

Pharmacological modulation of vascular abnormalities in experimental diabetes

Citation for published version (APA):

Heesen, B-J. (1996). *Pharmacological modulation of vascular abnormalities in experimental diabetes*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/1996

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Diabetes mellitus is characterized by a chronic elevation of the blood glucose concentration. It is caused by an absolute or a relative deficiency of insulin. Diabetes affects more than 300 thousand people in the Netherlands and about 200 million world-wide. Morbidity and mortality as well as quality of life of people with diabetes mellitus are usually determined by the development of vascular complications. Vascular dysfunction in diabetes has many features which range from mild abnormalities such as micro albuminuria and background retinopathy to severe conditions like end-stage renal failure, blindness and atherosclerosis.

In this thesis characteristics of vascular dysfunction were studied using an experimental diabetes model. The use of animal models allowed us to study different aspects of vascular dysfunction at a more basal level. We studied changes in large and smaller arteries in rats who were made diabetic by streptozotocin.

In **chapter 3** we describe the effects of duration of experimental diabetes, and glucose concentration on the vascular reactivity of the isolated aorta. We compared *in vitro* contractile responses to phenylephrine and relaxation responses to acetylcholine and sodium nitroprusside in isolated aortic rings from diabetic and control rats in normal (5 mM) and high (30 mM) glucose concentrations. Aortic rings from male Sprague Dawley rats who were diabetic for 9-days, 6-weeks and 3-months and from age-matched control rats were mounted in a myograph. With increasing duration of diabetes, maximal contractile responses to phenylephrine decreased. Acetylcholine-induced relaxation was decreased in aorta's from 9-day diabetic animals, compared to control aortas in 5 mM glucose. This decrease was also observed in control aortas exposed *in vitro* to 30 mM glucose for only 45 min. In contrast, acetylcholine-induced relaxation of 6-week and 3-month diabetic aortas in 30 mM glucose was increased by 50% compared to control aortas in 5 mM glucose. Relaxation to sodium nitroprusside was reduced in short-term diabetes compared to control aorta, but enhanced with longer duration of diabetes. These observations indicate that: 1) aortic cyclic GMP relaxation function is impaired by acute elevation of glucose levels after nine days of diabetes or *in vitro* in control aorta exposed to hyperglycemia. 2) in 30 mM glucose the aorta's of animals with six weeks and three months diabetes show an enhanced relaxation to acetylcholine and sodium nitroprusside *in vitro* compared to control aortas in 5 mM glucose. Thus, in time the vessel seems to adapt to this new situation.

In **chapter 4** we describe the influence of a diabetes on smaller arteries than the aorta. For this we isolated mesenteric and renal resistance arteries. There is a difference in the degree by which aorta, mesenteric and renal resistance arteries are affected by the diabetic state. The aorta was most severely affected by diabetes in both contractile and relaxing properties. The mesenteric resistance artery is less affected, since in this vessel no effect was seen on contractile function, but relaxation response to an endothelium-dependent relaxing agent was increased. Renal resistance arteries were unaffected, and no influence of the diabetic state was measurable.

SUMMARY

In **chapter 5** we describe the influence of various guanidine compounds on the inhibition of nitric oxide (NO) formation by cytokine-inducible and vascular constitutive isoforms of NO synthase. We compared aminoguanidine, diaminoguanidine, methylguanidine, and dimethylguanidine to N^G-monomethyl-L-arginine. These comparisons were performed by assessing (1) cytokine-induced production of nitrite by rodent β -cell insulinoma cells, (2) vasoconstrictor responses of isolated rat mesenteric arteries, and (3) *in vivo* blood pressure responses following intravenous bolus injection in anesthetized rats. We conclude that aminoguanidine is a selective inhibitor of the inducible isoform of NO synthase and that dimethylguanidine, like N^G-monomethyl-L-arginine, is a relatively potent inhibitor of both isoforms of NO synthase.

In **chapter 6, 7, and 8** we describe the effect of different pharmacological agents on the disturbed vascular reactivity in experimental diabetes. We studied the effects of normal blood glucose levels by insulin therapy, the effects of the nitric oxide inhibitors aminoguanidine and methylguanidine, the angiotensin converting enzyme inhibitor perindoprilat, and the aldose reductase inhibitors sorbinil and zopolrestat. We conclude that (1) insulin treatment prevents the disturbed vascular reactivity as observed in experimental diabetes. (2) Aminoguanidine treatment also prevented the development of disturbed the vascular reactivity, but methylguanidine has a less pronounced effect. (3) Perindoprilat does not affect the altered vascular reactivity in the diabetic animal, but reduces the contractile force to phenylephrine and enhances the response to acetylcholine in the aorta of control animals. (4) Sorbinil and zopolrestat had no effect on preventing the disturbed vascular reactivity in the aorta of diabetic animals.

In **chapter 9** we describe the differences in compliance and distensibility of the aortas of diabetic and non-diabetic rats. Our *in vitro* experiments showed that the contractile reactivity of the aorta was disturbed in experimental diabetes. We therefore compared in anesthetized control and diabetic rats, the compliance and distensibility of the thoracic aorta. In diabetic rats: (1) compliance was not significantly altered, (2) body weight, pulse pressure, heart rate, and the cross sectional area of the aortic media were significantly reduced and, (3) the distensibility of the aorta was significantly increased. Intravenous infusion of low doses of phenylephrine reduced the compliance coefficient to the same extent in control and diabetic rats and did not modify the distensibility. A high dose of phenylephrine reduced the compliance and distensibility to the same extent in aorta of control and diabetic rats, abolishing the differences between diabetic and control. Infusion of sodium nitroprusside reduced diastolic pressure and increased the distensibility coefficient, but not the compliance coefficient. Differences between diabetic and control animals persisted in the presence of sodium nitroprusside. We conclude that in intact diabetic rats the main alteration of the aorta consists of a reduction of the lumen caliber and of the wall mass, which involves an elevation of the distensibility and is not accompanied by alteration of the dynamic compliance of the vessel.

From the studies, described in this thesis we conclude that vascular reactivity is changed in experimental diabetes. Insulin treatment prevents this disturbed vascular reactivity, suggesting that the change in vascular reactivity is due to hyperglycemia

SUMMARY

perse. In people with diabetes intensive insulin therapy is necessary to achieve (near) normoglycemia. As (near) normoglycemia can not always be reached because of the development of hypoglycemia the use of additional drugs is warranted. From the studies presented in this thesis we conclude that aminoguanidine maybe such a drug. At the moment aminoguanidine is tested in a clinical trial in the USA, the results are to be expected in the next years.

SAMENVATTING

Diabetes mellitus is een chronische ziekte die gekenmerkt wordt door een verhoging van de bloedglucose concentratie. Diabetes mellitus wordt veroorzaakt door een absoluut of relatief gebrek aan insuline. Meer dan driehonderdduizend mensen in Nederland en ongeveer tweehonderd miljoen mensen wereldwijd hebben diabetes. Morbiditeit, mortaliteit en de kwaliteit van het leven van de mensen met diabetes mellitus wordt normaal gesproken bepaald door de ontwikkeling van diabetes mellitus. Vasculaire dysfunctie in diabetes heeft verscheidene vormen welke variëren van milde symptomen zoals micro-albuminurie en retinopathy tot ernstigere aandoeningen zoals nierfalen, blindheid en atherosclerose.

In dit proefschrift zijn karakteristieken van vasculaire dysfunctie bestudeerd, gebruikmakend van een experimenteel diabetes model. Het gebruik van diersmodellen stelt ons in staat om het aspect van vasculaire dysfunctie beter te bestuderen. Wij bestudeerden de veranderingen in vasculaire reactiviteit in de aorta, mesenteriale en renale weerstandsvaten in ratten met streptozotocine geïnduceerde diabetes.

In **hoofdstuk 3** beschrijven wij de effecten van experimentele diabetes, diabetes duur en glucose concentratie op de vasculaire reactiviteit in de geïsoleerde aorta. Wij vergeleken *in vitro* contractie van phenylephrine en relaxatie met acetylcholine of natrium nitroprusside in geïsoleerde ringen van de aorta van diabetische en controle ratten in normale (5 mM) en hoge (30 mM) glucose. Geïsoleerde aorta's van ratten met een diabetes duur van 9 dagen, 6 weken en 3 maanden werden vergeleken met leeftijdsgecontroleerde controle ratten. Met toename van de diabetesduur nam de maximale contractiele response op phenylephrine af. De door acetylcholine geïnduceerde relaxatie was afgenomen in de aorta van ratten met kortdurende diabetes vergeleken met controle aorta's in 5 mM glucose. Deze verminderde relaxatie werd ook waargenomen in controle aorta's welke *in vitro* gedurende 45 minuten werden blootgesteld aan 30 mM glucose. Dit in tegenstelling tot de door acetylcholine geïnduceerde relaxatie in aorta's van ratten met een diabetes duur van 6 weken en 3 maanden in 30 mM welke was toegenomen met 50% vergeleken met controle aorta's in 5 mM glucose. De door natrium nitroprusside geïnduceerde relaxatie was verminderd in de aorta's van dieren met 9 dagen diabetes vergeleken met controle aorta, maar verbeterde naarmate de diabetes duur langer werd. Deze observaties tonen aan dat: 1) relaxatie verminderd is wanneer de glucose concentratie acuut verhoogd wordt. 2) in 30 mM glucose de aorta's van dieren met zes weken en drie maanden diabetes een toegenomen relaxatie laten zien ten opzichte van controle aorta's in 5mM glucose. De aorta's lijken zich dus aan te passen aan de nieuwe situatie.

In **hoofdstuk 4** beschrijven wij de invloed van diabetes op kleinere bloedvaten, zoals mesenteriale en renale weerstandsvaten. Diabetes blijkt een andere invloed te hebben op aorta, mesenteriale en renale weerstandsvaten. De aorta lijkt het meeste aangedaan in zowel contractiele als relaxerende eigenschappen. De reactiviteit van mesenteriale weerstandsvaten is minder veranderd, er werd geen afwijking in de

SAMENVATTING

contractiele component gevonden. Diabetes mellitus lijkt geen meetbare invloed op de vaatreactiviteit van renale weerstands vaten te hebben.

In **hoofdstuk 5** beschrijven wij de invloed van verschillende guanidine substanties op de inhibitie van stikstof oxyde (NO) vorming via de cytokine-geïnduceerde en constitutieve isovormen van NO synthase. Wij vergeleken aminoguanidine, diamino-guanidine, methylguanidine en dimethylguanidine met NG-mono-methyl-L-arginine. Deze vergelijkingen werden gedaan door (1) het meten van cytokine geïnduceerde produktie van nitriet door β -cell insulinoma cellen, (2) het meten van vasoconstrictoire respons van geïsoleerde mesenteriale weerstandsarteriën van de rat en (3) het meten van de bloeddruk reactie na toediening van een intraveneuze bolus injectie in verdoofde ratten. Wij concluderen dat aminoguanidine een selectieve remmer van de induceerbare isovorm van NO synthase is en dat dimethylguanidine, net als NG-mono-methyl-L-arginine, een relatief sterke remmer is van beide isovormen van NO synthase.

In **hoofdstuk 6, 7 en 8** beschrijven wij de effecten van verschillende farmacologische interventies op de vasculaire reactiviteit bij experimentele diabetes. Wij bestudeerden de effecten van insuline, de effecten van medicamenten, als de NO synthase remmers aminoguanidine en methylguanidine, de ACE remmer perindoprilat en de aldose reductase remmers sorbinil en zopolrestat. In deze hoofdstukken concluderen wij dat: (1) insuline behandeling een verstoring van de vasculaire reactiviteit, zoals die optreedt bij experimentele diabetes, voorkomt. (2) Aminoguanidine heeft een vergelijkbaar effect op de vasculaire reactiviteit, methylguanidine heeft een minder duidelijk effect. (3) Perindoprilat heeft geen invloed op de veranderde vaatreactiviteit in ratten met experimentele diabetes, maar wel de contractie kracht, welke vermindert in controle dieren. (4) Sorbinil en zopolrestat hebben geen effect op de vasculaire reactiviteit in de aorta van ratten met diabetes.

In **hoofdstuk 9** beschrijven wij de verschillen tussen de compliantie en distensibiliteit in ratten met en zonder diabetes. De *in vitro* experimenten lieten zien dat de contractiele reactiviteit van de aorta veranderd is in de diabetische rat. Daarom vergeleken wij in verdoofde diabetische en niet diabetische dieren de compliantie en distensibiliteit van de thoracale aorta m.b.v. een echo. In diabetische ratten vonden wij dat: (1) de compliantie niet significant veranderd was, (2) lichaamsgewicht, polsdruk, hartslagfrequentie en de cross sectionele oppervlakte van de aorta significant verlaagd waren. Daarnaast was de distensibiliteit van de aorta significant toegenomen. Intraveneuze toediening van een lage, niet bloeddruk verhogende, dosis phenylephrine verminderde de compliantie coëfficiënt in dezelfde mate bij controle en diabetische ratten en had geen invloed op de distensibiliteit. Een hoge dosis phenylephrine verminderde de compliantie en distensibiliteit evenveel in controle en diabetische ratten waardoor de verschillen tussen diabeten en controles verdwenen. Toediening van natrium nitroprusside verminderde de diastolische druk en verhoogde de distensibiliteits coëfficiënt maar niet de compliantie coëfficiënt. De verschillen tussen dieren met diabetes en controles bleven bestaan in de aanwezigheid van natrium nitroprusside. Wij concluderen hieruit dat in intacte diabetische ratten de belangrijkste verandering van de aorta bestaat uit een reductie van de lumen diameter en de wand

SAMENVATTING

massa. Deze gaan gepaard met een toename van de distensibiliteit, zonder dat de dynamische compliantie van het bloedvat gemodificeerd wordt.

Uit de studies, die beschreven staan in dit proefschrift, concluderen wij dat de vasculaire reactiviteit verstoord is in ratten met door streptozotocine veroorzaakte diabetes. Behandeling met insuline voorkomt deze verandering hetgeen suggereert dat de veranderingen te wijten zijn aan de chronische hyperglycaemie. Voor mensen met diabetes is een intensief insuline regime noodzakelijk om zorg te dragen voor een zo normaal mogelijke bloedglucose spiegel. Aangezien normalisatie van de bloedglucose niet altijd goed mogelijk is en gepaard kan gaan met ongewenste neveneffecten als hypoglycaemie, is behandeling met additionele medicamenten geïndiceerd. Uit de studies beschreven in dit proefschrift zou men kunnen afleiden dat aminoguanidine zo'n medicament kan zijn. Het zichtbaar en meetbaar maken van de effecten van een medicament als aminoguanidine is erg ingewikkeld, aangezien de ontwikkeling van complicaties ten gevolge van diabetes meestal vele jaren in beslag neemt. Momenteel is de eerste grote klinische studie met aminoguanidine in de Verenigde Staten begonnen. De resultaten van deze studie zijn over een aantal jaren te verwachten.