



Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny

Anna Szczoczarz

**Wpływ receptora wapniowego na mechanizmy
regulujące sekrecję insuliny podczas blokady
kanałów wapniowych u szczurów**

Rozprawa doktorska

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: prof. dr hab. Apolonia Rybczyńska
emerytowany profesor Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2022

Streszczenie

Zespół metaboliczny jest zbiorem wzajemnie powiązanych czynników, które zwiększają ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, udaru mózgu i cukrzycy typu 2. W związku z współwystępowaniem u pacjentów z zespołem metabolicznym wielu zaburzeń, często niezbędne jest stosowanie terapii wielolekowej. Związki zastosowane w mojej pracy są powszechnie wykorzystywanymi lekami w chorobach związanych z zespołem metabolicznym, toteż istotne jest poznanie ich wpływu na parametry biochemiczne oraz ich potencjalnej roli w procesie sekrecji insuliny, co może być istotne przy schorzeniach, takich jak insulinooporność czy cukrzyca.

Komórki β trzustki reagują na wiele składników odżywczych w krążeniu krwi, ale to glukoza jest głównym bodźcem stymulującym sekrecję insuliny. Po posiłku, glukoza jest transportowana do komórek β trzustki, gdzie ulega przemianom metabolicznym, w wyniku których następuje depolaryzacja błony komórkowej, otwarcie zależnych od napięcia kanałów wapniowych, napływu Ca^{2+} do komórki i sekrecji insuliny. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} może być również wynikiem stymulacji receptorów powierzchniowych komórek; przykładem takiego receptora jest CaR, który należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G.

Udział CaR w mechanizmach regulujących sekrecję insuliny potwierdziły zarówno doświadczenia *in vitro* jak i *in vivo*. Wykazały one, że aktywacja CaR przez R-568 zwiększa sekrecję insuliny, a hamowanie CaR przy pomocy NPS 2143 powoduje spadek wydzielania insuliny. Pozostawało jednak pytanie, czy zmiana aktywności CaR jest w stanie wpłynąć na sekrecję insuliny w warunkach blokady kanału wapniowego, kiedy napływ jonów wapnia do komórki jest w znacznym stopniu ograniczony?

Celem przeprowadzonych doświadczeń było zbadanie w warunkach *in vivo* efektu aktywacji CaR za pomocą R-568 oraz hamowania CaR za pomocą NPS 2143 w obecności blokera kanału wapniowego – verapamilu na stężenie insuliny i glukozy we krwi u szczurów.

Doświadczenia zostały wykonane na szczurach szczepu Wistar znieczulanych przy pomocy inaktywny. Zwierzętom wykonano tracheotomię, wprowadzono dren polietylenowy do tętnicy w celu pomiaru średniego ciśnienia tętniczego (MAP) oraz pobierania krwi do badań. Drugi dren wprowadzono do żyły w celu podawania płynu infuzyjnego oraz związków badanych. Ostatnim etapem było wprowadzenie drenu do pęcherza moczowego celem swobodnej diurezy.

Efekt aktywacji CaR oceniano w dwóch grupach zwierząt: obciążonych i nieobciążonych glukozą, w obecności i bez verapamilu. W grupie obciążonej glukozą, po okresie wyrównawczym rozpoczęto podawanie verapamilu w dawce 8 µg/kg/min, później podano 100 µl roztworu R-568, w dawce 1 mg/kg m.c. Następnie szczurom podano dootrzewnowo glukozę. W grupie nieobciążonej glukozą procedura wyglądała analogicznie, przy czym zwierzętom nie podano glukozy.

Do doświadczeń, które oceniały efekt hamowania CaR użyto tylko szczury nieobciążone glukozą, w obecności i bez verapamilu. Postępowanie było identyczne jak w powyższej grupie szczurów nieobciążonych glukozą, przy czym zamiast R-568 podano NPS 2143 w dawce 2 mg/kg m.c.

Uzyskane wyniki wykazały, że u szczurów obciążonych glukozą blokada kanałów wapniowych powodowała wzrost poziomu glukozy oraz spadek stężenia insuliny we krwi w porównaniu z grupą kontrolną. Podczas gdy aktywacja CaR, powodowała spadek stężenia glukozy i wzrost poziomu insuliny. Przy czym w obecności verapamilu, podanie R-568 nie wpłynęło na zmianę stężenia ani glukozy ani insuliny w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej.

W grupach zwierząt nieobciążonych glukozą, tym z blokadą i bez blokady kanałów wapniowych, aktywacja CaR nie zmieniła stężenia glukozy w stosunku do grupy kontrolnej, jednakże we wszystkich grupach badanych wykazano nieznaczny spadek stężenia insuliny w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

W przypadku hamowania CaR, blokada kanału wapniowego w niewielkim stopniu zwiększała stężenie glukozy w stosunku do okresu początkowego doświadczenia, natomiast nie zmieniała podwyższonego poziomu glukozy wywołanego hamowaniem CaR. Jednocześnie wykazano, że blokada kanału wapniowego obniża stężenie insuliny i nasila jej spadek indukowany przez bloker CaR.

Podsumowując, doświadczenia wykazały, że w warunkach *in vivo* blokada kanału wapniowego przy pomocy verapamilu zapobiega spadkowi poziomu glukozy i wzrostowi stężenia insuliny indukowanymi przez agonistę CaR – R-568. Ponadto, obecność verapamilu nasiliła spadek stężenia insuliny bez wpływu na podwyższone stężenie glukozy wywołane hamowaniem CaR przez NPS 2143.

Uzyskane wyniki mogą być w przyszłości pomocne w farmakoterapii chorych z cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym oraz współistniejącą wtórną nadczynnością przytarczyc w przebiegu przewlekłej choroby nerek.

Abstract

Metabolic syndrome is a group of conditions that increase the risk of cardiovascular disease, stroke, and type 2 diabetes. Due to the coexistence of multiple disorders in patients with metabolic syndrome, multi-drug therapy is often required. The compounds used in my work are commonly used drugs in diseases related to metabolic syndrome, so it is essential to understand their influence on biochemical parameters and their potential role in insulin secretion, which may be important in diseases such as insulin resistance or diabetes.

Pancreatic β cells respond to many nutrients in the blood circulation, but glucose is the main stimulus for insulin secretion. After a meal, glucose is transported to the β -cells of the pancreas, where it undergoes metabolic changes resulting in depolarization of the cell membrane, the opening of voltage-dependent calcium channels, Ca^{2+} influx into the cell, and insulin secretion. The increase in intracellular Ca^{2+} concentration may also result from the stimulation of cell surface receptors; an example of such a receptor is CaR, which belongs to the family of G protein-coupled receptors.

The participation of CaR in the mechanisms regulating insulin secretion was confirmed by both *in vitro* and *in vivo* experiments. They showed that activation of CaR by R-568 increases insulin concentration, and inhibition of CaR with NPS 2143 causes a decrease in insulin level. However, the question remained whether the change in CaR activity could affect insulin secretion in conditions of calcium channel blockade when the influx of calcium ions into the cell is significantly limited?

The aim of the experiments was to investigate *in vivo* the effect of CaR activation with R-568 and CaR inhibition with NPS 2143 in the presence of the calcium channel blocker - verapamil on the concentration of insulin and glucose in the blood in rats.

The experiments were performed on Wistar rats anesthetized with inactin. The animals underwent a tracheotomy; later, a polyethylene tube was inserted into the artery to measure mean arterial pressure (MAP) and collect blood for testing. A second tube was inserted into the vein to administer the infusion fluid and test compounds. The last stage was to insert a tube into the bladder to facilitate the passage of urine.

The effect of CaR activation was assessed in two groups of animals: loaded and unloaded with glucose, with and without verapamil. In the glucose-loaded group, after

the compensatory period, the administration of verapamil was started at a dose of 8 µg/kg/min, then 100 µl of R-568 solution was administered at a dose of 1 mg/kg b.w. The rats were then dosed intraperitoneally with glucose. The procedure was analogous in the group unloaded with glucose, with the animals not receiving glucose.

In experiments evaluating the effect of CaR inhibition, only rats unloaded with glucose in the presence and absence of verapamil were used. The procedure was identical to that of the group of rats not loaded with glucose, in which the CaR was activated, but instead of R-568, NPS 2143 was administered at a dose of 2 mg/kg b.w.

The obtained results showed that in rats loaded with glucose, calcium channel blockade caused an increase in glucose level and a decrease in blood insulin concentration compared to the control group. At the same time, the activation of CaR caused a decrease in glucose concentration and an increase in insulin levels. However, in the presence of verapamil, the administration of R-568 did not change the concentration of glucose or insulin compared to animals from the control group.

In groups of animals unloaded with glucose, both with and without calcium channel blockade, CaR activation did not change the glucose concentration compared to the control group; however, in all test groups, a slight decrease in insulin concentration was shown compared to the control animals.

In the case of CaR inhibition, calcium channel blockade slightly increased the glucose concentration compared to the initial period of the experiment but did not change the increased glucose level caused by CaR inhibition. At the same time, it was shown that calcium channel blockade lowers insulin concentration and increases its decrease induced by CaR blocker.

In conclusion, the experiments showed that in the *in vivo* conditions, calcium channel blockade with verapamil prevents the decrease in glucose and the increase in insulin concentration induced by the CaR agonist - R-568. Moreover, the presence of verapamil intensified the decrease in insulin concentration without affecting the increased glucose concentration induced by CaR inhibition by NPS 2143.

The obtained results may be helpful in the pharmacotherapy of patients with diabetes, arterial hypertension, and coexisting secondary hyperparathyroidism in the course of chronic kidney disease.