. The distinct signal transduction mechanisms by which VEGF-A induces survival, proliferation, migration and nitric oxide (NO) production in endothelial cells are still under investigation [13]. Cellular responses to VEGF-A are primarily driven by its binding to cell surface receptors tyrosine kinases, known as VEGFR-1 and VEGFR-2. Most notably, it interacts with VEGFR-2 [14,15]. In contrast, VEGFR-1 seems to have an inhibitory role by sequestering VEGF-A, thereby preventing its interaction with VEGFR-2 [16]. Both VEGF-A and its receptors are expressed in the kidneys. Electron microscopy studies have shown that VEGF-A is localised in the foot processes of podocytes, which are the main sources of VEGF-A in the kidney, glomerular basement membrane, the lumen and on the endothelial surface, indicating that VEGF-A can be transported into endothelial cells in a direction opposite to the glomerular filtrate flow [17]. Additionally, receptors for VEGF-A are predominantly expressed on the endothelium of glomeruli, pre- and postglomerular arteries and, to a lesser extent, on mesangial cells and tubular cells [18]. The expression of VEGF-A and related receptors in the glomerulus and their biological roles suggest their potential involvement in DN [19]. Studies in streptozotocin-induced diabetic rats have depicted the upregulation of VEGF-A and VEGFR-2 in the kidneys during the early stages of DN, and glomeruli have been identified as the main site of VEGF-A binding [20]. Furthermore, it has been reported that in DN, there is an increase in plasma VEGF levels in both adults and children with diabetes [21].

Although VEGF-A was initially ascribed a negative role in the development of DN, many current reports indicate that the initial view of the role of VEGF-A was very one-sided, and the complex action of this cytokine has now been postulated [22]. This is supported by the results of studies in which the glomerular-specific depletion or overexpression of VEGF-A mice leads to glomerular pathology, suggesting the importance of a balance in VEGF-A expression [23]. Furthermore, the deletion of all VEGF-A isoforms from podocytes accelerates nephropathy in diabetic animals [24], and podocyte VEGF-A knockdown induces diffuse glomerulosclerosis in diabetic kidneys [25]. Recently, it was shown that isoform VEGF-A_{165b} via VEGFR-2 normalises glomerular permeability to albumin [26]. In humans, molecular analysis of microdissected tubulointerstitial compartments from biopsies has provided evidence that VEGF-A expression is decreased in patients with diabetes [27]. Moreover, it has been suggested that the local interaction between VEGF-A and its receptors, but not VEGF-A expression, is tightly regulated in diabetes [28]. The ambiguous role of VEGF-A in the development of DN is also reflected in the results of therapies based on the inhibition of VEGF-A-induced signalling, leading to increased protein excretion in the urine, among other things, suggesting that certain amounts of VEGF-A are needed to maintain normal glomerular function [29]. Thus, it is important to find a pharmacological or biochemical way to modulate the renal expression of VEGF-A in diabetes.

Our previous studies have shown that suramin increases the excretion of VEGF-A in the urine in short-term diabetes caused by streptozotocin, while at the same time, there are no significant changes in the blood concentration of this cytokine. This may indicate that changes in the expression of VEGF-A in the kidneys occur under the influence of suramin [30]. Suramin is used in the laboratory as a broad-spectrum antagonist of P2Rs

and also clinically with a wide array of potential applications in parasite-induced diseases, oncology, psychiatry and inflammatory diseases of the cardiovascular system [31]. Its action leads to reduced inflammation and fibrosis, including advanced fibrosis and improved renal function, such as reduced proteinuria in type 2 diabetes patients [32–34]. The mechanism of the effect of suramin is not completely known. However, it is known to interfere with the action of certain growth factors by competitive binding to their receptors [35]. Suramin mostly accumulates in the kidneys and has a long half-life, which requires it to be administered weekly [36]. As has been previously shown, suramin administered intraperitoneally at 10 mg/kg once per week for two weeks prevents 24-h proteinuria, attenuated renal fibrosis and glomerular damage from arising in the remnant kidney model of chronic kidney disease. Suramin also reduces the expression of mothers against decapentaplegic (SMAD) homolog 3, epidermal growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor, nuclear factor- κ B, extracellular-regulated kinase 1 and signal transducer and activator of transcription. It reduces the recruitment of monocytes and macrophages to the kidney by decreasing the expression of monocyte chemoattractant protein-1 [32].

The aim of our study was to assess the potential role of suramin in the regulation of renal VEGF-A and its receptors and in regulating renal endothelial function in a research model of short-term streptozotocin-induced diabetes. To achieve this objective, renal VEGF-A protein levels, *Vegfr* mRNA expression levels and the endothelial function of renal interlobar arteries were determined in short-term (3 weeks) streptozotocin-induced diabetic rats treated with suramin. Our results suggest that suramin may be considered a pharmacological tool for affecting the VEGF-A/VEGFR axis.

2. Results

2.1. Experiments In Vivo

The data on body weight, fluid intake, urine excretion and blood glucose concentration in the rats in all the experimental groups are presented in Figure 1. Suramin-untreated non-diabetic rats (CON) and suramin-treated non-diabetic rats (SUR) showed a significant increase in body weight (17%) over 2 weeks. No significant changes in body weight were observed in the diabetic rats not treated with suramin (STZ) or those treated with suramin (STZ+SUR). The nutrition variables, i.e., food intake, specific rate of body mass gain, feed efficiency ratio (FER) and efficiency of food utilisation for body weight (EFU_{BW}) are shown in Table 1. Accordingly, diabetic rats had a 1.5-fold higher food intake and a slight but significantly lower specific rate of body mass gain FER and EFU_{BW} compared to non-diabetic rats. Suramin did not significantly affect these nutritional variables in either diabetic or non-diabetic rats. The diabetic rats had higher diuresis (12-fold) and water intake (5-fold) compared to the non-diabetic rats (Figure 1). Suramin did not significantly affect these parameters in either diabetic or non-diabetic rats.

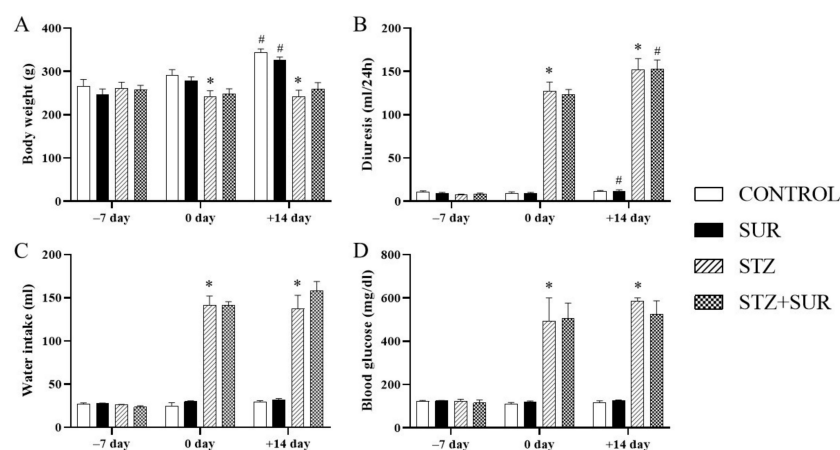


Figure 1. Functional variables output on days −7, 0 and +14 in non-diabetic and diabetic rats treated with suramin: (A) body weight, (B) diuresis, (C) water intake and (D) blood glucose. Streptozotocin

(60 mg/kg, *ip*, STZ) or citrate buffer (CON) were injected on day −7 and suramin (10 mg/kg, *ip*, SUR) or saline on days 0 and 7. The results are presented as mean ± standard error of the mean or median and 25th–75th percentile, $n = 7$ each group. Statistical significance: # $p < 0.05$ vs. day 0 in the same group (paired *t*-test/Wilcoxon test), * $p < 0.05$ vs. CON day 0 (unpaired *t*-test/Mann–Whitney U-test).

Table 1. Nutrition variable output on days +7 and +14 in non-diabetic and diabetic rats treated with suramin. Streptozotocin (60 mg/kg, *ip*, STZ) or citrate buffer (CON) were injected on day −7 and suramin (10 mg/kg, *ip*, SUR) on days 0 and +7.

Parameter	Day	Experimental Groups			
		CON	SUR	STZ	STZ+SUR
Food intake, (g)	0	20 ± 2	23 ± 1	29 ± 1 *	29 ± 1
	+14	23 ± 1	23 ± 0.4	35 ± 2 #,*	35 ± 2 #
Specific rate of body mass gain, (g/kg)	+14	184 ± 31	180 ± 26	−0.51 ± 22.2 &	43 ± 17
Feed efficiency ratio	+14	17 ± 1	15 ± 2	−0.06 ± 1.2 &	2 ± 1
Efficiency of food utilization for body weight, (g/cal)	+14	62 ± 5	56 ± 6	−0.2 ± 4.4 &	9 ± 4

The results are presented as mean ± standard error of the mean or median and 25th–75th percentile, $n = 7$ each group. Statistical significance: # $p < 0.05$ vs. day 0 in the same group (paired *t*-test/Wilcoxon test), * $p < 0.05$ vs. CON (unpaired *t*-test/Mann–Whitney U-test), & $p < 0.0001$ vs. CON (unpaired *t*-test/Mann–Whitney U-test).

2.2. Experiments In Vitro

To check the potential influence of suramin on the glomerular filtration process, we estimated the glomerular filtration rate. Figure 2A–C show the results of creatinine (A) and urea (B) concentrations in serum and the estimated glomerular filtration rate (C). There were no differences in creatinine concentrations among the study groups (Figure 2A). However, the urea concentration was 11% higher in the diabetic rats compared to the control rats (8.4 ± 0.8 mmol/L vs. 7.6 ± 0.4 mmol/L, $F_{1,15} = 4.801$, $p = 0.0446$), and the two-way ANOVA did not indicate an impact of suramin on the demonstrated differences ($F_{1,15} = 0.8335$, $p = 0.3757$) (Figure 2B). Concentrations of creatinine and urea were used to estimate glomerular filtration rates; there was an average of 13% lower eGFR in the diabetic group compared to the control rats (2078 ± 108 μ L/min vs. 2377 ± 123 μ L/min, $F_{1,15} = 9.366$, $p = 0.0079$), and suramin did not impact the observed differences ($F_{1,15} = 1.917$, $p = 0.1865$) (Figure 2C).

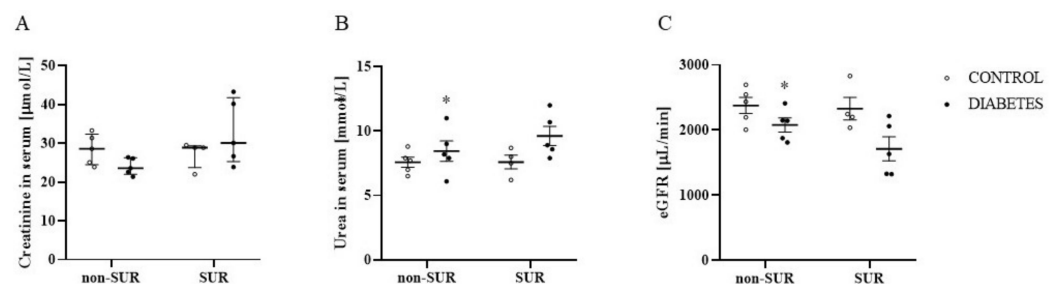


Figure 2. The effects of suramin on creatinine (A) and urea (B) concentrations in serum and estimated glomerular filtration rate (eGFR) (C) in non-diabetic and diabetic rats. Suramin (SUR, 10 mg/kg) or saline (non-SUR) were injected into non-diabetic rats (CONTROL) and streptozotocin-induced diabetic rats (DIABETES) on days 0 and +7 after streptozotocin or citrate buffer injection on day −7. The results obtained on day +14 are presented as single data points with median and 25th–75th percentile (creatinine) or with mean values ± standard error of the mean (urea, eGFR). Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. control non-SUR (two-way ANOVA).

The data regarding the VEGF-A protein level in the isolated glomeruli are shown in Figure 3. Diabetic glomeruli were characterised by a 54% reduction of VEGF-A protein level in glomeruli isolated compared to the control group (0.18 ± 0.02 vs. 0.33 ± 0.03 , $F_{1,22} = 11.86$, $p = 0.0023$). Our results also show that suramin had no significant effect on VEGF-A levels in glomeruli isolated either from non-diabetic ($p = 0.9513$) or diabetic rats ($p = 0.9824$) (Figure 3A,B).

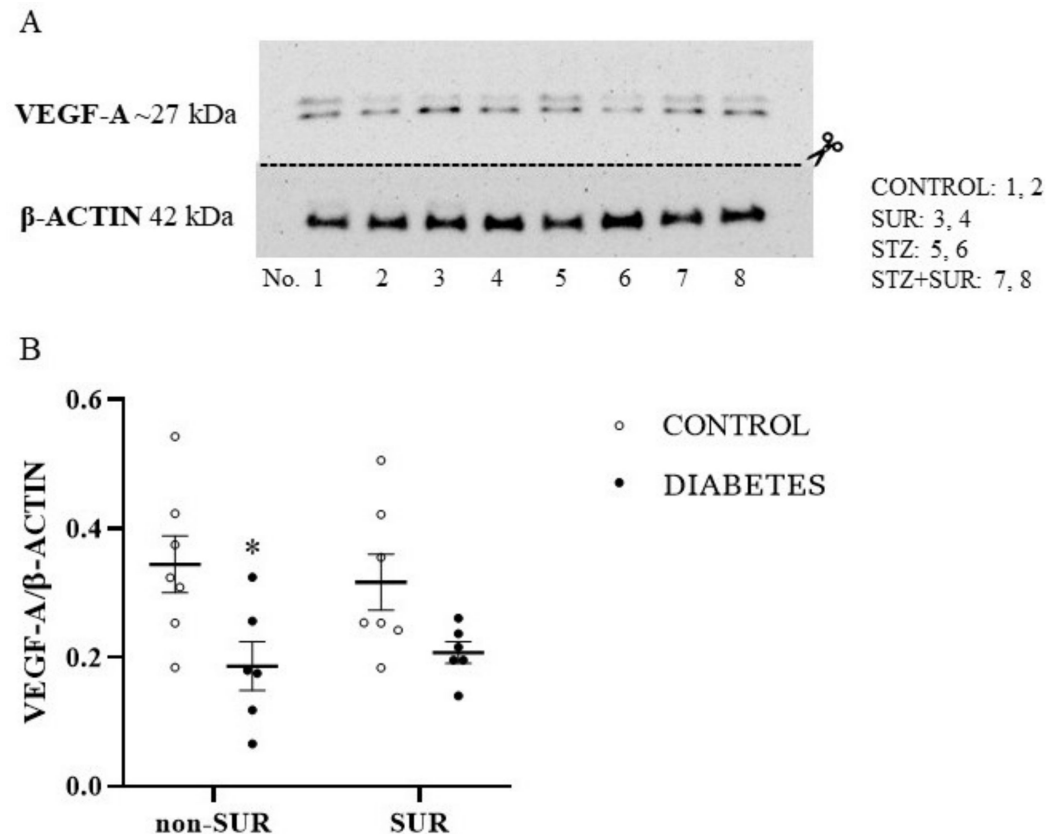


Figure 3. The effects of suramin on VEGF-A protein expression in glomeruli isolated from non-diabetic and diabetic rats. Suramin (SUR, 10 mg/kg) or saline (non-SUR) were injected into non-diabetic rats (CONTROL) and streptozotocin-induced diabetic rats (DIABETES) on days 0 and +7 after streptozotocin or citrate buffer injection on day −7. **(A)** Densitometric scans: relative optical density expressed as the VEGF-A/β-actin ratio. The results of VEGF-A/β-actin expression are presented as single data points with mean values \pm standard error of the mean. Statistical significance: * $p = 0.0023$ vs. control non-SUR (two-way ANOVA). **(B)** Representative immunoblot of VEGF-A protein expression in isolated glomeruli; lanes 1, 2: non-diabetic suramin untreated (CONTROL); lanes 3, 4: non-diabetic suramin treated (SUR); lanes 5, 6: diabetic suramin untreated (STZ); lanes 7, 8: diabetic suramin treated (STZ+SUR).

To further explore the effect of suramin on VEGF-A expression in the kidneys, an immunofluorescence study was performed. The expression and localisation of the VEGF-A protein in the kidneys of non-diabetic and diabetic rats treated or untreated with suramin are shown in Figure 4. Fluorescence staining of kidney scrapings from all the groups of the rats tested using anti-VEGF-A antibody showed positive signals in the glomerular cells (Figure 4A–D). Diabetes did not significantly affect VEGF-A expression in the glomeruli (Figure 4B,F). However, suramin significantly reduced VEGF-A expression in glomeruli by 40% in both non-diabetic and diabetic rats (7.19 ± 0.37 vs. 11.81 ± 0.84 , $F_{1,28} = 20.83$, $p < 0.0001$, Figure 4F). Interestingly, suramin also altered the localisation of VEGF-A expression in non-diabetic (Figure 4C) and diabetic (Figure 4D) rats; namely, the positive signal mainly corresponded to the localisation of parietal epithelial cells.

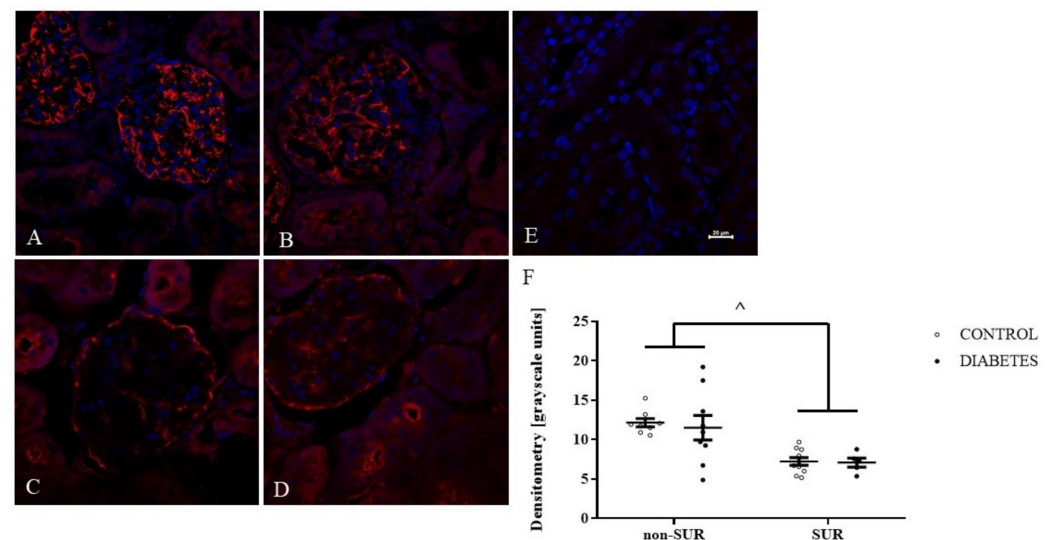


Figure 4. Immunofluorescent localisation and quantitative analysis of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in glomeruli of non-diabetic and diabetic rats treated with suramin. Suramin (SUR, 10 mg/kg) or saline (non-SUR) were injected into non-diabetic rats (CONTROL) and streptozotocin-induced diabetic rats (DIABETES) on days 0 and +7 after streptozotocin or citrate buffer injection on day −7. Glomerular immunofluorescence staining of VEGF-A (red) and counterstained cell nuclei with DAPI (blue) were analysed by confocal microscopy: (A) non-diabetic suramin-untreated; (B) diabetic suramin-untreated; (C) non-diabetic suramin-treated; (D) diabetic suramin-treated; (E) kidney sections incubated only with the secondary antibodies (negative control); the bar corresponds to 20 μ m; (F) quantitative analysis of the VEGF-A fluorescent signal in glomeruli. The mean fluorescence signal associated with VEGF-A in each glomeruli section was measured by ImageJ analysis and quantified manually as a mean grey value; the intensities (mean \pm standard deviation) are plotted in arbitrary units (a.u). Statistical significance $^* p < 0.0001$ (two-way ANOVA, Tukey for unequal sample sizes and Bonferroni post-hoc tests).

The expression and localisation of VEGF-A protein in the kidneys of non-diabetic and diabetic rats treated with suramin is presented in Figure 5. Fluorescence immunostaining of kidney sections from all the study groups of the rats using an anti-VEGF-A antibody showed positive signals in cells of the descending limb of the loop of Henle.

Next, the expression of receptors for VEGF-A (*Vegfr1* and *Vegfr2*) mRNAs in the renal cortex was measured quantitatively by RT-PCR (Figure 6). There was no difference in the *Vegfr1* mRNA levels between the diabetic and non-diabetic rats ($F_{1,19} = 1.387$, $p = 0.2535$). We also observed no effect of suramin on *Vegfr1* mRNA levels in both groups ($F_{1,19} = 0.015$, $p = 0.9036$) (Figure 6A). However, we observed different effects of suramin on the *Vegfr2* mRNA levels in the non-diabetic and diabetic rats ($F_{1,19} = 15.08$, $p = 0.001$) (Figure 6B). In the diabetic rats, suramin reduced the *Vegfr2* mRNA levels by an average of 84% ($p = 0.0001$). In contrast, there was no effect of suramin in the non-diabetic rats ($p = 0.9787$). At the same time, the observed difference between diabetic and non-diabetic rats was only significant in rats not treated with suramin ($p = 0.0002$).

Since VEGF-A may affect the expression of the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) susceptible to proteolytic cleavage, resulting in the production of soluble forms, the next experiments were performed to measure the serum concentrations of the soluble forms of VCAM-1 (sVCAM-1) and ICAM-1 (sICAM-1). The suramin did not significantly influence the sVCAM-1 concentration in the diabetic and non-diabetic rats ($F_{1,23} = 2.063$, $p = 0.1643$) (Figure 7A). There was a significant reduction (about 52%) in the sVCAM-1 concentrations in diabetic rats compared to non-diabetic rats in both animals that were treated and not treated with suramin ($F_{1,23} = 21.21$, $p = 0.0001$). Analysis of the sICAM-1 levels showed no differences between the diabetic

and non-diabetic rats ($F_{1,24} = 1.769 \times 10^{-5}$, $p = 0.9967$) (Figure 7B). There was also no effect of suramin on sICAM-1 concentrations ($F_{1,24} = 0.7933$, $p = 0.3819$).

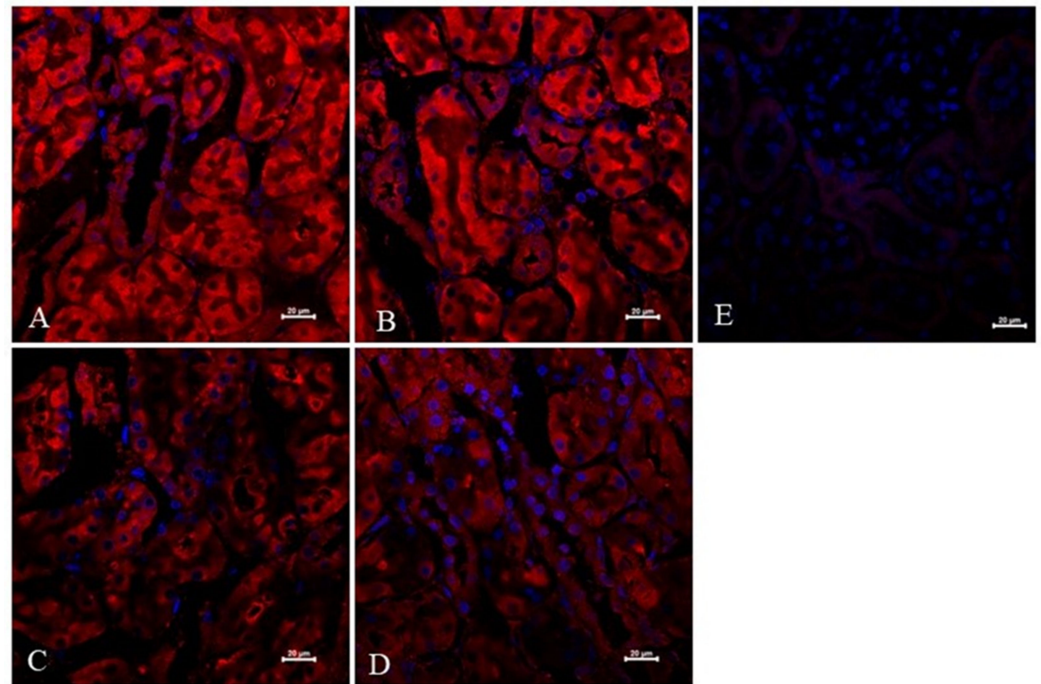


Figure 5. Immunofluorescent expression and localisation analysis of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in cells of the descending limb of the loop of Henle of non-diabetic and diabetic rats treated with suramin. Suramin (SUR, 10 mg/kg) or saline (non-SUR) were injected into non-diabetic rats (CONTROL) and streptozotocin-induced diabetic rats (DIABETES) on days 0 and +7 after streptozotocin or citrate buffer injection on day −7. Immunofluorescence staining of the descending limb of Henle’s loop for VEGF-A (red) and counterstaining of cell nuclei with DAPI (blue) were analysed by confocal microscopy: (A) non-diabetic suramin-untreated; (B) diabetic suramin-untreated; (C) non-diabetic suramin-treated; (D) diabetic suramin-treated; (E) kidney sections incubated only with the secondary antibodies (negative control); the bar corresponds to 20 μm .

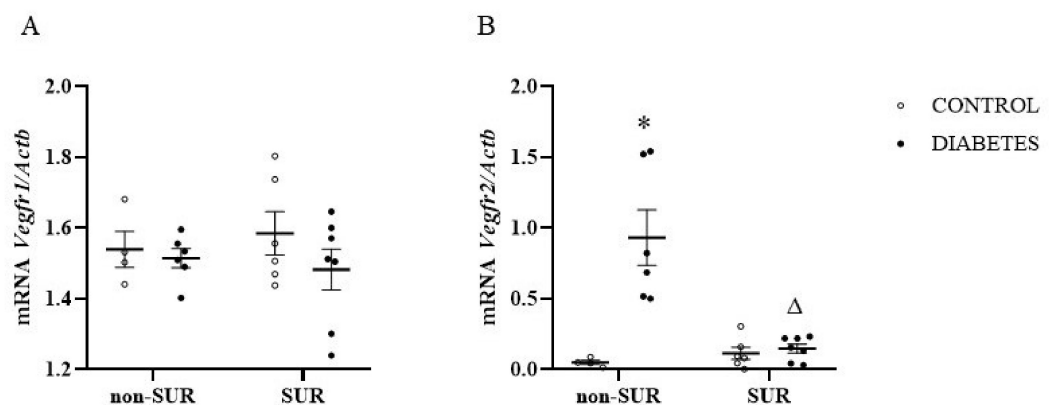


Figure 6. Effects of suramin on *Vegfr1* (A) and *Vegfr2* (B) mRNA expression in the renal cortex of non-diabetic and diabetic rats. Suramin (SUR, 10 mg/kg) or saline (non-SUR) were injected into non-diabetic rats (CONTROL) and streptozotocin-induced diabetic rats (DIABETES) on days 0 and +7 after streptozotocin or citrate buffer injection on day −7. Quantification of mRNA expression was normalised to the β -actin gene (*Actb*) reference transcript. The results are presented as single data points with mean values and standard errors of the mean. Statistical significance: * $p = 0.0002$ vs. control non-SUR, $\Delta p = 0.0001$ vs. diabetic SUR (two-way ANOVA).

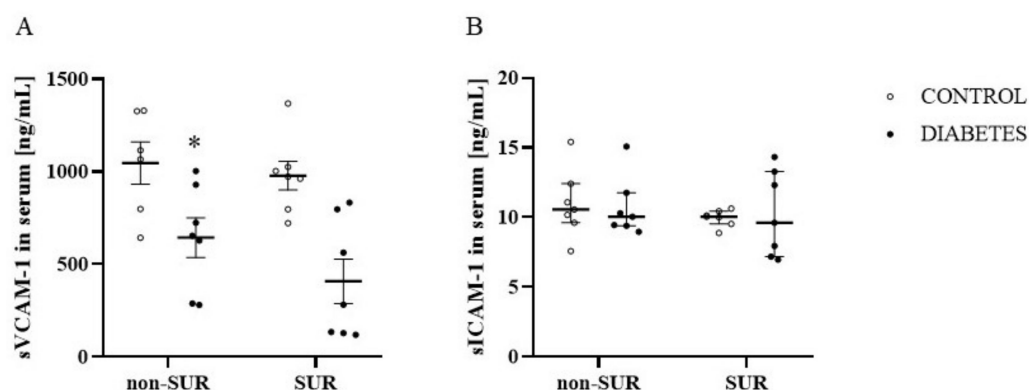


Figure 7. Effects of suramin on blood concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1 (A) and soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1 (B) in non-diabetic and diabetic rats. Suramin (SUR, 10 mg/kg) or saline (non-SUR) were injected into non-diabetic rats (CONTROL) and streptozotocin-induced diabetic rats (DIABETES) on days 0 and +7 after streptozotocin or citrate buffer injection on day −7. The results are presented as single data points with mean values \pm standard error of the mean (sVCAM-1) or as median and 25th–75th percentile (sICAM-1). Statistical significance: * $p = 0.0001$ vs. control non-SUR (two-way ANOVA).

2.3. Experiments Ex Vivo

Wire myography of renal interlobar arteries (ILA) was used to study the effect of acetylcholine (10^{-9} – 10^{-5} M) on phenylephrine-precontracted ILA isolated from non-diabetic and diabetic rats treated or untreated with suramin (Figure 8). The concentration-dependent effects of acetylcholine were observed for all the experimental groups (Figure 8A), and the maximal relaxation values are presented in Figure 8B. In the control group, a minimal relaxing effect of about 40% ($p = 0.0017$) occurred at 10^{-7} M acetylcholine, but a maximal effect of about 50% ($p < 0.001$) was observed at a concentration of 10^{-6} M. This further increased the concentration of acetylcholine up to 10^{-5} M and did not significantly enhance its relaxing effects. Suramin administration to non-diabetic rats shifted the value of the minimal effective concentration up to 10^{-6} M with an effect of about 42% ($p = 0.0236$). A maximal relaxing effect of about 45% ($p = 0.0197$) was observed at 5×10^{-5} M and was not statistically different from the maximal effect observed in the control rats (Figure 8B). In the diabetic rats, the minimal effective concentration of acetylcholine at 10^{-6} M simultaneously induced a maximal relaxing effect of about 19% ($p = 0.0065$), which was significantly lower compared to the control rats ($p < 0.05$, Figure 8B). Furthermore, suramin administration to diabetic rats induced the maximal relaxation of acetylcholine by about 53% ($p = 0.01$), with a simultaneous minimum effective concentration of 5×10^{-6} M, and this value was not significantly different from the value of the maximal relaxation observed in the control rats. The administration of suramin to diabetic animals restored the relaxation properties of acetylcholine to those found in non-diabetic animals (Figure 8C).

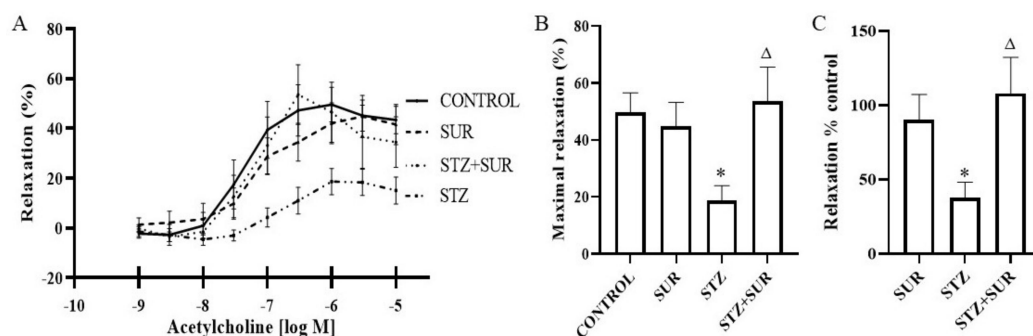


Figure 8. Relaxation effect of acetylcholine on the interlobar artery isolated from non-diabetic and diabetic rats treated with suramin. (A) The concentration-dependent effect of acetylcholine on phenylephrine-pr

-contracted interlobar artery, (B) the maximal effect of acetylcholine and (C) the effect of acetylcholine as the percentage of control set as 100%. Suramin (SUR, 10 mg/kg) or saline (non-SUR) were injected into non-diabetic rats (CONTROL) and streptozotocin-induced diabetic rats (DIABETES) on days 0 and +7 after streptozotocin or citrate buffer injection on day −7. Values are presented as the mean \pm standard error of the mean. Statistical significance: B and C * $p < 0.05$ vs. CONTROL, $\Delta p < 0.05$ vs. STZ, two-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

3. Discussion

In this study, we demonstrated the following actions of suramin in short-term streptozotocin-induced diabetic rats: (a) the decrease of VEGF-A protein expression in the renal cortex and influence on the intraglomerular distribution of VEGF-A protein, consisting of the decreased expression in the central part with the stimulation expression in an area corresponding with the location of glomerular parietal cells; (b) the reduction of increased *Vegfr2* mRNA expression in the renal cortex; (c) an increased decrease in concentration of a soluble form of the vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1) and (d) the restoration of the vasorelaxant properties of acetylcholine to the values found in non-diabetic animals. Moreover, suramin induced a decrease in renal VEGF-A protein expression in non-diabetic rats, suggesting that VEGF-A depletion in the kidney is not dependent on a high glucose concentration.

It is postulated that growth factors, such as VEGF-A, are involved in the pathogenesis of DN. However, the current reports on their actual role are unclear, pointing to their adverse effect, in particular on the permeability of the glomerular filter to albumin and to their beneficial effect on the other [22]. Another factor hindering the analysis of changes in the kidneys in the course of diabetes is the high variability of biochemical and molecular responses, depending on the duration of the disease. An incomplete understanding of the early events in the pathogenesis of DN is one of the main reasons why therapy can slow down the rate of pathology development. Currently, there are no known drugs that could reverse the pathological process developing in the kidneys during the course of diabetes. Therefore, we decided to use a model of short-term streptozotocin-induced diabetes to investigate the role of VEGF-A in the early stages of the disease. Additionally, we used suramin to modify the expression or concentration of VEGF-A, which, as we showed earlier, increases the excretion of VEGF-A in the urine and, at the same time, does not significantly change the concentration of this cytokine in the blood.

Suramin is a broad-spectrum antagonist of membrane purinoreceptor P2, but it is also taken up by endothelial cells and accumulates in the nucleus, suggesting possible action through an intracellular mechanism [37]. It is also used clinically in African trypanosomiasis, cancer, autism and inflammatory diseases of the cardiovascular system [31].

First, we evaluated the VEGF-A protein levels in short-term diabetic glomeruli and demonstrated a 54% decrease in VEGF-A protein levels in glomeruli isolated from 3-week-old diabetic rats. This finding is in accordance with a previous report indicating that, following 1 week of diabetes, VEGF-A levels in rat glomeruli decreased by 38% [38]. Furthermore, exposing mesangial cells to the high glucose concentration medium decreased levels of VEGF-A protein by 50% and mRNA by 27% [39]. It should be noted that there are conflicting reports regarding our results that indicate elevated expressions of VEGF-A in rodent kidneys; however, these are in mice glomeruli [40] or rat renal cortex but not glomeruli [20]. In humans, decreased levels of VEGF-A protein and mRNA have been reported in the glomeruli of patients with diabetes [39,41]. Next, using the western blot analysis, we did not observe a statistically significant effect of suramin on VEGF-A protein levels in glomeruli isolated from non-diabetic or diabetic rats. However, our immunofluorescence data analysis has shown that suramin induces a decrease in the VEGF-A signal in glomeruli isolated from non-diabetic and diabetic rats. Additionally, we found that suramin induces changes in the intraglomerular distribution of the VEGF-A protein. It is clear that the signal from VEGF-A in the central part of the glomerulus is weak but much increased in peripheral areas along the cells lining Bowman's capsule. Considering that changes in the

fluorescence signal correspond to the location of the parietal epithelial cells, the obtained results suggest that suramin may induce phenotypic transitions in parietal epithelial cells. This assumption requires further in-depth research, especially if it is taken into account that the mechanism of parietal epithelial cell transition is rarely understood [42].

The possible biological effects of VEGF-A should not be considered solely on the basis of VEGF-A protein expression. In addition, the level of specific receptors for this cytokine and the duration of diabetes should be taken into account, because there is evidence about increased binding of VEGF to its receptor in the endothelium of mildly injured glomeruli but decreased binding in severely injured glomeruli [28]. For this reason, we measured mRNA expression in the renal cortex for two receptors, *Vegfr1* and *Vegfr2*. We did not observe any significant changes in *Vegfr1* mRNA expression in diabetes or under the action of suramin. However, the diabetic rats had elevated levels of *Vegfr2* and, interestingly, suramin reversed this increase. The effect of short-term diabetes on *Vegfr2* has been described before [20]. However, our results show for the first time the effect of suramin treatment on the decreasing *Vegfr2* expression level. The specific roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in DN pathogenesis are not well understood, although it seems that the activation of VEGFR-2 may impair renal function. Selective stimulation of VEGFR-2 by genetic manipulation has been shown to lead to kidney injury without the aggravation of albuminuria [43]. Among the morphological indicators of renal injury caused by VEGFR-2 stimulation, mesangial expansion, macrophage influx and tubulointerstitial injury were found [43]. Instead, the small-molecule inhibitor SU54106, which blocks VEGFR-1 and VEGFR-2, ameliorates diabetic albuminuria in mice [44]. In light of the results of the previous and our present study, suramin, which reduces *Vegfr2* expression in diabetes, appears to be a promising drug which can be used to reduce kidney damage in patients with diabetes.

Physiologically, endothelial cells are in a quiescent resting state and express low levels of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1), produce nitric oxide (NO) and do not interact with circulating leukocytes [45]. However, their dysfunction is characterised by elevated levels of these molecules, resulting in adhesion of leukocytes to endothelial cells during atherosclerosis, hypertension and diabetes [46,47]. The cleavage release of the ectodomain of adhesion molecules from the endothelial cell surface results in the formation of soluble forms, sICAM-1 and sVCAM-1, and the rate of this process is related to the increased expression of membrane proteins [48]. There is evidence that even 24-h exposure of endothelial cells to high glucose concentrations leads to their activation associated with increased expression of VCAM-1 and ICAM-1 [49]. Moreover, VEGF-A stimulates the expression of ICAM-1 and VCAM-1 [12]. In the present study, we did not observe significant changes in sICAM-1 in the blood of diabetic rats, but even the sVCAM-1 concentrations in the blood decreased. These results suggest that systemic endothelial inflammation is unlikely to be elevated, if at all, in short-term streptozotocin-induced diabetes. In contrast, elevated plasma concentrations of sICAM-1 and sVCAM-1 in patients with diabetes have been shown to be associated with the progression of microalbuminuria to macroalbuminuria [50,51]. In our experiments, suramin did not affect the concentrations of sICAM-1 or sVCAM-1 in non-diabetic and diabetic rats, but it should be noted that increased expression of ICAM-1 protein in the diabetic renal cortex has previously been shown and suramin completely blocked the increased expression of ICAM-1. However, sICAM-1 and sVCAM-1 concentrations were not measured in this study [33].

Endothelial cells control the tone of the underlying vascular smooth muscle via the actions of several vasodilators, including NO, prostanoids (e.g., prostacyclin) and endothelium-derived hyperpolarising factor. Their relative contribution varies across different vascular beds, but NO appears to be the dominant player in renal endothelial vasodilator function in non-diabetes conditions. Reduced NO function is a hallmark of microvascular disease and appears to be the dominant factor in the dysfunction of endothelium-dependent vasodilation in diabetes [52,53]. Consistent with other findings [54,55], we found that the renal endothelium-dependent relaxing response to acetylcholine was attenuated in short-

term diabetes. The mechanism of diabetes-induced attenuation of acetylcholine action is related to several issues, including reduced NO bioavailability and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling, leading to the formation of superoxide anions instead of NO [56]. In the present study, suramin restored the endothelium-mediated vasorelaxation of the renal interlobar arteries. The mechanism of action of suramin is currently unknown. Whether the effect is related to the effect of suramin on intracellular metabolism or probably by changing the activity of the VEGF-A/VEGFR axis has not been identified. It has been shown that chronic treatment with VEGF-A preserves acetylcholine-evoked vascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats and this effect would be accompanied by normalisation of superoxide anion and NO levels and of endothelial NO synthase expression [57].

In conclusion, the administration of suramin affects the renal VEGF-A/VEGF receptors axis and has a beneficial impact on endothelium-dependent relaxation of renal arteries in short-term streptozotocin-induced diabetes in rats. Therefore, it is reasonable to assume that suramin may be considered a pharmacological agent modifying the activity of the VEGF-A/VEGFR axis, which may be used in research on the potential role of VEGF-A in the pathogenesis of renal vascular complications in the course of short-term diabetes.

4. Materials and Methods

4.1. Ethical Approval

The experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes and approved by the local Bioethics Commission in Bydgoszcz, Poland (approval no. 44/2019).

4.2. Animals

The experiments were performed on male Wistar rats ($n = 28$) (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Gdańsk, Poland), weighing 200–250 g, aged 8–10 weeks at the beginning of the experiments, housed under a 12-h light/12-h dark cycle, and fed a standard pellet diet (Labofeed B, Kcynia, Poland) and water ad libitum. The rats were randomly allocated into four groups ($n = 7$ per group):

1. Non-diabetes group—control group (CON): citrate buffer injected on day −7, saline injected on days 0 and +7.
2. Suramin-treated non-diabetes group (SUR): suramin (10 mg/kg, *ip*) injected on days 0 and +7 after the citrate buffer injection on day −7.
3. Diabetes group (STZ): streptozotocin (60 mg/kg, *ip*) injected on day −7, saline injected on days 0 and +7.
4. Suramin-treated diabetes group (STZ+SUR): streptozotocin (60 mg/kg, *ip*) injected on day −7 and suramin (10 mg/kg, *ip*) injected on days 0 and +7.

The streptozotocin and suramin were injected in volumes of 500 μ L. The experiments were performed on rats with tail blood glucose concentrations greater than 11 mM, measured 7 days after the STZ injections. The efficiency of hyperglycaemia induction was 87.5%. Twenty-four-hour urine samples were collected in metabolic cages (Tecniplast, Italy) one day prior to the STZ injection (−8) and on days −1 and +13 after the STZ injection. The urine was collected in tubes containing protease inhibitors (5×10^{-4} M PMSF, 10^{-6} M leupeptin) and 3×10^{-3} M NaN_3 . At the end of the experiment on day +14, all animals were overdosed with anaesthesia, their thoraxes were opened and blood was drawn by cardiac puncture to preserve the serum of each rat. A schema of the experimental protocol is presented in Figure 9.

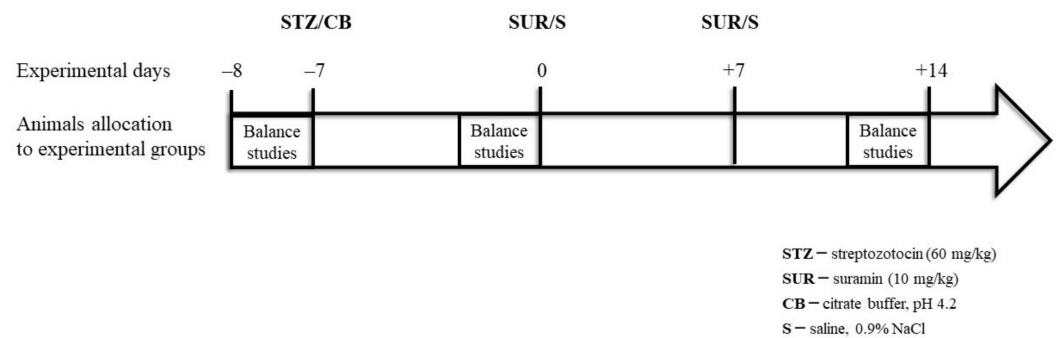


Figure 9. Schema of the experimental protocol.

4.3. Preparation of Renal Interlobar Arteries

The animals, previously anaesthetised with isoflurane inhalation anaesthetic (2.5%, flow rate 0.5 L/min), were killed by an intraperitoneal administration of a lethal dose of pentobarbital (120 mg/kg b.w.). The kidneys were removed immediately and placed in a cold preparation solution (in mM): 146 NaCl, 4.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.0 MgSO₄, 5.5 glucose, 0.025 EDTA-Na, 5 HEPES, 0.1 CaCl₂ and pH 7.4. The kidneys were sliced along the main axis of the tubular and vascular structures. The interlobar arteries were dissected, and the arterial sections (length approximately 2 mm) were isolated.

4.4. Measurements of Vascular Responses

The interlobar arteries (ILA) were mounted on 40 µm diameter stainless steel wires in a multi-chamber small vessel wire myograph (model 620M, DMT, Denmark) filled with cold preparation solution. The experimental buffers were heated to 37 °C and aerated with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) for 20 min before the experiments. After mounting, the solution was changed to an experimental solution (in mM): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 5.5 glucose, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 0.03 EDTA-Na and pH 7.4. The myograph was heated up to 37 °C under the unlimited gas flow of carbogen. Thereafter, the vessels underwent a normalisation procedure to an internal circumference equivalent to 90% of that produced under an intramural pressure of 100 mmHg. The viability of the ILA was demonstrated by the application of a high potassium solution (in mM): 123.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 5.5 glucose, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 0.03 EDTA-Na and pH 7.4. The endothelial-induced vessels relaxation was tested by the cumulative concentration–response relationships to acetylcholine (ACh) (10^{−9} to 10^{−5} M) on arteries precontracted with phenylephrine to 50–70% of the maximum arterial force to high potassium solution, and arterial relaxation was induced on stable phenylephrine-induced precontracted ILA. The data were digitised using the LabChart 8 system (ADInstruments, Dunedin, New Zealand).

4.5. Relative Quantitative Real-Time RT-PCR Analysis

The RNA was isolated from the renal cortex using the Chomczynski procedure [58] with our own modifications. The kidney tissues were homogenised in a sterile tube with 1 mL RNA extraction buffer (TRIzol Reagent, Gibco, Grand Island, NY, USA). The extraction was incited by the addition of 250 µL chloroform. After vigorous shaking, each sample was incubated at 4 °C for 15 min and spun down (10,000× g) for 15 min at 4 °C. The upper aqueous phase was transferred to a new tube and isopropanol was added in a ratio of 1:2 (isopropanol: RNA Extracol, *v/v*). The RNA precipitation was carried out overnight at −20 °C, and the next samples were centrifuged (10,000× g for 15 min at 4 °C). The RNA pellet was washed first with 99.8% ethanol and then with 75% ethanol (*v/v*), air-dried and reconstituted in nuclease-free water (15–20 µL) and stored at −20 °C. The quantity of the isolated RNA was determined by fluorometry using the Qubit RNA HS assay kit by Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer’s instructions. The gene expression levels of *Vegfr1* and *Vegfr2* were determined by real-time RT-PCR performed on a Light Cycler 480 II (Roche Diagnostic

GmbH, Mannheim, Germany) using the Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the corresponding Universal Probe Library for the rats (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The sequences of primers and probes used for *Vegfr1* and *Vegfr2* are shown in Table 2. The reaction mixture in the final volume 10 µL contained 5 µL of Multiplex RT-PCR Buffer, 1 µL of Multiplex Enzyme Mix and 0.5 µL of each primer for target transcript, 0.2 µL of a target probe, 0.2 µL of primers' reference gene, 0.2 µL of probe for reference transcript and 2 µL of total RNA. Reverse transcription was performed at 48 °C for 10 min, followed by 95 °C for 10 min. This was followed by 45 cycles of amplification at 95 °C for 10 s and then 60 °C for 40 s. The transcript levels of the target genes were normalised to that of the reference *β-actin* gene (*Actb*).

Table 2. The sequence of primers and TaqMan probes.

Gene Transcript	Accession No.	Oligonucleotide Sequence 5'-3'	Universal Probe Library Probe
<i>rFlt1 (Vegfr1)</i>	D28498	(F) cagtttccaagtggccagag (R) aggtcgcgatgaatgcac	#22
<i>rFlk1 (Vegfr2)</i>	U93306	(F) gagaccgcggttttcaga (R) aagaacaatatagctttgccatcc	#65
<i>Actb</i>	Universal ProbeLibrary Rat Actb Gene Assay (Roche, Cat #05046203001)		

4.6. Western Blotting Analysis

The glomeruli were isolated using the sieving technique and then lysed in buffer (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol and 0.5% Triton X-100) containing Protease Inhibitor Cocktail for 30 min and centrifuged at 13,000× *g* for 20 min at 4 °C. Identical amounts of total protein were denatured (98 °C, 5 min) and then subjected to 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were transferred to membranes (2 h at 200 mA) and the membranes were blocked (5% BSA, 0.05% Tween-20 in TBS) for 1 h at room temperature. Next, the membranes were incubated at 4 °C overnight with primary antibody (rabbit anti-VEGF-A, 1:500; Merck KGaA, Cat. #AB1876-I; rabbit anti-β-actin, 1:1000, Sigma-Aldrich, A2066). After washing (0.01% Tween-20 in TBS), secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (anti-rabbit IgG; BD Pharmingen, 554021) were added to the membranes for 1 h at room temperature. The reaction products were detected using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The membranes were analysed and archived in a GelDoc-It Imaging System (UVP). The rolling disc method was used to subtract the background signal.

4.7. Immunofluorescence Analysis and Confocal Microscopy of Kidney Sections

The kidneys were dissected, fixed in formalin, washed 3 times for 30 min in phosphate buffered saline (PBS) and soaked in 12.5% sucrose for 1.5 h and in 25% sucrose for no less than 24 h. All the incubations were performed at 4 °C. Next, the tissues were washed in PBS, embedded in Tissue-Tek compound, frozen in liquid nitrogen and sectioned into 20 µm slices using a cryostat (Leica). The sections were washed in PBS for 10 min, permeabilised in PBS/0.1% Triton X-100 for 20 min, and then blocked for non-specific antibody binding sites in PBS/3% BSA for 1.5 h. For protein detection, the sections were incubated overnight at room temperature with primary rabbit polyclonal anti-VEGF-A antibody (Merck KGaA, Cat. #AB1876-I) diluted in PBS/3% BSA (1:100). As a negative control, some sections were incubated without the primary antibody. Next, the sections were washed for 5 × 6 min with PBS/0.1% Triton X-100 and incubated for 1.5 h with secondary Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, Cambridge House, St. Thomas' Place, UK) diluted in PBS/3% BSA (1:500) at room temperature. Finally, the sections were washed for 10 min in PBS and mounted in Vectashield medium with DAPI (Vector Labs, Newark, NJ, USA). As a negative control, we used sections prepared without incubating with the primary antibody. Immunofluorescence (IF) analysis was performed on kidneys from

five rats from each group, and each staining was repeated three times with a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a $\times 40$ objective and Zeiss ZEN software. ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) was used to measure the mean fluorescence in each glomerular section. The signal intensity was manually quantified to generate a mean grey value, the sum of the grey values in the selected area divided by the number of pixels within that area.

4.8. Analytical Methods

The blood glucose was determined with an Accu-Chek Performa glucometer (Roche, Basel, Switzerland), and the urine volume was determined gravimetrically. Immunoenzymatic assays were used to measure the concentration of rat sVCAM-1 (MyBioSource, San Diego, CA, USA, Cat. No. MBS762680) and rat sICAM-1 (MyBioSource, San Diego, CA, USA, Cat. No. MBS266128). The creatinine (Wiener lab., Rosario, Santa Fe, Argentina) and urea (BioSystems, Barcelona, Spain) concentrations were measured by the enzymatic method.

4.9. eGFR Analysis

The GFR was estimated (eGFR, $\mu\text{L}/\text{min}$) based on the serum creatinine $<52 \mu\text{mol}/\text{L}$ and urea concentrations according to the published formula [59]:

$$\text{eGFR} = 880 \times W^{0.695} \times C^{-0.660} \times U^{-0.391} \quad (1)$$

where W is weight (g), C is creatinine concentration ($\mu\text{mol}/\text{L}$) and U is urea (mmol/L).

4.10. Nutrition Variable Analysis

The variables were calculated using the following formulas: feed efficiency ratio = (body weight gain/food intake) $\times 100$; efficiency of food utilisation for body weight = weight gain/daily kilocalories eaten; specific rate of body mass gain = (final body weight—initial body weight)/initial body weight.

4.11. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Statistica 13.3 (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA) and GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A Shapiro–Wilk test was used to test the determined the normality of the distribution of variables; continuous variables were expressed as mean \pm SE (standard error) or median and 25th and 75th percentile. The statistical significance of the differences between the groups was determined with an unpaired *t*-test or Mann–Whitney U-test. A paired *t*-test or Wilcoxon test was used to compare the values of the two related samples. The statistical significance between the groups was determined using two-way or one-way ANOVA and post hoc Tukey’s multiple comparisons. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

4.12. Materials

The streptozotocin and Triton X-100 were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The suramin sodium was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA, Cat. No. SC-507209). The protease inhibitor cocktail, BSA, acetylcholine chloride, phenylephrine hydrochloride and Tween-20 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). All the other agents were purchased from Avantor Performance Material Poland S.A. (Gliwice, Poland).

Author Contributions: Conceptualization, G.C.-D. and M.J.; methodology, G.C.-D., K.S.-Z., E.K., A.K. (Aleksandra Krzesińska), S.H. and M.S.-B.; software, G.C.-D., K.S.-Z., A.K. (Aleksandra Krzesińska), A.K. (Agnieszka Kuchta) and S.H.; validation, G.C.-D., E.K., A.K. (Agnieszka Kuchta) and S.H.; formal analysis, G.C.-D., K.S.-Z., A.K. (Agnieszka Kuchta), M.L. and M.J.; investigation, G.C.-D., K.S.-Z., E.K., A.K. (Aleksandra Krzesińska), S.H. and M.S.-B.; resources, G.C.-D., M.L. and M.S.-B.; data curation, G.C.-D., K.S.-Z. and M.J.; writing—original draft preparation, G.C.-D. and M.J.; writing—review and editing, K.S.-Z., E.K., A.K. (Aleksandra Krzesińska), A.K. (Agnieszka Kuchta), M.S.-B. and M.L.; visualization, G.C.-D., M.L. and M.J.; supervision, M.J.; project administration, G.C.-D. and M.J.; funding acquisition, G.C.-D. and M.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by the project POWR.03.02.00-00-I014/17-00 co-financed by the European Union through the European Social Fund under the Operational Programme Knowledge Education Development 2014–2020. Publication of the article was also supported by the project POWR.03.02.00-00-I014/17-00 co-financed by the European Union through the European Social Fund under the Operational Programme Knowledge Education Development 2014–2020. This research was funded by the Polish Ministry of Education and Science for the Medical University of Gdansk intended for Young Scientists, grant number 01-50022/643-0003381. This work was also supported by the “Experienced Researcher” MUG program no 71-01415/0004593/61/524/524/2022 to M.J.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of the local Bioethics Commission in Bydgoszcz, Poland (Approval no 44/2019, 12 December 2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sun, H.; Saeedi, P.; Karuranga, S.; Pinkepank, M.; Ogurtsova, K.; Duncan, B.B.; Stein, C.; Basit, A.; Chan, J.C.N.; Mbanya, J.C.; et al. IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2022**, *183*, 109119. [\[CrossRef\]](#)
2. Day, R.T.; de Cássia Cavaglieri, R.; Tabatabaimir, H.; Mantravadi, V.; Lee, M.J.; Barnes, J.L.; Kasinath, B.S.; Feliars, D. Acute Hyperglycemia Rapidly Stimulates VEGF mRNA Translation in the Kidney. Role of Angiotensin Type 2 Receptor (AT2). *Cell Signal.* **2010**, *22*, 1849–1857. [\[CrossRef\]](#)
3. Tervaert, T.W.C.; Mooyaart, A.L.; Amann, K.; Cohen, A.H.; TerenceCook, H.; Drachenberg, C.B.; Ferrario, F.; Fogo, A.B.; Haas, M.; de Heer, E.; et al. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 556–563. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Persson, F.; Rossing, P. Diagnosis of Diabetic Kidney Disease: State of the Art and Future Perspective. *Kidney Int. Suppl.* **2018**, *8*, 2–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Hempel, A.; Maasch, C.; Heintze, U.; Lindschau, C.; Dietz, R.; Luft, F.C.; Haller, H. High Glucose Concentrations Increase Endothelial Cell Permeability via Activation of Protein Kinase C α . *Circ. Res.* **1997**, *81*, 363–371. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Varma, S.; Lal, B.K.; Zheng, R.; Breslin, J.W.; Saito, S.; Pappas, P.J.; Hobson, R.W.; Durán, W.N. Hyperglycemia Alters PI3k and Akt Signaling and Leads to Endothelial Cell Proliferative Dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *289*, H1744–H1751. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Lassén, E.; Daehn, I.S. Molecular Mechanisms in Early Diabetic Kidney Disease: Glomerular Endothelial Cell Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9456. [\[CrossRef\]](#)
8. Vempati, P.; Popel, A.S.; mac Gabhann, F. Extracellular Regulation of VEGF: Isoforms, Proteolysis, and Vascular Patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 1–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Apte, R.S.; Chen, D.S.; Ferrara, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* **2019**, *176*, 1248–1264. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Lee, S.; Chen, T.T.; Barber, C.L.; Jordan, M.C.; Murdock, J.; Desai, S.; Ferrara, N.; Nagy, A.; Roos, K.P.; Iruela-Arispe, M.L. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell* **2007**, *130*, 691–703. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Kamba, T.; Tam, B.Y.Y.; Hashizume, H.; Haskell, A.; Sennino, B.; Mancuso, M.R.; Norberg, S.M.; O'Brien, S.M.; Davis, R.B.; Gowen, L.C.; et al. VEGF-Dependent Plasticity of Fenestrated Capillaries in the Normal Adult Microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *290*, H560–H576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Kim, I.; Moon, S.O.; Kim, S.H.; Kim, H.J.; Koh, Y.S.; Koh, G.Y. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-Selectin through Nuclear Factor-KB Activation in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7614–7620. [\[CrossRef\]](#)

13. Nakagawa, T. Uncoupling of the VEGF-Endothelial Nitric Oxide Axis in Diabetic Nephropathy: An Explanation for the Paradoxical Effects of VEGF in Renal Disease. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2007**, *292*, F1665–F1672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Yang, X.; Yang, Q.; Ma, B.; Wang, X.; Bove, A.M.; Simone, G. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 599281. [\[CrossRef\]](#)
15. Ferrara, N.; Gerber, H.P.; LeCouter, J. The Biology of VEGF and Its Receptors. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669–676. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Bussolati, B.; Dunk, C.; Grohman, M.; Kontos, C.D.; Mason, J.; Ahmed, A. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Modulates Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Angiogenesis via Nitric Oxide. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 993–1008. [\[CrossRef\]](#)
17. Sison, K.; Eremina, V.; Baelde, H.; Min, W.; Hirashima, M.; Fantus, I.G.; Quaggin, S.E. Glomerular Structure and Function Require Paracrine, Not Autocrine, VEGF-VEGFR-2 Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 1691–1701. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Simon, M.; Röckl, W.; Hornig, C.; Gröne, E.F.; Theis, H.; Weich, H.A.; Fuchs, E.; Yayon, A.; Gröne, H.J. Receptors of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) in Fetal and Adult Human Kidney: Localization and [125I]VEGF Binding Sites. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1998**, *9*, 1032–1044. [\[CrossRef\]](#)
19. Bartlett, C.S.; Jeansson, M.; Quaggin, S.E. Vascular Growth Factors and Glomerular Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 437–461. [\[CrossRef\]](#)
20. Cooper, M.E.; Vranes, D.; Youssef, S.; Stacker, S.A.; Cox, A.J.; Rizkalla, B.; Casley, D.J.; Bach, L.A.; Kelly, D.J.; Gilbert, R.E. Increased Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor VEGFR-2 in Experimental Diabetes. *Diabetes* **1999**, *48*, 2229–2239. [\[CrossRef\]](#)
21. Zafar, M.I.; Mills, K.; Ye, X.; Blakely, B.; Min, J.; Kong, W.; Zhang, N.; Gou, L.; Regmi, A.; Hu, S.Q.; et al. Association between the Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Metabolic Syndrome or Its Components: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2018**, *10*, 62. [\[CrossRef\]](#)
22. Majumder, S.; Advani, A. VEGF and the Diabetic Kidney: More than Too Much of a Good Thing. *J. Diabetes Complicat.* **2017**, *31*, 273–279. [\[CrossRef\]](#)
23. Eremina, V.; Sood, M.; Haigh, J.; Nagy, A.; Lajoie, G.; Ferrara, N.; Gerber, H.P.; Kikkawa, Y.; Miner, J.H.; Quaggin, S.E. Glomerular-Specific Alterations of VEGF-A Expression Lead to Distinct Congenital and Acquired Renal Diseases. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 707–716. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Sivaskandarajah, G.A.; Jeansson, M.; Maezawa, Y.; Eremina, V.; Baelde, H.J.; Quaggin, S.E. Vegfa Protects the Glomerular Microvasculature in Diabetes. *Diabetes* **2012**, *61*, 2958–2966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Veron, D.; Aggarwal, P.K.; Li, Q.; Moeckel, G.; Kashgarian, M.; Tufro, A. Podocyte VEGF-A Knockdown Induces Diffuse Glomerulosclerosis in Diabetic and in ENOS Knockout Mice. *Front. Pharm.* **2022**, *12*, 788886. [\[CrossRef\]](#)
26. Oltean, S.; Qiu, Y.; Ferguson, J.K.; Stevens, M.; Neal, C.; Russell, A.; Kaura, A.; Arkill, K.P.; Harris, K.; Symonds, C.; et al. Vascular Endothelial Growth Factor-A165b Is Protective and Restores Endothelial Glycocalyx in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 1889–1904. [\[CrossRef\]](#)
27. Lindenmeyer, M.T.; Kretzler, M.; Boucherot, A.; Berra, S.; Yasuda, Y.; Henger, A.; Eichinger, F.; Gaiser, S.; Schmid, H.; Rastaldi, M.P.; et al. Interstitial Vascular Rarefaction and Reduced VEGF-A Expression in Human Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 1765–1776. [\[CrossRef\]](#)
28. Hohenstein, B.; Hausknecht, B.; Boehmer, K.; Riess, R.; Brekken, R.A.; Hugo, C.P.M. Local VEGF Activity but Not VEGF Expression Is Tightly Regulated during Diabetic Nephropathy in Man. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 1654–1661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Tanabe, K.; Maeshima, Y.; Sato, Y.; Wada, J. Antiangiogenic Therapy for Diabetic Nephropathy. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 5724069. [\[CrossRef\]](#)
30. Chyła, G.; Sałaga-Zaleska, K.; Dąbkowski, K.; Kuchta, A.; Jankowski, M. Suramin Enhances the Urinary Excretion of VEGF-A in Normoglycemic and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pharmacol. Rep.* **2021**, *73*, 841–846. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Wiedemar, N.; Hauser, D.A.; Mäser, P. 100 Years of Suramin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01168-19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Liu, N.; Tolbert, E.; Pang, M.; Ponnusamy, M.; Yan, H.; Zhuang, S. Suramin Inhibits Renal Fibrosis in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 1064–1075. [\[CrossRef\]](#)
33. Korrapati, M.C.; Shaner, B.E.; Neely, B.A.; Alge, J.L.; Arthur, J.M.; Schnellmann, R.G. Diabetes-Induced Renal Injury in Rats Is Attenuated by Suramin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *343*, 34–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Korrapati, M.C.; Howell, L.H.; Shaner, B.E.; Megyesi, J.K.; Siskind, L.J.; Schnellmann, R.G. Suramin: A Potential Therapy for Diabetic Nephropathy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73655. [\[CrossRef\]](#)
35. Waltenberger, J.; Mayr, U.; Frank, H.; Hombach, V. Suramin Is a Potent Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor. A Contribution to the Molecular Basis of Its Antiangiogenic Action. *J. Mol. Cell Cardiol.* **1996**, *28*, 1523–1529. [\[CrossRef\]](#)
36. McNally, W.P.; DeHart, P.D.; Lathia, C.; Whitfield, L.R. Distribution of [14C]Suramin in Tissues of Male Rats Following a Single Intravenous Dose. *Life Sci.* **2000**, *67*, 1847–1857. [\[CrossRef\]](#)
37. Gagliardi, A.R.T.; Taylor, M.F.; Collins, D.C. Uptake of Suramin by Human Microvascular Endothelial Cells. *Cancer Lett.* **1998**, *125*, 97–102. [\[CrossRef\]](#)
38. Singh, A.K.; Gudehithlu, K.P.; Pegoraro, A.A.; Singh, G.K.; Basheerudin, K.; Robey, R.B.; Arruda, J.A.L.; Dunea, G. Vascular Factors Altered in Glucose-Treated Mesangial Cells and Diabetic Glomeruli. Changes in Vascular Factors Impair Endothelial Cell Growth and Matrix. *Lab. Investig.* **2004**, *84*, 597–606. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

39. Bailey, E.; Bottomley, M.J.; Westwell, S.; Pringle, J.H.; Furness, P.N.; Fechal, J.; Brenchley, P.E.C.; Harper, S.J. Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Expression in Minimal Change, Membranous, and Diabetic Nephropathy Demonstrated by Non-Isotopic in Situ Hybridisation. *J. Clin. Pathol.* **1999**, *52*, 735–738. [\[CrossRef\]](#)
40. Ichinose, K.; Maeshima, Y.; Yamamoto, Y.; Kitayama, H.; Takazawa, Y.; Hirokoshi, K.; Sugiyama, H.; Yamasaki, Y.; Eguchi, K.; Makino, H. Antiangiogenic Endostatin Peptide Ameliorates Renal Alterations in the Early of a Type 1 Diabetic Nephropathy Model. *Diabetes* **2005**, *54*, 2891–2903. [\[CrossRef\]](#)
41. Shulman, K.; Rosen, S.; Tognazzi, K.; Manseau, E.J.; Brown, L.F. Expression of Vascular Permeability Factor (VPF/VEGF) Is Altered in Many Glomerular Diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1996**, *7*, 661–666. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Cao, Y.; Lin, J.-H.; Hammes, H.-P.; Zhang, C. Cellular Phenotypic Transitions in Diabetic Nephropathy: An Update. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1038073. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Sato, W.; Tanabe, K.; Kosugi, T.; Hudkins, K.; Lanasa, M.A.; Zhang, L.; Campbell-Thompson, M.; Li, Q.; Long, D.A.; Alpers, C.E.; et al. Selective Stimulation of VEGFR2 Accelerates Progressive Renal Disease. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179*, 155–166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Sung, S.H.; Ziyadeh, F.N.; Wang, A.; Pyagay, P.E.; Kanwar, Y.S.; Chen, S. Blockade of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Ameliorates Diabetic Albuminuria in Mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 3093–3104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Oates, J.C.; Russell, D.L.; van Beusecum, J.P. Endothelial Cells: Potential Novel Regulators of Renal Inflammation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2022**, *322*, F309–F321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Marfella, R.; Esposito, K.; Giunta, R.; Coppola, G.; de Angelis, L.; Farzati, B.; Paolisso, G.; Giugliano, D. Circulating Adhesion Molecules in Humans: Role of Hyperglycemia and Hyperinsulinemia. *Circulation* **2000**, *101*, 2247–2251. [\[CrossRef\]](#)
47. Gu, H.F.; Ma, J.; Gu, K.T.; Brismar, K. Association of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) with Diabetes and Diabetic Nephropathy. *Front. Endocrinol.* **2013**, *3*, 179. [\[CrossRef\]](#)
48. Leeuwenberg, J.F.; Smeets, E.F.; Neefjes, J.J.; Shaffer, M.A.; Cinek, T.; Jeunhomme, T.M.; Ahern, T.J.; Buurman, W.A. E-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 Are Released by Activated Human Endothelial Cells in Vitro. *Immunology* **1992**, *77*, 543–549.
49. Altannavch, T.; Roubalová, K.; Kučera, P.; Anděl, M. Effect of High Glucose Concentrations on Expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without Cytokine Activation. *Physiol. Res.* **2004**, *53*, 77–82. [\[CrossRef\]](#)
50. Güler, S.; Cakir, B.; Demirbas, B.; Yönm, A.; Odabasi, E.; Önde, U.; Aykut, Ö.; Gürsoy, G. Plasma Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 Levels Are Increased in Type 2 Diabetic Patients with Nephropathy. *Horm. Res.* **2002**, *58*, 67–70. [\[CrossRef\]](#)
51. Clausen, P.; Jacobsen, P.; Rossing, K.; Jensen, J.S.; Parving, H.H.; Feldt-Rasmussen, B. Plasma Concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 Are Elevated in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus with Microalbuminuria and Overt Nephropathy. *Diabet. Med.* **2000**, *17*, 644–649. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Maric-Bilkan, C.; Flynn, E.R.; Chade, A.R. Microvascular Disease Precedes the Decline in Renal Function in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2012**, *302*, F308–F315. [\[CrossRef\]](#)
53. Edgley, A.J.; Tare, M.; Evans, R.G.; Skordilis, C.; Parkington, H.C. In Vivo Regulation of Endothelium-Dependent Vasodilation in the Rat Renal Circulation and the Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R829–R839. [\[CrossRef\]](#)
54. Johnstone, M.T.; Creager, S.J.; Scales, K.M.; Cusco, J.A.; Lee, B.K.; Creager, M.A. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Circulation* **1993**, *88*, 2510–2516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Kamata, K.; Miyata, N.; Kasuya, Y. Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation and Changes in Levels of Cyclic GMP in Aorta from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Br. J. Pharm.* **1989**, *97*, 614–618. [\[CrossRef\]](#)
56. Jourde-Chiche, N.; Fakhouri, F.; Dou, L.; Bellien, J.; Burtey, S.; Frimat, M.; Jarrot, P.A.; Kaplanski, G.; le Quintrec, M.; Pernin, V.; et al. Endothelium Structure and Function in Kidney Health and Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 87–108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Bardal, S.; Misurski, D.; Qiu, X.; Desai, K.; McNeill, J.R. Chronic Treatment with Vascular Endothelial Growth Factor Preserves Agonist-Evoked Vascular Responses in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Diabetologia* **2006**, *49*, 811–818. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159. [\[CrossRef\]](#)
59. Besseling, P.J.; Pieters, T.T.; Nguyen, I.T.N.; de Bree, P.M.; Willekes, N.; Dijk, A.H.; Bovee, D.M.; Hoorn, E.J.; Rookmaaker, M.B.; Gerritsen, K.G.; et al. A Plasma Creatinine- And Urea-Based Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate in Rats. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2021**, *320*, F518–F524. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.