

ENDOTELİNİN DİABET VASKÜLER HİPERAKTİVİTESİNDEKİ ROLÜ VE KALSİYUM ANTAGONİSTİ VERAPAMİL'İN YARARLILIĞI

Nergis MURAT, Şule KALKAN, Sedef GIDENER

D.E.Ü.Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma streptozosin ile diabetize edilmiş ve kontrol grubu sıçanlardan elde edilen aort halkalarında (Krebs-Bikarbonat solüsyonu içerisinde 1 gr dinlenme gerilimi uygulanan) endotelin-1 (ET-1, 10-30 nM)'e ait kasıcı cevaplar çalışılmıştır. Diabetik sıçanlardaki maksimum ET-1 kasılma cevapları kontrol grubundan %150 daha fazla bulunmuş, fakat ET-1'in EC₅₀'si değişmemiştir. Her iki grupta da verapamil ET-1 cevaplarını azaltmıştır (diabetik grupta p<0.001, kontrol grubunda p<0.05), ancak PD₂ değerleri istatistiksel olarak değişmemiştir. Bu sonuçlar L-tipi kanallardan Ca²⁺ girişine neden olan ET-1 kasıcı etkisinin verapamil tarafından inhibe edildiğini fakat bu etkinin diabetes mellitus'ta değişmediğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Diabetes Mellitus, Endotelin-1, Verapamil, Sıçan, Aort

SUMMARY

In this study investigated the constrictor responsiveness to endothelin-1 (ET-1, 10-30 nM) of aortic rings (under 1 g resting tension in Krebs-Bicarbonate solution) from 8-weeks streptozotocin (STZ, 65 mg/kg, ip)-induced diabetic rats and vehicle-treated control rats. The maximum ET-1-induced contraction of the aorta in diabetic rats was increased by 150 %, but the EC₅₀ of ET-1 remained unchanged. In both group, verapamil reduced responses to endothelin (diabetic group p<0.001, control group p<0.05) but PD₂ values are not significantly different. These results suggest that verapamil inhibits Ca²⁺ entry through the L-type channel induced by ET-1 and this effect did not change in diabetes mellitus.

Key words: Diabetes Mellitus, Endothelin-1, Verapamil, Rat, Aorta

Endotelyum, vasküler tonusun düzenlenmesinde ve patolojik durumlarda damarların yapısal değişimini sağlamada rol oynamaktadır (1). Fizyolojik koşullar altında endotelial hücrelerden devamlı olarak salınan nitrik oksid, düz kas hücresinde gevşeme oluşturmaktadır (1). Ancak endotelial hücreler hasara uğradığında veya aşırı uyarıldığında aynı zamanda vazokonstriktör maddeler de salgılamaktadır. Bunlardan en çok bilineni endotelin-1'dir (ET-1) (2). Elektron mikroskopik çalışmalar endotelial hücrelerdeki salgılayıcı granüllerde ET-1'in depolandığını ve uygun uyarı geldiğinde hızla salındığını göstermiştir (3). Vasküler düz kas hücreleri için kuvvetli bir mitojen olduğu gösterilen (4) ET-1'in aterosklerotik vasküler hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir.

Vasküler hasar diabetes mellitusun en sık rastlanılan komplikasyonlarından biridir; ancak, diabetli hastalarda anjiopatiden sorumlu esas mekanizma(lar) kesin olarak bilinmemektedir (4,5). Diabetik hastalardan elde edilen izole damar dokularında bozulmuş endotelial hücre fonksiyonu gösterilmiştir (5). Çeşitli deneysel araştırmalar sonucunda glukozun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak endotelial hücre disfonksiyonuna neden olduğu saptanmıştır (5). Yüksek glukozun ET-1'in sentez ve salınımını uyardığı ve diabette oluşan vasküler komplikasyonlarda ET-1'in rolü olduğu ileri sürülmüştür (6).

Damar düz kas hücresinde, ET-1'in ET_A reseptörünü aktive etmesiyle fosfolipaz C uyarılır ve böylece inositol 1,4,5 trifosfat oluşur. Bu olaylar zincirine bağlı olarak hücre

içi depolardan Ca^{2+} salıverilmesi ve L tipi Ca kanallarından Ca^{2+} girişiyle hücre içinde Ca^{2+} miktarında artış olmaktadır (7). ET-1'le aktive olan iki tip Ca kanalı vardır. Bunlardan birisi de L tipi kalsiyum kanalıdır (8) ve bir fenilalkilamin türevi olan verapamil bu kanalları bloke ederek etki gösterir.

Bu çalışmanın amacı streptozosin ile diabet oluşturulan sıçan aort halkalarında endotelin ile oluşturulan kasıcı cevaplar üzerinde bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamilin etkinliğini araştırmaktır.

YÖNTEM

Hayvan Modeli:

Çalışmada aynı koşullar altında yetiştirilmiş 150-250gr ağırlığındaki erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar streptozosin (STZ, 65 mg/kg, i.p) ile diabetize edildi. Enjeksiyondan sekiz hafta sonra çalışma başladı. 12 saat aç bırakılan hayvanlardan öldürülmeden önce kan örnekleri alınarak plazma glukoz seviyeleri otoanalizör ile saptandı (Opera, Bayer).

STZ uygulanan hayvanlardan plazma glukoz düzeyleri 180 mg/dL'nin altında olanlar çalışma dışı bırakıldılar. Çalışmaya dahil edilen sıçan sayısı 8 idi. Kontrol grubu ise 6 hayvandan oluşmaktaydı.

Dokuların Hazırlanması:

Sıçanlar servikal dislokasyonla öldürüldü ve göğüs kafesleri açılarak torakal aorta dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Doku, Krebs solüsyonu içinde çevre yağ ve bağ dokusundan temizlendi. 2-3 mm genişliğinde ringler şeklinde hazırlanan preparatlar Krebs-Bikarbonat (K-B)

solüsyonu (NaCl 118mM; KCl 4.7; $CaCl_2$ 2mM; $NaHCO_3$ 25mM; KH_2PO_4 1.2mM; $MgSO_4$ 1.2mM; D-Glukoz 12 mM) içeren 20ml'lik organ banyolarına asıldı. 37°C'de sabit tutulan banyo solüsyonu %95 O_2 ve %5 CO_2 karışımı ile gazlandırıldı. Dokular 1gr izometrik gerilim altında 1 saat dinlendirildi. Preparat dinlenme süresi boyunca 15dk'lık intervallerle K-B solüsyonu ile yıkandı. İzometrik gerilim değişiklikleri Grass 7F poligraf'a bağlı Grass 7PT 03E-force-displacement transduser aracılığıyla kaydedildi.

Aortanın Doz-Cevap İlişkisi:

Bir saatlik dinlenme periodundan sonra dokular 80mM KCl solüsyonu ile 15 dakika inkübe edildi ve kasılma cevabı başlangıç seviyesine dönene kadar beklendi. Daha sonra ET-1 kümülatif olarak uygulandı (10^{-8} - 3×10^{-6} M). Dokular K-B solüsyonu ile her 15dk'da bir yıkandı. Yarım saatlik dinlenme periodundan sonra değişik konsantrasyonlarda verapamil ile preinkübe edilen dokulara kümülatif olarak ET-1 uygulandı. ET-1 yanıtları %KCl yanıtları olarak değerlendirildi.

İlaçlar:

Çalışmamızda verapamil (Knoll), endotelin-1 (Sigma) ve streptozosin (Sigma) kullanıldı. Streptozosin sitratlı buffer'da, diğer ilaçlar ise distile suda çözüldü.

İstatistiksel Analiz:

Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Konsantrasyon-cevap eğrilerinin istatistiksel analizi için ANOVA testi kullanıldı. Gruplar arasındaki ortalamaların istatistiksel

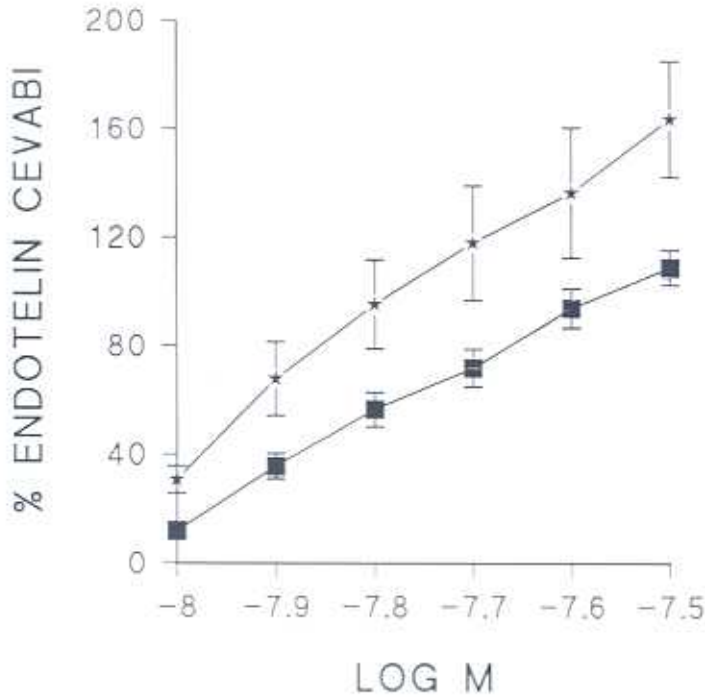
analizi için Student's t testi kullanıldı. $p < 0.05$ olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Her iki grubun plazma glukoz düzeyleri karşılaştırıldığında diabetli sıçanların plazma glukoz seviyeleri kontrol grubuna oranla iki kat daha yüksek bulunmuştur (Diabetli grup 229 ± 42 mg/dl (n=8), kontrol grubu 90.3 ± 37 mg/dl (n=6), $p < 0.05$).

Sıçan torasik aortasında ET-1'in kümülatif olarak uygulanması konsantrasyona bağlı kasılma cevabı oluşturdu (Şekil 1). Kontrol grubunda endotelinle oluşan kasılmalarla elde edilen pD_2 değeri 7.73 ± 0.04 olarak bulundu. Aynı grupta verapamille inkübasyon sonrasında elde edilen endotelin kasılmalarının pD_2 değeri ise 7.34 ± 0.39 olarak bulundu ($p > 0.05$). Diabetli

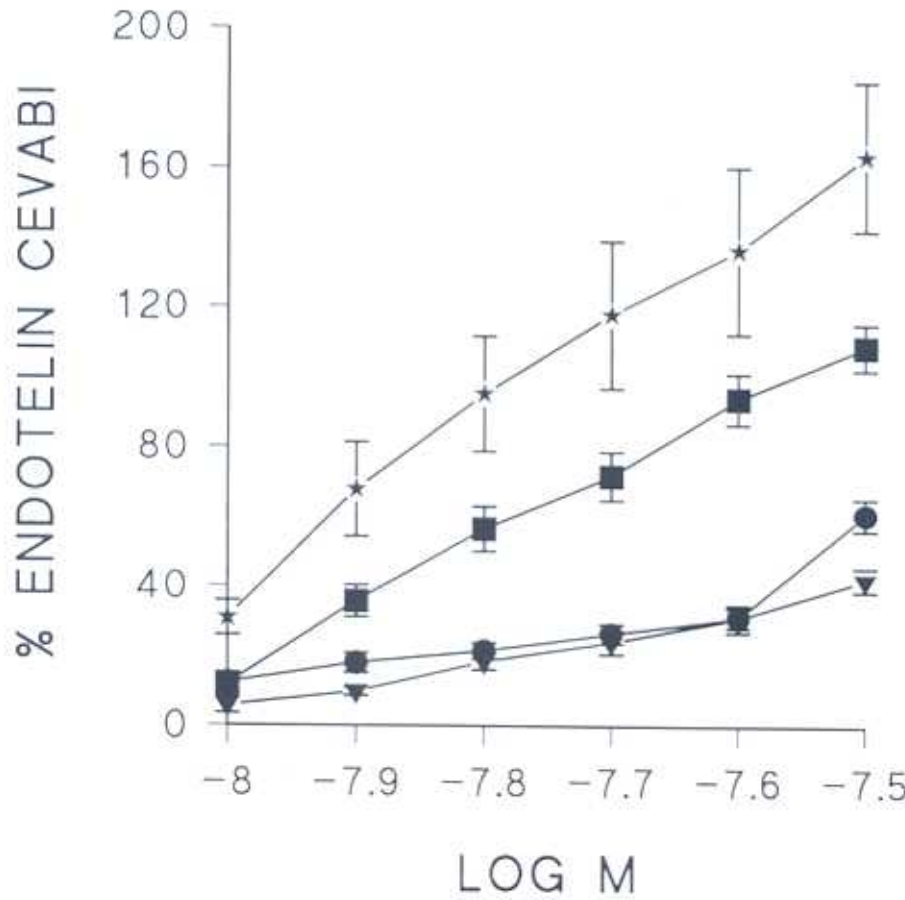
grupta endotelinle oluşan kasılmalarla elde edilen pD_2 değeri 7.78 ± 0.07 olarak bulundu. Aynı grupta verapamille inkübasyon sonrasında elde edilen endotelin kasılmalarının pD_2 değeri ise 7.64 ± 0.04 olarak bulundu ($p > 0.05$). Diabetli ve kontrol grubunun pD_2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$, Tablo I, Şekil 1). Diabetik grup ile kontrol grubunu karşılaştırdığımızda diabetli gruptaki E_{max} değerlerinde (%163.7) kontrol grubuna (%106.9) göre artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Ancak her iki grupta da verapamille inkübasyon sonrasında E_{max} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma bulundu (Tablo I). Her bir grupta görülen ET-1 cevapları kendi içerisinde verapamil preinkübasyonu ile maksimum cevapları karşılaştırıldığında inhibe olmuştur, ancak gruplar arasında oluşan % inhibisyonda istatistiksel farklılık gözlenmemiştir (Şekil 2).



Şekil 1: Endotelin doz-cevab eğrisi (*diabetli grup, ■ kontrol grubu)

Tablo 1: Diabetli ve kontrol gruplarında verapamil varlığında ve yokluğunda ET-1 ile elde edilen pD_2 , E_{max} değerleri.

	ET-1		Verapamille preinkübe ET-1	
	pD_2	E_{MAX} (% KCl)	pD_2	E_{MAX} (% KCl)
Kontrol grubu	7.73	106.9	7.74	42.1
Diabetli grup	7.78	163.7	7.64	60.8



Şekil 2: ★ Diabetli grubun ET-1 konsantrasyon cevap eğrisi, ● Diabetli grubun 3×10^{-5} M verapamille inkübasyon sonrasında ET-1 konsantrasyon cevap eğrisi, ■ Kontrol grubunun ET-1 konsantrasyon cevap eğrisi, ▼ Kontrol grubunun 3×10^{-5} M verapamille inkübasyon sonrasında ET-1 konsantrasyon cevap eğrisi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, verapamilin hem diabet oluşturulmuş sıçanlarda hem de kontrol grubunda ET-1 ile oluşturulan maksimum kasıcı cevabı inhibe ettiği gözlenmiştir.

Bundan önceki çalışmalarda streptozosin ile enjeksiyondan 2 ve 6 hafta sonra çalışılan aort

preparatlarında ET-1'e ait kasılma cevaplarının azaldığı bildirilmiştir (9). Nugent ve ark.ı (1996) ise insülin bağımlı olmayan diabetes mellituslu hastaların ön koluna lokal olarak infüze edilen ET-1'in vazokonstriksiyon yapmadığını bildirmişlerdir (10). Bu sonuçlar, diabetli sıçan aortlarında ET-1 cevaplarının % 150 arttığını bildiren bulgularımız ile uyumlu olmamasına

karşın, sonuçlar arasındaki farkın streptozosin enjeksiyonundan sonra geçen süreye, tür farkına ve uygulanma şekline bağlı olabileceğini düşünüyoruz. Bunun dışında yine streptozosin ile diabetize edilmiş sıçanlarda 50 gün sonra in vitro olarak çalışılan renal arterlerde ET-1 cevaplarının değişmediği de bildirilmiştir (11).

Arteriyal düz kaslarda ET_A reseptörlerinin uyarılması ile, hücre içi depolardan Ca^{2+} mobilizasyonu olduğu ve dihidropridin sensitif olmayan veya voltaj kapılı kalsiyum kanalları aracılığı ile Ca^{2+} içe akımında artış olduğunu (12) bildiren makalelerin yanında ET-1 tarafından aktive edilen Ca^{2+} girişinde L-tipi kanalların rol oynadığı da ileri sürülmüştür (7). Yine kobay portal veninde (13) ve domuz koroner arterinde (14) vasküler düz kas hücrelerinde yapılan çalışmalar da, ET-1'in dihidropridin sensitif kanalları aktive ettiğini göstermiştir. Buna karşın yapılan başka bir araştırma sonucunda ise insan uterin arterinde ET-1 cevaplarının dihidropridin sensitif Ca^{2+} kanallarından başka bir kanal aracılığı ile Ca^{2+} influksuna neden olduğu ileri sürülmüştür (15). Sunman ve ark.ı (1993) ise insan omental ve deri altı rezistans arterlerinde ET-1'e bağlı kasılma cevaplarında ekstrasellüler Ca^{2+} 'nin içe akışında voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının farklı rolü olduğunu ve kalsiyum antagonistlerinin etkilerinin bölgesel farklılıklar gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (16). Bizim çalışmamızda, kalsiyum kanal blokörü olan verapamilin hem streptozosin ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda hem de kontrol grubunda ET-1 ile oluşturulan maksimum kasıcı cevabı inhibe ettiği gözlenmiştir.

Bizim sonuçlarımız ile uyumlu olarak çeşitli arterlerde ET-1 ile oluşturulan yanıtların kalsiyum antagonistleri ile inhibe olduğu bildirilmiştir (12,17,18,19). Bu sonuçlardan farklı olarak Lawson ve ark.(1992) spontan hipertansif sıçanlarda yaptıkları çalışmada, nitrendipine vazodepresör cevapların ET-1 ile modifiye edilmediğini ve bu nedenle ET-1 ve kalsiyum antagonistleri arasında direkt bir etkileşme olamayacağını ileri sürmüşlerdir (20).

Diabet mellituslu hastalarda (21) ve streptozosin enjeksiyonu ile 8 haftada diabet oluşturulan sıçanlarda (22) plazma ET-1 düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Ancak Kanno ve ark.ı (1991) yüksek glukoz düzeyinin in vitro olarak vasküler endotelial hücrelerden ET-1 salınımını stimüle etse bile, anjiopatili veya anjiopatisiz diabetes mellituslu hastaların çoğunda dolaşan ET-1 düzeyinin yükselmediğini bildirmişlerdir (4). ET-1'in endokrin etkiden ziyade otokrin ve/veya parakrin olarak görev yaptığını ve vasküler endotelial hücrelerdeki lokal sentezinin önemli olduğunu vurgulamışlardır (23).

Özet olarak; streptozosin ile diabet oluşturulan sıçanlarda ET-1'e ait kasılma cevabının arttığını, ET-1 ile oluşan kasılma cevaplarının verapamil tarafından L-tipi kalsiyum kanallarından Ca^{2+} girişini önleyerek inhibe edildiğini, ancak bu etkinin streptozosin ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda herhangi bir değişikliğe uğramadığını söyleyebiliriz.

Teşekkür:

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğünce 0923960111 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Haller H. Endothelial function. General considerations. *Drugs* 1997; 53: 1-10.
2. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.
3. Tsubota K, Kitazumi K. The control of endothelin-1 secretion. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1059-1069.
4. Kanno K, Hirata Y, Shichiri M, Marumo F. Plasma endothelin-1 levels in patients with diabetes mellitus with or without vascular complication. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 475-476.
5. Cohen RA. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 87: 67-76.
6. Yamauchi T, Ohnaka K, Takayanagi R ve ark. Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1990; 267: 16-18.
7. Xuan Yting, Glass PSA. Propofol regulation of calcium entry pathways in cultured AI and rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 5-12.
8. Masaki T. Tissue specificity of the endothelin-induced responses. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 1-4.
9. Hodgson WC, King RG. Effects of glucose, insulin or aldose reductase inhibitor on responses to endothelin-1 of aortic rings from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 644-649.
10. Nugent AG, McGurk C, Hayes JR, Johnston GD. Impaired vasoconstriction to endothelin 1 in patients with NIDDM. *Diabetes* 1996; 45: 105-107.
11. Torffvit Ö, Edvinsson L. Blockade of nitric oxide decreases the renal vasodilatory effect of neuropeptide Y in insulin-treated diabetic rats. *Plügers Arch* 1997; 434:445-450.
12. Filep JG, Skrobik Y, Fournier A, Földes-Filep E. Effect of calcium antagonists on endothelin-1-induced myocardial ischemia and oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 893-900.
13. Inoue Y, Oike M, Nakao K, Kitamura K, Kuriyama H. Endothelin augments unitary calcium channel currents on the smooth muscle cell membrane of guinea-pig portal vein. *J Physiol (Lond)* 1990; 423: 171-191.
14. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N ve ark. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3915-3918.
15. Bodelsson G, Sjöberg NO, Stjernquist M. Contractile effect of endothelin in the human uterine artery and autoradiographic localization of its binding sites. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 745-750.
16. Sunman W, Martin G, Hair WM, Sever PS, Hughes AD. Effect of calcium antagonists on endothelin-induced contraction of isolated human resistance arteries: differences related to site of origin. *J Hum Hypertens* 1993; 7: 189-191.
17. Luscher TF, Yang Z. Calcium antagonists and ACE inhibitors. Effect on endothelium and vascular smooth muscle. *Drugs* 1993; 46: 121-132.
18. Okabe H, Chijiwa Y, Yoshinaga M, Misawa T, Kabemura T, Nawata H. Direct contractile effect of endothelin-1 on isolated circular smooth muscle cells of guinea pig caecum. *Digestion* 1995; 56: 21-24.
19. Ruschitzka FT, Luscher TF. Is there a rationale

- for combining angiotensin-converting enzyme inhibitors and calcium antagonists in cardiovascular disease? *Am Heart J* 1997; 134: 31-47.
20. Lawson K, Barras M, Zazzi-sudriez E, Martin DJ, Armstrong JM, Hicks PE. Differential effects of endothelin-1 on the vasorelaxant properties of benzopyran and non-benzopyran potassium channel openers *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107: 58-65.
21. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC ve ark. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33: 306-10.
22. Tada H, Marumatsu I, Nakai T, Kigoshi S, Miyabo S. Effects of chronic diabetes on the responsiveness to endothelin-1 and other agents of rat atria and thoracic aorta. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1221-1228.
23. Güvener N, Aytemir K, Aksoyek S, Gedik O. Plasma endothelin-1 levels in NIDDM patients with macrovascular disease. *Coron Artery Dis* 1997;8: 253-258.