

Hideki Kamiya<sup>1, 2</sup>, Weixian Zhang<sup>1, 2</sup>, Karin Ekberg<sup>3</sup>, John Wahren<sup>3</sup>, Anders A.F. Sima<sup>1, 2, 4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Wayne State University, School of Medicine, Detroit, Michigan

<sup>2</sup>Morris Hood Jr. Comprehensive Diabetes Center, Wayne State University, School of Medicine, Detroit, Michigan

<sup>3</sup>Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institute, Sztokholm, Szwecja <sup>4</sup>Department of Neurology, Wayne State University, School of Medicine, Detroit, Michigan

# Peptyd C odwracający neuropatię nocyceptywną w cukrzycy typu 1

## C-peptide reverses nociceptive neuropathy in type 1 diabetes

Przedrukowano za zgodą z: *Diabetes* 2006; 55: 3581–3587

### STRESZCZENIE

Autorzy zbadali działanie terapeutyczne peptydu C w ustalonej neuropatii nocyceptywnej u szczurów BB/Wor z cukrzycą typu 1. Oceniono nocyceptywną funkcję nerwów, morfometrię niezmielinizowanych włókien nerwu łydkowego i zwoju korzenia grzbietowego (DRG), zawartość peptydu nocyceptywnego oraz ekspresję czynników neurotroficznycych i ich receptorów. Peptyd C podawano w dawce substytucyjnej drogą pompy osmotycznej w ciągłym wlewie lub raz dziennie w iniekcji podskórnej. Szczury z cukrzycą leczono od 4.–7. miesiąca trwania cukrzycy i porównywano z nieleczonymi szczurami z grupy kontrolnej w tym samym okresie choroby. Peptyd C podawany przez pompę osmotyczną, lecz nie w iniekcjach podskórnych, zmniejszył hiperalgezę i cukrzycozależną redukcję liczby włókien niezmielinizowanych ( $p < 0,01$ ) oraz średnią wielkość aksonów ( $p < 0,05$ ) w nerwie łydkowym. Ekspresja receptora czynnika wzrostu nerwu (NGF) o dużym podobieństwie (NGFR-TrkA) w DRG zmniejszyła się znamiennie w 4. miesiącu ( $p < 0,01$ ). Ekspresja receptorów insulinowego oraz IGF-1 w DGR i NFG w nerwie

kulszowym zmniejszyła się znamiennie w 7. miesiącu u szczurów z cukrzycą (odpowiednio:  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  i  $p < 0,005$ ). Podawanie przez pompę osmotyczną zapobiegło spadkowi ekspresji NGFR-TrkA, receptora insulinowego ( $p < 0,05$ ) i IGF-IR ( $p < 0,005$ ) w DRG oraz zwiększyło zawartość NGF ( $p < 0,05$ ) w nerwie kulszowym. Natomiast peptyd C podawany drogą podskórną wpłynął jedynie w niewielkim stopniu na morfometryczne i molekularne zmiany u szczurów z cukrzycą. Stwierdzono, że peptyd C korzystnie wpływa na cukrzycową neuropatię nocyceptywną; aby uzyskać efekt optymalny, należy utrzymywać fizjologiczne stężenie peptydu C w ciągu dnia.

**Słowa kluczowe:** peptyd C, neuropatia nocyceptywna, cukrzyca

### ABSTRACT

We examined the therapeutic effects of C-peptide on established nociceptive neuropathy in type 1 diabetic BB/Worrats. Nociceptive nerve function, unmyelinated sural nerve fiber and dorsal root ganglion (DRG) cell morphometry, nociceptive peptide content, and the expression of neurotrophic factors and their receptors were investigated. C-peptide was administered either as a continuous subcutaneous replacement dose via osmopumps or a replacement dose given once daily by subcutaneous injection. Diabetic rats were treated from 4 to 7 months of diabetes and were compared with control and untreated diabetic rats of 4- and 7-month duration. Osmopump delivery but not subcutaneous injection

Adres do korespondencji: Dr Anders A.F. Sima  
Department of Pathology, Scott Hall 9275  
540 E Canfield Ave Detroit, MI 48201  
e-mail: asima@med.wayne.edu

Copyright © 2006 by the American Diabetes Association  
American Diabetes Association nie odpowiada za poprawność tłumaczenia

Diabetologia Praktyczna 2007, tom 8, 5, 178–187  
Tłumaczenie: lek. Magdalena Dmochowska-Joeck  
Wydanie polskie: VM Group, Grupa Via Medica

improved hyperalgesia and restored the diabetes-induced reduction of unmyelinated fiber number ( $p < 0.01$ ) and mean axonal size ( $p < 0.05$ ) in the sural nerve. High-affinity nerve growth factor (NGF) receptor (NGFR-TrkA) expression in DRGs was significantly reduced at 4 months ( $p < 0.01$ ). Insulin receptor and IGF-I receptor (IGF-IR) expressions in DRGs and NGF content in sciatic nerve were significantly decreased in 7-month diabetic rats ( $p < 0.01$ ,  $0.05$ , and  $0.005$ , respectively). Osmopump delivery prevented the decline of NGFR-TrkA, insulin receptor ( $p < 0.05$ ), and IGF-IR ( $p < 0.005$ ) expressions in DRGs and improved NGF content ( $p < 0.05$ ) in sciatic nerve. However, subcutaneous injection had only marginal effects on morphometric and molecular changes in diabetic rats. We conclude that C-peptide exerts beneficial therapeutic effects on diabetic nociceptive neuropathy and that optimal effects require maintenance of physiological C-peptide concentrations for a major proportion of the day.

**Key words:** C-peptide, nociceptive neuropathy, diabetes mellitus

## Wstęp

Cukrzycowa neuropatia nocyceptywna lub bolesna jest częstym zjawiskiem u pacjentów z neuropatią [1]. Mechanizm wywołujący to zjawisko jest złożony i nie do końca poznany [2]. Powszechnie przyjmuje się jednak, że czynnikiem inicjującym jest degeneracja niezmielinizowanych włókien C i A $\beta$  [2, 3]. Uszkodzenie włókien C powoduje zwiększenie pobudliwości kanałów sodowych i receptorów alfa-adrenergicznych poprzez na drodze *up-regulation* [4–6]. Odczucie bólu jest dalej wzmacniane w rogu grzbietowym przez toksyczną stymulację nocyceptywnych interneuronów drogą dodatkowego połączenia z włókien A $\beta$ . Zjawisko to nosi nazwę centralnej sensytyzacji [2, 7].

Bolesna neuropatia cukrzycowa może być wczesnym symptomem i objawiać się w stadium przedcukrzycowym (*pre-diabetes*) u ludzi i zwierząt [8–10]. We wcześniej przeprowadzonych badaniach autorzy wykazali związek między działaniem nieprawidłowej insuliny a zahamowaniem wpływu neurotroficznego, zmniejszoną ekspresją neuropeptydów nocyceptywnych i degeneracją komórek zwojów korzeni grzbietowych (DRG, *dorsal root ganglion*) u rodziców [11–13].

Peptyd C wywiera efekt insulinomimetyczny i brakuje go w cukrzycy typu 1, podobnie jak insuli-

ny [14, 15]. Chociaż nie wywiera on natychmiastowego efektu na hiperglikemię, przekazuje informację wewnątrzkomórkową częściowo przez drogę sygnałową insuliny [14–19]. Hamuje on sygnalizację insuliny przy wysokich stężeniach, a współdziała przy niskich [15–17]. We wcześniejszych badaniach wykazano, że peptyd C zwiększa ekspresję genu czynnika wzrostu nerwu (NGF, *nerve growth factor*), IGF-I i ich receptorów, a także samego receptora insulinowego [11, 18, 20].

W niniejszym badaniu autorzy analizowali wpływ terapeutyczny całkowitej substytucji peptydu C na neuropatię nocyceptywną u szczurów BB/Wor ze spontaniczną cukrzycą typu 1, prezentujących model choroby bliski cukrzycy typu 1 u ludzi.

## Projekt badania i metody

Autorzy przebadali 35 samców szczurów BB/Wor w stadium przedcukrzycowym oraz 17 szczurów bez skłonności do cukrzycy BB odpowiadających im pod względem wieku i płci. Szczury pochodziły z *Biomedical Research Models* (Worcester, MA). Wszystkie zwierzęta przetrzymywano w klatkach metabolicznych ze swobodnym dostępem do wody i karmy. Aby potwierdzić początek cukrzycy, codziennie monitorowano masę ciała, objętość moczu oraz glukozurię (Keto-Diastrix; Bayer, Elkhart, IN), a następnie na podstawie wyników badań określono codzienną dawkę insuliny. W celu utrzymania stężeń glukozy około 25 mmol/l, a także, aby zapobiec powstaniu kwasicy ketonowej, od początku choroby w wieku  $73 \pm 6$  dni, wszystkie szczury z cukrzycą otrzymywały codziennie suplementację insuliny cynkowo-protaminowej w dziennej dawce 1,6–2,6 jednostek (Novo-Nordisk, Princetown, NJ). Stężenie glukozy we krwi mierzono co 2 tygodnie oraz w dniu śmierci. Po stwierdzeniu początku cukrzycy szczury przydzielano losowo do 4 grup oraz 2 grup kontrolnych dopasowanych pod względem wieku. W 4. miesiącu badacze uśmiercili po 8 szczurów z cukrzycą i z grupy kontrolnej. Pozostałe 3 grupy szczurów z cukrzycą od 4. miesiąca otrzymywały podskórną drogą pompy osmotycznej (Alza, Palo Alto, CA) sól fizjologiczną lub sztucznie uzyskany szczurzy peptyd C-II (> 95% czystości w chromatografii w wysokiej rozdzielczości; Multiple Peptide System, San Diego, CA). Po rozpuszczeniu w buforze fosforanowym (PBS, *phosphate buffered saline*) peptyd C podawano drogą podskórną implantowanej pompy osmotycznej dostarczającej  $75 \text{ nmol} \times \text{kg}^{-1} \times 24 \text{ h}^{-1}$  lub w jednej iniekcji dziennie  $75 \text{ nmol/kg}$ . Szczury z tych grup uśmiercono w 7. miesiącu trwania cukrzycy i porównano z nieleczonymi osobnikami chorującymi

od 4 i 7 miesięcy oraz szczurami bez skłonności do cukrzycy w podobnym wieku i płci z grupy kontrolnej. Zwierzęta traktowano zgodnie z zaleceniami *Animal Investigation Committee, Wayne State University* (Detroit, MI) oraz *National Institutes of Health* (publikacja nr 85-23, 1995).

### Stężenia insuliny oraz biodostępność i stężenia peptydu C

Stężenie insuliny w surowicy krwi mierzono przy użyciu zestawu ELISA (Linco Research, St. Charles, MO w momencie śmierci, 20 min po ostatniej iniekcji insuliny). Stężenie peptydu C w surowicy badano codziennie 20 minut po podaniu podskórnym przy zastosowaniu zestawu do badań radioimmunologicznych (Linco Research). W celu zbadania biodostępności peptydu C w układzie sercowo-naczyniowym, jego stężenie w surowicy krwi kontrolowano w 0,5, 1, 2, 3, 6 i 24 godziny po podaniu podskórnym 75 nmol/kg masy ciała raz dziennie.

### Ciepły test podeszwy

Opóźnienie w reakcji cofania tylnej łapy po stymulacji cieplnej (42°C, 152 mW/cm<sup>2</sup>) było miarą hiperalgezji cieplnej, a pomiarów dokonano w 4. i 7. miesiącu, stosując aparat UGO Biological Research (Comerio, Włochy) [11, 12]. Sześciokrotnie mierzono czas w sekundach od aktywacji źródła ciepła do cofnięcia naprzemiennie prawej lub lewej łapy przez zwierzę. Obliczono średnią i zastosowano ją jako miarę opóźnienia reakcji.

### Pobieranie tkanek

Po 4 i 7 miesiącach szczury z cukrzycą oraz odpowiadające im zwierzęta z grupy kontrolnej uśmiercono, podając im dootrzewnowo dużą dawkę pentobarbitalu sodu (120 mg/kg mc.). Po 3 szczury z grup kontrolnej i cukrzycowej utrwalono w około 500 ml 4-procentowego paraformaldehydu. Pobrane od szczurów L4 i L5 DRG utrwalono w 4-procentowym roztworze paraformaldehydu w 0,1 mol/l buforu fosforowego (pH 7,4) przez noc w 4°C, wypłukano w PBS, odwodniono, zanurzono w ksylenie i umieszczono w parafinie.

Od 6 zwierząt z każdej grupy pobrano L4 i L5 DRG i nerwy kulszowe w celu ekstrakcji białka. Tkaniki zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do badania.

U szczurów z cukrzycą i z grupy kontrolnej wypreparowano nerwy tydkowe i utrwalono *in situ* na 10 minut za pomocą 1-procentowego kwasu kadylowego (pH 7,4) buforowanego 2,5-procento-

wym aldehydem glutaralowym, a następnie pobrano je i umieszczono w tym samym utrwalaczu na 2 godziny w 4°C. Potem preparaty włożono do 1-procentowego kakodylatu buforowanego (pH 7,4) czterotlenkiem osmu, po czym odwodniono i umieszczono w żywicy epoksydowej (Epon) w celu przeprowadzenia analizy morfometrycznej.

### Analiza morfometryczna

Przy zastosowaniu LKB ultramikrotomu (Marviac Limited, Halifax, Canada) uzyskano ultracienkie skrawki przekroju poprzecznego nerwów tydkowych do analizy morfometrycznej włókien niezmielinizowanych, które następnie wybarwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Zbadano je za pomocą mikroskopu elektronowego Zeiss 12AS (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Otrzymano systematycznie wybrane fragmenty reprezentujące przekroje poprzeczne o powierzchni około 30% nerwów tydkowych. Fotograficznie powiększono 10 000-krotnie, zeskanowano i wprowadzono do komputerowego systemu analizy obrazów (Image-1, Universal Imaging, West Chester, PA). Otrzymano następujące parametry morfometryczne włókien niezmielinizowanych: liczbę niezmielinizowanych włókien, gęstość włókna (n/mm<sup>2</sup>), średni rozmiar włókna (μm<sup>2</sup>), liczbę aksonów przypadającą na jednostkę komórkę Schwanna i częstość występowania relacji między komórką Schwanna typu 2 i aksonem, kieszonki kolagenowe, profil odnerwionych komórek Schwanna i regenerowanych włókien C [12].

### Identyfikacja i morfometria neuronów DRG zawierających substancję P i peptyd związany z genem kalcytoniny

Stosując metodę kompleksów awidyna-biotyna (zestaw *avidin biotin complex*, Vector Laboratories, Burlingame, CA) 6 skrawków o grubości mikrometrycznej wybarwiono metodą immunologiczną króliczą poliklonalną antysubstancją P lub króliczymi poliklonalnymi przeciwciałami przeciw peptydowi związanemu z genem kalcytoniny (CGRP, *calcitonin gene-related peptide*) (otrzymane z Peninsula Laboratories, San Carlos, CA). Kwantyfikację pozytywnych neuronów przeprowadzono za pomocą takiego samego systemu analizy obrazów jak powyżej. Obrazy trzech kolejno wybranych DRG (osobne fragmenty 60 μ) zachowano i oceniono za pomocą skali binarnej. Z każdego zwoju zachowano 200–300 komórek zwojowych z widocznymi jądrami. W każdej części oceniono częstość występowania i obszary neuronów zawierających substancję P i CGRP [13].

### Pomiary zawartości substancji P i CGRP w DRG

Zastosowano enzymatyczną metodę immunometryczną do oceny zawartości substancji P (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) oraz CGRP (SPLbio, Massy Cedex, France). Wyniki podano w pikogramach na zwój [13].

### Technika Western blotting

Zwoje korzeni grzbietowych poddano lizie w detergentowym buforze lizującym (50 mmol/l; Tris-HCl; pH 7,4; 150 mmol/l NaCl; 1 mmol/l EDTA; 1% Triton X-100; 1 mmol/l fluorku fenylmetylosulfonylu; 1  $\mu$ g/ml leupeptyny i 1  $\mu$ g/ml aprotyny). Lizat odwirowano, stosując 14 000 obrotów/min przez 20 minut w 4°C i stężenie białka zmierzono za pomocą odczynnika bisynchronicznego kwaśnego białka (Pierce, Rockford, IL), stosując albuminę surowicy krwi bydlęcej jako standard. Wydzielono 10–40  $\mu$ g metodą elektroforezy 7,5–12% SDS-PAGE i przełożono na błony z fluoropoliwinylidynu (Bio-Rad, Hercules, CA). Błony zablokowano buforem Tween-20-Tris (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 100 mmol/l NaCl i 0,1% Tween-20) zawierającym 5% odtłuszczonego mleka w proszku (Bio-Rad) przed inkubacją z króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi przeciw receptorowi IGF-1 (IGF-IR)- $\alpha$  (rozcieńczenie 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi przeciw receptorowi insulinowemu  $\alpha$  (rozcieńczenie 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi przeciw NGFR-TrkA (rozcieńczenie 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi przeciw p75 (rozcieńczenie 1:500, Sigma Chemical, St. Louis, MO) i mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciw aktynie (rozcieńczenie 1:5000; Chemicon International, Temecula, CA). Przeprowadzono badanie na obecność antygenów, stosując immunoluminescencję (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) z odpowiadającymi przeciwciałami połączonymi wtórnie peroksydazą chrzanową. Błony sfotografowano filmem Biomax (Kodak, Rochester, NY), obrazy zeskanowano i zagęszczenia określono za pomocą analizatora Bio-Rad Fluoro-S Multiimager (Bio-Rad). Ekspresję protein skorygowano ekspresją aktyny u zwierząt kontrolnych, którą określono arbitralnie jako 1,0.

### Analiza czynnika wzrostu nerwu

Zawartość NGF w nerwach kulszowych i DRG oceniono w jakościowym dwustronnym badaniu immunoenzymatycznym (Emax Immunoessay System;

Promega, Madison, WI). Badania przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta. Po zważeniu fragmenty nerwów kulszowych poddano homogenizacji w buforze lizującym (137 mmol/l NaCl, 20 mmol/l Tris HCl, pH 8,0, 1 mmol/l fluorku fenylmetylosulfonylu, 10  $\mu$ g/ml aprotyny, 1  $\mu$ g/ml leupeptyny i 0,5 mmol/l wanadu sodu), a następnie odwirowano (14 000 obrotów/min przez 20 min). Osad umieszczona na płytkach MaxiSorp 96-well (Nalge Nunc International, Rochester, NY) i dokonano pomiarów takich jak opisano wcześniej [12, 13]. Wynik podano w pikogramach na miligram białka w nerwie kulszowym i w pikogramach na zwój w DRG.

### Analiza statystyczna

Wszystkie wartości podano jako średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD, *standard deviation*). Znamienność różnic poddano analizie metodą ANOVA. Różnice między grupami oceniono w teście Scheffesa. Znamienność zdefiniowano jako wartość  $p < 0,05$ . Wszystkie analizy przeprowadzał personel niezwiązany z pochodzenia zwierząt.

### Wyniki

#### Dane kliniczne

Czteromiesięczne zwierzęta z cukrzycą charakteryzowały się utratą masy ciała, hiperglikemią i niedoborem insuliny (wszystkie  $p < 0,001$ ) (tab. 1). W 7. miesiącu zarówno nieleczone, jak i leczone peptydem C szczury BB/Wor cechowała ciężka hiperglikemia ( $p < 0,001$ ) i znamienna utrata masy ciała ( $p < 0,001$ ). Stężenie insuliny było znamienne obniżone ( $p < 0,001$ ) zarówno u nieleczonych, jak i leczonych peptydem C szczurów z cukrzycą (tab. 1). Stężenie peptydu C było obniżone u nieleczonych szczurów BB/Wor ( $p < 0,001$ ) i ponownie osiągnęło wartości prawidłowe u szczurów leczonych za pomocą pompy osmotycznej, lecz nie drogą iniekcji podskórnych (tab. 1). Stężenia peptydu C w krwi krążącej w różnym czasie po podaniu podskórnym 75 nmol peptydu C na kg masy ciała wynosiły: po 0,5 godzinie —  $13,616 \pm 2,142$  nmol/l; po godzinie —  $7,069 \pm 965$  nmol/l; po 2 godzinach —  $901 \pm 131$  nmol/l; po 3 godzinach —  $169 \pm 57$  nmol/l; po 6 godzinach —  $34 \pm 7$  nmol/l; i po 24 godzinach  $< 25$  nmol/l. Równanie rozkładu wynosiło  $y = 3,8204x^{-2,56}$ , gdzie  $r = 0,9829$ .

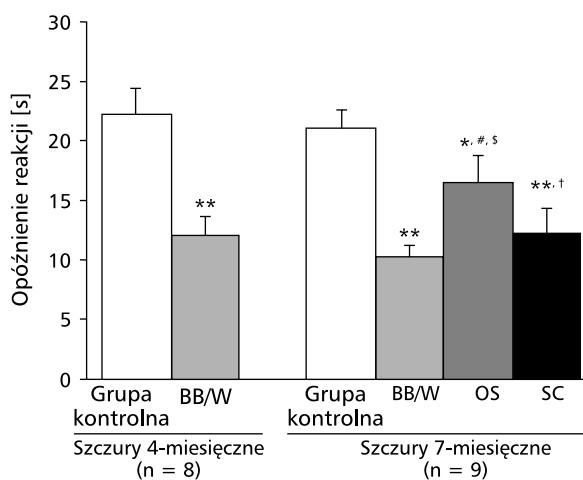
#### Test ciepłny podeszwy

Opóźnienie reakcji na bodziec ciepły mierzone u 4- i 7-miesięcznych szczurów z cukrzycą BB/Wor oraz z grupy kontrolnej przedstawiono na

Tabela 1. Masa ciała, stężenie glukozy we krwi, stężenie insuliny w surowicy, stężenia kontrolne peptydu C u szczurów BB/Wor nieleczonych i leczonych peptydem C

Czas trwania cukrzycy (miesiące)	Grupa	n	Masa ciała [g]	Stężenie glukozy we krwi [mmol/l]	Stężenie insuliny w surowicy [pmol/l]	Stężenie peptydu C [pmol/l]
4	Kontrolna	8	458 ± 16	5,0 ± 0,4	418 ± 48	
	BB/Wor	8	374 ± 16*	24,4 ± 1,9*	117 ± 46*	
7	Kontrolna	9	505 ± 37	5,3 ± 0,3	526 ± 108	727 ± 24
	BB/Wor	9	370 ± 18*	25,2 ± 1,7*	153 ± 55*	< 25*
	OS	9	370 ± 14*	25,6 ± 2,0*	144 ± 48*	696 ± 26
	SC	9	380 ± 16*	24,3 ± 2,1*	135 ± 32*	< 25*

Dane stanowią wartości średnie ± SD; OS — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczurzego peptydu C × kg<sup>-1</sup> × dzień<sup>-1</sup> przez pompę osmotyczną; SC — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczurzego peptydu C/kg w iniekcjach podskórnych raz dziennie; \*p < 0,001 vs. odpowiadające szczury z grupy kontrolnej



**Rycina 1.** Opóźnienie reakcji na bodziec cieplny u szczurów chorujących na cukrzycę od 4 i 7 miesięcy. Analizie porównawczej poddano wyniki 6 grup: 4-miesięczne szczury z grupy kontrolnej, 4-miesięczne nielezione szczury BB/Wor, 7-miesięczne szczury z grupy kontrolnej, 7-miesięczne nielezione szczury BB/Wor, 7-miesięczne szczury BB/Wor otrzymujące od 4. miesiąca cukrzycy szczurzy peptyd C 75 nmol × kg<sup>-1</sup> × dzień<sup>-1</sup> przez pompę osmotyczną (OS) i 7-miesięczne szczury BB/Wor otrzymujące od 4. miesiąca trwania cukrzycy 1 raz dziennie 75 nmol/kg szczurzego peptydu C w iniekcji podskórnej (SC). Wyniki podane są jako wartości średnie ± SD; \*p < 0,005; \*\*p < 0,001 vs. odpowiednio szczury z grupy kontrolnej; #p < 0,005 vs. 4-miesięczne nielezione szczury BB/Wor; †p < 0,001 vs. 7-miesięczne nielezione szczury BB/Wor; ‡p < 0,01 vs. OS

rycinie 1. Opóźnienie reakcji wycofania łapy uległo znacznemu zmniejszeniu zarówno u 4-, jak i 7-miesięcznych szczurów z cukrzycą (p < 0,001). Peptyd C podawany drogą pompy osmotycznej znacznie zredukował opóźnienie reakcji na bodziec cieplny u szczurów z cukrzycą, natomiast podawanie peptydu C drogą iniekcji podskórnych nie przyniosło istotnego skutku (ryc. 1).

### Analiza morfometryczna

W porównaniu ze szczurami z grupy kontrolnej liczba niezmielinizowanych włókien w nerwie tydkowym u 4- i 7-miesięcznych nieleczonych szczurów BB/Wor znacząco się zmniejszyła (p < 0,001, w obu przypadkach) (tab. 2). Peptyd C podawany przez pompę osmotyczną, lecz nie w iniekcjach podskórnych, znacząco poprawił ten spadek (p < 0,005 vs. nielezione 4-miesięczne szczury BB/Wor; p < 0,01 vs. 7-miesięczne nielezione szczury BB/Wor) (tab. 2). Gęstość włókien niezmielinizowanych znacząco zmniejszyła się u nieleczonych 4- i 7-miesięcznych szczurów BB/Wor (p < 0,05 w obu przypadkach). Procesowi temu zapobiegło podawanie drogą pompy osmotycznej (tab. 2). Znacząco spadkowi średniego rozmiaru włókna niezmielinizowanego u nieleczonych 4-miesięcznych (p < 0,05) i 7-miesięcznych (p < 0,005) szczurów BB/Wor zapobiegł peptyd C podawany przez pompę osmotyczną, lecz nie drogą iniekcji podskórnych (tab. 2). Częstość występowania odnerwionych komórek Schwanna wzrosła 4-krotnie (p < 0,005) u nieleczonych 4-miesięcznych szczurów BB/Wor oraz 2,6-krotnie u 7-miesięcznych nieleczonych szczurów BB/Wor. Całkowicie zapobiegł temu peptyd C podawany przez pompę osmotyczną, a także drogą iniekcji podskórnych (p < 0,001 w obu przypadkach) (tab. 2). Podobnie częstość występowania kieszonek kolagenowych w komórkach Schwanna i częstość związku między komórkami Schwanna a aksonami wzrosła u nieleczonych 4-miesięcznych (p < 0,05 i p < 0,001, odpowiednio) i 7-miesięcznych (p < 0,01 i p < 0,001, odpowiednio) szczurów z cukrzycą. Wzrost przyrostu od 4. do 7. miesiąca został całkowicie zatrzymany przez peptyd C podawany drogą pompy osmotycznej (p < 0,01 i p < 0,001, odpowiednio), podczas

Tabela 2. Dane morfometryczne włókien niezmielinizowanych nerwów łydkowych

	Grupa kontrolna	BB/Wor	OS	SC
n	5	5	5	5
Szczury 4-miesięczne				
włókna niezmielinizowane (n)	5065 ± 374	3622 ± 218*		
gęstość włókien niezmielinizowanych (n/mm <sup>2</sup> )	115 375 ± 9434	103 859 ± 3998†		
średnia powierzchnia włókna niezmielinizowanego [μm <sup>2</sup> ]	0,74 ± 0,09	0,61 ± 0,04†		
liczba aksonów/jednostka komórki Schwanna (n/komórka Schwanna)	5,26 ± 0,64	4,22 ± 0,29†		
profil komórek Schwanna odnerwionych (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	0,24 ± 0,18	0,97 ± 0,26†		
kieszonki kolagenowe (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	0,62 ± 0,42	1,59 ± 0,57†		
stosunek komórki Schwanna typu II/akson (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	1,18 ± 0,13	6,45 ± 2,00*		
włókna regenerowane (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	0,56 ± 0,43	2,07 ± 0,36*		
Szczury 7-miesięczne				
włókna niezmielinizowane (n)	6195 ± 740	3505 ± 293*	4,865 ± 602§ <sup>¶</sup>	4,022 ± 343*
gęstość włókien niezmielinizowanych (n/mm <sup>2</sup> )	122 212 ± 10 540	97 928 ± 7466†	108 487 ± 11 134	100 622 ± 9933†
średnia powierzchnia włókna niezmielinizowanego [μm <sup>2</sup> ]	0,71 ± 0,07	0,53 ± 0,04†	0,64 ± 0,06**	0,59 ± 0,04†
liczba aksonów/jednostka komórki Schwanna (n/komórka Schwanna)	5,29 ± 0,26	4,17 ± 0,11*	4,83 ± 0,21 <sup>†††</sup>	4,54 ± 0,23*
profil komórek Schwanna odnerwionych (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	1,00 ± 0,32	2,61 ± 0,57*	0,93 ± 0,18 <sup>††</sup>	1,10 ± 0,24 <sup>††</sup>
kieszonki kolagenowe (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	1,65 ± 0,32	3,15 ± 0,89 <sup>§</sup>	1,59 ± 0,51 <sup>¶</sup>	2,06 ± 0,41
stosunek komórki Schwanna typu II/akson (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	3,30 ± 0,54	14,45 ± 3,02*	6,57 ± 1,49 <sup>††</sup>	8,22 ± 2,16 <sup>†††</sup>
włókna regenerowane (% wszystkich włókien niezmielinizowanych)	1,69 ± 0,51	12,49 ± 0,46	5,48 ± 0,99* <sup>††§§</sup>	3,94 ± 0,49* <sup>††¶§§</sup>

Dane stanowią wartości średnie ± SD; OS — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczurzego peptydu C × kg<sup>-1</sup> × dzień<sup>-1</sup> przez pompę osmotyczną; SC — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczurzego peptydu C/kg w iniekcjach podskórnych raz dziennie; \*p < 0,001; †p < 0,05; ‡p < 0,005; §p < 0,01 vs. odpowiadające im szczury z grupy kontrolnej; ¶p < 0,01; \*\*p < 0,05; ††p < 0,005; †††p < 0,001 vs. 7-miesięczne nieleczone szczury BB/Wor; †p < 0,005; §§p < 0,001 vs. 4-miesięczne szczury BB/Wor; ¶¶p < 0,05 vs. OS

gdy ten efekt był mniejszy przy podawaniu podskórnym (tab. 2). Częstość zregenerowanych włókien była znamienne zwiększona (p < 0,001) u 4-miesięcznych, lecz nie u 7-miesięcznych szczurów z cukrzycą. Dostarczenie peptydu C zarówno drogą pompy osmotycznej, jak i w iniekcjach podskórnych znamienne (p < 0,001 — w obu przypadkach) poprawiło regenerację włókien C w porównaniu z 4-miesięcznymi szczurami z cukrzycą.

#### Liczba neuronów z substancją P i CGRP oraz zawartość neuropeptydu w DRG

Zawartość substancji P na zwój zmniejszyła się odpowiednio o 13% (NS) i 31% (p < 0,05) u 4- i 7-miesięcznych nieleczonych szczurów BB/Wor.

Spadkowi temu zapobiegło dostarczenie peptydu C drogą pompy osmotycznej i, w mniejszym stopniu, drogą iniekcji podskórnych (tab. 3). Dostarczenie przez pompę częściowo zapobiegło spadkowi zawartości CGRP w DRG u 7-miesięcznych nieleczonych szczurów BB/Wor (tab. 3). Częstość występowania neuronów zawierających substancję P i CGRP była zmniejszona nieznamienne u 4-miesięcznych, ale zmniejszona znamienne u 7-miesięcznych nieleczonych szczurów z cukrzycą (p < 0,005 i p < 0,05, odpowiednio). Przyrostowi ubytku neuronów z substancją P i CGRP zapobiegło podawanie peptydu C przez pompę osmotyczną, lecz nie w iniekcjach podskórnych. Średni rozmiar neuronów z substancją P i CGRP zmniejszył się znamienne (p < 0,001

Tabela 3. Morfometria oraz zawartość w neuronach substancji P i CGRP

	n	Grupa kontrolna	BB/Wor	OS	SC
Szczury 4-miesięczne					
zawartość SP (pg/zwój)	5	85,5 ± 13,8	74,3 ± 21,0		
neurony z SP (%)	3	24,0 ± 0,5	22,1 ± 1,7		
średnia powierzchnia neuronów z SP [ $\mu\text{m}^2$ ]	3	448,8 ± 11,8	380,6 ± 56,3		
zawartość CGRP (pg/zwój)	5	717,6 ± 160,1	628,1 ± 85,1		
neurony z CGRP (%)	3	29,1 ± 0,7	27,5 ± 2,6		
średnia powierzchnia neuronów z CGRP [ $\mu\text{m}^2$ ]	3	519,2 ± 18,9	439,2 ± 28,2*		
Szczury 7-miesięczne					
zawartość SP (pg/zwój)	6	87,6 ± 11,4	60,6 ± 20,5*	73,4 ± 14,8	68,9 ± 12,6
neurony z SP (%)	3	23,8 ± 1,2	18,3 ± 0,9 <sup>†</sup>	21,1 ± 1,3	18,6 ± 0,6 <sup>††</sup>
średnia powierzchnia neuronów z SP [ $\mu\text{m}^2$ ]	3	448,1 ± 14,3	346,7 ± 8,4 <sup>§</sup>	412,2 ± 10,5* <sup>¶</sup>	360,5 ± 9,7 <sup>§</sup>
zawartość CGRP (pg/zwój)	6	739,4 ± 109,0	488,3 ± 80,1 <sup>†</sup>	580,3 ± 104,9	529,0 ± 92,4*
neurony z CGRP (%)	3	29,4 ± 3,0	22,7 ± 1,5*	25,2 ± 2,9	22,8 ± 0,9* <sup>‡</sup>
średnia powierzchnia neuronów z CGRP [ $\mu\text{m}^2$ ]	3	536,9 ± 27,3	431,0 ± 30,0*	510,7 ± 24,0 <sup>‡</sup>	471,1 ± 46,0

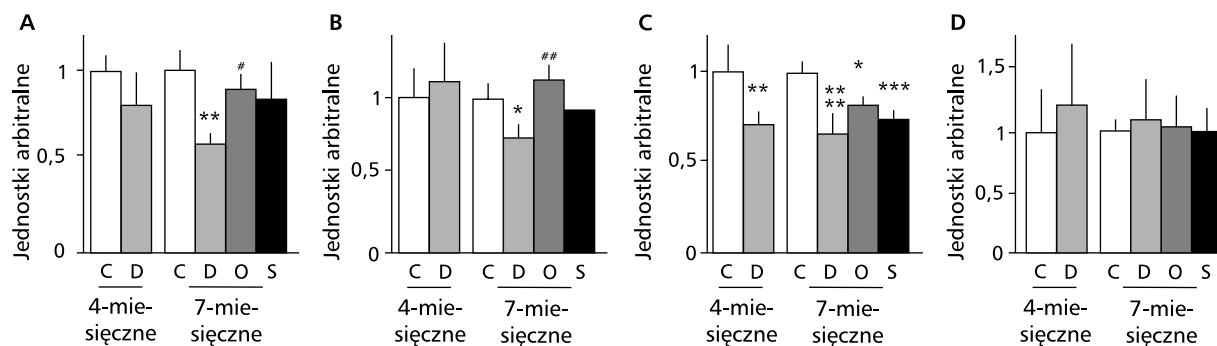
Dane stanowią wartości średnie  $\pm$  SD; OS — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczurzego peptydu C  $\times$  kg<sup>-1</sup>  $\times$  dzień<sup>-1</sup> przez pompę osmotyczną; SC — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczurzego peptydu C/kg w iniekcjach podskórnych raz dziennie; \*p < 0,05; <sup>†</sup>p < 0,005; <sup>§</sup>p < 0,001 vs. odpowiadające szczury z grupy kontrolnej; <sup>‡</sup>p < 0,05 vs. 4-miesięczne szczury BB/Wor; <sup>¶</sup>p < 0,001 vs. 7-miesięczne nieleczone szczury BB/Wor; <sup>‡</sup>p < 0,005 vs. OS

i p < 0,05, odpowiednio) u 7-miesięcznych nieleczonych szczurów BB/Wor. Atrofii neuronów z substancją P zapobiegło podawanie przez pompę osmotyczną (p < 0,001), podczas gdy rozmiar neuronów CGRP zwiększył się (p < 0,05) w porównaniu z 4-miesięcznymi zwierzętami z cukrzycą i różnił się nieznamienicie od stwierdzonego u osobników z grupy kontrolnej. Podawanie podskórne nie wpłynęło na rozmiar żadnego z neuronów (tab. 3).

#### Ekspresja receptorów neurotroficznyc w DRG

Ekspresja receptorów insulinowych zmniejszyła się znamienicie (p < 0,01) u 7-miesięcznych niele-

czonych szczurów BB/Wor. Spadkowi temu zapobiegło znamienicie (p < 0,05) podawanie peptydu C w pompie osmotycznej i, w mniejszym stopniu, w iniekcji podskórnej (ryc. 2). Ekspresja IGF-IR była niezmieniona u 4-miesięcznych szczurów z cukrzycą, lecz zmniejszyła się o 25% (p < 0,05) u 7-miesięcznych nieleczonych szczurów z cukrzycą. Spadkowi całkowicie zapobiegł peptyd C w pompie osmotycznej (p < 0,005) i, w mniejszym stopniu, w iniekcji podskórnej (ryc. 2). Ekspresja receptora o dużym podobieństwie do NGF (NGFR-TrkA) w DRG była znamienicie statystycznie zablokowana u 4- i 7-miesięcznych szczurów BB/Wor (p < 0,01 i p < 0,001,



Rycina 2. Porównanie ekspresji protein w DRG i NGF w nerwie kulszowym u 4- i 7-miesięcznych szczurów. A: receptor insulinowy (n = 4); B: Receptor IGF-1 (n = 4); C: NGFR o dużym podobieństwie (NGFR-TrkA) (n = 4); D: NGFR o małym podobieństwie (NGFR-p75) (n = 4) w DRG; C — szczury kontrolne; D — nieleczone szczury BB/Wor; O — szczury, które otrzymywały peptyd C 75 nmol  $\times$  kg<sup>-1</sup>  $\times$  dzień<sup>-1</sup> drogą pompy osmotycznej od 4. miesiąca trwania cukrzycy; S — szczury BB/Wor, które otrzymywały peptyd C 75 nmol/kg 1 raz dziennie podskórnie od 4. miesiąca trwania cukrzycy; wyniki podane są jako wartości średnie  $\pm$  SD; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005; \*\*\*\*p < 0,001 vs. odpowiednie szczury z grupy kontrolnej; #p < 0,05, ##p < 0,005 vs. 7-miesięczne nieleczone szczury BB/Wor

Tabela 4. Zawartość NGF w nerwie łydkowym

	n	Grupa kontrolna	BB/Wor	OS	SC
4-miesięczne NGF [pg/mg proteiny]	5	2702 ± 356	2150 ± 376*		
7-miesięczne NGF [pg/mg proteiny]	6	3518 ± 341	2207 ± 480 <sup>†</sup>	3029 ± 494 <sup>‡§</sup>	2429 ± 511 <sup>¶</sup>

Dane stanowią wartości średnie ± SD; OS — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczerzego peptydu C × kg<sup>-1</sup> × dzień<sup>-1</sup> przez pompę osmotyczną; SC — 7-miesięczne szczury BB/Wor, którym podawano 75 nmol szczerzego peptydu C/kg w iniekcjach podskórnych raz dziennie; \*p < 0,05; <sup>†</sup>p < 0,005; <sup>‡</sup>p < 0,01, vs. odpowiadające szczury z grupy kontrolnej; <sup>§</sup>p < 0,05 vs. 7-miesięczne nieleczone szczury BB/Wor; <sup>¶</sup>p < 0,05 vs. 4-miesięczne szczury BB/Wor

odpowiednio). Peptyd C podawany przez pompę częściowo poprawił ten ubytek (ryc. 2), podczas gdy podawanie go w iniekcjach podskórnych wywarło nieznaczny skutek. Ekspresja receptora o niskim powinowactwie do NGFR (NGFR-p75) i aktywność (dane nieprzedstawione) nie zmieniła się w żadnej z grup.

#### Zawartość NGF w nerwie kulszowym

Zawartość NGF w nerwie kulszowym zmniejszyła się o 20% (p < 0,05) i 37% (p < 0,005) u 4- i 7-miesięcznych nieleczonych szczurów BB/Wor, odpowiednio; spadkowi temu zapobiegło (p < 0,05) podawanie peptydu C drogą pompy osmotycznej, lecz nie w iniekcjach podskórnych (tab. 4).

#### Dyskusja

Autorzy przedstawili wpływ terapeutyczny substytucji peptydu C na rozpoznaną neuropatię nocycceptywną. Stałe podawanie pełnej dawki peptydu C wpłynęło korzystnie na hiperalgezę i wywołującą ją utratę włókien C. Towarzyszyła temu normalizacja receptorów insuliny i IGR-IR w komórkach zwojowych DRG i promocja regeneracji włókien C. Peptydu C w pompie osmotycznej zapobiegał dalszemu spadkowi gęstości, rozmiaru i zmianom degeneracyjnym we włóknach C. Ten proces zachodził równolegle z zapobieganiem dalszej utracie neuronów z nocycceptywną substancją P i CGRP oraz troficznego działania NGF poprzez NGFR-TrkA. Te zjawiska przebiegały w warunkach stałego poziomu hiperglikemii. Z drugiej strony podawanie pełnej dawki substytucyjnej peptydu C raz dziennie w miernym stopniu zapobiegło dalszemu spadkowi liczby włókien wywarło nieznaczny wpływ na regenerację włókien C oraz ekspresję receptora insulinowego i IGF-IR. Te odkrycia wykazują, że stałe podawanie peptydu C optymalizuje jego efekt terapeutyczny w neuropatii nocycceptywnej. Różnice w skutkach terapeutycznych tych dwóch sposobów podawania peptydu C można wytłumaczyć jego odmienną biodostępnością. Okres półtrwania peptydu C w surowicy wynosi około godziny. Tak więc przy podawaniu raz dziennie przez

większość doby brak peptydu C. Wlew ciągły w większym stopniu naśladuje prawidłowe fizjologiczne wydzielanie peptydu C z jego 3 pikami w ciągu 24 godzin i kilkoma mniejszymi pikami w międzyczasie, zapewniając podstawowe stężenie [21]. Niezwykle wysokie stężenie peptydu C w organizmie natychmiast po podaniu podskórnym może nawet hamować sygnalizację insuliny [15–17].

Neuropatia cukrzycowa jest wywołana kilkoma następującymi po sobie, częściowo współdziałającymi, dynamicznymi mechanizmami patogenetycznymi, które można podzielić na dwa stadia. Wczesna faza metaboliczna przedstawia dysfunkcję nerwów odwracalną dzięki korektom metabolicznym. Postępuje stopniowo wraz z długością trwania cukrzycy aż do późnej fazy strukturalnej i staje się w coraz większym stopniu niewrażliwa na interwencje metaboliczne [22].

W przedstawionym badaniu interwencja była celowo zapoczątkowana w stadium neuropatii nocycceptywnej, w której faza strukturalna jest już rozwinięta [11, 12], w celu zbadania zdolności naprawczych peptydu C i imitacji sytuacji klinicznej.

Peptyd C pochodzący od proinsuliny jest wydzielany w równomolarnym stężeniu jak insulina, a więc w cukrzycy typu 1 występuje jego niedobór. Chociaż nie wykryto receptora swoistego dla peptydu C, wiadomo, że uczestniczy on w przekazywaniu sygnałów [17, 19, 23]. Sam posiada właściwości neurotroficzne, podobnie jak insulina, a razem z insuliną wpływa na regulację genów NGF, IGF-1, NT-3 i odpowiadające im receptory, łącznie z receptorem insulinowym, poprzez mechanizm *upregulation* NF-kappaB [18, 20]. Wywiera efekt promujący aktywność Na/K ATP-azy w neuronach i eNOS, który leży u podstaw jego działania zapobiegającego wczesnej neuropatii cukrzycowej [24–29]. Podobnie jak insulina peptyd C wpływa także na fosforylację i inne modyfikacje potranslacyjne kilku protein neuronowych [30].

Nocycceptywne neurony DRG są uzależnione głównie od neurotroficznego działania NGF i insuliny



[31, 32]. W przedstawionym badaniu dzięki dostarczeniu peptydu C drogą pompy osmotycznej te dwa czynniki oraz odpowiadające im receptory powróciły do prawidłowego stanu lub były utrzymane na poziomie sprzed leczenia. Jednak podawanie drogą iniekcji podskórnych wywarło niewielki efekt u szczurów z cukrzycą. Rozbieżność między tymi dwiema grupami znalazła odzwierciedlenie w różnicach w liczbie neuronów nocycceptywnych, ich rozmiarach i zawartości w nich neuropeptydów.

Wzrost liczby włókien C w grupie z pompą osmotyczną jest najprawdopodobniej spowodowany zwiększeniem liczby włókien zregenerowanych. Podobnie utrzymanie liczby włókien sprzed leczenia w grupie przyjmującej iniekcje podskórne odzwierciedla słabszy efekt peptydu C na regenerację i zmiany degeneracyjne, takie jak relacja komórka Schwanna typu II/ akson, kieszonki kolagenowe i odnerwione komórki Schwanna.

Korzystny wpływ substytucji peptydu C na regenerację włókien nerwowych jest zgodny z wynikami wcześniej przeprowadzonych badań dotyczących wczesnej regulacji genów IGF-I, c-fos i NGF, a także z zapoczątkowaniem mechanizmu *upregulation* neurotubuli i *downregulation* neurofilamentów [20]. Utrzymanie rozmiaru aksonu i integralności jest w dużym stopniu zależne od syntezy oraz właściwej fosforylacji neurofilamentów w ciele neuronów i ich aksonów [33, 34], które z kolei zależą od działania neurotroficznego [35, 36]. Niewłaściwa synteza białek neuroszkieletowych wtórna do neurotroficznego wstrzymania i niestabilności ich mRNA spowodowanych niedoborem insuliny powoduje nieprawidłowy transport aksonalny, atrofię aksonów i degenerację typu *dying back* — objaw rozpoznawczy neuropatii cukrzycowej [13, 22, 37–39]. Dlatego też oddziaływanie naprawcze peptydu C na czynniki neurotroficzne i ich receptory, a także na działanie insuliny, harmonizuje z utrzymaniem niezmięnionej średnicy aksonu i korzystnym wpływem na degenerację neuronów i aksonów. Przedstawione wyniki pozwalają wyjaśnić, jakie mechanizmy leżą u podstaw klinicznej poprawy funkcjonowania nerwów u chorych na cukrzycę typu 1 leczonych peptydem C [40, 41].

Klinicznie, bolesna neuropatia cukrzycowa występuje u pacjentów w fazie *pre-diabetes* [8, 9] i w fazie wczesnej, w przebiegu neuropatii cukrzycowej u chorych na cukrzycę typu 2 [42, 43]. Ma to związek z deficytem czynników neurotroficznymi, jak NGF, i nieprawidłowym działaniem insuliny, które wpływają na peptydy neuroefektorowe, takie jak substancja P i CGRP [36, 38, 44]. Te sytuacje

kliniczne poddano badaniom eksperymentalnym u szczurów z nietoleracją glukozy Stockholm-bred GK oraz u szczurów z cukrzycą typu 2 BBZDR/Wor [10, 12]. W porównaniu ze szczurami z cukrzycą typu 1 BB/Wor u tych ostatnich stwierdzono wolniejszą progresję zmian czynnościowych, molekularnych i strukturalnych typowych dla neuropatii nocycceptywnej przed fazą charakteryzującą się stopniowo zmniejszającym się odczuwaniem bólu [12]. Takie różnice w stopniu progresji mogą wyjaśnić znaczną częstość występowania (aż do 32%) bolesnej neuropatii cukrzycowej u chorych na cukrzycę typu 2 [42]. Obecnie na szczurach BBZDR/Wor przeprowadza się badania mające na celu określenie, czy peptyd C ma taki sam wpływ na neuropatię nocycceptywną w cukrzycy typu 2, jaki wykazano dla typu 1.

Podsumowując, w zaprezentowanym badaniu wykazano, że stała substytucja peptydu C zapewnia lepszy efekt terapeutyczny w cukrzycowej neuropatii nocycceptywnej niż pojedyncze iniekcje podskórne. Wyniki te pozostają zbieżne z takim samym wpływem na czynność włókien zmielinizowanych i patologię [45]. Tak więc rezultaty te sugerują stanowczo, że uzyskanie optymalnego efektu terapeutycznego u chorych na cukrzycę typu 1 wymaga utrzymywania fizjologicznego stężenia peptydu C w odpowiednich proporcjach w ciągu dnia.

## Nota

H.K. został zaproszony do członkostwa w Fundacji Thomasa. Badanie uzyskało wsparcie *Creative Peptides* (Stockholm, Szwecja).

## PIŚMIENNICTWO

1. Quattrini C., Tesfaye S. Understanding the impact of painful diabetic neuropathy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2003; 19: S2–S8.
2. Kapur D. Neuropathic pain and diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2003; 19: S9–S15.
3. Dyck P.J., Lambert E.H., O'Brien P.C. Pain in peripheral neuropathy related to rate and kind of fiber degeneration. *Neurology* 1976; 26: 466–471.
4. Dickenson A.H., Matthews E.A., Suzuki R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. *Eur. J. Pain* 2002; 6: A51–A60.
5. Hirade M., Yasuda H., Omatsu-Kanbe M., Kikkawa R., Kitasato H. Tetrodotoxin-resistant sodium channels of dorsal root ganglion neurons are readily activated in diabetic rats. *Neuroscience* 1999; 90: 933–939.
6. Lee Y.H., Ryu T.G., Park S.J. i wsp. Alpha 1-adrenoceptors involvement in painful diabetic neuropathy: a role in allodynia. *Neuroreport* 2000; 11: 1417–1420.
7. Mannion R.J., Woolf C.J. Pain mechanisms and management: a central perspective. *Clin. J. Pain* 2000; 16: S144–S156.
8. Singleton J.R., Smith A.G., Bromberg M.B. Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes Care* 2001; 24: 1448–1453.

9. Novella S.P., Inzucchi S.E., Goldstein J.M. The frequency of undiagnosed diabetes and impaired glucose tolerance in patients with idiopathic sensory neuropathy. *Muscle Nerve* 2001; 24: 1229–1231.
10. Murakawa Y., Zhang W., Pierson C.R. i wsp. Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the GK-rat causes peripheral neuropathy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2002; 18: 473–483.
11. Kamiya H., Zhang W., Sima A.A.F. C-peptide prevents nociceptive sensory neuropathy in type 1 diabetes. *Ann. Neurol.* 2004; 56: 827–835.
12. Kamiya H., Murakawa Y., Zhang W., Sima A.A.F. Unmyelinated fiber sensory neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2005; 21: 448–458.
13. Kamiya H., Zhang W., Sima A.A.F. Apoptotic stress is counterbalanced by survival elements preventing programmed cell death of dorsal root ganglions in subacute type 1 diabetic BB/Wor rats. *Diabetes* 2005; 54: 3288–3295.
14. Sima A.A.F. (red.). Physiological and pathophysiological significance of C-peptide actions. *Exp. Diabetes Res.* 2004; 5: 1–96.
15. Sima A.A.F., Kamiya H. Insulin, C-peptide and diabetic neuropathy. *Science Med.* 2004; 10: 308–319.
16. Jensen M.E., Messina E.J. C-peptide induces a concentration-dependent dilation of skeletal muscle arterioles only in presence of insulin. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: H1223–H1228.
17. Grunberger G., Qiang X., Li Z. i wsp. Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-peptide. *Diabetologia* 2001; 44: 1247–1257.
18. Li Z.G., Zhang W., Sima A.A.F. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2003; 19: 375–385.
19. Zhong Z., Davidescu A., Ehren I. i wsp. C-peptide stimulates ERK1/2 and JNK MAP kinases via activation of protein kinase C in human renal tubular cells. *Diabetologia* 2005; 48: 187–197.
20. Pierson C.R., Zhang W., Sima A.A.F. Proinsulin C-peptide replacement in type 1 diabetic BB/Wor-rats prevents deficits in nerve fiber regeneration. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 2003; 62: 765–779.
21. Polonsky K.S., Given B.D., Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest.* 1988; 81: 442–448.
22. Sima A.A.F., Kamiya H. Diabetic neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Ann. NY Sci.* (w druku).
23. Grunberger G., Sima A.A.F. The C-peptide signaling. *Exp. Diabetes Res.* 2004; 5: 25–36.
24. Ohtomo Y., Aperia A., Sahlgren B., Johansson B.L., Wahren J. C-peptide stimulates rat renal tubular Na<sup>+</sup>, K(+) -ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia* 1996; 39: 199–205.
25. Ido Y., Vindigni A., Chang K. i wsp. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* 1997; 25: 563–566.
26. Sima A.A.F., Zhang W., Sugimoto K. i wsp. C-peptide prevents and improves chronic type I diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat. *Diabetologia* 2001; 44: 889–897.
27. Zhang W., Yorek M., Pierson C.R., Murakawa Y., Breidenbach A., Sima A.A.F. Human C-peptide dose dependently prevents early neuropathy in the BB/Wor-rat. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 2001; 2: 187–193.
28. Cotter M.A., Ekberg K., Wahren J., Cameron N.E. Effects of proinsulin C-peptide in experimental diabetic neuropathy: vascular actions and modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Diabetes* 2003; 52: 1812–1817.
29. Stevens M.J., Zhang W., Li F., Sima A.A.F. C-peptide corrects endoneurial blood flow but not oxidative stress in type 1 BB/Wor rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004; 287: E497–E505.
30. Sima A.A.F., Zhang W., Li Z.G., Murakawa Y., Pierson C.R. Molecular alterations underlie nodal and paranodal degeneration in type 1 diabetic neuropathy and are prevented by C-peptide. *Diabetes* 2004; 53: 1556–1563.
31. Levi-Montalcini R., Dal Toso R., della Valle F., Skaper S.D., Leon A. Update of the NGF saga. *J. Neurol. Sci.* 1995; 130: 119–127.
32. Sugimoto K., Murakawa Y., Sima A.A.F. Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2002; 7: 44–53.
33. Hoffman P.N., Cleveland D.W., Griffin J.W., Landes P.W., Cowan N.J., Price D.L. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 3472–3476.
34. Scott J.N., Clark A.W., Zochodne D.W. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain* 1999; 122: 2109–2117.
35. Zochodne D.W. Neurotrophins and other growth factors in diabetic neuropathy. *Semin. Neurol.* 1996; 16: 153–161.
36. Tomlinson D.R., Fernyhough P., Diemel L.T. Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes* 1997; 46 (supl. 2): S43–S49.
37. Recio-Pinto E., Rechler M.M., Ishii D.N. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J. Neurosci.* 1986; 6: 1211–1219.
38. Tomlinson D.R., Fernyhough P. Neurotrophism in diabetic neuropathy. W: Sima A.F.F. (red.). *Chronic complications in diabetes: animal models and chronic complications.* Harwood Academic Publishers, Amsterdam 2000; 167–182.
39. Kamiya H., Zhang W., Sima A.A.F. Degeneration of Golgi and neuronal loss in DRG's in diabetic BB/Wor-rats. *Diabetologia* 2006; 49: 2775–2785.
40. Ekberg K., Brismar T., Johansson B.L., Jonsson B., Lindstrom P., Wahren J. Amelioration of sensory nerve dysfunction by C-Peptide in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 536–541.
41. Ekberg K., Juntti-Berggren L., Norrby A. i wsp. C-peptide improves sensory nerve function in type 1 diabetes and neuropathy. *Diabetologia* 2005; 48 (supl. 1): A81.
42. Dyck P.J., Kratz K.M., Karnes J.L. i wsp. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester diabetic neuropathy study. *Neurology* 1993; 43: 817–824.
43. Ziegler D., Gries F.A., Spüler M., Lessmann F. The epidemiology of diabetic neuropathy. *J. Diabetes Complications* 1992; 6: 49–57.
44. Sima A.A.F. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol. Life Sci.* 2003; 60: 2445–2464.
45. Zhang W., Kamiya H., Ekberg K., Wahren J., Sima A.A.F.: C-peptide improves chronic peripheral neuropathy in type 1 diabetic BB/Wor-rats: effects of varying dose regimens. *Diabetes Metab Res Rev.* (w druku).