

Streszczenie w języku polskim

Zespół metaboliczny (MetS) definiowany jest jako zespół współistniejących schorzeń, takich jak otyłość, zaburzenia gospodarki węglowodanowej oraz lipidowej, insulinooporność oraz podwyższone wartości ciśnienia tętniczego. MetS stanowi istotny problem chorobowy, gdyż dotyka co trzeciej kobiety oraz blisko 40% mężczyzn w Polsce. W tej grupie pacjentów szczególnie zwiększone jest ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz obserwowany jest rozwój niewydolności serca z zachowaną frakcją wyrzutową. W patogenezie powikłań sercowo-naczyniowych w MetS ważną rolę odgrywa postępująca dysfunkcja komórek śródbłónka naczyniowego w sercu, a co za tym idzie, mikrokrażenia. Objawy MetS, takie jak hiperglikemia, hipercholesterolemia, czy nadciśnienie, mają negatywny wpływ na metabolizm komórek śródbłónka poprzez indukcję stanu zapalnego, zaburzenia w gospodarce wolnymi rodnikami, czy deregulację produkcji NO. Powyższe zmiany prowadzą do sztywnienia ścian naczyń, zwiększonej przepuszczalności bariery naczyniowej i upośledzenia procesów angiogenezy. Rezultatem jest upośledzenie krążenia, prowadzące do obrzęku, włóknienia i niewydolności serca.

Celem prac było określenie roli, jaką odgrywa sygnalizacja VEGF/VEGFR-2 w odpowiedzi angiogennej śródbłónka oraz regulacji przepuszczalności mikronaczyń miokardium w MetS na modelu myszy db/db, które wykazują cechy zespołu metabolicznego.

Jako model do doświadczeń wykorzystano myszy db/db, które na skutek spontanicznej mutacji nie posiadają funkcjonalnego receptora dla leptyny. Zwierzęta te nie kontrolują apetytu, a co za tym idzie rozwijają otyłość, cukrzycę i hipercholesterolemię. Myszy karmione były standardową paszą i w 21. tygodniu życia pobrano od nich serce oraz aortę. Aby potwierdzić występowanie cech zespołu metabolicznego u zwierząt doświadczalnych, w odstępach tygodniowych były one poddawane ważeniu i mierzono poziom glikemii. Gęstość naczyń krwionośnych, receptora dla VEGF i VE-kadheryny w miokardium oceniana była z wykorzystaniem barwień immunohistochemicznych i mikroskopii konfokalnej. Ultrastrukturę komórek śródbłónkaw miokardium, ze szczególnym uwzględnieniem połączeń między komórkami śródbłónka i liczebności pęcherzyków transcytotycznych oceniano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Następnie z miokardium na drodze enzymatycznej i przy zastosowaniu techniki sortowania na kolumnie magnetycznej wyizolowano komórki śródbłónka naczyniowego i przeprowadzono analizę ekspresji wybranych mRNA (między innymi VEGF-A, VEGF-B, VEGFR-2, AKT, SRC, ERK1,

VE-kadheryna) używając techniki Real-Time PCR. Ponadto wykonano test stymulacji krążków aortalnych w celu oceny potencjału angiogenego śródbłónka.

W badaniach wykazano, że mysz db/db karmiona paszą standardową szybko przybiera na wadze, a pomiary stężenia glukozy wykazały hiperglikemię, jednakże różnice pomiędzy osobnikami w obrębie jednej grupy były znaczące. W miokardium myszy db/db obserwowano zmniejszoną liczbę mikronaczyń krwionośnych w stosunku do zwierząt kontrolnych. Ponadto w analizie ultrastruktury naczyń mikrokrażenia w koniuszkowej części serca zaobserwowano zwiększenie przestrzeni pomiędzy komórkami śródbłónka naczyniowego oraz spadek intensywności transportu pęcherzykowego, co może wskazywać na rozszerzenie bariery naczyniowej. Wykazano, że ekspresja mRNA dla VEGF-A i VEGFR-2 jest zwiększona w izolowanych komórkach śródbłónka naczyniowego myszy db/db, natomiast analiza immunohistochemiczna gęstości ekspresji VEGFR-2 w komórkach śródbłónka wykazała, że dochodzi do jej zmniejszenia w całym sercu, w szczególności w obszarze przegrody międzykomorowej. Wykazano, że w izolowanych komórkach śródbłónka naczyń serca dochodzi do zwiększenia ekspresji mRNA dla kluczowych białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego regulującego angiogenezę (szlak kinazy AKT i MAP) oraz przepuszczalność bariery naczyniowej (szlak kinazy SRC); kiedy analizę przeprowadzono na fragmencie tkanki miokardium różnic w ekspresji nie obserwowano. Jednocześnie wykazano na drodze barwienia immunohistochemicznego, że w obszarze lewej komory dochodzi do spadku ekspresji VE-kadheryny w komórkach śródbłónka serca myszy db/db. Test krążków aortalnych wykazał, że komórki śródbłónka myszy db/db mają mniejszy potencjał angiogeny, gdyż po pobudzeniu przez VEGF-A wytwarzają mniej naczyniopodobnych struktur niż aorty myszy z grupy kontrolnej.

Otrzymane wyniki mogą sugerować, że w MetS dochodzi do istotnego upośledzenia odpowiedzi angiogennej komórek śródbłónka serca, zależnej od szlaku sygnałowego VEGF-VEGFR-2. Ponadto analiza izolowanych komórek śródbłónka pozwala przybliżyć mechanizmy, które regulują proces angiogenezy i przepuszczalności naczyń krwionośnych u myszy db/db, co nie jest możliwe, kiedy podobne badania prowadzi się na fragmencie miokardium. Uzyskane wyniki mogą być wstępem do dalszych badań nad dysfunkcją mikrokrażenia w MetS, a co za tym idzie w przyszłości mogą się przyczynić do opracowania nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych niewydolności serca w zespole metabolicznym.

Streszczenie w języku angielskim (wraz z angielską wersją tytułu rozprawy)

The role of VEGF/VEGFR-2 signaling in the regulation of endothelial angiogenic response and microvascular permeability in the myocardium in a mouse model of metabolic syndrome

Metabolic syndrome (MetS) is defined as a set of coexisting abnormalities, such as obesity, carbohydrate and lipid metabolism disorders, insulin resistance and elevated blood pressure. MetS is a significant disease problem as it affects every third woman and nearly 40% of men in Poland. In this group of patients the risk of cardiovascular events is particularly increased and the development of heart failure with preserved ejection fraction is observed. In the pathogenesis of cardiovascular complications in MetS, an important role is played by the progressive dysfunction of vascular endothelial cells in the heart and, consequently, of the microcirculation. Symptoms of MetS, such as hyperglycemia, hypercholesterolemia, or hypertension, have a negative impact on the metabolism of endothelial cells by inducing inflammation, disturbances in the metabolism of free radicals, and deregulation of NO production. The above changes lead to stiffening of the vascular wall, increased permeability of the vascular barrier and impaired angiogenesis processes. The result is impaired circulation, leading to edema, fibrosis, and heart failure.

The aim of the study was to determine the role of VEGF/VEGFR-2 signaling in the endothelial angiogenic response and the regulation of myocardial microvascular permeability in MetS in the db/db mouse model, which exhibits features of the metabolic syndrome.

The db/db mouse was used as a model for the experiments, which, due to a spontaneous mutation, lacks a functional leptin receptor. These animals do not control their appetite and therefore develop obesity, diabetes and hypercholesterolemia. The mice were fed standard feed and at 21 weeks of age their heart and aorta were collected. To confirm the presence of features of the metabolic syndrome in experimental animals, they were weighed at weekly intervals and their glycemia levels were measured. The density of blood vessels, VEGF receptor and VE-cadherin in the myocardium was assessed using immunohistochemical staining and confocal microscopy. The ultrastructure of endothelial cells in the myocardium, with particular emphasis on junctions between endothelial cells and the number of transcytotic vesicles, was assessed using a transmission electron

microscope. Then, vascular endothelial cells were isolated from the myocardium using an enzymatic method and a magnetic column sorting technique, and an analysis of the expression of selected mRNAs (including VEGF-A, VEGF-B, VEGFR-2, AKT, SRC, ERK1, VE-cadherin) was performed using the Real-Time PCR. Additionally, an aortic ring assay was performed to assess the angiogenic potential of the endothelium.

The study showed that db/db mice fed standard diet quickly gained weight, and glucose measurements showed hyperglycemia, but the differences between individuals within one group were significant. A reduced number of blood microvessels was observed in the myocardium of db/db mice compared to control animals. Moreover, the ultrastructure analysis showed an increase in the space between vascular endothelial cells and a decrease in the intensity of vesicular transport in the apical region of the heart, which may indicate a weakening of the vascular barrier. VEGF-A and VEGFR-2 mRNA expression was shown to be increased in isolated vascular endothelial cells of db/db mice, while immunohistochemical analysis of VEGFR-2 expression density in endothelial cells showed that it was decreased throughout the heart, especially in the interventricular septum area. It has been shown that in isolated cardiac endothelial cells there is an increase in the expression of mRNA for key proteins involved in the transmission of intracellular signals regulating angiogenesis (AKT and MAP kinase pathway) and vascular barrier permeability (SRC kinase pathway); when the analysis was performed on a fragment of myocardial tissue, differences in expression were not observed. At the same time, immunohistochemical staining showed that there is a decrease in VE-cadherin expression in the cardiac endothelial cells of db/db mice in the left ventricular area. The aortic ring assay showed that the endothelial cells of db/db mice have a lower angiogenic potential because they produce fewer vascular-like structures when stimulated by VEGF-A than the aortas of control mice.

The obtained results may suggest that in MetS there is a significant impairment of the angiogenic response of cardiac endothelial cells, which is dependent on the VEGF-VEGFR-2 signaling pathway. Moreover, the analysis of isolated endothelial cells allows us to elucidate the mechanisms that regulate the process of angiogenesis and blood vessel permeability in db/db mice, which is not possible when similar studies are carried out on a fragment of the myocardium. The obtained results may be an introduction to further research on microcirculation dysfunction in MetS, and thus in the future they may contribute to the development of new diagnostic and therapeutic methods for heart failure in MetS.