

## STRESZCZENIE

Cukrzyca typu 2 nierozzerwalnie związana jest z co najmniej wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym. Spośród wielu cząsteczek regulujących funkcję śródbłonna naczyniowego największe znaczenie wydaje się mieć niezmiennie tlenek azotu (NO). Mimo, że powikłania obejmujące mikro- i makro-krążenie były dotychczas przedmiotem licznych prac, wiedza na temat roli zaburzeń osi biotransformacji tlenu azotu, w tym kontekście pozostaje niepełna.

Przez wiele lat koncentrowano się na przemianach tlenu azotu wyłącznie w kompartmentie osoczym. Potwierdzono jednak, że szlaki biotransformacji NO wykazują swoją ekspresję także we wnętrzu krwinek czerwonych. Mając na uwadze fakt, że erytrocyty stanowią około 40% objętości krwi krążącej i są najliczniejszymi elementami morfotycznymi, mogą one być niedocenianym, a jednocześnie niepomijalnym elementem regulatorowym złożonych procesów biochemicznych. Szczególnie istotna wydaje się ich rola w zależnej od tlenu azotu regulacji perfuzji na poziomie mikrokrążenia.

Z tego powodu nadrzędnym celem niniejszej pracy jest poszukiwanie osi regulującej biodostępność NO i ocena poszczególnych jej elementów wewnątrz erytrocytów, u pacjentów, którzy rozwinęli już cukrzycę typu 2, ale nie obserwuje się u nich jeszcze istotnych klinicznie powikłań narządowych. Ponadto powiązано otrzymane oznaczenia biochemiczne z czynnościowymi parametrami odpowiedzi mikrokrążenia, które oceniono w badaniach EndoPAT i Laser Doppler wykorzystując bodźce termiczne i niedokrwiennie.

Wykazano znacząco niższe stężenia L-argininy i L-cytruliny w kompartmentie osoczym, z równoczesnym obniżeniem stosunków L-arginina/ADMA oraz ADMA/DMA w grupie pacjentów z cukrzycą. Stwierdzono także zachowany metabolizm NO w krwinkach czerwonych z obniżonym stężeniem L-cytruliny oraz znacząco wyższą biodostępnością tlenu azotu w tym kompartmentie. Ponadto obserwowano nieprawidłową odpowiedź śródbłonna w reakcji na bodziec termiczny w grupie pacjentów z cukrzycą. Przedstawione wyniki wskazują, że cukrzyca wiąże się z istotnymi zaburzeniami metabolizmu NO, co bardziej wyrażone jest w kompartmentie osoczym. Erytrocyty mogą natomiast pozostawać buforem, który zachowuje względnie prawidłowy metabolizm NO w początkowej fazie cukrzycy typu 2.

Niniejsza dysertacja podkreśla niezwykle ważną rolę erytrocytów w utrzymaniu odpowiedniej funkcji śródbłonna naczyniowego w osób z cukrzycą typu 2 i może translacyjnie nieść za sobą dość istotne implikacje kliniczne, bowiem poznanie dokładnych molekularnych aspektów przemian tlenu azotu w erytrocytach może pozwolić na opracowanie inhibitorów arginazy, leków przeciwdziałających rozprzęganiu NOS lub redukujących stres oksydacyjny. Dodatkowo zastosowanie przepływowomierza laserowego wraz z oceną odpowiedzi na bodziec termiczny może być istotnym narzędziem w ocenie wczesnych powikłań cukrzycy, pozwalając na pełniejszą stratyfikację ryzyka i formułowanie racjonalnych, spersonalizowanych przesłanek do eskalacji terapii w grupie osób bez jawnych klinicznie powikłań narządowych, lecz z dużym ryzykiem ich szybkiego wystąpienia.

## SUMMARY

Type 2 diabetes mellitus (DM) is inseparably associated with at least high cardiovascular risk. Among numerous molecules regulating the vascular tone, the nitric oxide (NO) is considered to play a pivotal role. Even though the micro- and macrovascular abnormalities are being extensively studied, the alterations in the nitric oxide metabolic pathway still require further investigations. For many years, the studies on the NO were mostly focused on the plasma compartment. However, emerging data confirmed that nitric oxide metabolic pathway is present also in red blood cells. Taking into consideration, that erythrocytes constitute about 40% of circulating blood, they can be an underappreciated, albeit indisputable part of complex biochemical processes. Their role in the nitric oxide-dependent regulation of perfusion at the level of microcirculation seems to be of particular importance.

Therefore, the main scope of this dissertation was to evaluate the role of the erythrocytes' nitric oxide metabolism in preserving the appropriate vascular function, as well as to identify the alterations that occur at the early stage of diabetes mellitus. Additionally, the biochemical results were compared with the endothelial function parameters, obtained from EndoPAT and LaserDoppler flowmetry, in response to the thermal and ischemic stimuli.

This study has demonstrated significantly decreased L-arginine and L-citrulline concentrations in the plasma compartment with reduced Arginine/ADMA and ADMA/DMA-ratios in the *diabetes mellitus* group. Preserved nitric oxide metabolism in erythrocytes with reduced L-citrulline level and significantly higher NO-bioavailability have also been noted. What is more, an endothelial vasodilatory dysfunction in microcirculation at the early stage of diabetes mellitus has been identified and, what is noteworthy - was more pronounced in response to the thermal-stimulus.

The original paper is the first study to show that diabetes mellitus is associated with significant differences in the expression of the nitric oxide metabolic pathway, which are more pronounced in the plasma than in the erythrocyte compartment. Hence, the red blood cells could constitute a buffer with a higher nitric oxide bioavailability, less affected by the diabetes mellitus-related abnormalities.

This dissertation points at the importance of erythrocytes in preserving the appropriate endothelial function in subjects with diabetes mellitus. The identification of the mechanisms responsible for limiting the nitric oxide bioavailability may lead to the discovery of novel drug targets, limiting the burden of nitrosative-stress and in a consequence induced this way damage to microcirculation. It provides a rationale for personalized therapy aiming at minimizing the residual cardiovascular risk in diabetic subjects without clinically relevant complications but being at high risk for their development.