

**Olga Adamska**

**Badania nad wpływem farmakologicznie wywołanej cukrzycy na morfologiczne zmiany oraz wpływem melatoniny na stężenie markerów biochemicznych stresu oksydacyjnego w więzadłach stawu kolanowego**

Abstract in Polish

Wstęp

Brak fizjologicznego działania insuliny w cukrzycy powoduje upośledzenie metabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek. Są to składniki niezbędne do homeostazy komórkowej i aktywności tkankowej. Zaburzony metabolizm glukozy implikuje negatywny wpływ na wszystkie podstawowe procesy zachodzące w organizmie i pozostaje przyczyną upośledzonego funkcjonowania i zdolności regeneracyjnych organizmu. Cukrzyca jest złożonym zaburzeniem metabolicznym, które ma kilka bezpośrednich i pośrednich skutków dla wielu procesów, począwszy od prostych do bardziej złożonych: chemotaksji, fagocytozy, infekcji, ekspresji białek, syntezy przeciwutleniaczy, degradacji wytwarzanymi wolnych rodników tlenowych, stężenia glikokortykoidów, proliferacji komórek i innych. Komórkowe i molekularne tło tych zmian a zarazem ich nieodwracalnej degradacji pozostaje wciąż nieoczywiste, natomiast kwestia wpływu zmian wywołanych cukrzycą na układu ruchu jest nadal niezbadany. Ze względu na dużą epidemiologię chorób układu kostno-stawowego, pozostaje nagłym problemem klinicznym. Na podstawie rozważań wpływu zaburzeń metabolizmu zrodziła się koncepcja badania, które ma na celu przybliżenie obrazu histopatologicznego oraz biochemicznego tkanek, poddanego niewyrównanej farmakologicznie indukowanej cukrzycy oraz zbadania możliwości wpłynięcia, tudzież odwrócenia zaistniałych zmian.

Więzadła to kluczowe elementy prawidłowo funkcjonującego układu ruchu, biochemicznie stanowią kompozycję tkanki kolagenowej, które tworzą stawy i łączą ze sobą kości. W 2/3 więzadła składają się z wody, natomiast pozostałą część tworzą: kolagen, proteoglikany, elastyna i inne białka i glikoproteiny takie jak aktyna, laminina i integryny. Więzadła odgrywają kluczową rolę w układzie ruchu, stabilizując stawy w reakcji na obciążenia i mikrourazy, które dotyczą je przez całe życie. Wszystkie czynności życiowe wraz ze starzeniem się, dojrzewaniem

i ćwiczeniami fizycznymi wpływają na właściwości biomechaniczne więzadeł oraz ich potencjał regeneracyjny. Cukrzyca obok procesu fizjologicznego starzenia organizmu stanowi czynnik utraty funkcjonalności w obrębie więzadeł, co następnie przekłada się na upośledzenie dotychczasowych funkcji spełnianych przez tkankę. Prognozy WHO szacują, że epidemiologia cukrzyca do 2030 r. sięgnie 500 milionów ludzi na świecie. Zatem kluczowym aspektem w kontekście opieki zdrowotnej nad pacjentami wydaje się wprowadzanie działań służących niwelowaniu bądź opóźnianiu wywołanych przez cukrzycę powikłań. Odkrycie histopatologicznego i biochemicznego podłoża degeneracji więzadeł jako bezpośredniego czynnika wywołującego zmiany w obrębie więzadeł stanowi podstawę do dalszych badań, służących wprowadzeniu celowanych technik leczniczych.

Cele:

1. Identyfikacja zmian w mikroarchitekturze więzadła, poznanie mechanizmów degeneracyjnych, skutkujących utratą funkcji na podstawie porównania tkanki szczura z cukrzycą z tkanką zdrowego szczura oraz klasyfikacja zmian z wykorzystaniem histologicznej oceny skali nasilenia włóknienia, utraty włókien elastycznych i zwapnienia w obrębie więzadeł wg Sairyo.
2. Analiza różnic w przebudowie i uszkodzeniu więzadeł po interwencjach operacyjnych i procedurach pozorowanych u szczurów z farmakologicznie wywołaną cukrzycą (hiperglikemią) w porównaniu do grupy kontrolnej z normoglikemią.
3. Analiza stężeń inhibitorów aktywności autooksydacyjnej peroksydazy lipidowej, tlenku azotu, S-transferazy glutationu, ceruoplazminy, albuminy, kwasu moczowego w homogenacie tkankowym oraz osoczu krwi zwierząt z grupy z farmakologicznie wywołaną cukrzycą oraz grupy z normoglikemią.
4. Analiza wpływu suplementacji melatoniny na obniżenie stężenia markerów biochemicznych stresu oksydacyjnego w homogenacie tkankowym oraz osoczu krwi pochodzących od zwierząt z farmakologicznie wywołaną cukrzycą oraz normoglikemią.
5. Analiza różnic w stężeniach markerów biochemicznych stresu oksydacyjnego w grupie badanej i kontrolnej oraz pomiędzy grupami z farmakologicznie wywołaną cukrzycą oraz od zwierząt z normoglikemią, poddanych zabiegom operacyjnym w obrębie więzadeł.

## Materiał i metody

Badanie zostało przeprowadzone z udziałem czterdziestu (40) szczurów, samców rasy Sprague-Dawley o wadze od 280 do 300 g, w wieku 12 tygodni. Szczury przebywały w plastikowych klatkach z metalową pokrywą w liczbie 2 modeli zwierzęcych na klatkę od 1 tygodnia przed badaniem, celem aklimatyzacji. Klatki były przezroczyste, co gwarantowało kontakt wzrokowy między zwierzętami. Zwierzęta otrzymywały karmę komercyjną i miały swobodny dostęp do wody. Klatki z modelami umieszczono w pomieszczeniach laboratoryjnych z cyklem 12 godzin światła/12 godzin ciemności w temperaturze  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  i wilgotności  $55\% \pm 10\%$ .

Zwierzęta podzielono losowo na cztery równe grupy, pierwsza i druga grupa (20 szczurów) otrzymała roztwór soli fizjologicznej podskórnie i dalej funkcjonowały jako grupy kontrolne. Trzeciej i czwartej grupie (20 szczurów) wstrzyknięto dootrzewnowo pojedynczą dawkę streptozotocyny (STZ) w dawce 60 mg/kg masy ciała, rozpuszczonej w świeżo przygotowanym buforze (0,1 mol/L cytrynian, pH 4,5). Szczury głodzono przez 8 godzin przed wstrzyknięciem STZ. 72 godziny po wstrzyknięciu STZ szczury ze stałym poziomem glukozy we krwi  $\geq 200$  mg/dl uznano za udane modele cukrzycowe. 20 modeli przeszło udaną indukcję DM. Szczury z cukrzycą karmiono dietą komercyjną. Krew żylną pobierano i badano na paskach glukometru.

Wszystkie zwierzęta poddano operacji przecięcia lewego więzadła pobocznego pierszelowego w tylnej kończynie i zaszycia go oraz zaszycia miejsca dostępu, celem wytworzenia stanu zapalnego, by zbadać zdolności regeneracyjne zwierząt z prawidłową gospodarką węglowodanową oraz z farmakologicznie wywołaną cukrzycą. Każde ze zwierząt następnie poddano pozorowanej operacji uzyskania dostępu operacyjnego do prawego więzadła pobocznego pierszelowego w tylnej kończynie i zaszycia go bez interwencji w obrębie więzadła.

Po poddaniu zwierząt zabiegom chirurgicznym, grupy drugą oraz czwartą poddano suplementacji melatoniny, która trwała 4 tygodnie.

Zwierzęta poddano eutanazji po 6 tygodniach od rozpoczęcia eksperymentu. Od każdego modelu pobrano tkankę łączną z obrębu więzadła poddanego interwencji oraz więzadła z drugiej kończyny, która podległa operacji pozorowanej. Z każdego z więzadeł modelu pobrano

po dwie próbki materiału do dwóch probówek w celu oceny histologicznej oraz utworzenia homogenatu tkankowego do oceny biochemicznej. Ponadto pobrano krew do badań laboratoryjnych.

Wszystkie zwierzęta miały zapewnione warunki utrzymania zgodnie z kryteriami określonymi w przewodniku dotyczącym opieki nad zwierzętami laboratoryjnymi i ich wykorzystywania, przygotowanym na mocy Dyrektywy UE 2010/63/UE do celów doświadczeń na zwierzętach. Zasad etycznych przestrzegano zgodnie z krajowymi i instytucjonalnymi wytycznymi dotyczącymi ochrony dobrostanu zwierząt podczas eksperymentów. Badanie zostało zaprojektowane zgodnie z wytycznymi ARRIVE. Badanie przeprowadzono na wydziałach uniwersyteckich, wcześniej zorganizowanych do prowadzenia badań na zwierzętach. Personel, który pracował ze zwierzętami, miał doświadczenie w indukowaniu DM u szczurów SPRD. Szczury reprezentują najczęściej spotykany gatunek wykorzystywany w eksperymentach dotyczących układu mięśniowo-szkieletowego i regeneracji pourazowej.

## Wyniki

Wystąpiło sprzężenie zwrotne dodatnie między wartościami glukozy w osoczu krwi zwierząt na czczo a ich masą ciała i stopniem degradacji elastyny, zwłóknienia i zwapnienia w obrębie więzadeł. Wszystkie zwierzęta z grupy cukrzycowej pomyślnie przeszły procedurę indukcji DM i uzyskały istotnie większą masę ciała w porównaniu do grupy kontrolnej. Badanie histopatologiczne szczurów z normoglikemią z grup I i II oraz szczurów z cukrzycą z grup III i IV oceniano za pomocą skali Sairyo. Wyniki pokazały statystycznie istotne gorsze parametry w obrębie lewego MCL poddawanego interwencji chirurgicznej w grupie zwierząt z indukowaną cukrzycą w porównaniu do tkanek więzadeł lewego MCL zwierząt z prawidłową glikemią.

Szczególnie zauważalne było znaczące zwłóknienie w lewym MCL w porównaniu z prawym MCL w grupie III z wynikiem w zakresie  $3,43 \pm 0,88$ ;  $P < 0,05$  oraz w grupie I w zakresie  $1,44 \pm 0,7$ ;  $P < 0,05$ . Grupa I wykazała współczynnik Sairyo w granicach  $1,44 \pm 0,7$  w obrębie wypreparowanej tkanki więzadłowej z lewego MCL. W wypreparowanym MCL zaobserwowano zwiększoną utratę włókien elastyny we wszystkich grupach  $P < 0,05$ . Grupa z suplementowaną melatoniną wykazała małą utratę włókien elastyny w porównaniu do grupy kontrolnej, uzyskując odpowiednio wyniki  $0$  i  $0,5 \pm 0,2$ ,  $P < 0,05$  dla prawego MCL oraz

odpowiednio 0 i  $1.05 \pm 0.55$ ,  $P < 0.05$  dla lewego MCL. Próbki prawego MCL we wszystkich grupach wykazywały statystycznie istotnie więcej zwapnień niż tkanki pobrane z lewego MCL z tych samych grup. Grupa bez cukrzycy prezentowała zwapnienia w wypreparowanym MCL ( $1.05, \pm 1.7$ ) i brak oznak zwapnień wśród prawego MCL ze statystycznie istotnym wynikiem ( $P < 0.05$ ).

W porównaniu do grupy kontrolnej, badania biochemiczne osocza szczurów z grupy poddanych cukrzycy wykazały podwyższone stężenie peroksydazy lipidowej i kwasu moczowego w osoczu ( $P=0.0011$ ) i obniżone stężenie albumin ( $P=0.0321$ ). W porównaniu do grupy kontrolnej tlenek azotu był zwiększony ( $P=0.0567$ ) u szczurów z cukrzycą, podczas gdy całkowite tiole i ceruloplazmina były zmniejszone ( $P > 0.05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Leczenie melatoniną znacząco zwiększyło całkowitą aktywność tioli i ceruloplazminy. Również leczenie melatoniną znacząco obniżyło ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ) odpowiednio nadtlenki lipidów i kwas moczowy.

W porównaniu do grupy kontrolnej, homogenaty tkankowe więzadeł z grupy szczurów poddanych cukrzycy wykazały znaczny wzrost peroksydazy lipidowej ( $P=0.0032$ ). Aktywność GST znacznie wzrosła ( $P < 0.001$ ) u szczurów z cukrzycą leczonych melatoniną. Całkowite tiole wykazywały obniżone wartości w tkankach szczurów z grupy cukrzycowej w porównaniu z grupą kontrolną. Leczenie melatoniną znacznie zwiększyło ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ) aktywność odpowiednio dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w porównaniu z grupą DM i wykazało podobny zakres wartości w porównaniu do grupy kontrolnej.

W homogenacie tkankowym z więzadeł pobranych od szczurów z indukowaną cukrzycą stwierdzono obniżenie poziomu TAS, podczas gdy poziomy TOS, ROS i wskaźniki OSI wzrosły. Zmiany te okazały się znaczące w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ). Leczenie melatoniną szczurów z cukrzycą złagodziło te zmiany, w grupie homogenatów tkankowych z więzadeł pobranych od szczurów z grupy z indukowaną cukrzycą leczonych melatoniną, wyniki przybrały statystycznie istotne wartości (odpowiednio  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ). Najwyższą wartość MDA w tkance kostnej uzyskano w grupie DM. Poziomy MDA w tkance kostnej w grupach z DM i w grupie z suplementowaną melatoniną były niższe niż w grupie DM, ale wyższe niż we wszystkich pozostałych grupach. Wartości GSH okazały się wyższe w grupach z

suplementowaną melatoniną niż w grupach bez suplementacji. Najwyższe poziomy GSH zmierzono w grupie DM z suplementowaną melatoniną.

Tkanki z grupy z cukrzycą suplementowaną melatoniną wykazały obniżone stężenie MDA w oraz podwyższone wartości GSH w więzadłach szczurów. Wyniki badania potwierdziły ochronny wpływ suplementacji melatoniny na więzadła stawu kolanowego, poprzez zapobieganie peroksydacji lipidów. Wynik ten pokazuje, że suplementacja melatoniną znacznie zwiększa aktywność przeciwutleniającą u szczurów z indukowaną cukrzycą. Przyjmuje się, że melatonina hamuje peroksydację lipidów, która nasila się w cukrzycy, poprzez aktywację antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych. W związku z tym melatonina wykazuje działanie ochronne na więzadła w cukrzycy w kontekście ich funkcjonalności. Wyniki niniejszego badania wykazują, że suplementacja melatoniną zapobiega zwiększonej produkcji wolnych rodników i hamuje aktywność antyoksydacyjną wynikającą z cukrzycy w więzadłach.

Wyniki badania osocza krwi zwierząt z grupy z indukowaną cukrzycą są analogiczne. Wykryto statystycznie istotny wzrost stężenia peroksydazy lipidowej w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto zauważono znamienne wzrost stężenia tlenu azotu, dysmutazy nadtlencowej, S-transferazy glutationu, ceruroplazminy, albuminy, kwasu moczowego w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie całkowitych tioli, ceruroplazminy, albuminy jako markerów protekcyjnych było znamienne niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Suplementacja melatoniny w grupie zwierząt z indukowaną cukrzycą przyczyniła się do zwiększenia stężenia przeciwutleniaczy, takich jak dysmutaza nadtlencowa oraz katalaza. Wyniki pobrane od grupy zwierząt z indukowaną cukrzycą z suplementacją melatoniny przedstawiały wartości istotnie statystycznie porównywalne z grupą kontrolną. W przypadku suplementacji melatoniny w grupie zwierząt z normoglikemią, suplementacja melatoniny nie spowodowała istotnych zmian. Zbadanie homogenatu tkankowego pod względem całkowitego statusu antyoksydacyjnego przyniosło wynik statystycznie niższy w porównaniu z grupą kontrolną. Całkowity status oksydacyjny, poziom reaktywności cząstek tlenu oraz współczynnik stresu oksydacyjnego wykazały zaś istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną z normoglikemią.

## Wnioski

1. Tkanki pochodzące od zwierząt z grupy z indukowaną cukrzycą charakteryzowały się włóknieniem strukturalnym, przerostem komórkowym, rozluźnionymi włóknami kolagenowymi z naciekiem limfocytarnym, obecnością komórek tłuszczowych i nadreaktywnością fibroblastów. Cechy te wskazują na intensywnie upośledzone zdolności regeneracyjne, obecność stanu zapalnego i przebudowy.
2. Interwencja chirurgiczna w obrębie więzadła przyczyniła się do nieprawidłowej regeneracji i uszkodzenia struktury więzadła u zwierząt z indukowaną cukrzycą. W grupie zwierząt z normoglikemią zaobserwowano niższe nasilenie zmian zapalnych, co sugeruje implikacje choroby metabolicznej na zdolności regeneracyjne tkanki.
3. W homogenacie tkankowym utworzonym z więzadeł zwierząt z grupy z indukowaną cukrzycą wystąpił wzrost aktywności autooksydacyjnej peroksydazy lipidowej spowodowany streptozotocyną, który jest wyznacznikiem zmian zapalnych w obrębie więzadeł. Również stężenie innych molekuł pośrednio świadczących o obniżonej zdolności regeneracyjnej więzadeł w homogenacie tkankowym pobranym od zwierząt z grupy z indukowaną cukrzycą było podwyższone. Wskazuje to na wysoki poziom stresu oksydacyjnego w tych tkankach. Suplementacja melatoniną w grupie zwierząt z indukowaną cukrzycą przyczyniła się do wzrostu stężenia przeciwutleniaczy, wykazując tym samym ochronny wpływ na tkanki w środowisku hiperglikemii. W grupie zwierząt normoglikemicznych suplementacja melatoniną nie powodowała istotnych zmian.
4. Badanie homogenatu tkankowego pod kątem całkowitego statusu antyoksydacyjnego dało wynik świadczący o cukrzycy jako determinancie zmniejszonej aktywności antyoksydacyjnej więzadeł narażonych na przewlekłą hiperglikemię. Leczenie melatoniną znacząco zwiększyło całkowitą zdolność odpowiedzi na stres oksydacyjny.
5. Badanie dowodzi, że cukrzyca wywiera negatywny wpływ na więzadła, hamując fizjologiczny mechanizm ochronny przed stresem oksydacyjnym. Leczenie melatoniną szczurów z cukrzycą złagodziło zmiany i poprawiło status antyoksydacyjny więzadeł z grupy cukrzyków.
6. Peroksydacja lipidów, która jest jednym z najbardziej szkodliwych skutków produktów wolnorodnikowych, oraz MDA, który jest jednym z jej produktów końcowych, wykazują aktywność do indukcji apoptozy tkanek, co dowodzi, że cukrzyca i towarzyszący jej stres

oksydacyjny są głównymi mediatorami zanikania prawidłowej morfologii więzadeł. Obniżone wartości MDA ustalone w grupie z cukrzycą z suplementowaną melatoniną wskazują, że tłumi ona negatywny wpływ hiperglikemii na więzadła.

7. Suplementacja melatoniną znacznie zwiększa aktywność przeciwutleniającą u szczurów z indukowaną cukrzycą. Zaobserwowano zahamowanie peroksydacji lipidów, nasilonej w cukrzycy pod wpływem melatoniny.