



UNIwersytet
MEDYCZNY
W ŁODZI

Rozprawa Doktorska

Ocena właściwości pleiotropowych empagliflozyny w modelu uszkodzenia śródbłonna naczyniowego utlenionym cholesterolem i u pacjentów z cukrzycą typu 2 z niewydolnością serca

Assessment of pleiotropic properties of empagliflozin in a model of vascular endothelial damage with oxidized cholesterol and in patients with type 2 diabetes and heart failure

Magdalena Świstek

Katedra Chorób Wewnętrznych i Kardiologii

Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej

Stacjonarne Studia Doktoranckie

Wydział Lekarski

Promotor

prof. dr hab. n. med. Marlena Broncel

Promotor pomocniczy

dr n. biol. Ewelina Woźniak

Łódź, 2022

9. Streszczenie

Dotychczasowe badania jasno wskazują, że zastosowanie empagliflozyny (EMPA) u pacjentów z cukrzycą typu 2 (T2DM) skutecznie obniża stężenie glukozy we krwi, przyczynia się do redukcji masy ciała i ciśnienia tętniczego, ponadto zmniejsza ryzyko zgonu, zgonu z powodu choroby sercowo-naczyniowej i hospitalizacji z powodu zaostrzeń niewydolności serca (HF). Do tej pory nie wyjaśniono jednoznacznie jaki mechanizm działania EMPA odpowiedzialny jest za tak wiele korzystnych efektów.

Celem pracy było określenie właściwości przeciwzapalnych EMPA (1 μM i 10 μM) w modelu *in vitro* poprzez ocenę na poziomie ekspresji mRNA *IL-33*, *IL-35* (*IL-12A*, *EBI3*), *IL-1 β* , *IL-10* w modelu HUVECs indukowanych 25-OHC w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ oraz w modelu *in vivo* poprzez ocenę wpływu trzymiesięcznej terapii EMPA w dawce 10 mg/dobę na poziom ekspresji mRNA *IL-33*, *IL-35*(*IL-12A*, *EBI3*), *IL-1 β* , *IL-10* i białka IL-33 u pacjentów z T2DM i HF. Ponadto ustalenie wpływu EMPA na kinetykę generowania ROS, uszkodzenia jedno- i dwuniciowe DNA oraz oksydacyjne uszkodzenia puryn i pirymidyn w HUVECs indukowanych 25-OHC.

Materiał badawczy w badaniu *in vitro* stanowiły HUVECs inkubowane przez 4 godziny z 25-OHC a następnie przez 24 godziny z EMPA w stężeniach 1 μM i 10 μM . Oceniano ekspresję wybranych interleukin pro- i przeciwzapalnych na poziomie mRNA metodą Real-Time PCR. Dodatkowo poddano analizie wpływ badanego leku na kinetykę generowania ROS z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej: DCFH₂DA. W następnym etapie oceniono wpływ EMPA na powstawanie jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA oraz zmianę poziomu oksydacyjnych uszkodzeń puryn i pirymidyn pod wpływem EMPA przy użyciu ludzkiej glikozylazy 8-oksoguaniny DNA i endonukleazy III, wykorzystując alkaliczną wersję testu kometowego w modelu HUVEC uszkodzonego utlenionym cholesterolem. Do badania *in vivo* zrekrutowano pacjentów z rozpoznaną T2DM i HF. Zebrano dane antropometryczne, laboratoryjne i echokardiograficzne przed i po 3 miesięcznej terapii EMPA 6 pacjentów. Określono zmianę ekspresji wybranych interleukin pro- i przeciwzapalnych na poziomie mRNA w PBMCs metodą RT-PCR oraz IL-33 na poziomie białka metodą ELISA.

Wyniki. W badaniu *in vitro* EMPA w stężeniach 1 μM i 10 μM zmniejsza ekspresję cytokin *IL-1 β* , *IL-12A*, *EBI3* na poziomie mRNA w HUVECs oraz zwiększa poziom ekspresji *IL-33* i *IL-10* na poziomie mRNA w HUVECs. EMPA w badanych stężeniach zmniejsza kinetykę generowania ROS, poziom jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA oraz oksydacyjnych

uszkodzeń puryn i pirymidyn wywołanych preinkubacją HUVECs z 25-OHC. Nie wykazano istotnego wpływu EMPA po 3 miesiącach stosowania przez pacjentów z T2DM i HF na poziom ekspresji wybranych interleukin, parametry echokardiograficzne.

Wnioski. EMPA korzystnie zmienia profil ekspresji genów interleukin prozapalnych i przeciwzapalnych na poziomie mRNA w modelu komórek śródbłonna uszkodzonego oksysterolem. EMPA wpływa na obniżenie poziomu uszkodzeń DNA, w tym uszkodzeń oksydacyjnych puryn i pirymidyn, co wynika najprawdopodobniej z właściwości antyoksydacyjnych związanych z redukcją generowania reaktywnych form tlenu w modelu komórek śródbłonna uszkodzonego oksysterolem. Korzystne przeciwzapalne właściwości EMPA obserwowane w warunkach *in vitro* nie potwierdziło pilotażowe badanie u pacjentów z T2DM i HF leczonych flozyną przez okres 3 miesięcy

10. Abstract

Previous studies clearly indicate that the use of empagliflozin (EMPA) in patients with type 2 diabetes (T2DM) effectively lowers blood glucose levels, contributes to the decrease of body weight and blood pressure, and also reduces the risk of death from any cause, death from cardiovascular causes and hospitalization due to heart failure (HF). To date, it has not been clearly explained what EMPA mechanism of action is responsible for that many beneficial effects.

The aim of the study was to determinate the anti-inflammatory properties of EMPA (1 μ M and 10 μ M) in the *in vitro* model by assessing mRNA expression of *IL-33*, *IL-35* (*IL-12A*, *EBI3*), *IL-1 β* , *IL-10* in HUVECs model induced by the 25-hydroxycholesterol (25-OHC) at a concentration of 10 μ g/ml and also in an *in vivo* model by assessing the effect of three month EMPA treatment at the dose of 10 mg/day on mRNA expression levels of *IL-33*, *IL-35* (*IL-12A*, *EBI3*), *IL-1 β* , *IL-10* and protein level of IL-33 in patients with T2DM and HF. In addition, to establish the effect of EMPA on the kinetics of reactive oxygen species (ROS) generation, single- and double-stranded DNA breaks and oxidative damage to purines and pyrimidines in HUVECs model induced by 25-OHC.

The *in vitro* study material were HUVECs stimulated for 4 hours with 25-OHC and then for 24 hours with EMPA at concentrations of 1 μ M and 10 μ M. The expression of selected pro- and anti-inflammatory interleukins at the mRNA level was assessed by Real-Time PCR (RT-PCR). Additionally, the effect of the investigated drug on the kinetics of ROS generation using a fluorescent probe (DCFH2DA) was analyzed. Subsequently, the effect of EMPA on the arrangement of single- and double-stranded DNA breaks and the change in the level of oxidative damage to purines and pyrimidines under the influence of EMPA was assessed using 8-oxoguanine DNA glycosylase and endonuclease III, utilising the alkaline version of the comet assay in the HUVECs model induced by 25-OHC. Patients diagnosed with T2DM and HF were enrolled in the *in vivo* study. Anthropometric, laboratory and echocardiographic data were collected before and after the 3-month EMPA treatment of 6 patients. The change in the expression of selected pro- and anti-inflammatory interleukins was determined at the mRNA level in PBMCs by RT-PCR and IL-33 at the protein level by ELISA assay.

Results. In the *in vitro* study, EMPA at concentrations of 1 μ M and 10 μ M reduces the expression of *IL-1 β* , *IL-33*, *EBI3*, *IL-12A* and increases the expression levels of *IL-33* and *IL-10* at the mRNA level in HUVECs induced with 25-OHC. EMPA at the concentrations

tested reduced the kinetics of ROS generation, the level of single- and double-strand DNA breaks, and oxidative damage to purines and pyrimidines in HUVECs induced by 25-OHC. There was no significant effect of EMPA on the expression levels of selected interleukins, echocardiographic parameters, after 3-month treatment in patients with T2DM and HF.

Conclusions. EMPA favorably alters the expression profile of pro- and anti-inflammatory interleukin genes on mRNA level in an oxysterol-damaged endothelial cell model. EMPA reduces the level of DNA damage, including oxidative damage to purines and pyrimidines, which is probably due to antioxidant properties associated with the depletion of reactive oxygen species generation in the oxysterol-damaged endothelial cell model. The beneficial anti-inflammatory properties of EMPA observed *in vitro* were not confirmed by a pilot study in patients with T2DM and HF treated with EMPA for 3 months.