

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A mikroerek vazomotor működésének vizsgálata
diabetes mellitusban**

Dr. Beleznai Tímea Zsuzsanna



Témavezető: Dr. Bagi Zsolt

**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2012**

I. TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. KARDIOVASZKULÁRIS MEGBETEGEDÉSEK DIABETES MELLITUSBAN	7
2.1.1. Az endothel funkciói	8
2.1.2. A diabetes mellitus és endothel diszfunkció	13
2.1.3 Az L-arginin szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben.....	16
2.1.4. A fokozódott argináz 1 expresszió lehetséges szerepe diabetes mellitusban.	20
2.2. A FEHÉRJÉK O-GLCÑAC MÓDOSULÁSA DIABETES MELLITUSBAN	22
3. MÓDSZERTAN.....	27
3.1. A BETEGEK JELLEMZÉSE	27
3.2. IZOLÁLT MIKROÉRTECHNIKA.....	28
3.3. A HUMÁN KORONÁRIA ARTERIOLÁK MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA VAZOAKTÍV SZEREKKEL	29
3.4. KÍSÉRLETI PROTOKOLLOK PATKÁNY IZOLÁLT VÁZIZOM EREKEN	30
3.5. IMMUNHISZTOKÉMIA	31
3.6. WESTERN IMMUNOBLOT	32
3.7. AZ EREDMÉNYEK STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉSE	33
4. EREDMÉNYEK	34
4.1. A DIABETES MELLITUS HATÁSA A KORONÁRIA ARTERIOLÁK VAZOMOTOR MŰKÖDÉSÉRE	34
4.2. A MAGAS GLÜKÓZ KONCENTRÁCIÓ HATÁSA VÁZIZOM ARTERIOLÁK VAZOMOTOR MŰKÖDÉSÉRE	40
4.3. WESTERN IMMUNOBLOT	47
5. MEGBESZÉLÉS.....	49
5.1. DIABETES MELLITUS HATÁSA A KORONÁRIA MIKROEREK VAZOMOTOR MŰKÖDÉSÉRE.....	50
5.2. A MAGAS GLÜKÓZ KONCENTRÁCIÓ HATÁSA A VÁZIZOM MIKROEREK VAZOMOTOR MŰKÖDÉSÉRE	54
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	58
7. IRODALOMJEGYZÉK	60
8. TÁRGYSZAVAK	71
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73
10. FÜGGELÉK.....	74

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE: angiotenzin-konvertáló enzim

ACh: acetilkolin

ADK: arginin dekarboxiláz

ADMA: asszimetrikus dimetil-arginin

AGE: előrehaladott glikációs végtermék

Ang II: angiotenzin II

AT-1: angiotenzin II 1-es típusú receptor

AT-2: angiotenzin II 2-es típusú receptor

BH₄: tetrahidrobiopterin

Ca²⁺: kalcium ion

CABG: koronária artéria bypass graft

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

COX: ciklooxigenáz

COX-1: ciklooxigenáz-1 izoenzim

COX-2: ciklooxigenáz-2 izoenzim

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole

DM: diabetes mellitus

DM+: diabeteses

DM-: nem diabeteses

EDHF: endothel-dependens hiperpolarizáló faktor

EDRF: endothel-dependens relaxációs faktor

eNOS: endotheliális nitrogén-monoxid szintáz

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

FMN: flavin-mononukleotid

Fru-6-P: fruktóz-6-foszfát

GFAT: *L*-glutamin-*D*-fruktóz-6-foszfát aminoszferáz

Glc-NH₂-6-P: glükózamin-6-foszfát

GLUT-1: glükóz transzporter

Hb_{A1c}: glikoheamoglobin

HBP: hexózamin bioszintézis útvonal

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz

IR: inzulin receptor
IRS: inzulin receptor szubsztrát
L-Arg: L-arginin
L-NAME: *N*⁰-nitro-*L*-arginin-metil-észter
L-NMMA: *L-N*-monometilarginin
L-NOHA: *N*^G-hydroxy-*L*-arginine
NADH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
NADPH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NE: norepinefrin
NO: nitrogén-monoxid
NOS: nitrogén-monoxid szintáz
nNOS: neuronális nitrogén-monoxid szintáz
OAT: ornitin-aminotranszferáz
ODK: ornitin-dekarboxiláz
O-GlcNAc: oxigén-kapcsolt *N*-acetilglükózamin
O-GlcNAcase: *N*-acetilglikozidáz
OGT: uridin 5'-difoszfó-*N*-acetilglükózamin: polipeptid β -*N*-acetilglükózaminiltranszferáz
OTK: ornitin transzkarbamiláz
PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor 1
PG: prosztaglandin
PGE₂: prosztaglandin E₂
PGH₂/TXA₂: prosztaglandin H₂/tromboxan A₂
PGI₂: prosztaciklin
PUGNAc: *O*-GlcNAcase inhibitor
PKC: protein kináz C
SDMA: szimmetrikus dimetil-arginin
sGC: szolubilis guanilát-cikláz
SNP: nitroprusszid-nátrium
T1DM: 1-es típusú diabetes mellitus
T2DM: 2-es típusú diabetes mellitus
TGF- β : transzformáló növekedési faktor- β
UDP-GlcNAc: uridin 5'-difoszfó-*N*-acetilglükózamin
VEGF: vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
5HT: szerotonin

1. BEVEZETÉS

A diabetes mellitus (DM) a XXI. század elejének egyik legjelentősebb népegészségügyi problémájává vált és előkelő helyet foglal el a nem fertőző ún. "civilizációs" betegségek sorában. A Nemzetközi Diabetes Szövetség adatai szerint a 2011-ben 366 millióra tartott diabeteses betegek száma (20 éven felüliek körében) 2030-ra várhatóan 552 millióra fog növekedni (jelenleg Magyarországon 570 ezer diabeteses beteg él). A DM-nak a jelentős részét (~90%-át) a felnőtt korban manifesztálódó 2-es típus teszi ki, amely a jelenlegi prevalencia-adatok és a várható incidenciánövekedés, ill. a társuló kardiovaszkuláris szövődmények folytán - világméretű gondokat okoz [1]. DM-ban a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának kockázata a nem cukorbeteg populációhoz viszonyítva fokozott. Megdöbbentő statisztikai adat, hogy DM-ban a szívinfarktus kialakulásának kockázata a már korábban egyéb okból szívinfarktuson átesett betegek rizikófaktorozódásával egyenlő nagyságú [2].

A DM-ban kialakuló atherosclerosis klinikai kórformái között kiemelt jelentőségűek a coronariák érintettségén alapuló megbetegedések, a cerebrovaszkuláris szövődmények és az alsó végtagi artériás keringési zavar következményei. Az atherosclerosis kórfejlődéséből adódóan az egyik érterületen mutatkozó kórképek észlelése esetén joggal feltételezhető, s ezért vizsgálandó a szervezet egyéb érterületeinek érintettsége is. DM-ban gyakran észlelhető hipertónia, melynek pathomechanizmusa a diabetes két alapvető típusában egymástól eltér. Míg 1-es típusú diabetes mellitusban (T1DM) a hipertónia a diabeteses nephropathia egyik jellemző tüneteiként van jelen, addig 2-es típusú diabetes mellitusban (T2DM) a hipertónia kialakulását a metabolikus szindróma koncepciója alapján értelmezzük. Nephropathiához társuló hipertónia azonban előfordulhat T2DM-ban is. Összefoglalva, DM-ban a kis ereket érintő microangiopathia talaján kialakuló nephropathia, neuropathia, retinopathia, cerebrális-,

kardiális, és alsó végtagi mikrokeringési zavarok nagymértékben hozzájárulnak az e betegségben szenvedők fokozott morbiditási és mortalitási rizikójához.

Korábbi vizsgálatokban kimutatták a nagy konduktív erek vazomotor funkciózavarát DM-ban, azonban kevés irodalmi adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy DM-ban hogyan változik meg a humán koronária és a vázizom rezisztencia erek funkciója és milyen mechanizmusok állnak a patológiás mikroér működés hátterében. Valamint, a megemelkedett glükóz szint milyen hatással van az endothel- és simaizom sejt funkciójára.

Mindezek alapján tudományos kutatásaimban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. Vizsgáljam a szívsebészeti műtéten átesett betegekből származó, izolált koronária mikroerek vazomotor működését.
2. Feltárjam a koronária mikroerek vazomotor működészavarában szerepet játszó lehetséges mechanizmusokat, különös tekintettel a diabetes mellitus mikrovaszkuláris hatásaira.
3. Továbbá, hogy vizsgáljam a magas glükóz koncentráció és fokozott fehérje glikoziláció endothel- és simaizom sejtekre gyakorolt hatását.

A kísérleteink eredményei és az azokból levonható következtetések segíthetnek a diabetes mellitusban kialakuló koronária mikroér funkciózavar kórélettani folyamatainak megismerésében, valamint hozzájárulhatnak a megváltozott mikroérműködés és feltehetőleg annak következtében kialakuló kardiális rizikó csökkentésére irányuló gyógyszeres terápiás elvek pontosabb kidolgozásához.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Kardiovaszkuláris megbetegedések diabetes mellitusban

A T2DM különböző etiológiájú anyagcserezavarok összefoglaló neve, melyet elsősorban a szénhidrát, de a lipid anyagcserét is érintő folyamatok komplex eltéréseivel társuló, krónikus hiperglikémia jellemez [3]. Jól ismert, hogy a lipid anyagcsere kóros elváltozásai (hiperkoleszterinémia, hipertrigliceridémia, aterogén diszlipidémia szindróma) az iszkémiás szív-, agy- és perifériás érbetegségek kialakulásának egyik fő rizikófaktorát képezik. Az érrendszeri komplikációk nagyrészt a lipid anyagcsere zavar következményeként kialakuló atherosclerosis talaján jönnek létre. Korábbi vizsgálatok rámutattak arra a tényre, hogy a makrovaszkuláris atherosclerotikus érelváltozások mellett, illetve azt megelőzően diszlipidémiában funkcionális mikrovaszkuláris elváltozások alakulnak ki [4, 5]. A diszlipidémia okozta makro- és mikrovaszkuláris funkciókárosodás hátterében részben az endothel működésének megváltozását feltételezik, amely központi szerepet játszhat egyes aterogén folyamatok elindításában és kialakításában [6-9].

A további klinikai kutatások rávilágítottak arra a tényre is, hogy a szénhidrát anyagcsere legjelentősebb zavarának, a ma már epidémia jellegű DM-nak szintén szerepe van a kardiovaszkuláris rizikó fokozódásában [10]. Ezért nem meglepő, hogy a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában különösen komoly szereppel bírhat egy olyan kórállapot, amely a magas vércukorszint és a megváltozott glükóz tolerancia mellett egyéb lipid eltéréseket, így emelkedett triglicerid szintet és csökkent magas denzitású lipoprotein (HDL) szintet, valamint magas vérnyomás együttes előfordulását is magában foglalja [11]. Korábbi tanulmány szerint elsősorban a lipid háztartás zavarait érintő, elhízással és magas vérnyomással társuló metabolikus szindróma esetén 3,53-szorosára, ugyanakkor a T2DM együttes fennállása esetén 8,19-szorosára emelkedik a kardiovaszkuláris mortalitás [12]. T2DM-ban szenvedő betegeknél feltételezhetően az anyagcsere-folyamatok kóros következményei miatt kialakuló

kardiovaszkuláris (cerebrális, kardiális, alsó végtagi) szövődmények okozzák a betegek legnagyobb hányadának morbiditását és mortalitását [13-16]. A T2DM-mal ellentétben, az 1-es típusú diabetes mellitus (inzulin-függő diabetes mellitus) előfordulása szignifikánsan kevesebb, a DM populációnak kb. 10% százalékát teszi ki. Az T1DM kialakulásának a pathomechanizmusa különbözik a T2DM-től, a hasnyálmirigy β -sejteinek pusztulása következtében létrejövő abszolút inzulín hiánya jellemzi, a betegség hátterében genetikai és autoimmun tényezők állnak. A korszerű inzulinkezeléseknek köszönhetően a betegek életminősége jelentősen javult, azonban az életkilátásokat az alapbetegséggel kapcsolatos érszövődmények jelentősen befolyásolják, amelyek mikrovaszkuláris (retinopathia, nephropathia, neuropathia) és makrovaszkuláris elváltozásokra (stroke, koronária betegség) oszthatók, hasonlóan a T2DM-hoz [17].

Az intenzív klinikai és kísérletes kutatások ellenére a diabetes mellitusban megfigyelhető szív- és érrendszeri elváltozások pontos kóreltani mechanizmusai és a kialakulásukban szerepet játszó patológiai tényezők még ma sem teljesen tisztázottak. Prospektív populációs vizsgálatok kimutatták, hogy a szoros vércukor kontroll csökkenti a diabetesben szenvedő betegek mikroérrendszeri elváltozásaiból adódó vaszkuláris rizikófokozódást, ami a normálisnál magasabb plazma glükóz koncentráció kóroki szerepére irányította a figyelmet [18].

2.1.1. Az endothel funkciói

Az elmúlt évek kutatásai bebizonyították, hogy a vaszkuláris endothel nemcsak egy, az ereket bélelő passzív barrier. Kis tömegéhez (~110 gramm) képest óriási felületet képez (~350 m²) és aktívan részt vesz a kardiovaszkuláris rendszer működésében. Fontos élettani feladata a vérkeringés lokális szabályozása, résztvesz az ion- és folyadékcsereben, kontrollálja a véralvadási mechanizmusokat, a vérlemezke és leukocita adhézio folyamatát, az érfalban zajló lokális gyulladásos folyamatokat, a vaszkulogenezist [19] és angiogenezist. Az endothel

különböző fiziológiás stimulusokra értágító és érszűkítő anyagok szintézisével és felszabadításával válaszol, ezáltal szabályozva az adott érterület vérellátását, a szöveti perfúziót. Az endothel további alapvető tulajdonsága a szenzoros funkció, melynek során az endothel membrán receptor-függő és független mechanizmusok révén érzékeli a különböző mechanikai stimulusokat, így a transzluminális nyomásváltozást és az áramlás okozta nyíróerő/feszültség változásait [20]. Ezen paraméterek változásai élettani mechanizmusokon keresztül szabályozzák a rezisztencia erek átmérőjét, ezáltal a szöveti keringés kialakításában töltenek be fontos szerepet [21]. A lokális keringésszabályozás meghatározó a szövetek, szervek vérellátásának biztosításában, melyet a vérnyomás változása esetén a fokozódó anyagszállítási igényekhez alakít, ezáltal a véráramlást függetleníti a vérnyomás pillanatnyi változásaitól. A nagy artériákat (makroerek) követő kis artériákra és az arteriolákra (mikroerek) esik a teljes nagy vérköri perifériás ellenállás legnagyobb része, amely a szisztémás vérnyomás egyik legmeghatározóbb tényezője (1. táblázat).

Makroerek		Átmérő
Aorta		2,5 cm
Legnagyobb, elasztikus típusú artériák		1-2 cm
Kisebb, muscularis típusú artériák		0.1-1 cm
Mikroerek		Átmérő
Arteriolák		20-200 μm
Kapillárisok		5-7 μm

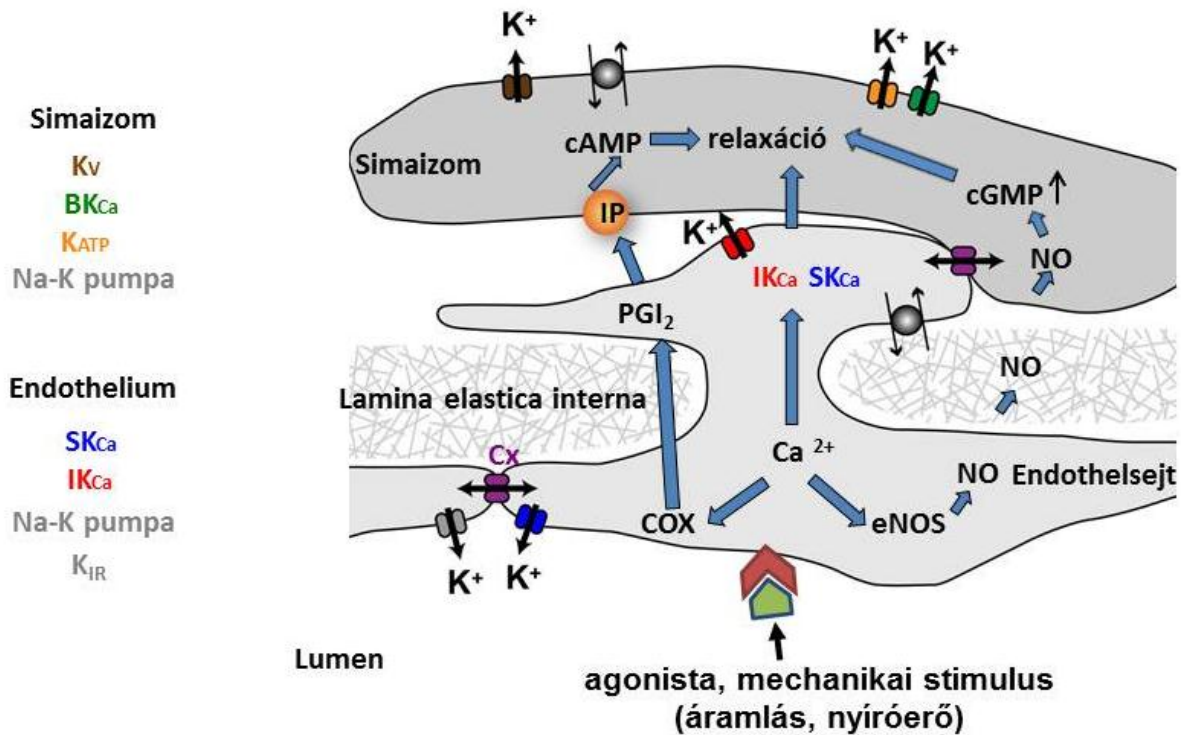
1. táblázat. Az artériás rendszer ereinek csoportosítása átmérőjük alapján.

A lokális keringésszabályozási mechanizmusokban korábban a vasoaktív metabolitok, az artériás pH, pO_2 , pCO_2 szerepét hangsúlyozták, azonban az elmúlt évtizedek kutatásai

bebizonyították, hogy az intrinzik vaszkuláris mechanizmusok (miogén mechanizmus, nyírófeszültség indukálta dilatáció) nagymértékben hozzájárulnak a lokális vérátáramlás szabályozásához. A sebészek és morfológusok körében már több száz éve ismert, hogy az erek nagysága a bennük áramló véráramlás nagyságával arányos, tehát nemcsak az érátmérő határozza meg az áramlást, hanem e tétel fordítva is igaz.

Az endothel által termelt legfontosabb vazodilatátor anyagok a nitrogén monoxid (NO), a prosztaciklin (PGI_2) és a mai napig tisztázatlan hatásmechanizmusú endothel-dependens hiperpolarizáló faktor (EDHF) (1. ábra). Az egyes vazodilatátorok a különböző érterületeken eltérő mértékben járulnak hozzá a vazodilatáció kialakításához [22]. Furchgott és Zawadzki bizonyították először, hogy az acetilkolin (ACh) kiváltotta relaxációra csak az ép endothellel rendelkező erek képesek. Ez vezetett az endothel által termelt relaxációs faktor (EDRF) felfedezéséhez [23], amelyről Palmer és mtsai 1987-ben mutatták ki, hogy a NO-dal azonos [24]. Az azóta eltelt évek kutatásai részletesen feltárták a NO élettant és biokémiáját. A NO a nitrogén monoxid szintáz (NOS) által katalizált reakcióban L-argininből és oxigénből képződik, miközben L-citrullin is felszabadul. A NOS több izoformája található meg az emlős szervezetben, az endotheliális (eNOS), neurális (nNOS) és az indukálható (iNOS) izoforma, melyek szabályozása és élettani funkciói eltérőek [25]. A biokémiai reakció kofaktorai a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) és a tetrahydrobiopterin (BH_4) [26]. A NOS obligát alkotórésze a hem vas, a flavin-mononukleotid (FMN) [27] és a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) [28]. A vaszkuláris szövetekben termelődött és felszabadult NO a vaszkuláris simaizomban a szolubilis guanilát cikláz (sGC) enzim aktivációjához vezet, mely enzim emeli az intracelluláris ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) koncentrációt. Ennek következtében Ca^{2+} koncentráció és/vagy simaizom Ca^{2+} érzékenység csökkenés révén vaszkuláris simaizom relaxáció jön létre [29, 30]. Az endothel vazodilatátor működése azonban nemcsak NO mediálta folyamat, hanem további az endothel által termelt dilatátor

faktorok, mint például az EDHF és a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) rendszeren keresztül ható ciklooxygenáz (COX) izoenzimek (COX-1 és COX-2) termelte prosztaglandinok, a prosztaglandin E2 (PGE₂) és a PGI₂ következménye is [31-33].



1.ábra – Endothel-függő vazodilatátor anyagok: nitrogén monoxid (NO), prosztaciklin (PGI₂), endothel-dependens hiperpolarizáló faktor (EDHF). Ez a sematikus ábra tartalmazza a főbb enzimeket, csatornákat és anyagokat, amelyek szükségesek az endothel-függő vazodilatáció kialakulásához. Endothelsejtekben megtalálható a lassú konduktanciájú kalcium-aktivált K⁺csatorna (SK_{Ca}), az intermedier konduktanciájú kalcium-aktivált K⁺csatorna (IK_{Ca}), az inward rektifikáló K⁺ csatorna (K_{IR}), a Na-K pumpa, az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS), a ciklooxygenáz (COX), és a connexinek (Cx). Simaizomsejtekben megtalálható az ATP-szenzitív K⁺csatorna (K_{ATP}), a nagy konduktanciájú kalcium-aktivált K⁺ csatorna (BK_{Ca}), a feszültség függő K⁺ csatorna (K_V), a Na-K pumpa, prosztaciklin receptor (IP) és a Cx-nek.

Az endothel azonban nem csak dilatátor természetű, hanem konstriktor anyagokat is termel. Ilyen anyag az endothelin, amely egyike a leghatékonyabb vazokonstriktor molekuláknak. Három izoformája létezik (endothelin 1,2,3), melyek az endothelin különböző receptorain keresztül fejtik ki hatásukat [34]. Az endothel által termelt másik fontos vazokonstriktor anyag az angiotenzin II. Az angiotenzin II többek között az angiotenzin I-ből képződik az angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) hatására, mely enzim a lokális renin-angiotenzin rendszer részeként feltehetőleg a vaszkuláris endothelben és a simaizomban is megtalálható [35, 36]. Az angiotenzin II a simaizomsejtek felszínén található receptoraihoz (AT-1 és 2) kötődik, a G-protein rendszeren keresztül fejt ki hatását, melynek eredménye az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedése, a protein kináz C aktivitásának és a simaizomsejtek migrációjának és proliferációjának fokozódása [37]. A ciklooxygenáz izoenzimek nemcsak vazodilatátor, hanem vazokonstriktor természetű prosztaglandinokat is termelnek. Ilyen a prosztaglandin H_2 /tromboxan A_2 (PGH_2/TXA_2), amely a simaizomsejteken megtalálható receptorok aktivációjával erőteljes vazokonstriktiót idéz elő [38].

Az endothel rendkívül összetett, egymással párhuzamosan működő és kölcsönhatásban álló élettani folyamatainak megbomlott egyensúlya bizonyos kórélettani körülmények között az endothel kóros működéséhez, endothel diszfunkcióhoz vezethet. Az endothel diszfunkció esetén megbomlik a vazodilatátor (NO, PGI_2 , EDHF) és vazokonstriktor (endothelin-1, angiotenzin II, vazokonstriktor prosztaglandinok) tényezők közötti egyensúlyi állapot. Így a vazodilatátor mechanizmusok csökkenése, vazodilatátor adaptációs folyamatok beszűkülése, vazospazmus alakul ki. Azonban a lokális szöveti faktorok aktiválódása és az endothel működési egyensúlyának megbomlása következtében nemcsak az endothel-függő vazodilatátor folyamatok sérülnek, hanem a vérlemezkék, monocyták és egyéb sejtes elemek adhéziója következtében fokozott trombózis hajlam, az érfali simaizomsejtek proliferációja és az érfalban lokálisan zajló gyulladás alakul ki, melyek tovább károsíthatják az endothel

működését [20, 39].

2.1.2. A diabetes mellitus és endothel diszfunkció

A diabeteses betegek legnagyobb hányadának mortalitását és morbiditását a kardiovaszkuláris, elsősorban myocardialis szövődmények okozzák [40]. A diabetes mellitus *koronária nagyerekre* kifejtett hatásával – felgyorsult atherosclerosis, atherothrombosis – magyarázható a myocardialis infarktus emelkedett incidenciája. A nagy koronária erekben feltehetőleg az endothel kóros, megváltozott működése vezet az atherosclerosis gyors progrediációjához diabeteses betegeken. Az atheroscleroticus plakkokban is - csakúgy, mint az adventitiában - megfigyelhető a szöveti gyulladás. Makrofágok és T-lymphocyták akkumulálódnak, a lipid mag méretesebb, és a makrofágok és simaizom sejtek apoptózis hajlama fokozottabb, mint nem diabeteses állapotban. Mindezek a körülmények együtt eredményezik a plakk fokozott vulnerabilitását és thrombogenitását [41]. A diabetesben megfigyelhető fokozott thrombosis hajlam másik oka a megnövekedett szöveti faktor termelés, amelyről kimutatták, hogy arányban áll a plakk-makrofágok apoptózisának mértékével [42]. A teljes koagulációs kaszkád kórosan működik diabetesben, a thrombocyták reaktivitása is fokozott. Mind az adhezivitásuk, mind az aggregabilitásuk és trombin produktivitásuk emelkedett [43]. Korábbi vizsgálatok szerint, az inzulin normál körülmények között gátolja a thrombocyta aggregációt azáltal, hogy fokozza a NO szintézisét a thrombocytákban [44], a PGI₂ szintézisét az endothelben, növeli a PGI₂-receptorok számát a thrombocyták felszínén, és szöveti plazminogén aktivátort (thrombolytikus enzim) szabadít fel a vérlemezkékből [45]. Az inzulin által biztosított thrombocyta aggregáció gátlás csökkenése ugyancsak magyarázhatja a diabetesben fokozott thrombosis hajlamot.

Ismert, hogy a diabetes mellitus nemcsak a nagyerek szintjén, hanem a *mikorerekben* is kóros változásokat indukál. A diabeteses mikroérszövődmények állnak a nephropathia, neuropathia és retinopathia háttérében is. A szívet érintő diabeteses koronária

mikroérkárosodás mechanizmusáról azonban még mindig keveset tudunk. Humán [46] és állatkísérletes [47, 48] kutatások igazolták, hogy a mikroerek kóros intrinsic vazoregulatorikus működése már a betegség korai stádiumában is megfigyelhető. A szívizom perfúzió romlása a még intact koronária keringés mellett is már kimutatható diabeteses betegekben [49, 50]

Feltételezések szerint a mikorvaszkuláris szövődmények közös kiindulópontja az *endothel diszfunkció* kialakulása. Az endothel rendkívül összetett, egymással párhuzamosan működő és kölcsönhatásban álló élettani folyamatainak megbomlott egyensúlya diabetes mellitusban az endothel kóros működéséhez vezethet [22]. Az endothel diszfunkció többek között az értágító mechanizmusok csökkenéséhez, érszűkülethez, továbbá fokozott thrombosis-készséghez és az érfali simaizomsejtek proliferációjához vezethet. Az endothel diszfunkció korai stádiumában sérülnek a NO- és prosztaciklin-függő érelernyedési mechanizmusok, illetve emelkedhet egyes érszűkítő prosztaglandinok, endothelinek, angiotenzinek szintézise. A lokális szöveti faktorok aktiválódása és az endothel működési egyensúlyának megbomlása következtében nemcsak az endothel-függő dilatátor mechanizmusok sérülnek, hanem többek között a vérlemezkék, monocyták és egyéb sejtes elemek adhéziója is fokozódik, melyek jelenléte tovább károsíthatja az endothel amúgy is kóros működését. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy különböző érterületeken károsodik az endothel-függő arterioláris dilatáció diabetes mellitusban [22], melynek hátterében álló mechanizmusok felderítésére számos kísérletes megfigyelés történt. Ezek közül kiemelendő a diabetesben fennálló krónikus hiperglikémia kóros szerepe. A megfelelő vércukor kontroll csökkenti a diabetesben szenvedő betegek mikroérrendszeri elváltozásaiból adódó vaszkuláris rizikófaktorok fokozódását. A Magyar Diabetes Társaság anyagcsere paramétereire és kockázati szintre vonatkozó irányelvei alapján, ha a glikált haemoglobin (Hb_{A1c}) %-os értéke $\leq 6,5$ kisfokú a kockázat, $>6,5$ macroangiopathiás kockázat, $>7,5$ microangiopathiás kockázat fokozódását

emeli. Bizonyos esetekben (fiatalabb, jól kooperáló betegeknél) indokolt lehet a Hb_{A1c} 6,0–6,5%-os értékét megcélozni, míg idősebb, társbetegségekben szenvedő és rövidebb várható élettartammal rendelkező, olykor egyedül élő cukorbeteg esetében szerényebb kezelési célértékek (Hb_{A1c} 7,0–8,0%) is elfogadottak. Ez utóbbi szintén fontos a kardiovaszkuláris szövődményben szenvedő beteg esetében is, ahol az esetleges hipoglikémia várható következményei sokkal nagyobb súllyal esnek latba, mint a kicsit magasabb szinten tartott vércukorértékek évek múltán jelentkező potenciális következményei (Magyar Diabetes Társaság).

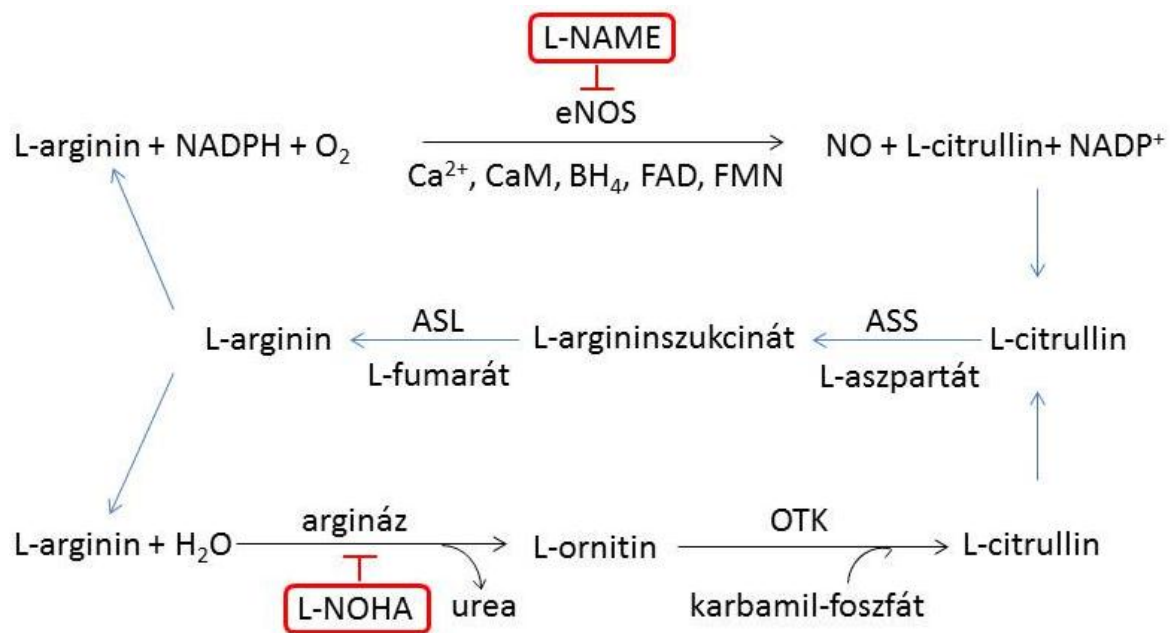
Az endothel-függő vazodilatáció javul hosszú távú inzulin terápia hatására [51]. A Hb_{A1c} szintje és a kóros endothelműködés között korreláció mutatható ki [51]. Minden egyes százalékpontos csökkenés a Hb_{A1c} szintjében 37%-kal csökkenti a mikorvaszkuláris szövődmények kockázatát [52]. Másik ilyen fontos patológiai elváltozás a *nem-enzimatis glikáció*. A glükóz a fehérjék és lipidek szabad aminos csoportjához képes kötődni nem-enzimatis glikoziláció révén, így irreverzibilis előrehaladott glikációs végtermék (AGE, advanced glycosilation end product) jön létre, amely nem képes lebomlani, ezáltal felhalmozódik a szövetekben. A folyamat normál glükózháztartás mellett is lejátszódik, de diabetesben a szubsztrát-főlöseg miatt fokozott mértékű [53]. Az AGE pathogenitása többek között abban áll, hogy keresztkötések létrehozására képes és az oxigén-eredetű szabadgyökök termelődését fokozza. Az AGE-produkció gátlójával, aminoguanidinnal a diabeteses érelváltozások gátolhatóak voltak állatkísérletekben [54].

2.1.3 Az L-arginin szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben

L-argininre (L-Arg) nemcsak a fehérjék szintéziséhez van szükség, de jelentős szerepe van az urea, kreatin(in), NO, agmatin, poliaminok, glutaminsav, illetve a prolin termelődésében is. Ezeken az anyagokon keresztül szerepe van a nitrogén-egyensúly fenntartásában (fehérje lebomlási termékek eliminációja, izomanyagcsere), az értónus szabályozásában, a trombociták és fehérvérsejtek kitapadásának befolyásolásában, az immunrendszer szabályozásában, a neurotranszmisszióban, az RNS-szintézisben és következményesen a sejt- és szövetnövekedésben, sejt differenciálódásban és a kollagén szintézisben [55-57]. Az L-arginin szintézis főhelye a vese (kb. 60%), a keletkezett termék főként kationos aminoszporter segítségével jut a sejtekbe [58]. Az L-arginin bejutása az endothelsejtekbe a Na^+ független y^+ és y^+L vagy a Na^+ függő $\text{B}^{0,+}$, $\text{b}^{0,+}$ transzporterek segítségével történik, de lehetséges a passzív diffúzióval való bejutása is [59]. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre arról, hogy a diabetes milyen hatással van ezekre az aminoszporterekre. Gestációs diabetesből származó umbilicális endothel sejtekben 2,5x-es L-arginin transzport fokozódást mutatták ki, valamint a thrombociták csökkent L-arginin transzportjáról számolnak be több irodalmi közleményben 2-es típusú diabetes mellitusban [60]. A májban is jelentős L-arginin termelés folyik, de az ott jelenlévő nagyfokú argináz-hatás miatt az L-arginin nagy része metabolizálódik és így nem kerül a keringésbe. Kismértékű L-arginin szintézist az endothelsejtekben és makrofágokban is megfigyeltek [56, 57, 61]. Az L-arginin becsült in vivo szintézise kb. 16 $\mu\text{mol/kg/h}$, mely konstans [62]. Az endogén eredetű L-arginin az összes keringő L-argininnak mindössze 5-15%-át teszi ki, amelyet a teljes test fehérje metabolizmusa határoz meg elsősorban [57].

Az elmúlt években az L-arginin a kutatások középpontjába került a NO szintézisben betöltött szerepe miatt (2.ábra), valamint az állatkísérletes modellekben tapasztalt kedvező hatásai következtében, ahol annak egyszerű adása megállította, vagy visszafordította az erek

atherogenezisét.



2.ábra – Az eNOS és az argináz szubsztrátjai, kofaktorai és az L-arginin metabolizmusa és szintézise. Az eNOS működéséhez szükséges L-arginin, NADPH, O₂, Ca²⁺, kalcium-kalmodulin (CaM), BH₄, FAD, FMN, valamint a NO termelés a N^o-nitro-L-arginin-metilészter (L-NAME) segítségével gátolható. Az L-arginin szubsztrátja az argináznak is, amelynek hatására L-ornitin képződik urea felszabadulásával, ami N^G-hydroxy-L-arginin (L-NOHA) adásával gátolható. Az L-ornitin és L-citrullin számos enzim segítségével ismét L-argininná alakul: ornitin transzkarbamiláz (OTK) argininszukcinát-szintetáz (ASS), argininszukcinátliáz (ASL).

Korábbi klinikai vizsgálatokban kimutatták, hogy 5g L-arginin adása orálisan vagy intravénásan naponta, növelte a NO felszabadulást endothel diszfunkcióval rendelkező betegekben [63]. Több klinikai tanulmányban, az L-arginin rövid vagy középtávú adása javította a kardiovaszkuláris betegségben szenvedők tüneteit, azonban előfordultak olyan esetek is, ahol nem volt hatása az L-argininek, vagy a hosszútávú adása magasabb mortalitást eredményezett a placebo csoporttal összehasonlítva. Az eltérő eredmények felvetik azt a

tényt, hogy az L-arginin adása nem minden beteg számára kedvező, ezért a betegek előzetes szelekciójával (pl; aszimmetrikus dimetil-arginin [ADMA] szint mérésével) meg kell határozni azt a csoportot, amelynek előnye származik az L-arginin adásából [63]. Exogén L-arginin adására az eNOS aktivációja jön létre annak ellenére, hogy az L-arginin már eleve feleslegben van jelen, ez az „arginin-paradox”-nak nevezett jelenség [64]. Az L-arginin szintje a plazmában eltérő nemek és kor szerint, fiatal férfiakban: $81.6 \pm 7.3 \mu\text{mol/L}$, idős férfiakban: $113.7 \pm 19.8 \mu\text{mol/L}$, fiatal nőkben: $72.4 \pm 6.7 \mu\text{mol/L}$ és idős nőkben: $88 \pm 7.8 \mu\text{mol/L}$ [65]. Az L-arginin koncentrációja magasabb ($0.1 \text{ mmol/l} - 1 \text{ mmol/L}$) intracellulárisan, mint extracellulárisan vagy a plazmában [66, 67], valamint az endothelsejtek képesek gyors felvételére a plazmából NO produkció céljából [68]. A táplálkozással bevitt L-arginin a vékonybélben felszívódik és a májba kerül, ahol a hepatikus-urea ciklusban hasznosul, azonban egy kis része a májat elkerülve, közvetlenül a NO produkcióban vesz részt, amelyet humán és állat kísérletekben egyaránt kimutattak radioaktív izotóppal jelölt (^{15}N) L-arginin alkalmazásával [69, 70]. Az L-argininnel folyó humán kísérletekben, kezdetben nagy dózist alkalmaztak intravénásan (L-arginin: 30g/30min), amely vazodilatációt eredményezett, valamint megfigyelték a hipofízis eredetű növekedési hormon emelkedését is [71-73]. Az L-arginin intravénás adására vazodilatáció alakult ki az egészséges önkéntesekben [72], ami reprodukálható a kardiovaszkuláris betegségben szenvedők körében [73], kivéve a pulmonáris hipertenzió esetében [74]. A NO metabolitok (nitrit, nitrát) megemelkedett szintjének a kimutatása vizeletből a NO függő folyamatra utal, azonban hormonok (pl, növekedési hormonok) felszabadulása is hozzájárul a vazodilatáció létrejöttéhez, amit a szomatosztatin képes részben gátolni [75]. Ezek a hatások az L-arginin intravénás bejuttatása esetén alakultak ki, az orális adagolás nem hozott hasonló eredményeket, amely az alacsonyabb plazma koncentráció elérésével magyarázható. Kimutatták, hogy az L-arginin szintje a plazmában nem változik kardiovaszkuláris

betegségekben [76], azonban felvetődött, hogy a biológiai hozzáférhetősége csökkent az eNOS számára a megnövekedett argináz aktivitás következtében, amely ezáltal az NO-produkció csökkenéséhez vezet [77-81]. Az eNOS endogén inhibitorának az ADMA-nak, a megemelkedett szintje pathofiziológias állapotokban (pl kardiovaszkuláris betegség) gátolja a NO-termelést [82-84]. Az ADMA az L-arginin helyére kötődve gátolja az eNOS működését, amely felveti azt a hipotézist, hogy L-arginin-adása hatásos az emelkedett ADMA-szinttel rendelkező betegekben, de hatástalan normál, vagy alacsony ADMA-szint esetén [85]. Az ADMA és más arginin-származékok, a szimmetrikus dimetil-arginin (SDMA), L-N-monometilarginin (L-NMMA) a fehérjék posztranszlációs metilációjával keletkeznek [86]. Az L-NMMA gátolja az NO-termelődést, azonban az ADMA plazmakoncentrációja tízszer nagyobb, ezért jelentősebb szerepet játszik a NOS-gátlásában. Az SDMA-nak nincs direkt gátló hatása. Az L-arginin első klinikai alkalmazása kardiovaszkuláris betegségben szenvedő betegekben 1991-ben Drexler és munkatársai nevéhez fűződik. Koronária-katéterezés közben ACh-t és L-arginint jutattak a koronária erekbe és mérték az áramlásfokozódást. A kardiovaszkuláris betegségben szenvedők esetében jelentős áramlás-növekedést tapasztaltak, míg kontroll-esetekben az L-arginin-adásának nem volt hatása [87].

Az eddigi kutatási eredmények szerint, az L-arginin-orális alkalmazása effektív azokban az egyéneknél, ahol az endotheliális L-arginin-NO-metabolizmus károsodott. Ennek okai lehetnek 1.) megnövekedett L-arginin-vesztés veseelégtelenség következtében 2.) megnövekedett L-arginin-igény a fokozott argináz-működés hatására [88, 89] 3.) valamint az endogén eNOS-inhibitor ADMA megemelkedett koncentrációja [82, 85]. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az L-arginin-orális adása alkalmas lehet a kardiovaszkuláris betegségek kezelésére egy bizonyos betegpopulációban, azonban keveset tudunk a mikroerekre gyakorolt hatásáról, amelynek feltárására további vizsgálatok szükségesek.

2.1.4. A fokozódott argináz 1 expresszió lehetséges szerepe diabetes mellitusban.

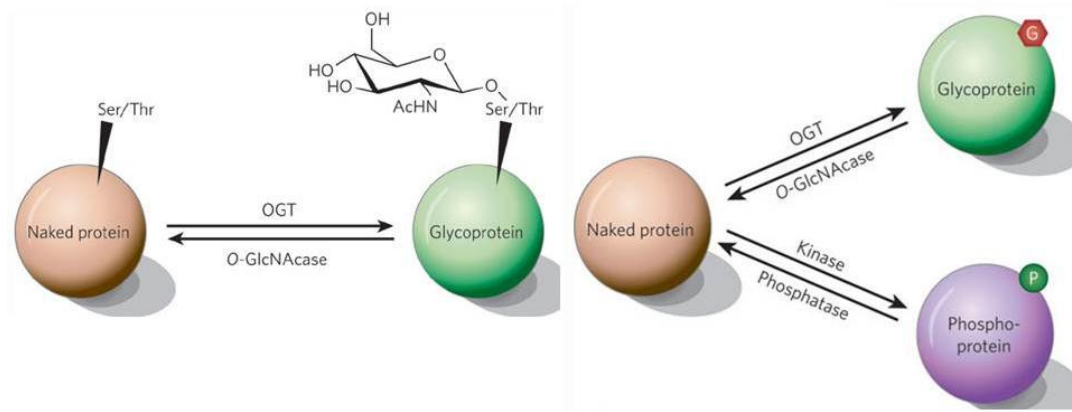
Az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz szubsztrátja az L-arginin csakúgy, mint az arginázok családjába tartozó argináz 1-nek [90, 91]. Az argináznak két izomere ismert. Az argináz 1 citoszolikus enzim, nagy mennyiségben fordul elő a májban az urea-ciklus részeként, míg az argináz 2 mitokondriális lokalizációjú, és főleg a vesében található, valamint mindkét izomer előfordul endothelsejtekben [81, 92]. Az argináz L-argininből L-ornitin-t és ureát hasít, majd az L-ornitin-t az ornitin-dekarboxiláz (ODK, poliamin-szintézis), illetve az ornitin-aminotranszferáz (OAT, L-prolin-szintézis, L-glutaminsav-szintézis) alakítja tovább. A poliaminoknak a sejtproliferációban, az L-prolinnak a kollagénszintézisben van szerepe, míg az L-glutaminsav a tejben leggyakrabban előforduló aminosav, illetve utóbbiak prekursorai a GABA-szintézisnek, mely fontos ingerületátvivő anyag. Az urea markere a vesefunkciónak, a diétás fehérje bevitelnek és a hidráltsági állapotnak. Az ornitin-transzkarbamiláz enzim (OTK) az L-ornitin-t L-citrullinná alakítja, karbamil-foszfát beépítésével [57, 61, 93]. Az L-arginin azonban más enzimek fontos szubsztrátja is: az agmatint az arginin dekarboxiláz (ADK) enzim szintetizálja L-arginiből, széndioxid keletkezése mellett. Az ADK enzim a vesében mind a kéregben, mind a velőben megtalálható, emellett az agyszövetben, a májban, a szívben, a lépben és a tüdőben [94], illetve endothel sejtekben és az aorta membránfrakciójában is kimutatták jelenlétét [95], valamint aktiváló hatását az eNOS működésére [96]. Thomson és munkatársai streptozotocinnal indukált diabeteses patkányok veséjében csökkent ADK aktivitás mértek, bizonyítva ezzel az esetleges L-arginin hiány következtében kialakuló csökkent működést [97]. A kreatin termelésre nagy mennyiségű L-arginin használandó fel a vese, máj, izmok és a hasnyálmirigy közreműködésével [56, 98], azonban az endothel sejtek kreatin termeléséről arginin-glicin amidinotranszferáz segítségével kevés irodalmi adat áll rendelkezésre diabetes mellitusban.

Streptozotocinnal (β -sejtek elpusztítása) indukált diabetes mellitusban megfigyelték az argináz 1 expressziójának a növekedését patkány aortában és májban, ami az ACh által kiváltott vazorelaxáció károsodásával párosult a koronária arteriolákban. Az argináz 2 gyengén volt detektálható utalva ezzel az argináz 1 súlyozott szerepére [99]. Jól ismert, hogy az inzulin gátolja az urea szintézis génjeinek expresszióját, aminek az abszolút vagy relatív hiánya T1DM és T2DM-ben, fokozott argináz aktivitáshoz és csökkent L-arginin mennyiségéhez vezet [100, 101]. Az argináz fokozott működése képes az L-arginin biológiai hozzáférhetőségét korlátozni az eNOS számára, ezáltal az endothelsejtek NO termelését csökkenti [99]. A megnövekedett argináz aktivitást kimutatták különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekben, mint például pulmonáris hipertóniában [102], erektilis diszfunkcióban [103], koronária betegségekben [80]. Az argináz 1 lehetséges kolokalizációja az eNOS-al, megnövekedett argináz 1 aktivitás esetén csökkentheti az L-arginin mennyiségét az NO produkció számára. Az nem teljesen tisztázott, hogy az argináz 2 hogyan befolyásolja az eNOS működését. Lehetséges magyarázata, hogy a fokozott mitokondriális L-arginin degradáció megnöveli annak transzportját a citoplazmából a mitokondriumba, ezáltal csökkentve a NO termelés szubsztrátját [91]. Li és munkatársai, bovine vénából származó endothelsejtekbe argináz 1-et vagy 2-t kódoló patkány cDNS-t jutattak az L-arginin felhasználás fokozására, amelynek következtében az argináz 1 aktivitása 258%-al nagyobb volt, mint az argináz 2-é. A megnövekedett argináz 1 expresszió hatására az eNOS NO termelése 60%-kal csökkent a kontrollhoz viszonyítva, amelyet a nitrit-nitrát szint csökkenésének a mérésével határoztak meg, valamint megfigyelték az L-arginin felvételének enyhe emelkedését a sejtekbe [104]. A megnövekedett argináz 1 aktivitás kialakulásában a diabetes mellitusra jellemző hiperglikémia is szerepet játszhat. Magas glükóz koncentrációjú oldatban (25 mmol/L, 24 órás) inkubált bovine koronária endothelsejtekben fokozott argináz aktivitást, valamint 50%-kal csökkent NO termelést tapasztaltak [99]. A fokozott argináz 1

aktivitás kimutatására, az endothelsejteket argináz 1 siRNA-val transzfektálták, amely teljesen meggátolta a magas glükóz koncentráció által okozott NO termelés csökkenését [99]. Anthony R. White és munkatársai szolgáltak először közvetlen bizonyítékkal az eNOS és argináz reciprok regulációjáról, argináz knock-down (géncsendesített) patkány vaszkuláris endothelsejtekből. Argináz 1 knock-down endothelsejtekből jelentősen javult az eNOS aktivitása, míg argináz 2 esetében nem történt változás, ami az argináz 1 domináns szerepére utal a patkány endothelsejtekből [105]. Továbbá klinikai tanulmányokban vizsgálták a plazma argináz aktivitását T2DM-ban szenvedő betegekben és egészséges egyedekben. Az argináz 1 (T2DM: 0.25 ± 0.08 vs. kontroll: 0.31 ± 0.10 ng/ml) és az argináz 2 (T2DM: 0.16 ± 0.05 vs. kontroll: 0.21 ± 0.09 ng/ml) plazma koncentrációja nem különbözött a két csoportban. Azonban a teljes argináz aktivitás szignifikánsan megemelkedett a T2DM-ban ($0.48 \pm 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ vs. kontroll: $0.32 \pm 0.12 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), ami szoros korrelációt mutatott a hiperglikémia súlyosságával. A fokozott aktivitással párhuzamosan, az argináz egyik végtermékének, az ornitinnek a megemelkedett szintjét mérték a plazmában, ezzel is alátámasztva az argináz patológiás működését diabetes mellitusban. Inzulin infúzió hatására a megemelkedett argináz aktivitás jelentősen csökkent, utalva ezzel az inzulin fontos regulációs szerepére az argináz működésében [99]. Ezen eredmények azt tükrözik, hogy a fokozott argináz aktivitásnak vagy expresszióknak a befolyásolása, egy lehetséges terápiás utat nyújthat az egyes kardiovaszkuláris betegségek kezelésében diabetes mellitusban, azonban ennek alátámasztására további vizsgálatok szükségesek [89].

2.2. A fehérjék O-GlcNAc módosulása diabetes mellitusban

A glikoziláció egyik speciális formája az úgynevezett O-GlcNAc (oxigén-kapcsolt N-acetilglükózamin) típusú glikoziláció, ami a hexózamin bioszintézis útvonalhoz tartozik (HBP). Ennek során a glükóz a hexózamin útvonal enzimikus lépésein keresztül átalakulva a fehérjék szerin és treonin oldalláncaihoz kapcsolódik (3. ábra) [106].

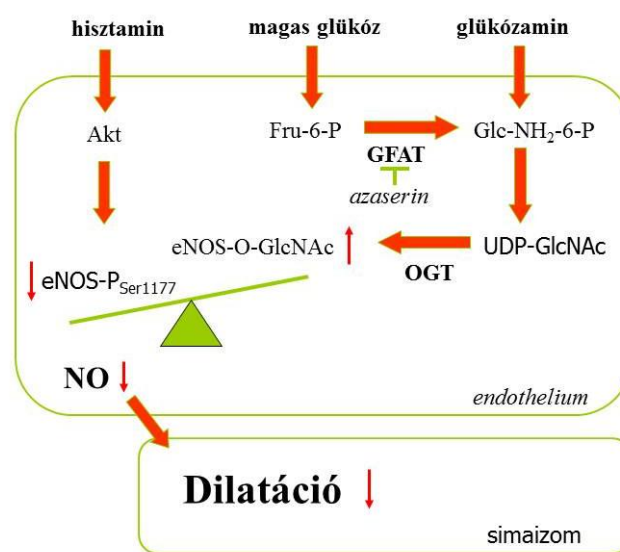


3.ábra - A citoplazmatikus és a nukleáris fehérjék szerin és treonin oldalláncainak O-GlcNAc típusú glikozilációját, két magas fokban konzervált enzim kontrolálja. Az OGT (uridin 5'-difoszfo-N-acetilglükózamin: polipeptid β -N-acetilglükózaminiltranszferáz) felelős az O-GlcNAc csoport fehérjére történő helyezésért, az O-GlcNAcase (N-acetilglikozidáz) annak eltávolításáért. Reciprok kapcsolat van a foszforiláció és az O-GlcNAc-glikoziláció között, tekintettel arra, hogy a foszforilációt végző kinázok ugyancsak a szerin/treonin kötőhelyeket célozzák, mint az O-GlcNAc csoport [106].

In vitro sejtkultúrán végzett tanulmányok alapján a sejtek által felvett glükóz közel 2- 5%-a lép be a HBP-ba. A belépés folyamatát és sebességét az L-glutamin-D-fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz (GFAT) szabályozza, mely a fruktóz-6-foszfátot (Fru-6-P) alakítja glükózamin-6-foszfáttá (Glc-NH₂-6-P), glutamint használva amino-csoport donorként. A glükózamin-6-foszfát átalakulása számtalan intermedier terméken keresztül az uridin 5'-difoszfo-N-acetilglükózamin (UDP-GlcNAc) szintéziséhez vezet. Az UDP-GlcNAc glikozid prekuzorként szerepel glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok szintézisében, ugyanakkor esszenciális donor a fehérjék O-GlcNAc módosulásához. Számos fehérjén az O-GlcNAc csoport verseng a foszfátcsoporttal a szerin és treonin helyekért, ezáltal potenciálisan befolyásolja a fehérjék (pl: a kinázok, foszfatázok, transz-kripciós faktorok, metabolikus enzimek) működését (3.ábra). Újabban felmerült annak lehetősége, hogy hasonló

glikozilációs folyamatok következtében funkcionális változás következhet be az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz működésében is hiperglikémia esetében [107]. Köztudott, hogy a diabetes mellitus kardiovaszkuláris szövődményeinek kialakulásában a hiperglikémia jelentős szerepet játszik [107, 108]. A megemelkedett plazma glükóz koncentráció következtében az endothelsejtekbe bejutó glükóz mennyisége megnő. A glükóz endothelsejtekbe lépése inzulintól független mechanizmussal, a GLUT-1 glükóz-transzporter révén, a koncentráció gradienst követve jön létre [109-111]. A krónikusan megemelkedett glükóz fluxus a HBP-ban inzulin rezisztenciához és glükóz toxicitáshoz vezet [112, 113]. Húsz évvel ezelőtt Marshall és munkatársai mutatták ki először a direkt kapcsolatot a fluxus megemelkedése HBP-ban és az inzulin rezisztencia között patkány zsírsjtekben [114]. A HBP fluxusa kísérleti úton növelhető exogén glükóz vagy glükózamin adásával. A glükózamin szintén a glükóz-transzporter rendszeren keresztül jut be a sejtekbe, ahol glükózamin-6-foszfáttá foszforilálódik hexokinázok által, így képes megkerülni a HBP sebességét szabályozó GFAT enzimet, ezáltal gyors UDP-GlcNAc szintemelkedést eredményez. A megnövekedett fluxus a HBP-ben károsítja az IR (inzulin receptor)/IRS (inzulin receptor szubsztrát)/PI3-K/Akt útvonalat, a foszforilációs helyek glikozilálásával létrehozva az eNOS működészavarát és a következményes endothel diszfunkciót [115]. A NO nem csak elengedhetetlen az érátmérő szabályozásában, hanem fontos szabályozó szerepe van a thrombocytá aggregációban, gyulladásos folyamatokban, remodellingben valamint az atherogenesis gátlásában [116]. Az eNOS-t elsősorban a Ca^{2+} szint emelkedése aktiválja, de működését a BH_4 -koncentráció, a kaveolinhoz kötődés és számos foszforilációs hely foszforiláltsági állapota (Ser114, Ser1177, Thr495, Ser615, Ser633) is jelentősen befolyásolja. Az eNOS foszforilációs helyei közül, a Thr495 foszforilációja gátolja, a Ser1177 foszforilációja aktiválja az enzimet [117]. Federici és munkatársai, humán koronária endothelsejtekét 20 mmol/L glükóz vagy 7.5 mmol/L glükózamin jelenlétében inkubált 72 órán keresztül. Az eNOS enzimen az *O*-GlcNAc-csoport

jelenléte 294%-kal emelkedett a kontrolléhoz képest, amelyet a GFAT inhibitor azaserin teljes mértékben gátolt magas glükóz koncentráció jelenlétében, de nem volt hatással a glükózaminnal kezelt sejtekre. In vitro kináz assay alkalmazásával, a ^{32}P –nak a jelenléte 46%-kal (magas glükóz) és 83%-kal (glükózamin) csökkent, amely az eNOS aktivációjának a szignifikáns gátlását mutatja a megemelkedett glikoziláció következtében. Az eNOS Ser1177 foszforilációs hely vizsgálata Western blot analízissel 37%-os (magas glükóz) és 42%-os (glükózamin) csökkenést eredményezett inzulin stimulációra (4. ábra) [115].



4. ábra – A megnövekedett glükóz vagy glükózamin koncentráció az endothelsejtekben, növeli a HBP útvonal fluxusát, amely fokozza az eNOS fokozott O-GlcNAc-ációt, ezáltal gátolva az eNOS Ser1177 foszforilálását, ami csökkent NO mediálta vazodilatációhoz vezet. Akt (szerin/treonin – specifikus protein kináz), Fru-6-P (fruktóz-6-foszfát), GFAT (L-glutamin-D-fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz), azaserin (a GFAT gátlószere), Glc-NH₂-6-P (glükózamin-6-foszfát), UDP-GlcNAc (uridin 5'-difoszfó-N-acetilglükózamin), OGT (uridin 5'-difoszfó-N-acetilglükózamin: polipeptid β-N-acetilglükózaminiltranszferáz), O-GlcNAc (oxigén-kapcsolt N-acetilglükózamin).

Összefoglalva, a HBP útvonal tanulmányozására háromféle kísérletes megközelítést alkalmaznak elterjedten 1.) magas glükóz koncentráció és 2.) glükózamin kezelés, valamint 3.) a GFAT enzimnek a gátlása. [114, 118]. Az *O*-GlcNAc szerepét a sejtfunkció szabályozásában számos betegséghez kötötték, köztük az inzulinrezisztenciához és diabetes mellitushoz, azonban az ennek a talaján kialakuló károsodott endothel működés mechanizmusa és ennek a hatása a mikroerek működésére még nem pontosan ismert.

3. MÓDSZERTAN

Kísérleteink első részében jobb pitvari fülcsét használtunk szívműtéten átesett betegekből. Kísérleteink második részében hím Wistar patkányokat használtunk (Charles River, Magyarország). A kísérleti protokollok után valamennyi állaton 150 mg/tskg nembutal intraperitoneális injekció adásával eutanáziát végeztünk.

3.1. A betegek jellemzése

Kísérleteink során a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum valamint a New York Medical College Etikai Bizottsága által jóváhagyott protokolloknak megfelelően jártunk el. Minden beteg írásbeli tájékoztatást kapott és írásbeli jóváhagyást adott a humán minta kísérletes felhasználásáról.

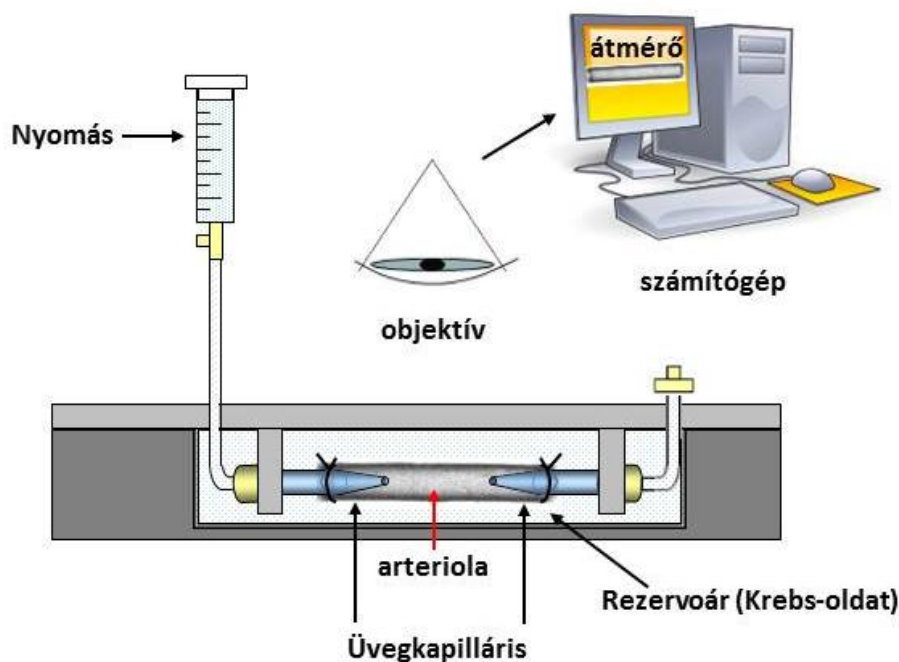
Vizsgálatainkba 41 szívsebészeti műtéten átesett beteget vontunk be. A betegeket a dokumentáltan ismert diabetes mellitus betegség megléte (DM+) illetve annak hiánya (DM-) alapján két csoportra osztottuk. A betegek demográfiai adatait, a fennálló egyéb betegségeket, gyógyszereket valamint a szívsebészeti műtét típusát az alábbi táblázat tartalmazza (2. táblázat).

		DM (-) n=21	DM(+) n=20
	Nem, férfi (n)	14	10
	Kor	60±14	59±8
Egyéb betegségek (n)	1-es típusú DM	0	5
	2-es típusú DM	0	15
	Magas vérnyomás	17	18
	Hiperkoleszterinémia	13	10
	Koronária betegség	9	16
	Angina pectoris	10	15
	Korábbi AMI	2	7
	Perifériás érbetegség	0	3
	Szívbillentyű betegség	13	6
	Szívelégtelenség	0	4
Gyógyszerek (n)	Aspirin	11	13
	Lipid csökkentő	15	13
	Inzulin	0	8
	Orális antidiabetikum	0	15
	ACE gátló	13	18
	Diuretikum	10	10
	Antikoaguláns	13	10
	Ca ²⁺ -csatorna blokkoló	6	4
Sebészeti beavatkozás (n)	CABG	7	11
	Billentyű csere	13	7
	Egyéb okok	1	2

2. táblázat – A táblázat tartalmazza a betegek demográfia adatait, társbetegségeit, gyógyszeres kezelésüket és sebészeti beavatkozásait. A korra vonatkozó adatok átlagértékei ± SD (Fisher exact statisztikai test), n = vizsgált betegek száma, angiotenzin-konvertáló enzim (ACE), akut miokardiális infarktus (AMI), koronária artéria bypass graft (CABG).

3.2. Izolált mikroértechnika

Izolált mikroér kísérleteinknek egy részét koronária arteriolákon (~100 µm átmérő), valamint patkány gracilis vázizomból izolált arteriolákon (~150 µm) végeztük. A koronária arteriolákat koronária bypass műtét vagy billentyűcsere során eltávolított jobb fülcse darabból izoláltuk. Nembutállal altatott állatokból steril körülmények között eltávolítottuk a musculus gracilis vázizmot. A jobb fülcsét, valamint a musculus gracilis vázizmot egy hideg (0-4°C, pH 7,4) Krebs-oldatot (110,0 mmol/L NaCl, 5,0 mmol/L KCl, 2,5 mmol/L CaCl₂, 1,0 mmol/L MgSO₄, 1,0 mmol/L KH₂PO₄, 5,5 mmol/L glükóz és 24,0 mmol/L NaHCO₃) tartalmazó szilikon alapú Petri-csészében tűkkel rögzítettük, majd Nikon SMZ 1000 sztereomikroszkóp segítségével, mikrosebészeti eszközökkel az elsőrendű koronária arteriola 2-3 mm-es szakaszát, valamint a gracilis arteriola másodrendű ágának 2-3 mm-es szakaszát izoláltuk. Az izolált arteriolát először egyik végén (ez lett a proximális vég) kanülálva rögzítettük, majd 20 Hgmm-es perfúziós nyomással a lumenből a véresejteket eltávolítottuk. Ezután az ér disztális végét is megkanüláltuk és miután egy mikrocsovar segítségével beállítottuk az eredeti érhosszt, egy állandó hőmérsékletű (T=37°C, pH=7,4) szervfürdőbe helyeztük. A szervkamrát folyamatosan oxigenizált (O₂: 10%, CO₂: 5%, N₂: 85%) Krebs-oldattal áramoltattuk át (40 ml/min). Az intraluminális nyomást folyadékoszlop segítségével lassan 80 Hgmm-re emeltük és körülbelül 60 percig ott tartottuk, amíg az ér állapota stabilizálódott. Közben az intraluminális nyomást folyamatosan nyomástranzducerrel mértük. A felvételek egy mikroszkóphoz (Nikon, Eclipse 80i) rögzített digitális kamerával (CFW1310, Scion Corp, USA) készültek (5. ábra). Az izolált arteriola belső átmérőjét az Image J software-rel mértük (NIH Image, MD, USA).



5. ábra - Az izolált erek átmérőváltozásait mérő videomikroszkópos rendszer vázlatos képe.

3.3. A humán koronária arteriolák működésének vizsgálata vazoaktív szerekkel

Az izolált koronária arteriolán az egy órás inkubáció során spontán miogén tónus alakult ki a 80 Hgmm-es intraluminális nyomás hatására. Kísérleteinkben az izolált koronária mikroerek válaszait ismert hatásmechanizmusú, endothel-függő és endothel-független vazoaktív farmakonokkal teszteltük. A protokollok során az alkalmazott vazoaktív anyagokat az ismert térfogatú (15 mL) perfundált kádba megfelelő végkoncentrációkban adtuk. Kumulatív koncentrációkat alkalmazva folyamatosan regisztráltuk az egyes szerek megfelelő koncentrációjának érátmérőre gyakorolt maximális hatását.

Az első kísérleti sorozatban az endothel-függő vazodilatátor, **acetilkolin (0.1 nmol/L – 0.1 μmol/L)**, majd az endothel független, a simaizomsejteken közvetlenül ható vazodilatátor, **nátrium nitroprusszid (SNP; 0.1 nmol/L – 1 μmol/L)** hatására kialakuló átmérőváltozásokat mértük. Az egyes kumulatív dózis-hatás görbéket kimosási periódus és 10 perc inkubáció követte, melynek során az arteriolák visszanyerték kiindulási tónusukat.

A jobb fülcséből izolált koronária arteriolákat 30 percig NO szintáz gátló **N^ω-nitro-L-**

arginin-metil-észter (L-NAME, 2×10^{-4} mol/L) jelenlétében inkubáltuk, majd ismételten megfigyeltük az acetilkolin és a SNP növekvő dózisainak hatására bekövetkező átmérőváltozásokat. Kísérleteink másik részében, a feltételezeten jelenlevő fokozott argináz 1 működés blokkolása céljából szelektív argináz gátlót ***N*^G-hydroxy-L-arginine (L-NOHA, 10 μ mol/L)** alkalmaztunk, melynek jelenlétében 30 percen keresztül inkubáltuk a humán koronária arteriolákat, majd ismételten megmértük az agonista szerekre kialakuló átmérőváltozásokat. Más protokollokban az arteriolákat **L-arginin (3 mmol/L)** jelenlétében is inkubáltuk, majd ismételten megmértük az agonista szerek növekvő dózisainak hatására kialakuló átmérőváltozásokat.

3.4. Kísérleti protokollok patkány izolált vázizom ereken

Arteriolaris dilatáció vizsgálata vazoaktív szerekkel patkány izolált vázizom ereken

A kísérletekben az izolált vázizom arteriolák dilatációs válaszait ismert hatásmechanizmusú receptor-mediálta vagy receptor független vazoaktív farmakonokkal teszteltük. Az izolált arteriolákban az endothel-függő dilatációt **acetilkolin (1 nmol/L – 1 μ mol/L)** és **hisztamin (1 nmol/L – 10 μ mol/L)** alkalmazásával vizsgáltuk. Az endothel független, a vaszkuláris simaizomra ható direkt NO donorként a **nitroprusszid-nátrium (SNP; 1 nmol/L – 1 μ mol/L)** dózisfüggő hatásait figyeltük meg, valamint vizsgáltuk vazokonstriktor anyagok **norepinefrin (NE; 0.3 nmol/L – 0.1 μ mol/L)** és **szerotonin (5HT; 0.1 nmol/L – 1 μ mol/L)** érátmérőre gyakorolt hatását. Az egyes kumulatív dózis-hatás görbéket kimosási periódus követte, ezután 10 percet vártunk. Ez idő alatt az arteriolák visszanyerték kiindulási miogén tónusukat. A patkányból izolált vázizom arteriolákat 30 percig NO szintáz gátló ***N*^o-nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME, 2×10^{-4} mol/L)** jelenlétében inkubáltuk, majd ismételten megfigyeltük az acetilkolin és a hisztamin növekvő dózisainak hatására kialakuló átmérőváltozásokat.

A magas glükóz koncentráció és a glükózamin vazoaktív hatásának vizsgálata

A **magas glükóz koncentráció (30 mmol/L, 2 órás inkubáció)** érátmérőre gyakorolt hatását az acetilkolin, hisztamin, SNP, NE, 5-HT növekvő dózisainak hatására kialakuló érátmérő változások mérésével vizsgáltuk izolált gracilis arteriolákon. A **glükózamin (5mmol/L)** kezelés érátmérőre gyakorolt hatását a **hisztamin (1 nmol/L – 10 µmol/L)** növekvő dózisainak hatására kialakuló érátmérő változások mérésével vizsgáltuk izolált gracilis arteriolákon. A hexózamin bioszintézis útvonal szerepének a tisztázására a hisztamin hatására kialakuló érátmérő változásokat a GFAT enzim antagonistá **azaserin (20 µmol/L)** jelenlétében is megvizsgáltuk. A hiperozmoláris hatás kizárására, további kísérletekben az izolált arteriolákat **mannitol (25 mmol/L)** jelenlétében inkubáltuk, majd ismételtén megfigyeltük az acetilkolin és a hisztamin növekvő dózisainak hatására kialakuló érátmérőváltozásokat.

3.5. Immunhisztokémia

Diabeteses betegeken végzett kísérletekben funkcionális vizsgálatainkat immunhisztokémiai kísérletekkel is kiegészítettük. A nem diabeteses [DM (-), n=4] és a diabetes mellitusban szenvedő [DM (+), n=4] betegekből származó koronária arteriolákat hosszában kettévágva, acetonos fixálás után, 1% marha szérum albumint (BSA), 0.6 % Triton X-100-at tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk (Sigma). Az ereket (hígítás: 1:50 blokkoló oldatban) monoklonális argináz 1 ellenanyaggal (1:100 hígítás, Sigma) és poliklonális endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) ellenanyaggal (1:100, hígítás, BD Bioscience) jelöltük egy időben. Az immunfluoreszcens jelölést argináz 1 és eNOS elleni Alexa 488 és Alexa 597 (Invitrogen) jelölt szekunder antitesttel végeztük. Magfestésre 4,6-diamidino-2-phenylindole-t (DAPI, Invitrogen) használtunk. A nem specifikus kötődés kimutatására az

elsődleges antitestet kihagytuk a kontroll protokollokban. A felvételeket Olympus BX61 típusú mikroszkóphoz csatolt CCD kamerával (Luca^{EM}-S, Andor) készítettük.

3.6. Western immunoblot

A diabetes mellitus hatása az argináz 1 expresszióra humán koronária arteriolákban

A DM (-) és DM (+) betegek jobb fülcséjéből izolált koronária arteriolákat, a környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd 20 µl SDS mintapufferben (összetevők: 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% brómfenol kék és 0.125 M Tris HCl, pH~ 6.8, Sigma) homogenizáltuk. A fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen 125 V feszültségen 1 óra alatt szeparáltuk [119], majd polyvinil membránra transzferáltuk. Ezt követően membrán szabad kötőhelyeit 5% tejet tartalmazó T-BST-vel (0.1% Tween-20 TBS-ben, Sigma) 1 óráig blokkoltuk. A membránt az argináz 1 ellenes elsődleges antitesteket 1:1000 hígításban 5% tejet tartalmazó T-BST oldatban inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcencia (ECL kit, Fisher) segítségével autoradiográfiás módszerrel vizualizáltuk. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, β-aktin ellenes antitestet 1:5000 hígításban használtunk 5% tejet tartalmazó T-BST-ben. Az optikai denzitást Image J szoftver segítségével mértük és az argináz 1 expresszióját β-aktinra normalizáltuk.

A magas glükóz koncentráció és glükózamin kezelés hatásának a vizsgálata az eNOS foszforilációs szintjére és a fehérjék O-GlcNAc glikolizációs állapotára

Wistar patkányokból izolált arteriolákat (artéria femorális ágai), a környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd három csoportra osztva: **normál glükóz (5.5 mmol/L, 2 órás inkubáció), magas glükóz (30 mmol/L, 2 órás inkubáció) és glükózamin (5 mmol/L, 2 órás inkubáció)** kezelésnek vetettük alá. A mintákat folyékony nitrogénben megfagyasztottuk, majd 20 µl RIPA bufferben (összetevők: 50 mM Tris-HCl, pH~8.0, 150 mM nátrium klorid, 1.0% Igepal CA-630 (NP-40), 0.5% nátrium deoxikolat és 0.1% nátrium

dodecil szulfát, Sigma) homogenizáltuk, 20 µl mintapuffer (összetevők: 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% brómfenol kék és 0.125 M Tris HCl, pH~ 6.8, Sigma) hozzáadásával a fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen 125 V feszültségen 1 óra alatt szeparáltuk, majd polyvinil membránra transzferáltuk. Ezt követően az eNOS és a GlcNAc detektálására szánt membránok szabad kötőhelyeit 5% tejet, míg a P-eNOS detektálása esetén 1% marha szérumban albumint tartalmazó T-BST-vel 1 óráig blokkoltuk. Az O-GlcNAc és eNOS ellenes elsődleges antitesteket 1:1000 hígításban 5% tejet tartalmazó T-BST-ben alkalmaztuk, míg a P-eNOS antitestet 1:500 hígításban 1% marha szérumban albumint tartalmazó T-BST oldatban inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcencia (ECL kit, Fisher) segítségével autoradiográfias módszerrel vizualizáltuk. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, β-aktin ellenes antitestet 1:5000 hígításban használtunk 5% tejet tartalmazó T-BST-ben. Az optikai denzitást Image J szoftver segítségével mértük és az O-GlcNAc és eNOS expresszióját β-aktinra, míg a P-eNOS expresszióját eNOS-ra normalizáltuk.

3.7. Az eredmények statisztikai értékelése

A vasoaktív szerek hatására kialakuló átmérőváltozásokat abszolút értékekben, illetve a Ca^{2+} mentes oldatban megfigyelt passzív átmérő százalékában fejeztük ki. A normalizált érátmérőt az adott nyomásértéken mért aktív és passzív érátmérő arányaként határoztuk meg. Az arteriolák miogén tónusát az ugyanazon a nyomáson mért aktív (Ca^{2+} tartalmú Krebs oldatban mért) átmérőjének a Ca^{2+} mentes oldatban mért passzív átmérőjének százalékában adtuk meg. Az adatokat a GraphPad Prism (San Diego, California) statisztikai program segítségével értékeltük ki. Az ábrákon a nyert adatok átlagértékei \pm S.E.M szerepelnek. A statisztikai analízishez ismételt mérésekkel ANOVA-t használtunk, amit Tukey post hoc teszttel vagy Student's t-teszttel egészítettünk ki a protokolloknak megfelelően. Az értékeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$ volt.

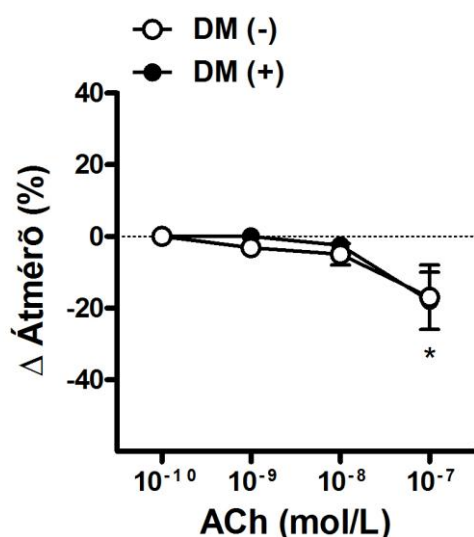
4. EREDMÉNYEK

4.1. A diabetes mellitus hatása a koronária arteriolák vazomotor működésére

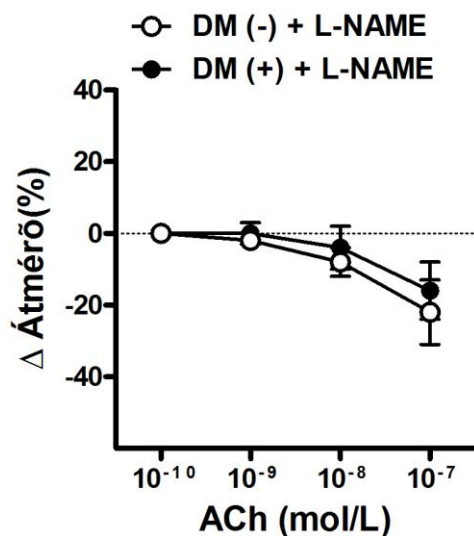
A diabetes mellitus koronária erek vazomotor működésére gyakorolt hatását koronária bypass vagy billentyűműtéten átesett betegekből (n = 41) származó ereken vizsgáltuk. A betegek demográfiai mutatóit az 2. táblázatban foglaltuk össze. A betegeket a diabetes mellitus hiánya [DM(-), n = 21] vagy megléte alapján [DM(+), n = 20] két alcsoportba osztottuk. A két csoport között nem találtunk eltérést a műtétek típusa, a kor és nem tekintetében. A társbetegségek esetében a DM(+) csoportban a perifériás érbetegség és szívelégtelenség előfordulása volt megfigyelhető, DM(-) csoportban viszont nem. A gyógyszerek tekintetében mindkét csoport hasonló kezelésben részesült, különbség a diabetes mellitus kezelésére alkalmazott orális antidiabetikum és inzulin adásában található (2. táblázat).

Az egyórás inkubáció során az izolált humán koronária arteriolákon 80 Hgmm-es intraluminális nyomás hatására spontán miogén tónus alakult ki. Nem volt szignifikáns különbség a diabeteses [DM(+)] és nem diabeteses [DM(-)] betegekből izolált arteriolák között sem az aktív [AD, az egyórás inkubáció után kialakult átmérő; DM(-): 106 ± 9 , DM(+): $97 \pm 12 \mu\text{m}$], sem a passzív [PD, a kalcium mentes Krebs-oldatban mérhető átmérő; DM(-): 131 ± 11 , DM(+): $133 \pm 17 \mu\text{m}$] érátmérőkben, sem az ezek alapján kalkulált ([PD-AD/PD]*100) miogén tónusban [DM(-): 38 ± 6 , DM(+): $39 \pm 5 \%$].

Elsőként az endothel-függő vazodilatátor acetilkolin kumulatív dózisait alkalmazva (ACh; 0,1 nmol/L – 0,1 $\mu\text{mol/L}$), a humán koronária arteriolák konstriktója alakult ki mindkét csoportban (6. ábra). A NO szintáz gátló (L-NAME, 2×10^{-4} mol/L) kezelésnek nem volt további hatása a kialakult válaszra (7. ábra). A NO-donor nitroprusszid nátrium (SNP, 1 nmol/L és 10 $\mu\text{mol/L}$) adására az izolált koronária arteriolák jelentős mértékű vazodilatációja alakult ki (8. ábra).

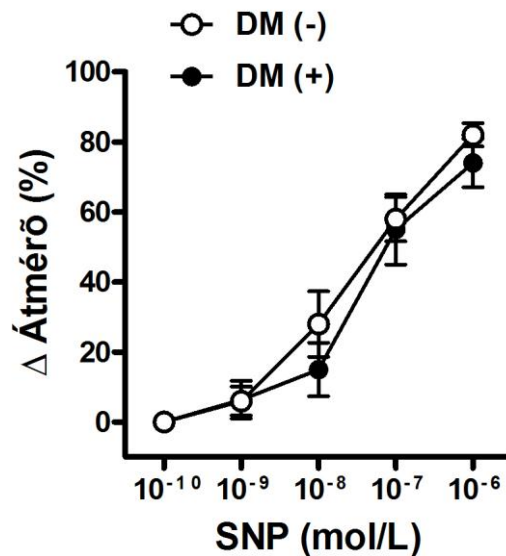


6. *ábra* – A diabetes mellitusban szenvedő betegek [DM(+), n=10] és a nem diabeteses betegek [DM(-), n=11] izolált koronária arterioláinak belső érátmérő változásai acetilkolin kumulatív dózisának hatására. Az adatok a mért százalékos érátmérő változás átlagértékei \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).



7. *ábra* – A diabetes mellitusban szenvedő betegek [DM(+), n=6] és a nem diabeteses betegek [DM(-), n=6] izolált koronária arterioláinak belső érátmérő változásai acetilkolin kumulatív dózisának hatására a NO szintáz gátló L-NAME jelenlétében. Az adatok a mért százalékos érátmérő változás átlagértékei \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

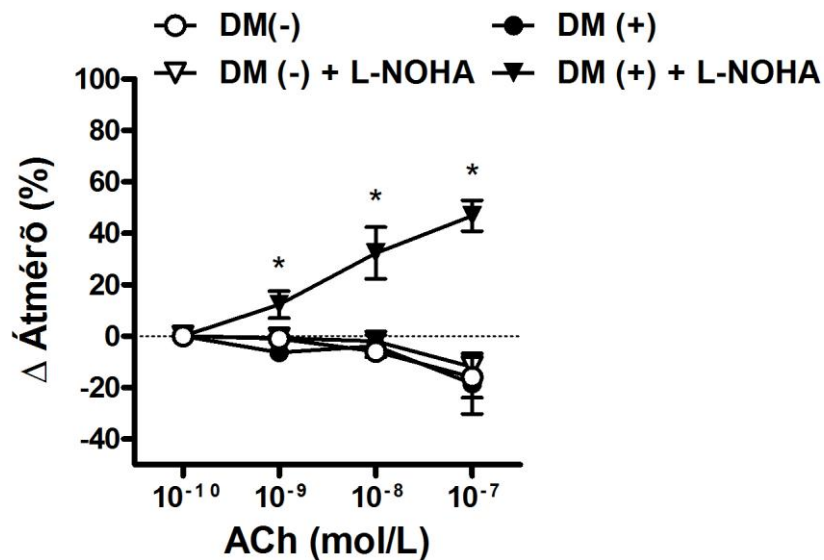
Az endothel-független direkt NO-donor, nátrium-nitroprusszid növekvő koncentrációjának (SNP; 0,1 nmol/L – 1 µmol/L) hatására kialakult vazodilatáció mértéke vizsgálatainkban nem különbözött a két betegcsoport koronária mikroerein. Ezek az eredmények és a kezdetben kalkulált közel azonos miogén tónus a simaizom megtartott reaktivitását mutatja a két ércsoportban (8. ábra).



8. ábra – A diabetes mellitusban szenvedő betegek [DM(+), n=8] és a nem diabeteses betegek [DM(-), n=9] izolált koronária arterioláinak belső érátmérő változásai SNP kumulatív dózisának hatására. Az adatok a mért százalékos érátmérő átlagértékei ± SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

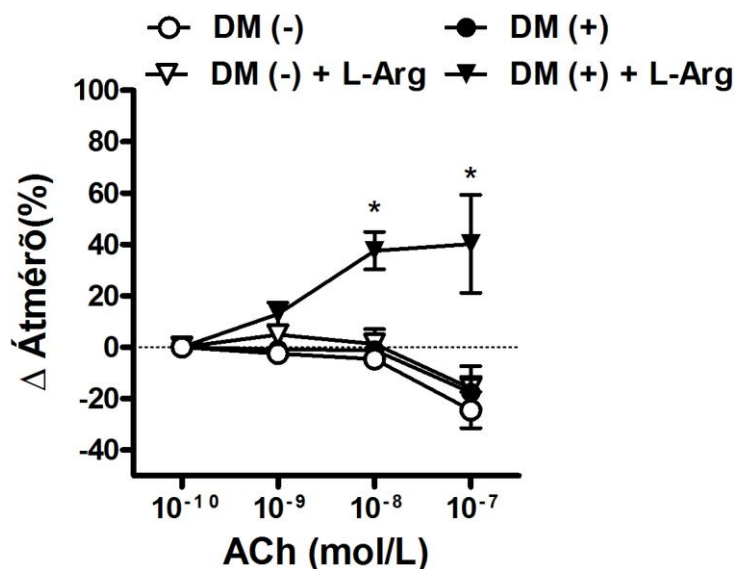
Korábbi vizsgálatokban, a diabetes mellitusban megfigyelték a NO termelés csökkenését, vagy teljes károsodását. Ennek a háttérében álló okok feltárására a továbbiakban a szelektív argináz gátló jelenlétében is (L-NOHA, 10 µmol/L, 30 percig) vizsgáltuk a válaszokat. Míg a nem diabeteses betegek arterioláin a szelektív argináz gátló nem befolyásolta jelentősen az acetilkolin indukált érválaszokat, addig a diabetes mellitusban

szenvedő betegek koronária arterioláiban szignifikáns mértékben javította az ACh válaszokat (9. ábra).



9. ábra - A diabetes mellitusban szenvedő betegek [DM(+), n=5] és a nem diabeteses betegek [DM(-), n=5] izolált koronária arterioláinak belső érátmérő változásai acetilkolin kumulatív dózisának hatására szelektív argináz gátló kezelés (L-NOHA, 10 μ mol/L, 30 percig) előtt és után. Az adatok a mért százalékos érátmérő átlagértékei \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

A megnövekedett argináz aktivitás csökkentheti a NO szintézishez szükséges szubsztrát, az L-arginin mennyiségét. Ennek igazolására, L-arginin hozzáadása után is (3 mmol/L, 30 percig) vizsgáltuk a válaszokat. Míg a nem diabeteses betegek arterioláin az L-arginin nem befolyásolta az acetilkolin indukált érválaszokat, addig a diabetes mellitusban szenvedő betegek koronária arterioláiban szignifikáns mértékben javította azokat (10. ábra).

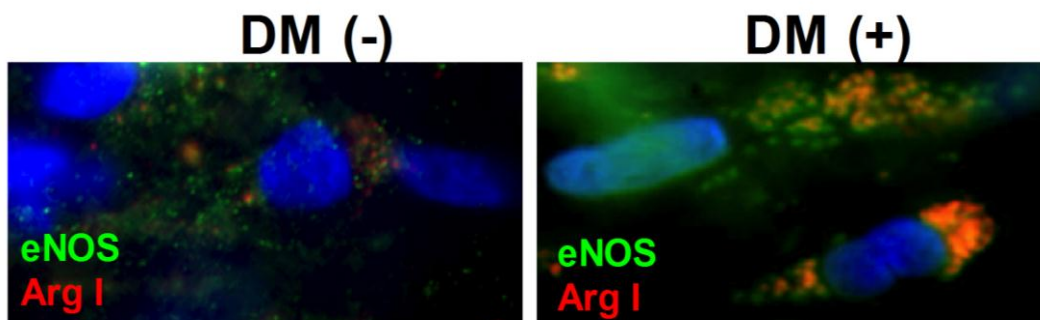


10. ábra - A diabetes mellitusban szenvedő betegek [DM(+), n=6] és a nem diabeteses betegek [DM(-), n=6] izolált koronária arterioláinak belső érátmérő változásai acetilkolin kumulatív dózisének hatására L-arginin adása (3 mmol/L, 30 percig) előtt és után. Az adatok a mért százalékos érátmérő átlagértékei \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

A szelektív argináz gátlóval (L-NOHA) történő előkezelés a mikroerek kiindulási belső átmérőjét nem befolyásolta jelentős mértékben [DM(-): $98 \pm 10 \mu\text{m}$, DM(+): 91 ± 7], azonban az L-arginin kezelés növelte az átmérőt [DM(-): $112 \pm 9 \mu\text{m}$, DM(+): 113 ± 14].

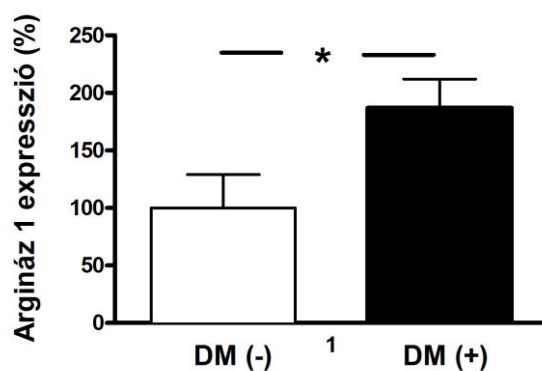
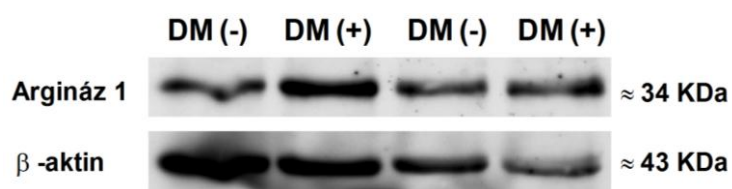
4.2. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a DM(+) betegekből izolált erek falában az argináz 1 festődés jelentősen fokozott volt az endothelsejtekben összehasonlítva a DM(-) betegek mintáival, valamint az argináz 1 kolokalizációt mutatott az eNOS festődéssel a DM(+) betegekből, míg a DM(-) csoportban ez nem volt megfigyelhető (11. ábra).



11. ábra - Az argináz 1 és eNOS együttes immunhisztokémiai kimutatása diabetesben [DM(+), n=4, jobb oldal] és diabetes mellitusban nem szenvedő betegek [DM(-), n=4, bal oldal] koronária arterioláiban (3-4 endothelsejt egy nézetben). Az argináz 1 festést az Alexa 597 másodlagos antitest (piros), az eNOS festést az Alexa 488 másodlagos antitest (zöld) mutatja. Az argináz 1 és eNOS kolokalizációját a narancs/sárga szín ábrázolja. A sejtmag kimutatására DAPI-t festést alkalmaztunk (kék).

Az argináz 1 fehérje fokozott expresszióját sikerült kimutatni a DM(+) betegek koronária arterioláiban Western immunoblot segítségével (12. ábra).



12. ábra - Az argináz 1 expresszió a diabetes mellitusban szenvedő betegek [DM(+), n=5] és a nem diabeteses betegek [DM(-), n=5] izolált koronária arterioláiban. Az argináz 1

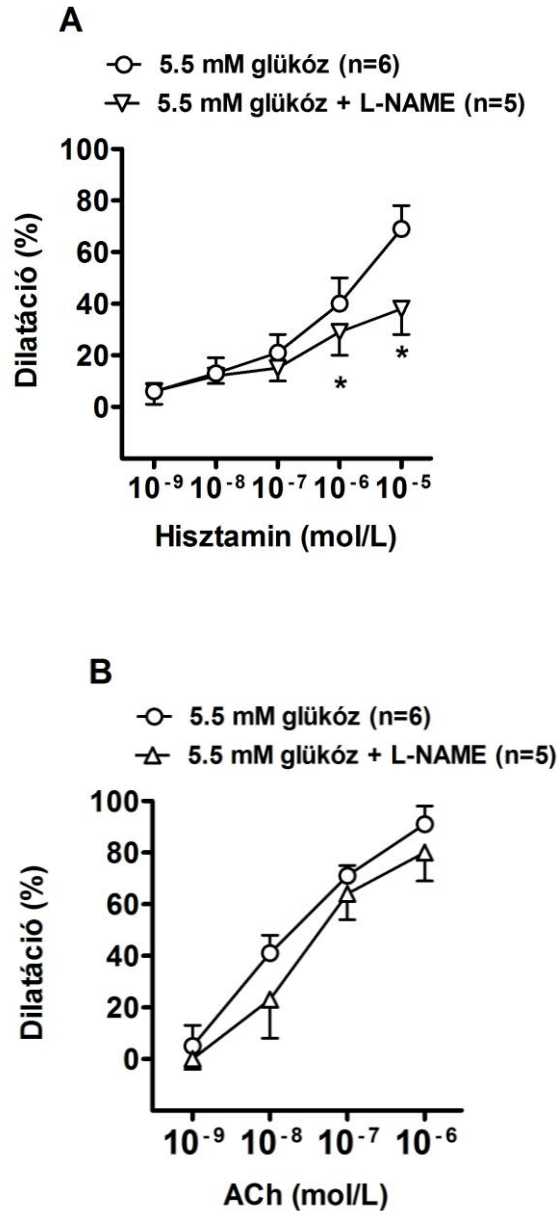
expresszióját β -aktinra normalizáltuk. A megadott értékek átlagok \pm SEM. A csillag () szignifikáns különbséget jelöli ($p < 0,05$).*

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a diabetes mellitusban szenvedő betegekben fokozódik az argináz 1 expresszió, amely az L-arginin szubsztrát nagyobb mértékű felhasználása következtében csökkenti annak biológiai hozzáférhetőségét az eNOS számára, így csökkenti vagy teljesen eltörli a NO-mediált vazodilatációt a koronária arteriolákban. Feltételezzük, hogy ezen elváltozásoknak szerepe van a mikrovaszkuláris diszfunkció kialakulásában diabetes mellitusban.

4.2. A magas glükóz koncentráció hatása vázizom arteriolák vazomotor működésére

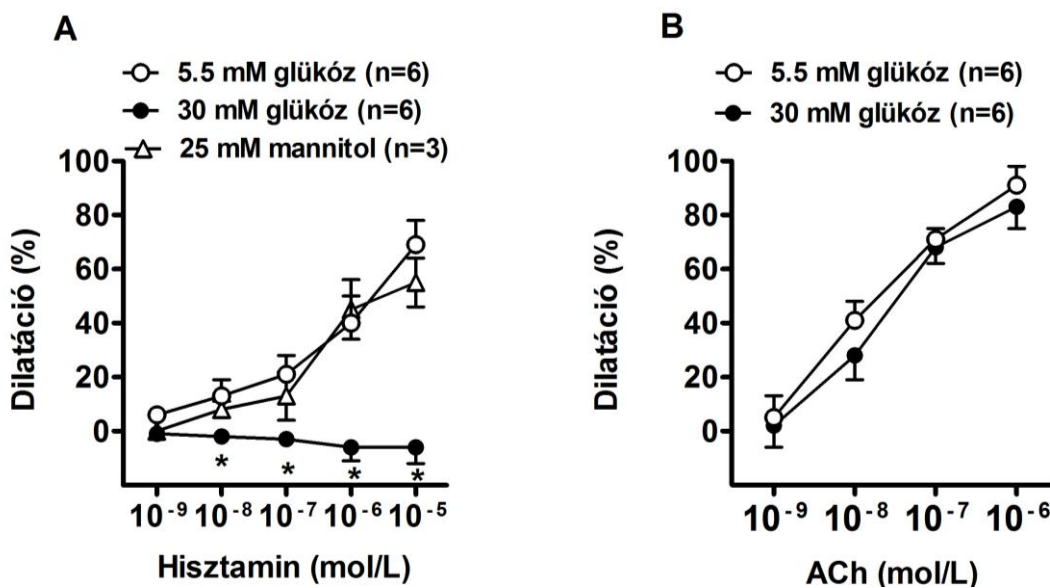
Következő lépésben a szénhidrát anyagcserezavar következtében létrejövő magas glükóz koncentrációt hoztunk létre kísérletesen, a vázizom arteriolák vazomotor működésének tanulmányozására ebben a kóros állapotban. Kísérleteink során patkány (Wistar, hím) gracilis vázizomból izolált arteriolákat használtunk. A preparálást követő egy órás inkubációs idő alatt az izolált gracilis arterioláknak spontán miogén tónusa (~30%) fejlődött ki anélkül, hogy bármilyen vazoaktív anyagot alkalmaztunk volna.

Elsőként az endothel-függő vazodilatátor acetilkolin (ACh; 1 nmol/L – 1 μ mol/L) és hisztamin (1 nmol/L – 10 μ mol/L) által kiváltott válaszokat vizsgáltuk kontroll körülmények között. A NO szintáz gátló (L-NAME, 2 X 10⁻⁴ mol/L) kezelésnek nem volt hatása az acetilkolin általt kiváltott vazodilatációra, azonban a hisztamin választ szignifikánsan csökkentette (13. ábra A és B panel). Ennek oka, hogy az ACh elsősorban EDHF-en keresztül váltja ki az erek vazodilatációját és kevésbé hangsúlyos a NO útvonal szerepe.



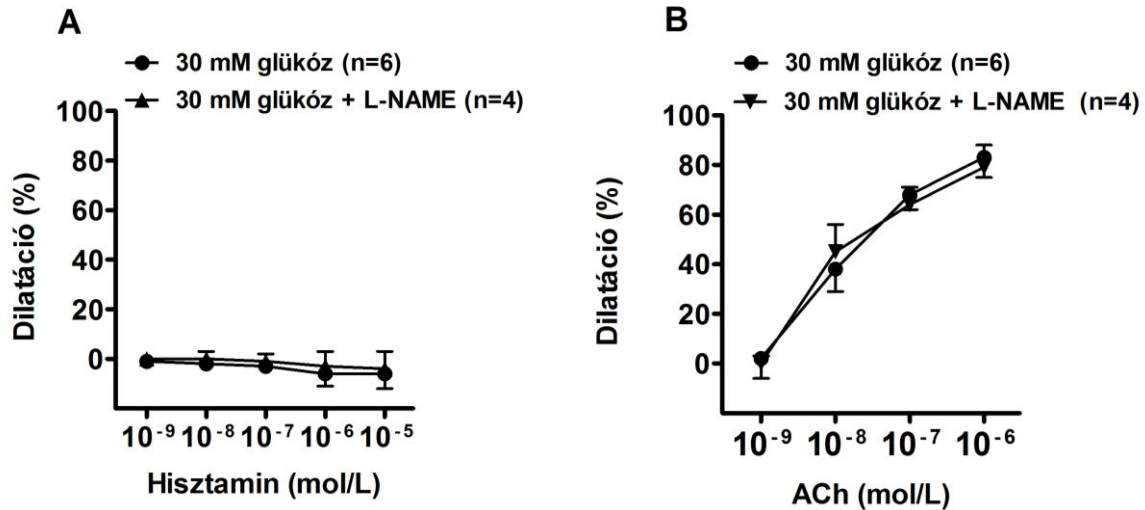
13. ábra - Wistar patkányokból izolált arteriolák hisztamin (A panel; $1 \text{ nmol/L} - 10 \text{ } \mu\text{mol/L}$) és acetilkolin (B panel; $1 \text{ nmol/L} - 1 \text{ } \mu\text{mol/L}$) növekvő dózisainak hatására kialakuló érválaszai a NO szintáz gátlószere, az L-NAME-mel történő inkubáció előtt és után normál glükóz szint jelenlétében. Az adatok a mért százalékos dilatációk átlagértékei \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

A következő kísérletekben az arteriolákat magas glükóz koncentrációjú oldatban (30 mmol/L, 2 órás inkubáció) inkubáltuk és ismét megvizsgáltuk az acetilkolin és hisztamin válaszokat. A magas glükózszint szignifikánsan csökkentette a hisztamin által kiváltott vazodilatációt, míg az acetilkolin válasza nem volt hatással. Hiperozmotikus kontroll kísérletekben a hisztamin válasz nem változott mannitol (25 mmol/L, 2 órás inkubáció) jelenlétében (14. ábra A és B panel).



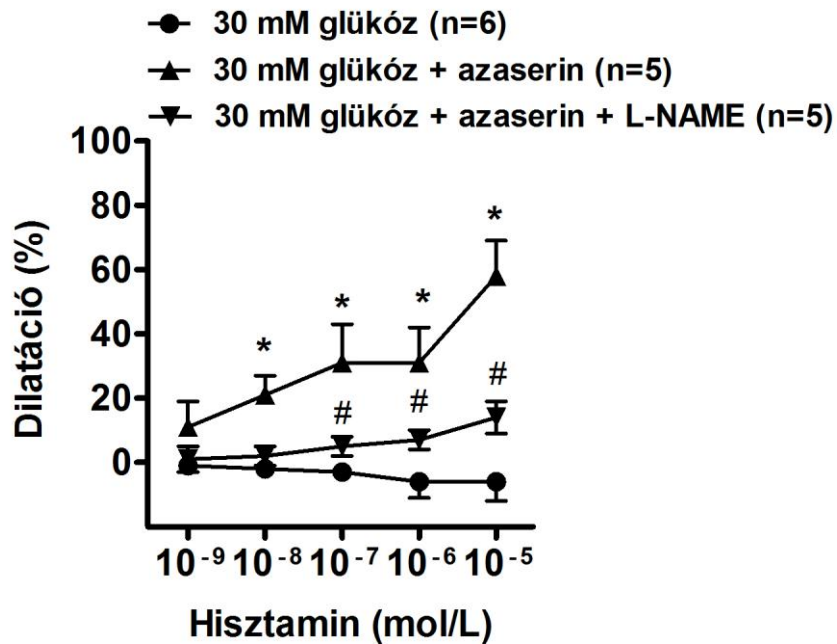
14. ábra - Wistar patkányokból izolált arteriolák hisztamin (A panel; 1 nmol/L –10 μ mol/L) és acetilkolin (B panel; 1 nmol/L –1 μ mol/L) növekvő dózisainak hatására kialakuló érválaszai normál glükóz (5.5 mmol/L), magas glükóz (30 mmol/L) és mannitol (25 mmol/L) jelenlétében. Az adatok a mért százalékos dilatációk átlagértékei \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

A NO szintáz gátlónak (2×10^{-4} mol/L) nem volt hatása a magas glükóz koncentrációjú oldattal (30 mmol/L) kezelt arteriolák hisztamin és acetilkolin válaszára (15. ábra A és B panel).



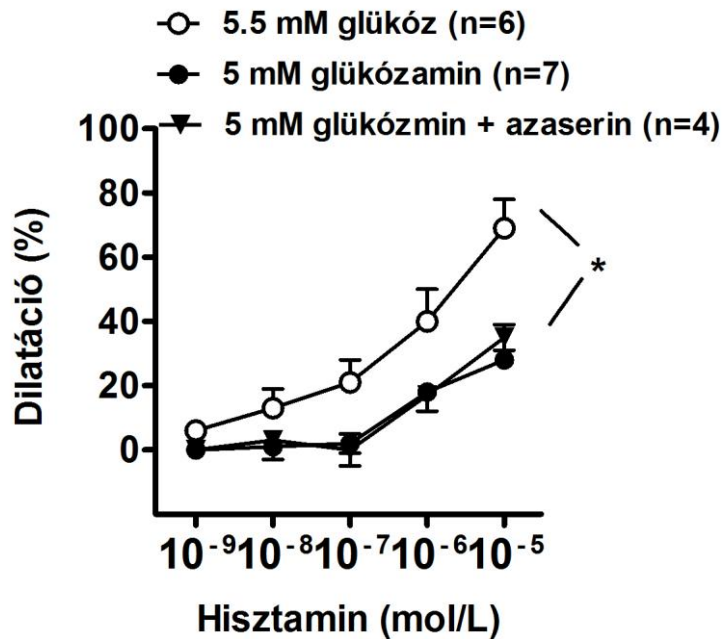
15. ábra - Wistar patkányokból izolált arteriolák hisztamin (A panel; 1 nmol/L – 10 μ mol/L) és acetilkolin (B panel; 1 nmol/L – 1 μ mol/L) növekvő dózisainak hatására kialakuló érválaszai magas glükóz koncentráció (30 mmol/L) és L-NAME (2×10^{-4} mol/L) jelenlétében. Az adatok a mért százalékos dilatációk átlagértékei \pm SEM.

A HBP útvonal egyik kulcs enzime az *L*-glutamin-*D*-fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz (GFAT). A GFAT enzim antagonistája az aszerin (20 μ mol/L), a hisztamin indukálta vazodilatációt a kontroll (normál glükóz koncentrációjú) válasz szintjére emelte vissza a magas glükóz szintnek kitett gracilis erekben. Az aszerin és a magas glükóz koncentráció jelenlétében a NO szintáz gátló (L-NAME) adására a hisztamin kiváltotta vazodilatáció mértéke szignifikánsan csökkent (16. ábra).



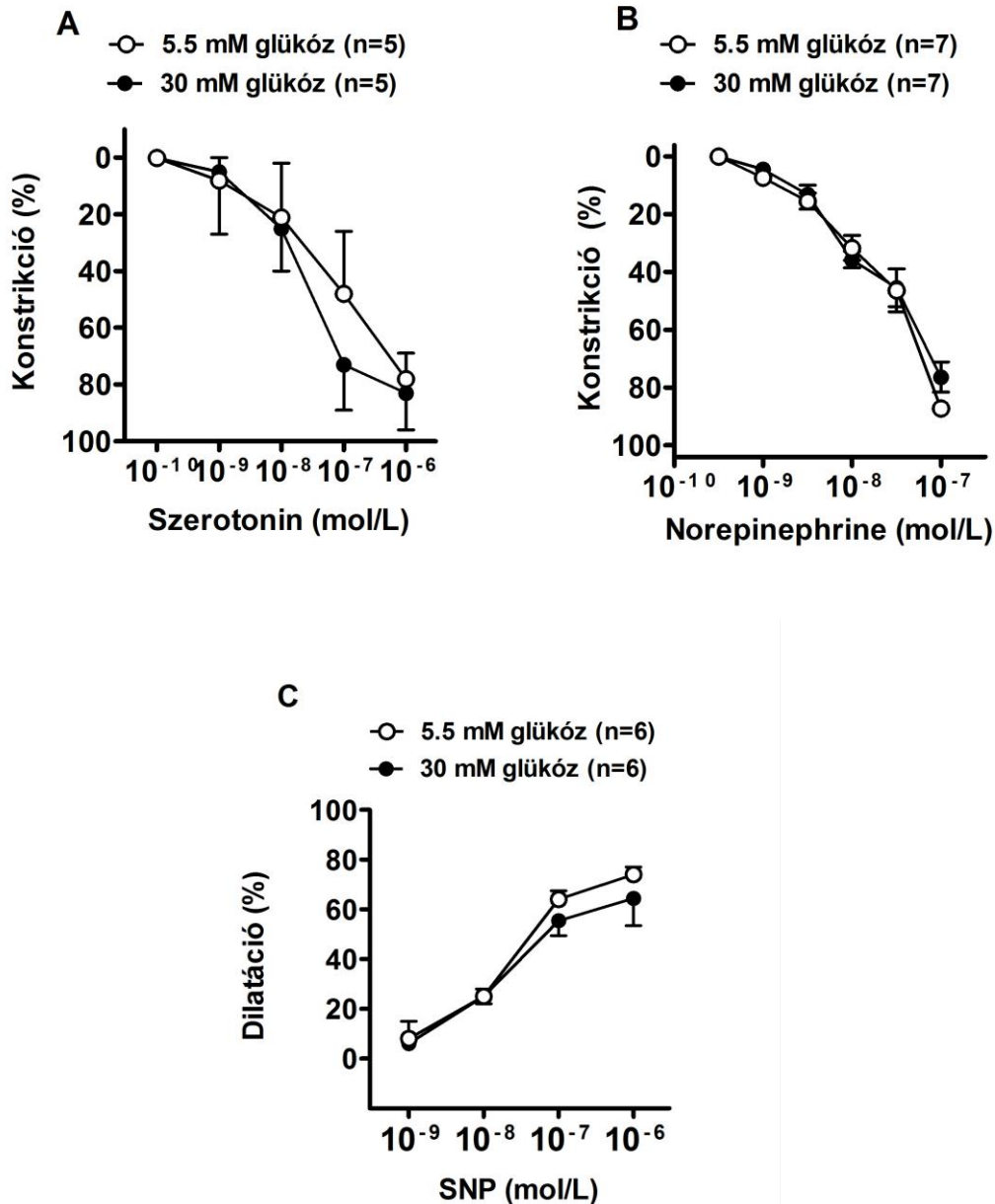
16. ábra - A hisztamin (1 nmol/L – $10 \text{ } \mu\text{mol/L}$) növekvő dózisának hatására kialakuló érválaszok magas glükóz koncentráció (30 mmol/L) jelenlétében, azaserin kezelés előtt és után, valamint L-NAME ($2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) azonfelüli adásával. Az adatok a mért százalékos dilatációk átlagértékei \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

A HBP-n való átáramlás kísérleti úton növelhető exogén glükózamin adásával, mely a glükóz-transzporter rendszeren keresztül jut be a sejtekbe, glükózamin-6-foszfáttá foszforilálódik hexokinázok által, így képes megkerülni a HBP sebességét szabályozó GFAT enzimet, ezáltal gyors UDP-GlcNAc szint emelkedést eredményezve. A következőekben a glükózamin (5 mmol/L) hatását vizsgáltuk izolált gracilis arteriolákon. A hisztamin indukálta vazodilatáció szignifikánsan csökkent glükózamin adására, azonban az azaserinnel való inkubációnak nem volt hatása, a magas glükóz esetéhez hasonlóan (17. ábra).



17. ábra - A hisztamin (1 nmol/L – $10 \text{ } \mu\text{mol/L}$) növekvő dózisának hatására kialakuló érválaszok glükózamin (5 mmol/L) jelenlétében, azaserin kezelés előtt és után, valamint normál glükóz jelenlétében. Az adatok a mért százalékos dilatációk átlagértékei $\pm \text{SEM}$. A csillag (*) szignifikáns különbséget jelöl ($p < 0,05$).

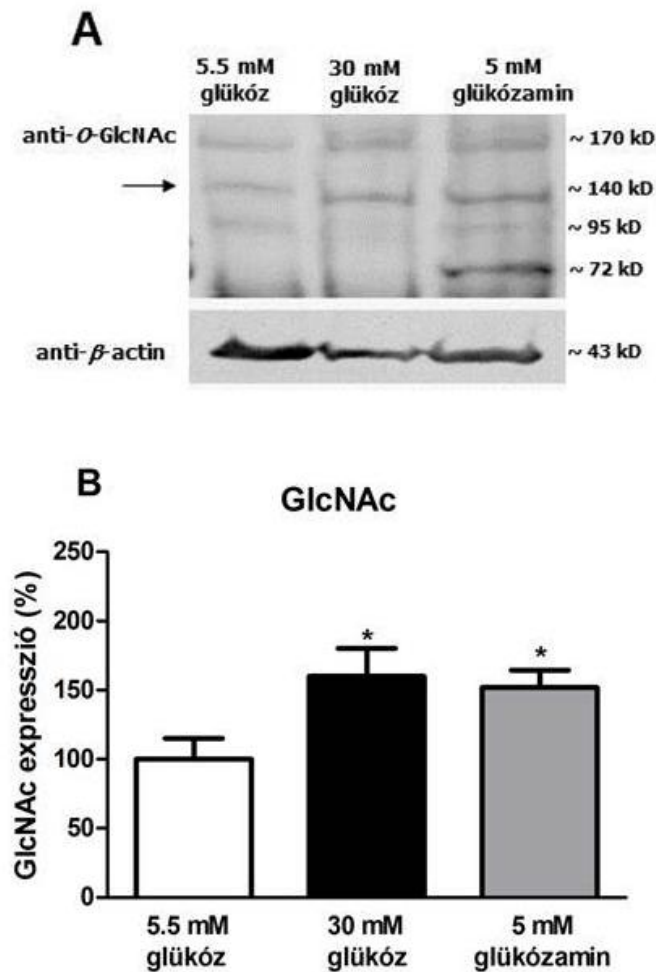
Vizsgálatainkat kiterjesztettük az endothelium-független nitroprusszid-nátrium (SNP) vazodilatátorra, valamint a simaizmon ható vazokonstriktor norepinefrin (NE) és szerotonin (5HT) anyagokra. Kontroll körülmények között a NO-donor SNP növekvő dózisának adására az izolált gracilis arteriolák jelentős mértékű vazodilatációja alakult ki, míg a NE és az 5-HT vazokonstriktort okozott. Mindhárom esetben a magas glükóz koncentrációjú (30 mmol/L) kezelésnek nem volt hatása a SNP, 5-HT és NE válaszokra (18. ábra. A,B,C panel)



18. ábra - Izolált vázizom arteriolák 5-HT (A panel; $1 \text{ nmol/L} - 1 \text{ } \mu\text{mol/L}$); NE (B panel; $0.3 \text{ nmol/L} - 0.1 \text{ } \mu\text{mol/L}$) és SNP (C panel; $1 \text{ nmol/L} - 1 \text{ } \mu\text{mol/L}$) növekvő dózisainak hatására kialakuló érválaszai normál (5.5 mmol/L) és magas glükóz koncentráció (30 mmol/L) jelenlétében. Az adatok a mért százalékos érátmérő változás átlagértékei $\pm \text{SEM}$.

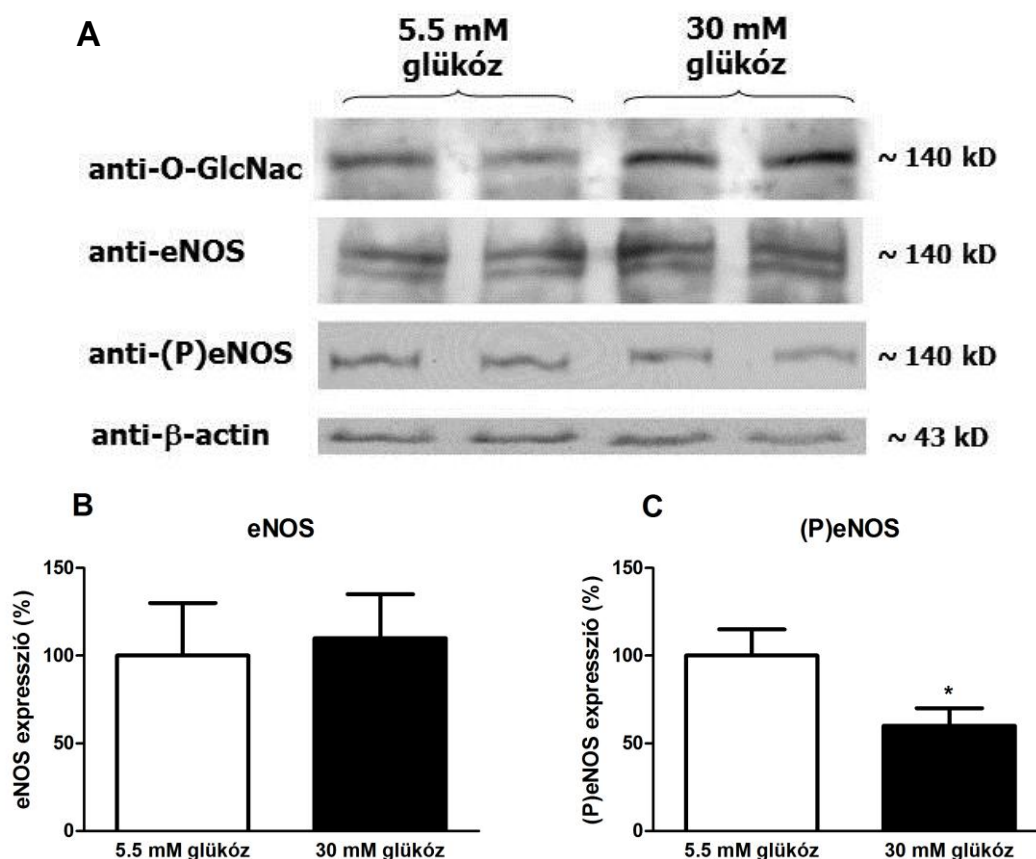
4.3. Western immunoblot

A magas glükóz koncentráció és glükózamin adás molekuláris szintű hatásának felderítéséhez Western immunoblot analízist végeztünk. Első lépésben, izolált femorális artériákban vizsgáltuk a fehérjék *O*-GlcNAc szintjének a változását. A magas glükóz koncentrációnak és glükózaminnak kitett mintákban, az *O*-GlcNAc szintje szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest (19. ábra).



19. ábra - Reprezentatív Western immunoblot (A panel) és az oszlopdiaagramm (B panel) mutatja a fehérjék *O*-GlcNAc szintjét normál glükóznak (5.5 mmol/L); magas glükóznak (30 mmol/L) és glükózaminnak kitett vázizom artériákban ($n = 4$). A 140 kD sávot denzitáltuk, ami az *e*NOS szintjének felel meg. Az *O*-GlcNAc expresszióját β -aktinra normalizáltuk. A megadott értékek átlagok \pm SEM. A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

Második lépésben arra kerestük a választ, hogy az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz foszforiláltsági szintje hogyan változik magas glükóz koncentráció hatására. Ismert, hogy reciprok kapcsolat van a foszforiláció és az *O*-GlcNAc-glikoziláció között – tekintettel arra, hogy a foszforilációt végző kinázok ugyancsak a szerin/treonin kötőhelyeket célozzák. A Ser1177 hely foszforiláltsága az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz enzimen, annak aktivációjához vezet. A magas glükóz koncentrációval kezelt femorális artériákban a (P)eNOS szintje szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz hasonlítva (20. ábra).



20. ábra. - Reprezentatív Western immunoblot (A panel) és az oszlopdiagramm (B és C panel) mutatja a fehérjék *O*-GlcNAc, eNOS és (P)eNOS szintjét normál (5.5 mmol/L); magas glükóznak (30 mmol/L) és glükózaminnak kitett vázizom artériákban ($n = 4$). Az *O*-GlcNAc és eNOS expresszióját β -aktinra, míg a P-eNOS expresszióját eNOS-ra normalizáltuk. A megadott értékek átlagok \pm SEM. A csillag (*) szignifikáns különbséget jelöl ($p < 0,05$).

5. MEGBESZÉLÉS

Annak ellenére, hogy az 1-es és 2-es típusú diabetes mellitus ma már jól kezelhető, szövődményei még ma is vezető helyet foglalnak el a halálozási statisztikában. A változatlanul magas mortalitás 80%-ban kardiovaszkuláris eredetű. Ennek okaként elsősorban a hiperglikémia következtében kialakult mikro- és makroangiopátia jelentőségét hangsúlyozzák. A UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) vizsgálatban a 2-es típusú diabetes mellitus észlelésekor a betegek 33%-ánál a makroangiopátia mellett már jelen vannak a mikroangiopátiás eltérések is. Míg 1-es típusú diabetes mellitusban a tartósan fennálló anyagcserezavar késői kísérőbetegségeként észleljük, addig 2-es típusú diabetesben, a diffúz endothel károsodás következtében, a koronária betegség már jelen lehet az egyértelmű hiperglikémia észlelése előtt, az inzulinrezisztencia időszakában [120, 121]. A klinikai tapasztalat egyértelműen azt mutatja, hogy diabetes mellitusban a mortalitás és morbiditás jelentős hányadáért a koronária betegség kialakulása tehető felelőssé, mindazonáltal a háttérben húzódó mechanizmusok még mindig nem teljesen tisztázottak. Még kevesebb ismeretünk van a rezisztencia erek szintjén játszódó változásokról.

Tudományos kutatásaimban ezért célul tűztem ki, hogy tanulmányozzam a diabetes mellitusban a humán koronária erek vazomotor működésében létrejövő elváltozásokat. E cél érdekében a szívsebészeti műtéten átesett betegekből származó, izolált koronária mikroerekben vizsgáltam a létrejövő patológiás mechanizmusokat és lehetséges okait az endothel-függő és simaizom által közvetített vazomotor működésében. Továbbá célul tűztem ki, hogy feltárjam az egyes vázizom mikroerek vazomotor működészavarában szerepet játszó lehetséges mechanizmusokat, különös tekintettel a megemelkedett glükóz koncentráció mikrovaszkuláris hatásaira.

5.1. Diabetes mellitus hatása a koronária mikroerek vazomotor működésére

Korábban azt feltételezték, hogy a diabetesben csökkent koronária áramlás fő oka a nagyerek atherosclerosisa. Nitenberg és mtsai bebizonyították, hogy diabetesben a koronária áramlási rezervkapacitás csökkenése már azelőtt igazolható, mielőtt még az angiographián, vagy a bal kamra szisztolés funkciójában valami kóros változás megjelenne [50]. Mindezek alapján feltételezték, hogy a diabetesben látható koronária áramlásirezerv-csökkenésért nem az epikardialis erek atherosclerosisa tehető felelőssé, hanem a koronária mikrovaszkulatura csökkent dilatátor kapacitása [49, 50]. Az érfalfüggő vazoregulátor mechanizmusok megváltozását a diabetes állatkísérletes modelljeiben már korábban kimutatták: bizonyítottan csökkent az áramlás [47] és az agonista [48] által kiváltott endothel-függő dilatáció. A nagy konduktancia artériák szintjén az endothel-függő vazodilatáció csökkent volta már a humán diabeteses mintákban is kimutatott [22]. Azonban a diabetes mellitus kiserekre, főként a humán koronária arteriolákra kifejtett kóros hatásáról keveset tudunk.

A NO fontos szerepet tölt be az érátmérő szabályozásában testszerte, így a koronária arteriolák átáramlásában is [122]. Nagyszámú kutatási eredmény mutatja a nagy- és rezisztencia erek csökkent NO termelését diabetes mellitusban [16, 123-125]. A diabeteses betegek koronária ereiben kimutatott endothel diszfunkció kórélettani szerepe és a háttérben húzódo mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a szívműtéten átesett betegek jobb fülcséjéből izolált koronária arteriolákon az endothel-függő vazodilatátor ACh vazokonstriktiót indukált mind a diabeteses mind a nem diabeteses csoportban egyaránt, feltételezhetően az eNOS kóros működése következtében. A NO szintáz gátló L-NAME kezelésnek nem volt hatása a kialakult válaszra. Ezek az eredmények a NO mediálta vazomotor válasz hiányára utalnak mind a diabeteses és nem diabetes csoportban egyaránt. Az endothel-független, direkt NO-donor SNP hatására kialakult vazodilatáció mértéke vizsgálatainkban nem különbözött a két betegcsoport koronária arterioláiban, ami

arra utal, hogy a szolubilis guanilát cikláz és a cGMP-függő jelátvitel megtartott a simaizomban. A humán koronária arteriolákon végzett kísérletek egyik limitáló tényezője az igazi kontroll hiánya. Fiatal, koronária betegségben nem szenvedő egyedekből (billentyű műtét) származó jobb pitvari fülcséből izolált koronária arteriolák, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ACh hatására jelentős (~60%) vazodilatációt mutattak, amely L-NAME jelenlétében gátolható volt (Bagi, munkacsoportunk nem közölt eredménye), utalva ezzel a NO útvonal jelentős szerepére a humán koronária arteriolákban.

Az utóbbi években, az oxidatív stressz a kutatások középpontjába került, mint lehetséges oka a csökkent NO termelésre diabetes mellitusban [22, 47]. Egy munkacsoport antioxidáns C-vitamin adására, a brachiális artéria dilatációjának a javulását tapasztalta DM-ban [126]. Azonban előfordultak olyan esetek is, ahol nem sikerült kimutatni az antioxidánsok preventív hatását a vaszkuláris komplikációk megelőzésében [127-129], valamint munkacsoportunk korábban azt találta, hogy szuperoxid dizmutáz adása nem gátolta meg a vázizom arteriolák dilatációját diabeteses patkányokban [130]. A fenti eredmények alapján arra következtetünk, hogy az oxidatív stressz nem az egyedüli oka a kialakult vaszkuláris funkciózavarnak diabetes mellitusban. A NO szintézishez különböző kofaktorok és szubsztrátok szükségesek, mint például tetrahydrobiopterin és L-arginin [26, 131, 132]. Ezen anyagoknak a biológiai hozzáférhetősége az eNOS számára csökkent diabetes mellitusban. Orális glükóz terhelésnek kitett egészséges egyedekben csökkent brachiális áramlást tapasztaltak, ami előzetes BH_4 kezeléssel megelőzhető volt [133], valamint L-arginin adása orálisan vagy intravénásan javítja az endothel diszfunkciót diabeteses betegekben [134]. Az L-arginin adása felvet bizonyos kételyeket, mert a NO szintáz szükséges L-arginin K_m értéke 2.9 $\mu\text{mol/l}$, az L-arginin intracelluláris koncentrációja 0.1-1mmol/l között változik, ami jóval meghaladja az eNOS igényeit. Ez a jelenség az úgynevezett „arginin paradox”. Újabb eredmények felvetik az argináz lehetséges szerepét az L-arginin szintjének csökkenésében az

eNOS közvetlen közelében, ezáltal befolyásolva a NO szintézis mértékét [131]. Ezzel összhangban, egy másik munkacsoport fokozott argináz 1 aktivitást mutatott ki diabeteses patkányok koronária arterioláiban [99].

Ezek a megfigyelések felvetik az argináz szerepét a diabetes mellitusban kialakuló endothel diszfunkcióban, ezért diabeteses humán koronária arteriolákban tanulmányoztam az argináz expresszióját. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a diabeteses betegekből izolált erek falában az argináz 1 festődés jelentős fokozódását találtuk az endothelsejtekben, összehasonlítva a nem diabeteses betegek mintáival, valamint az argináz 1 kolokalizációt mutatott az eNOS festődéssel a diabeteses betegekben, míg a nem diabeteses csoportban ez nem volt megfigyelhető. Az argináz 1 fehérje fokozott expresszióját sikerült kimutatni a diabeteses betegek koronária arterioláiban Western immunoblot segítségével is. A fokozott argináz 1 expresszió funkcionális következményeinek a feltárására, a diabeteses és nem diabeteses betegekből származó koronária arteriolák L-argininnel történő inkubációja a diabeteses csoportban visszaállította az endothel függő agonista által kiváltott vazodilatációt, amely során az ACh vazodilatációt váltott ki az L-argininnel történő inkubáció előtt megfigyelt vazokonstriktió helyett. A nem diabeteses csoport esetében nem tapasztaltunk változást az ACh indukálta válaszban L-argininnel történő inkubáció esetén. A megnövekedett argináz aktivitás további alátámasztására, a szelektív argináz gátló (L-NOHA) alkalmazására az ACh szintén vazodilatációt váltott ki a diabeteses csoportban, míg a válasz változatlan maradt a nem diabeteses betegekből származó koronária arteriolában. Mivel nem áll rendelkezésünkre szelektív argináz 1 vagy 2 gátló, ezért nem tudjuk kizárni az argináz 2 lehetséges szerepét a diabetesben kialakult endothel diszfunkcióban. Azonban, Romero és munkatársai streptozotocin injekcióval létrehozott diabetikus egerek aortáján vizsgálták az argináz két izoformájának, az argináz 1(AI) és 2(AII)-nek a hatását az endothel függő vazodilatációra, valamint felmérték az erek fibrotikus állapotát és stiffness-ét. Diabetes

mellitusban az endothel-függő vazodilatáció szignifikánsan csökkent a wild type (WT, 53%) és az $AI^{+/+}AII^{-/-}$ (44%) aortákban, összehasonlítva az $AI^{+/-}AII^{-/-}$ (27%) egerekből származó mintákkal. Az erek stiffness-e és a koronáriák fibrózisa szintén szignifikánsan fokozott volt WT és az $AI^{+/+}AII^{-/-}$ egerekben, amely arra utal, hogy az argináz 1-nek jelentős szerepe van a diabetes mellitusban létrejövő endothel diszfunkcióban [135]. Azonban, állnak rendelkezésre olyan kutatási eredmények is, amelyekben az argináz 2 fokozott expresszióját figyelték meg. Goto-Kakizaki diabeteses patkányok koronária vazomotor funkciózavarát mutatták ki, amit argináz inhibitor adása javított, valamint az aortában emelkedett argináz 2 expressziót találtak, míg az argináz 1 változatlan maradt [136]. Azok a mechanizmusok, amelyek a fokozott argináz 1 expresszióhoz vezetnek a diabeteses betegek koronária arterioláiban továbbra is tisztázatlanok. Ismert, hogy az inzulin gátolja az urea ciklus enzimeinek az expresszióját és a kialakult inzulin rezisztencia (T2DM), vagy abszolút inzulin hiány (T1DM) következtében ez a regulációs mechanizmus károsodik és hozzájárul a fokozott argináz 1 expressziójához. A vizsgálataink során felvetődött az a kérdés, hogy azon betegeknél, akik nem szenvedtek diabetes mellitusban, viszont más kardiovaszkuláris és egyéb betegségeik voltak, a koronária arteriolák nem mutattak javulást az L-NOHA és L-arginin kezelésre, amely kizárja a fokozott argináz expresszió lehetőségét. Így a károsodott endothel-függő vazodilatáció hátterében egyéb mechanizmusok lehetnek, mint például a megemelkedett endogen NO szintáz inhibitor ADMA [137], vagy csökkent kofaktorok (BH4) szintje [133]. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a diabetes mellitusban szenvedő betegekben fokozódik az argináz 1 expresszió, amely az L-arginin szubsztrát nagyobb mértékű felhasználása következtében csökkenti annak biológiai hozzáférhetőségét az eNOS számára, így csökkenti vagy teljesen eltörli a NO-mediált vazodilatációt a koronária arteriolákban. Feltételezzük, hogy ezen elváltozásoknak szerepe van a mikrovaszkuláris diszfunkció kialakulásában diabetes mellitusban.

5.2. A magas glükóz koncentráció hatása a vázizom mikroerek vazomotor működésére

Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a magas glükóz koncentráció károsítja az áramlás-mediálta endothel-függő vazodilatációt és a különböző endothel-függő agonisták által kiváltott vazodilatációt, ezáltal hozzájárulva a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához [138-142]. A magas glükóz koncentráció hatására létrejövő elváltozások kialakulásáért több molekuláris mechanizmust tesznek felelőssé, többek között a polyol utat, a fehérjék nem enzimátikus glikációját (előrehaladott glikációs végtermékek: AGE-advanced glycation end products), a HBP útvonalat és a Protein kináz C (PKC) aktivációt [143]. A polyol út feltételezhetően a fokozott oxidatív stressz következtében fejti ki káros hatását, ugyanis az aldóz redukáz, mely a glükózt szorbitollá alakítja, depletálja a sejt NADPH tartalmát, s ezen keresztül a redukált glutationt is, így az egyensúly az oxidatív irányba mozdul el [144]. Az AGE képzés mind sejten belül, mind extracellulárisan olyan nem-specifikus glikált fehérjéket eredményez, melyek közvetlenül vagy közvetve, jelátviteli folyamatokat beindítva járnak káros következményekkel [145, 146]. A glükóz úgyszintén növeli *de novo* a diacil-glicerol (DAG) szintjét, mely a PKC aktiválásához vezet. A PKC számos folyamat beindítója, növekedési faktorok termelődését serkenti (VEGF, transzformáló növekedési faktor- β [TGF- β]), NAD(P)H oxidázon keresztül növeli a szabadgyökök mennyiségét, valamint csökkenti az eNOS aktivitását [147]. A HBP megemelkedett fluxusa hiperglikémia következtében a fehérjék szerin és treonin oldalláncainak *O*-GlcNAc glikozilációját eredményezi. Tartósan magas glükóz-expozíció az egyensúlyt a fokozott glikoziláció irányába tolja el, amely különböző kóros folyamatok beindításához vezet.

Jelen kutatásaimban ezért a magas glükóz koncentráció vázizom arteriolák vazomotor működésére gyakorolt hatását tanulmányoztam. Továbbá, vizsgáltam az elváltozások hátterében álló endothel- és simaizom sejtek által közvetített mechanizmusokat is. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a patkány gracilis vázizmából izolált arteriolákban a magas

glükóz koncentráció hatására a hisztamin által kiváltott dilatáció teljes mértékben gátlódott, összehasonlítva a kontroll csoporttal. A hisztamin által kiváltott dilatáció endothel-függő, H_1 receptoron keresztül mediált [148, 149]. A hisztamint választottuk az eNOS működésének vizsgálatára magas glükóz koncentráció esetén, mivel korábban kimutattuk, hogy az L-NAME-nek jelentős gátló hatása van a hisztamin által kiváltott vazodilatációra a gracilis arteriolán, amely a NO súlyozott szerepére utal [150]. Továbbá, vizsgáltuk az ACh (szintén endothel-függő vazodilatátor) által kiváltott vazodilatációt, de ebben az esetben a magas glükóz koncentrációjú oldatban történt kezelésnek nem volt hatása az ACh válaszra. Az általunk vizsgált vázizom mikroerekben az acetilkolin választ csupán kismértékben közvetíti a NO és legnagyobb részben a választ az ún. endothel-dependens hiperpolarizáló faktor (EDHF) mediálja. Ismert, hogy az EDHF válasz kialakításában feltehetőleg egyéb K^+ csatornák, így az intermedier konduktanciájú K^+ csatornák (IK_{Ca}), és lassú konduktanciájú K^+ csatornák (SK_{Ca}) játszanak szerepet. Munkacsoportunk korábban kimutatta az acetilkolin által kiváltott vazodilatáció szignifikáns csökkenését apamin és TRAM-34 (SK_{Ca} és IK_{Ca} csatorna blokkolók) jelenlétében patkány gracilis arteriolákon [150, 151]. Annak alapján, hogy az acetilkolin válasz csak kismértékben csökkent a magas glükózzal kezelt vázizom mikroereiben arra következtetünk, hogy az EDHF válasz, illetve az azt kialakító K^+ csatorna aktiváció megtartott lehet és kevésbé érzékeny a magas glükóz szintre.

A magas glükóz kezelés hatására kialakult károsodott hisztamin indukálta vazodilatáció megelőzhető volt a HBP útvonal egyik sebesség-meghatározó enzimének, a GFAT-nek (amely a fruktóz-6-foszfátot alakítja glükózamin-6-foszfáttá) a gátlásával azaserinnel, ami az *O*-GlcNAc típusú glikoziláció jelentőségére utal ebben a folyamatban. Ennek alátámasztására a GFAT enzimet kikerülő glükózaminnal történő inkubáció szignifikánsan csökkentette a hisztamin által kiváltott vazodilatációt, azonban az azaserinnel történő inkubáció nem javította a károsodott vazodilatációt a magas glükóz koncentrációjú csoporttal összehasonlítva. Ennek

oka: a HBP útvonal fluxusa emelhető glükózamin exogén adásával, amely a glükóz transzport rendszeren keresztül bejutva a sejtekbe, hexokinázok segítségével glükózamin-6-foszfáttá alakul, ezáltal hozzájárul az UDP-GlcNAc szint emelkedéséhez és a következményes *O*-GlcNAc fehérje glikozilációhoz a GFAT enzim megkerülésével. Az endothel független, direkt NO donor (SNP) vazodilatátor hatásában nem találtunk különbséget a kontroll erekhez viszonyítva, ami arra enged következtetni, hogy a vaszkuláris simaizom NO érzékenysége nem változik magas glükóz koncentráció hatására. Hasonló eredményeket mutattak ki fruktózzal etetett inzulin rezisztens patkányok a cerebri mediájában, ahol csökkent mértékű endothel-függő vazodilatációt találtak, míg az endothel független SNP-kiváltott dilatáció nem különbözött a kontroll csoporthoz viszonyítva [152]. A simaizom sejteken ható vazokonstriktor norepinefrin és szerotonin hatásában szintén nem találtunk különbséget a kontroll és a magas glükóz csoport között. Azonban rendelkezésre állnak olyan tanulmányok, ahol streptozotocinnal kezelt patkányokban a norepinefrin [153] és a hisztamin [154] által kiváltott konstriktó csökkenését találták. A funkcionális eredményekkel összhangban, a fehérjék fokozott *O*-GlcNAc típusú glikozilációját találtuk a magas glükózzal és glükózaminnal kezelt vázizom arteriolákban a kontroll csoporthoz képest. Ismert, hogy reciprokapcsolat van a foszforiláció és az *O*-GlcNAc glikoziláció között – tekintettel arra, hogy a foszforilációt végző kinázok ugyancsak a szerin/treonin kötőhelyeket célozzák. A Ser1177 hely foszforiláltsága az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz enzimen annak aktivációjához vezet. A magas glükózzal kezelt femorális artériákban szignifikánsan csökkent az eNOS foszforiláltsági állapota a Ser1177 helyen a kontroll csoporthoz hasonlítva. Előzőekben, magas glükóz koncentrációnak kitett sertés aorta endothelsejteken kimutatták az eNOS Ser1177 helyének a gátolt foszforilációját és Th495 (inhibitor hely, ha foszforilált az eNOS inaktivációjához vezet) defoszforilációjának csökkenését bradykinin hatására [155]. Ezért lehetséges, hogy a fehérjék *O*-GlcNAc típusú glikozilációja interferál mind az

aktivációs, mind az inhibitor helyekkel az eNOS enzimen [156]. Különböző irodalmi adatok az eNOS Thr495 oldalláncának változatlan foszforiláltsági szintjét írták le fokozott *O*-GlcNAc glikoziláció esetén. Musicki és munkatársai alloxannal indukált diabetikus patkányok peniszében változatlan, a kontrollhoz hasonló Thr495 foszforiláltsági állapotot mutattak ki. Szintén változatlan foszforiláltsági szintet találtak két további helyen, a Ser-615, 633-on, amelynek oka strukturális sajátságokon is alapulhat [117]. Lima és munkatársai PUGNAc (*O*-GlcNAcase inhibitor) alkalmazásával gátolták az *O*-GlcNAc csoportok eltávolítását a fehérjékről, ami után változatlan maradt az eNOS Thr495 foszforiláltsága, de a Ser1177 helyen csökkent foszforilációt mutattak ki [157].

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a magas glükóz koncentrációnak és glükózaminnak kitett patkány vázizom arterioláiban fokozódik az érfali fehérjéknek az *O*-GlcNAc típusú glikozilációja, ami hozzájárul a csökkent endothel-függő vazodilatáció kialakulásához hisztamin által, feltehetőleg az eNOS aktivációs helyének, a Ser1177-nek a csökkent foszforilációja által. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a fokozódott fluxus a HBP útvonalon keresztül kulcsszerepet játszik a diabetes mellitus korai és előrehaladottabb stádiumában kialakuló vazomotor diszfunkció kialakításában. Kísérletes eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy a magas glükóz koncentráció és következményes fehérje glikoziláció már a diabetes korai szakaszában károsítja az endothel dilatátor működését, míg a simaizom szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok megtartottak maradhatnak. Felvetődő további kérdések, hogy az *O*-GlcNAc fehérje glikoziláció in vivo hogyan befolyásolja a rezisztencia erek vazoreaktivitását és, hogy ezen mechanizmusok hozzájárulhatnak-e a vaszkuláris rezisztencia fokozódásához és a hipertónia kialakulásához, valamint a diabetes mellitus egyéb kardiovaszkuláris szövődményeihez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A diabetes mellitusban a rezisztencia erek vazomotor működése megváltozik, aminek természete és a háttérében álló pontos kórélettani mechanizmusok nem kellően ismertek. Kutatásainkban ezért célul tűztük ki, hogy szívsebészeti műtéten átesett, DM-ban szenvedő betegekből származó, izolált koronária mikroerek segítségével vizsgáljuk a rezisztencia erek endothel- és simaizom-függő vazomotor működésének elváltozásait. Továbbá, vizsgáltuk a magas glükóz koncentráció és glükózamin mikroér vazomotor működésre gyakorolt hatását, és a mögötte álló mechanizmusokat. A kutatásaink során az alábbi új megállapításokat tettük: 1) a szívműtétből származó koronária erek működése károsodik mind a diabeteses és nem diabeteses betegekben, azonban 2) a diabeteses betegekből izolált koronária arteriolák argináz gátló kezelés hatására, vagy L-arginin adására jelentős javulást mutattak az endothel-függő agonista (ACh) által kiváltott vazodilatációban a nem diabeteses betegekhez viszonyítva. Ezek alapján feltételezzük, hogy az argináz fokozott expressziójának szerepe van a koronária arteriolák károsodott működésében DM-ban. Kísérleteink más részében azt találtuk, hogy 3) a magas glükóz vagy glükózamin kezelés gátolta a hisztamin által kiváltott vazodilatációt a vázizom arterioláiban, aminek a háttérében a hexózamin bioszintézis útvonal fokozott fluxusa következtében létrejövő fehérje glikoziláció áll, amely gátolja az eNOS foszforilációját és ezáltal annak aktivációját, hozzájárulva a vazomotor működési zavar kialakulásához. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a kardiovaszkuláris betegségekben kialakuló vazomotor funkciózavar kialakulásában az érfali fokozott argináz expresszió kulcsszerepet játszik a diabeteses betegekben. Valamint, a diabetesre jellemző magas glükóz szint hatására fokozódik a fehérjék glikozilációja, ami hozzájárulhat a DM korai és előrehaladottabb szövődményeinek a kialakulásához. Mindezen eredmények felvetik, hogy az argináz 1 és a HBP gátlásának, vagy L-arginin adásának potenciális szerepe lehet a diabetes mellitussal társuló kórképek kezelésében.

6. SUMMARY

It is well known that resistance vessel vasomotor function is impaired in diabetes mellitus, however, the underlying mechanisms are not completely understood. Therefore, we aimed to study the vasomotor function in isolated human coronary arterioles in patients with diabetes mellitus. Furthermore, we examined the effect of high glucose concentration and glucosamine on skeletal muscle arteriolar dilations. Our key observations were the following:

1) In coronary arterioles dissected from the heart of patients with diabetes or without diabetes, we found a diminished vasodilatation to ACh, which is not affected by the inhibition of NO synthesis.

2) Impairment of endothelium-mediated vasodilation was restored by prior incubation with an arginase inhibitor or L-arginine in patients with diabetes, but it had no effect on coronary arterioles from non-diabetic patients. These findings suggest that in the coronary arterioles of patients with diabetes, arginase 1 is upregulated, which interferes with NO-mediated vasomotor responses.

3) In the subsequent experiments, we found an increased flux through the hexosamine biosynthetic pathway, which leads to enhanced protein *O*-GlcNAcylation of eNOS under high glucose or glucosamine condition, which consequently interferes with NO-dependent arteriolar dilation.

Based on our findings we believe that the increased protein expression of arginase 1 in diabetes mellitus plays a key role in the development of endothelial dysfunction in human coronary arterioles. Furthermore, an increased glucose concentration may lead to augmented glycosylation of various proteins that contribute to the development of diabetic complications. We believe that different inhibitor agents acting on arginase 1 or hexosamine biosynthetic pathway or supplementation of L-arginine may play a potential role in the future treatment of diabetes-associated microvascular dysfunction.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
2. Beckman, J.A., et al., *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management*. JAMA, 2002. **287**(19): p. 2570-81.
3. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 1997. **20**(7): p. 1183-97.
4. Sellke, F.W., et al., *Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates*. Circulation, 1990. **81**(5): p. 1586-93.
5. Yamamoto, H., et al., *Videomicroscopic demonstration of defective cholinergic arteriolar vasodilation in atherosclerotic rabbit*. J Clin Invest, 1988. **81**(6): p. 1752-8.
6. Cox, D.A., et al., *Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans*. Circulation, 1989. **80**(3): p. 458-65.
7. Forstermann, U., et al., *Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries*. Circ Res, 1988. **62**(2): p. 185-90.
8. Freiman, P.C., et al., *Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates*. Circ Res, 1986. **58**(6): p. 783-9.
9. Mugge, A., et al., *Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits*. Circ Res, 1991. **69**(5): p. 1293-300.
10. Sowers, J.R., et al., *Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update*. Hypertension, 2001. **37**(4): p. 1053-9.
11. Alberti, K.G., et al., *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
12. Haffner, S.M., et al., *Metabolic syndrome, new onset diabetes, and new end points in cardiovascular trials*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(3): p. 469-75.
13. Alberti, K.G. et al., *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
14. Fuller, J.H., et al., *Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study*. Lancet, 1980. **1**(8183): p. 1373-6.
15. Kannel, W.B. et al., *Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study*. JAMA, 1979. **241**(19): p. 2035-8.

16. Stehouwer, C.D., et al., *Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 55-68.
17. De Block, C.E., et al., *Impact of overweight on chronic microvascular complications in type 1 diabetic patients*. Diabetes Care, 2005. **28**(7): p. 1649-55.
18. Turner, R.C., et al., *Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23)*. BMJ, 1998. **316**(7134): p. 823-8.
19. Pries, A.R., et al., *Normal endothelium*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 1): p. 1-40.
20. Hartge, M.M., et al., *The endothelium and vascular inflammation in diabetes*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(2): p. 84-8.
21. Koller, A., *Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension*. Microcirculation, 2002. **9**(4): p. 277-94.
22. De Vriese, A.S., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(5): p. 963-74.
23. Furchgott, R.F., et al., *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
24. Palmer, R.M., et al., *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
25. Michel, T., et al., *Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?* J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2146-52.
26. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
27. Cosentino, F., et al., *Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1530-7.
28. Klatt, P., et al., *Stimulation of human nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and selective binding of the cofactor*. FEBS Lett, 1992. **305**(2): p. 160-2.
29. Perkins, W.J., *Regulation of soluble guanylyl cyclase: looking beyond NO*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(3): p. L334-6.
30. Sausbier, M., et al., *Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation*. Circ Res, 2000. **87**(9): p. 825-30.
31. Katusic, Z.S. et al., *Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction*. Hypertension, 1991. **18**(5 Suppl): p. III86-92.

32. Shepherd, J.T., et al., *Endothelium-derived vasoactive factors: I. Endothelium-dependent relaxation*. Hypertension, 1991. **18**(5 Suppl): p. III76-85.
33. Edwards, G., et al., *K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries*. Nature, 1998. **396**(6708): p. 269-72.
34. D'Orleans-Juste, P., et al., *Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology*. Pharmacol Ther, 2002. **95**(3): p. 221-38.
35. Re, R.N., *Tissue renin angiotensin systems*. Med Clin North Am, 2004. **88**(1): p. 19-38.
36. Re, R.N., *The clinical implication of tissue renin angiotensin systems*. Curr Opin Cardiol, 2001. **16**(6): p. 317-27.
37. Iglarz, M., et al., *Role of endothelin-1 in hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2003. **5**(2): p. 144-8.
38. Bos, C.L., et al., *Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(7): p. 1187-205.
39. Jansson, P.A., *Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes*. J Intern Med, 2007. **262**(2): p. 173-83.
40. Winer, N., et al., *Epidemiology of diabetes*. J Clin Pharmacol, 2004. **44**(4): p. 397-405.
41. Tedgui, A., *[Physiopathology of atherosclerosis in diabetics]*. Arch Mal Coeur Vaiss, 2004. **97 Spec No 3**: p. 13-6.
42. Moreno, P.R., et al., *New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(12): p. 2293-300.
43. Stratmann, B., et al., *Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes*. Diab Vasc Dis Res, 2005. **2**(1): p. 16-23.
44. Kahn, N.N., et al., *Nitric oxide: the "second messenger" of insulin*. IUBMB Life, 2000. **49**(5): p. 441-50.
45. Chakraborty, K., et al., *The role of insulin as an antithrombotic humoral factor*. Bioessays, 2004. **26**(1): p. 91-8.
46. Miura, H., et al., *Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels*. Circ Res, 2003. **92**(2): p. 151-8.
47. Bagi, Z., et al., *Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(4): p. H1404-10.
48. Koltai, M.Z., et al., *Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 157-63.

49. Nahser, P.J., Jr., et al., *Maximal coronary flow reserve and metabolic coronary vasodilation in patients with diabetes mellitus*. *Circulation*, 1995. **91**(3): p. 635-40.
50. Nitenberg, A., et al., *Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function*. *Diabetes*, 1993. **42**(7): p. 1017-25.
51. Rodriguez-Manas, L., et al., *Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Br J Pharmacol*, 1998. **123**(8): p. 1495-502.
52. Stratton, I.M., et al., *Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study*. *BMJ*, 2000. **321**(7258): p. 405-12.
53. Baynes, J.W., et al., *Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm*. *Diabetes*, 1999. **48**(1): p. 1-9.
54. Friedman, E.A., *Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications*. *Diabetes Care*, 1999. **22 Suppl 2**: p. B65-71.
55. De Nicola, L., et al., *Enhancement of nitric oxide synthesis by L-arginine supplementation in renal disease: is it good or bad?* *Miner Electrolyte Metab*, 1997. **23**(3-6): p. 144-50.
56. Reyes, A.A., et al., *Role of arginine in health and in renal disease*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(3 Pt 2): p. F331-46.
57. Wu, G., et al., *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. *Biochem J*, 1998. **336** (Pt 1): p. 1-17.
58. Deves, R., et al., *Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(2): p. 487-545.
59. Mann, G.E., et al., *Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(1): p. 183-252.
60. Sobrevia, L., et al., *Diabetes-induced activation of system y⁺ and nitric oxide synthase in human endothelial cells: association with membrane hyperpolarization*. *J Physiol*, 1995. **489** (Pt 1): p. 183-92.
61. Peters, H., et al., *Dietary L-arginine in renal disease*. *Semin Nephrol*, 1996. **16**(6): p. 567-75.
62. Castillo, L., et al., *Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(2 Pt 1): p. E360-7.
63. Boger, R.H., *L-Arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous?* *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008. **11**(1): p. 55-61.

64. McDonald, K.K., et al., *A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox"*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31213-6.
65. Moller, P., et al., *Effect of aging on free amino acids and electrolytes in leg skeletal muscle*. Clin Sci (Lond), 1979. **56**(5): p. 427-32.
66. Bogle, R.G., et al., *Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases?* Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 1): p. C750-6.
67. Boger, R.H., et al., *LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases*. Circ Res, 2000. **87**(2): p. 99-105.
68. Schmidt, H.H., et al., *Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide*. Eur J Pharmacol, 1988. **154**(2): p. 213-6.
69. Castillo, L., et al., *Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(1): p. 193-7.
70. Boger, R.H., et al., *Hypercholesterolemia impairs basal nitric oxide synthase turnover rate: a study investigating the conversion of L-[guanidino-(15)N(2)]-arginine to (15)N-labeled nitrate by gas chromatography--mass spectrometry*. Nitric Oxide, 2004. **11**(1): p. 1-8.
71. Merimee, T.J., et al., *Plasma growth hormone after arginine infusion. Clinical experiences*. N Engl J Med, 1967. **276**(8): p. 434-9.
72. Bode-Boger, S.M., et al., *L-arginine infusion decreases peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects*. Clin Sci (Lond), 1994. **87**(3): p. 303-10.
73. Bode-Boger, S.M., et al., *L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. A randomized, controlled study*. Circulation, 1996. **93**(1): p. 85-90.
74. Boger, R.H., et al., *Differential systemic and pulmonary hemodynamic effects of L-arginine in patients with coronary artery disease or primary pulmonary hypertension*. Int J Clin Pharmacol Ther, 1996. **34**(8): p. 323-8.
75. Bode-Boger, S.M., et al., *L-arginine stimulates NO-dependent vasodilation in healthy humans--effect of somatostatin pretreatment*. J Investig Med, 1999. **47**(1): p. 43-50.
76. Jeserich, M., et al., *Reduced plasma L-arginine in hypercholesterolaemia*. Lancet, 1992. **339**(8792): p. 561.
77. Bachetti, T., et al., *Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(2): p. 515-23.

78. Berkowitz, D.E., et al., *Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels*. *Circulation*, 2003. **108**(16): p. 2000-6.
79. Xu, W., et al., *Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension*. *FASEB J*, 2004. **18**(14): p. 1746-8.
80. Zhang, C., et al., *Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles*. *Hypertension*, 2004. **44**(6): p. 935-43.
81. Chicoine, L.G., et al., *Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(1): p. L60-8.
82. Boger, R.H., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond*. *Ann Med*, 2006. **38**(2): p. 126-36.
83. Veresh, Z., et al., *ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway*. *Hypertension*, 2008. **52**(5): p. 960-6.
84. Toth, J., et al., *Asymmetrical dimethylarginine inhibits shear stress-induced nitric oxide release and dilation and elicits superoxide-mediated increase in arteriolar tone*. *Hypertension*, 2007. **49**(3): p. 563-8.
85. Boger, R.H. et al., *L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor*. *Altern Med Rev*, 2005. **10**(1): p. 14-23.
86. Boger, R.H., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials*. *Vasc Med*, 2005. **10 Suppl 1**: p. S19-25.
87. Drexler, H., et al., *Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine*. *Lancet*, 1991. **338**(8782-8783): p. 1546-50.
88. Lee, J., et al., *Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(8): p. 4843-8.
89. Morris, S.M., Jr., *Arginine metabolism in vascular biology and disease*. *Vasc Med*, 2005. **10 Suppl 1**: p. S83-7.
90. Wu, G., et al., *Maternal dietary protein deficiency decreases nitric oxide synthase and ornithine decarboxylase activities in placenta and endometrium of pigs during early gestation*. *J Nutr*, 1998. **128**(12): p. 2395-402.
91. Knowles, R.G., et al., *Nitric oxide synthases in mammals*. *Biochem J*, 1994. **298** (Pt 2): p. 249-58.

92. Zhang, C., et al., *L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27159-65.
93. Mori, M. et al., *Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(3): p. 715-9.
94. Lortie, M.J., et al., *Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat*. J Clin Invest, 1996. **97**(2): p. 413-20.
95. Regunathan, S., et al., *Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **276**(3): p. 1272-82.
96. Morrissey, J.J., et al., *Agmatine activation of nitric oxide synthase in endothelial cells*. Proc Assoc Am Physicians, 1997. **109**(1): p. 51-7.
97. Thomson, S.C., et al., *Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes*. J Clin Invest, 2001. **107**(2): p. 217-24.
98. McGuire, D.M., et al., *Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy*. J Histochem Cytochem, 1986. **34**(4): p. 429-35.
99. Romero, M.J., et al., *Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 95-102.
100. Pieper, G.M., et al., *Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: acute arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(2): p. 684-91.
101. Hagenfeldt, L., et al., *Plasma amino acids in relation to metabolic control in insulin-dependent diabetic children*. Acta Paediatr Scand, 1989. **78**(2): p. 278-82.
102. Morris, C.R., et al., *Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease?* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(1): p. 63-9.
103. Bivalacqua, T.J., et al., *Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(4): p. 923-7.
104. Li, H., et al., *Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(1): p. E75-82.
105. White, A.R., et al., *Knockdown of arginase I restores NO signaling in the vasculature of old rats*. Hypertension, 2006. **47**(2): p. 245-51.

106. Hart, G.W., et al., *Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1017-22.
107. Fulop, N., et al., *Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1370-8.
108. Wells, L., et al., *A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(2): p. 222-8.
109. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
110. Dominiczak, M.H., *Obesity, glucose intolerance and diabetes and their links to cardiovascular disease. Implications for laboratory medicine*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(9): p. 1266-78.
111. Gugliucci, A., *Glycation as the glucose link to diabetic complications*. J Am Osteopath Assoc, 2000. **100**(10): p. 621-34.
112. Dias, W.B., et al., *O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease*. Mol Biosyst, 2007. **3**(11): p. 766-72.
113. Wang, Z., et al., *Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(8): p. 1365-79.
114. Marshall, S., et al., *Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance*. J Biol Chem, 1991. **266**(8): p. 4706-12.
115. Federici, M., et al., *Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells*. Circulation, 2002. **106**(4): p. 466-72.
116. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
117. Musicki, B., et al., *Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(33): p. 11870-5.
118. Heart, E., et al., *Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(1): p. E103-12.
119. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
120. Bloomgarden, Z.T., *Cardiovascular disease and diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(1): p. 230-7.

121. Ghosh, J., et al., *Diabetes mellitus and coronary artery disease: therapeutic considerations*. Heart Dis, 2003. **5**(2): p. 119-28.
122. Loscalzo, J., et al., *Nitric oxide and its role in the cardiovascular system*. Prog Cardiovasc Dis, 1995. **38**(2): p. 87-104.
123. Frisbee, J.C., et al., *Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(3): p. H1304-11.
124. Henderson, K.K., et al., *Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high-fat, high-cholesterol diet: effect of exercise*. J Appl Physiol, 2004. **97**(3): p. 1159-68.
125. Roberts, C.K., et al., *Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet*. Hypertension, 2000. **36**(3): p. 423-9.
126. Beckman, J.A., et al., *Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans*. Circulation, 2001. **103**(12): p. 1618-23.
127. Marchioli, R., et al., *Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data*. Lipids, 2001. **36 Suppl**: p. S53-63.
128. Maxwell, S., et al., *Anti-oxidants-- a protective role in cardiovascular disease?* Expert Opin Pharmacother, 2001. **2**(11): p. 1737-50.
129. Gazis, A., et al., *Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in Type 2 diabetes mellitus*. Diabet Med, 1999. **16**(4): p. 304-11.
130. Bagi, Z., et al., *Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type I diabetes is restored by sepiapterin*. J Vasc Res, 2003. **40**(1): p. 47-57.
131. Durante, W., et al., *Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(9): p. 906-11.
132. Thony, B., et al., *Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions*. Biochem J, 2000. **347 Pt 1**: p. 1-16.
133. Ihlemann, N., et al., *Tetrahydrobiopterin restores endothelial dysfunction induced by an oral glucose challenge in healthy subjects*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H875-82.
134. Regensteiner, J.G., et al., *Oral L-arginine and vitamins E and C improve endothelial function in women with type 2 diabetes*. Vasc Med, 2003. **8**(3): p. 169-75.
135. Romero, M.J., et al., *Diabetes-induced vascular dysfunction involves arginase I*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **302**(1): p. H159-66.

136. Gronros, J., et al., *Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **300**(4): p. H1174-81.
137. Krzyzanowska, K., et al., *Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(7): p. 1834-9.
138. Picchi, A., et al., *Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: A review*. *World J Cardiol*. **2**(11): p. 377-90.
139. Kawano, H., et al., *Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **34**(1): p. 146-54.
140. Title, L.M., et al., *Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **36**(7): p. 2185-91.
141. Shige, H., et al., *Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in the postprandial state in type 2 diabetes mellitus*. *Am J Cardiol*, 1999. **84**(10): p. 1272-4, A9.
142. Vehkavaara, S., et al., *In vivo endothelial dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose*. *Diabetes Care*, 1999. **22**(12): p. 2055-60.
143. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
144. Gabbay, K.H., *The sorbitol pathway and the complications of diabetes*. *N Engl J Med*, 1973. **288**(16): p. 831-6.
145. Androne, L., et al., *In vivo effect of lipoic acid on lipid peroxidation in patients with diabetic neuropathy*. *In Vivo*, 2000. **14**(2): p. 327-30.
146. Brownlee, M., *Negative consequences of glycation*. *Metabolism*, 2000. **49**(2 Suppl 1): p. 9-13.
147. Kelkar, P., et al., *Distinctive pathologic findings in proximal diabetic neuropathy (diabetic amyotrophy)*. *Neurology*, 2000. **55**(1): p. 83-8.
148. Jansen-Olesen, I., et al., *Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human cranial arteries and detection of mRNA encoding H1- and H2-receptors by RT-PCR*. *Br J Pharmacol*, 1997. **121**(1): p. 41-8.
149. Toda, N., *Mechanism underlying responses to histamine of isolated monkey and human cerebral arteries*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(2 Pt 2): p. H311-7.
150. Erdei, N., et al., *High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(5): p. H2107-15.

151. Feher, A., et al., *Caveolin-1 limits the contribution of BK(Ca) channel to EDHF-mediated arteriolar dilation: implications in diet-induced obesity*. Cardiovasc Res. **87**(4): p. 732-9.
152. Erdos, B., et al., *Impaired endothelium-mediated relaxation in isolated cerebral arteries from insulin-resistant rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2060-5.
153. Leung, J.Y., et al., *Attenuated alpha-adrenoceptor-mediated arterial and venous constrictions in rat models of diabetes*. Eur J Pharmacol. **642**(1-3): p. 128-33.
154. James, G.M., et al., *Attenuated 5-hydroxytryptamine receptor-mediated responses in aortae from streptozotocin-induced diabetic rats*. Br J Pharmacol, 1994. **111**(1): p. 370-6.
155. Zhang, X.H., et al., *Beneficial effect of the oligomerized polyphenol oligonol on high glucose-induced changes in eNOS phosphorylation and dephosphorylation in endothelial cells*. Br J Pharmacol. **159**(4): p. 928-38.
156. Du, X.L., et al., *Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1341-8.
157. Lima, V.V., et al., *Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli - VASOACTIVE PEPTIDE SYMPOSIUM*. J Am Soc Hypertens, 2008. **2**(6): p. 410-7.

8. TÁRGYSZAVAK

diabetes mellitus

koronária arteriola

mikrokeringés

endothel

nitrogén monoxid

argináz

L-arginin

hexózamin bioszintézis útvonal

magas glükóz

glükózamin

O-GlcNAc

glikoziláció

8. KEYWORDS

diabetes mellitus

coronary arteriole

microcirculation

endothelial

nitrogen monoxid

arginase

L-arginine

hexosamine biosynthetic pathway

high glucose

glucosamine

***O*-GlcNAc**

glycosylation

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Kardiológiai Intézet munkatársainak, kiemelten Professzor Dr. Édes István Intézet Igazgató Úrnak, hogy a Debreceni Egyetem Doktori Iskola keretében végzett munkámat mindenkor támogatták.

Köszönettel tartozom a Klinikai Fiziológia Tanszék vezetőjének, Professzor Dr. Papp Zoltánnak, illetve a Tanszék valamennyi dolgozójának.

Külön köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Bagi Zsoltnak a munkámhoz nyújtott pótolhatatlan segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom szüleimnek, akik szeretetükkel végig támogattak tanulmányaim során, valamint köszönöm férjemnek, Dr. Köbling Gábornak a türelmét és szeretetét, amivel ezernyi módon segítette munkámat.

10. FÜGGELÉK

A függelék az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények különlenyomatait tartalmazza.

Iktatószám: DEENKÉTK /11/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Beleznai Tímea
Neptun kód: DKADHO
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Beleznai, T.,** Bagi, Z.: Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation.
Vasc. Pharmacol. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2011.11.003>
IF:2.174 (2010)
2. **Beleznai, T.,** Fehér, A., Spielvogel, D., Lansman, S.L., Bagi, Z.: Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 300 (3), H777-H783, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00831.2010>
IF:3.88 (2010)



További Közlemények

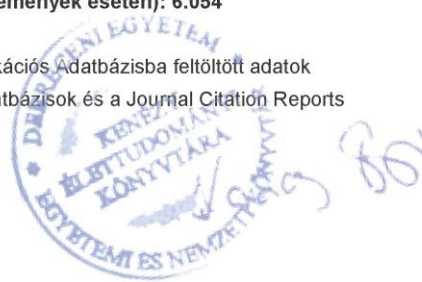
3. **Beleznai, T.**, Takano, H., Hamill, C., Yarova, P.L., Douglas, G., Channon, K., Dora, K.A.: Enhanced K⁺-channel-mediated endothelium-dependent local and conducted dilation of small mesenteric arteries from ApoE^{-/-} mice.
Cardiovasc. Res. 92 (2), 199-208, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr181>
IF:6.051 (2010)
4. **Beleznai, T.**, Yarova, P.L., Yuill, K.H., Dora, K.A.: Smooth Muscle Ca²⁺-Activated and Voltage-Gated K⁺ Channels Modulate Conducted Dilation in Rat Isolated Small Mesenteric Arteries.
Microcirculation. 18 (6), 487-500, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00109.x>
IF:2.533 (2010)
5. Fehér, A., Rutkai, I., **Beleznai, T.**, Ungvári, Z., Csiszár, A., Édes, I., Bagi, Z.: Caveolin-1 limits the contribution of BK(Ca) channel to EDHF-mediated arteriolar dilation: implications in diet-induced obesity.
Cardiovasc. Res. 87 (4), 732-739, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvq088>
IF:6.051
6. Bagi, Z., Fehér, A., **Beleznai, T.**: Preserved coronary arteriolar dilatation in patients with type 2 diabetes mellitus: Implications for reactive oxygen species.
Pharmacol. Rep. 61 (1), 99-104, 2009.
IF:2.086

Összesített impakt faktor: 22.775

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.054

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.01.20



Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes

Timea Beleznai,^{1,2} Attila Feher,^{2,3} David Spielvogel,⁴ Steven L. Lansman,⁴ and Zsolt Bagi^{1,3}

¹Department of Pharmacology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom; ²Division of Clinical Physiology, Institute of Cardiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; and Departments of ³Physiology and ⁴Cardiothoracic Surgery, New York Medical College, Valhalla, New York

Submitted 23 August 2010; accepted in final form 28 December 2010

Beleznai T, Feher A, Spielvogel D, Lansman SL, Bagi Z. Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H777–H783, 2011. First published January 7, 2011; doi:10.1152/ajpheart.00831.2010.—Arginase 1, via competing with nitric oxide (NO) synthase for the substrate L-arginine, may interfere with NO-mediated vascular responses. We tested the hypothesis that arginase 1 contributes to coronary vasomotor dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). Coronary arterioles were dissected from the right atrial appendages of 41 consecutive patients with or without DM (the 2 groups suffered from similar comorbidities), and agonist-induced changes in diameter were measured with videomicroscopy. We found that the endothelium-dependent agonist ACh elicited a diminished vasodilation and caused constriction to the highest ACh concentration (0.1 μ M) with a similar magnitude in patients with (18 \pm 8%) and without (17 \pm 9%) DM. Responses to ACh were not significantly affected by the inhibition of NO synthesis with N^G-nitro-L-arginine methyl ester in either group. The NO donor sodium nitroprusside-dependent dilations were not different in patients with or without DM. Interestingly, we found that the presence of N^G-hydroxy-L-arginine (10 μ M), a selective inhibitor of arginase or application of L-arginine (3 mM), restored ACh-induced coronary dilations only in patients with DM (to 47 \pm 6% and to 40 \pm 19%, respectively) but not in subjects without DM. Correspondingly, the protein expression of arginase 1 was increased in coronary arterioles of patients with DM compared with subjects without diabetes. Moreover, using immunocytochemistry, we detected an abundant immunostaining of arginase 1 in coronary endothelial cells of patients with DM, which was colocalized with NO synthase. Collectively, we provided evidence for a distinct upregulation of arginase 1 in coronary arterioles of patients with DM, which contributes to a reduced NO production and consequently diminished vasodilation.

coronary microvessel; endothelium; endothelial nitric oxide synthase

PATIENTS WITH DIABETES exhibit endothelial dysfunction, which is characterized by an impaired flow- and acetylcholine (ACh)-induced, endothelium-dependent relaxation of brachial artery (8) and forearm resistance vessels (36). Kaneda et al. (17) performed a study in which 165 patients underwent intracoronary injection of ACh and found that diabetes was the strongest predictor for ACh-induced vasospasm, a response that indicates coronary endothelial dysfunction. This and other studies indicated that diabetes is also associated with an impaired dilator function of coronary arteries, and this is manifested and measured as a reduced vasodilator or even vasoconstrictor response to ACh (5, 23). Our previous studies have demonstrated that coronary arterioles isolated from animals with

experimental diabetes also exhibit impaired ACh-induced dilation, which is primarily due to the reduced synthesis and/or availability of nitric oxide (NO) (1, 2, 9, 16). The exact mechanism(s) responsible for the diminished NO production in human diabetes is still incompletely understood.

L-Arginine, the substrate for NO synthase, is the precursor for NO synthesis in the vascular endothelium. Experimental and also human studies have indicated that the administration of L-arginine could improve NO bioavailability in coronary arteries (12). Intracoronary infusion of L-arginine in patients with coronary artery disease attenuated the vasoconstrictor response to intracoronary ACh and increased coronary blood flow (6). Lerman et al. (19) studied the effect of the long-term administration of L-arginine (9 g/day) on patients with nonobstructive coronary disease and found a markedly improved coronary vasodilator response to ACh. It is known that the K_m of NO synthase for L-arginine is 2.9 μ M and the intracellular concentrations of L-arginine range from 0.1 to 1.0 mM; thus in these studies it was surprising that the administration of L-arginine is associated with an increased bioavailability of NO, the arginine paradox. Interestingly, recent studies suggested an attractive hypothesis, namely, that arginase 1, the focal enzyme of the urea cycle hydrolyzing L-arginine, interferes with NO synthesis and may contribute to the development of vascular disease (7). Recently, Zhang et al. (40) demonstrated that in pigs with experimental hypertension, NO-mediated dilation of coronary arterioles is reduced because of an increased arginase-1 activity, which limited L-arginine availability to NO synthase. A study by Romero et al. (31) showed that increased arginase-1 activity contributes to a diminished NO-mediated response in coronary arteries of diabetic rats. Experimental evidence supporting the contribution of arginase 1 to diminished coronary dilation is lacking in human diabetes.

Accordingly, in this study we set out to characterize alterations in endothelium-dependent coronary arteriolar responses and the contribution of arginase 1 in this process in patients with diabetes mellitus (DM). Thus changes in the diameter of coronary arterioles were monitored before and after the pharmacological-interfering L-arginine/NO pathway and arginase 1. Protein expression and localization of arginase 1 was also detected to furnish further evidence for an upregulated arginase 1 in human coronaries.

METHODS

Patient characteristics. All protocols were approved by the Institutional Review Board at New York Medical College, Valhalla, New York. Consecutive patients who underwent cardiac surgery were enrolled into this study. Patients were divided into two groups with or without documented diabetes.

Address for reprint requests and other correspondence: Z. Bagi, Dept. of Physiology, New York Medical College, Valhalla, NY 10595 (e-mail: zsolt_bagi@nymc.edu).

Isolation of coronary arterioles. With the use of microsurgical instruments and a stereomicroscope (Nikon SMZ 1000; Nikon Instruments, Melville, NY), the coronary arteriole (~1 mm in length) from the right atrial appendage was isolated and cannulated, as previously described (34). Briefly, the cannulated arteriole was connected with silicone tubing to a pressure servo control system (Living Systems Instrumentation, Burlington, VT) to set the intraluminal pressure to 80 mmHg. Changes in arteriolar diameter were continuously recorded with a CCD camera (CFW1310; Scion, Frederick, MD), connected to a microscope (Eclipse 80i; Nikon Instruments, Melville, NY) and measured with a microangiometer (Texas Instruments, Dallas, TX).

Experimental protocols. During an incubation period of 1 h, a spontaneous myogenic tone developed in the isolated coronary arteriole in response to the intraluminal pressure of 80 mmHg. In the first series of experiments, cumulative concentrations of the endothelium-dependent agonist ACh (0.1 nmol/l–0.1 μ mol/l) and the endothelium-independent dilator sodium nitroprusside (1 nmol/l–1 μ mol/l) were administered to the arterioles and changes in diameter were measured. The same protocols were repeated in the presence of N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 μ mol/l for 30 min), an inhibitor of the NO synthase. Arterioles were also incubated in the presence of N^G -hydroxy-L-arginine (L-NOHA), a selective inhibitor of arginase (10 μ mol/l for 30 min) (14) or L-arginine (3 mmol/l for 30 min), and agonist-induced arteriolar responses were obtained again.

Immunoblots. Coronary arterioles, same-sized microvessels as used in the functional experiments, were dissected from the hearts of patients with ($n = 5$) and without ($n = 5$) diabetes, cleared of connective tissue, and briefly rinsed in ice-cold physiological salt solution. Protein electrophoresis and immunoblot analysis were carried out as previously described (16). Briefly, single coronary arterioles were homogenized in 20 μ l of radioimmunoprecipitation assay buffer and mixed with an equal amount of Laemmli sample buffer. The total amount of homogenates was then loaded to the gel for electrophoresis, without further quantifying the actual protein concentrations. After blotting, a goat polyclonal antibody was used for the detection of the protein expression of arginase 1 (dilution, 1:1,000). Membranes were also reprobbed with anti- β -actin IgG (dilution, 1:5,000) to normalize for loading variations in protein concentrations. Corresponding horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies were used, and enhanced chemiluminescence was visualized autoradiographically. The optical density of the bands was measured and normalized for β -actin by using National Institutes of Health (NIH) ImageJ software.

Immunocytochemistry for colocalization. To visualize individual endothelial cells, after longitudinal cutting, en face coronary arterioles from patients with or without diabetes ($n = 4$ in each group) were prepared. Acetone-fixed preparations were simultaneously immunolabeled with a monoclonal mouse anti-arginase-1 primary antibody (dilution, 1:100) and a polyclonal rabbit endothelial NO synthase (eNOS) primary antibody (dilution, 1:100). Subsequent fluorescent labeling was performed with Alexa 488-labeled anti-rabbit or Alexa 597-labeled anti-mouse secondary antibodies. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used for nuclear staining. For nonspecific binding, the primary antibody was omitted. With the use of a $\times 100$ oil immersion objective (numerical aperture, 1.4), individual endothelial cells were visualized in the en face vascular preparation. Images were collected from multiple endothelial cells (at least 5 cells from 3 different regions from each vessels) with an electron-multiplying CCD camera (Luca^{EM}-S, Andor, Belfast, UK), connected to an Olympus BX61 microscope (Olympus America, Center Valley, PA). Merged RGB images were generated with NIH ImageJ software, and representative images are shown.

Drugs and chemicals. All drugs, chemicals, and antibodies were purchased from Sigma (St. Louis, MO) with the exception of anti- β -actin IgG (Abcam, Cambridge, UK), polyclonal rabbit eNOS primary antibody (BD Bioscience; Rockville, MD), Alexa 488-labeled anti-

rabbit and Alexa 597-labeled anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen; Carlsbad, CA).

Data analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (version 5.00 for Macintosh, San Diego, CA). All pertinent risk factors were examined by Fisher exact test, and continuous variables were examined by Student's *t*-test between the two patient groups. Agonist-induced arteriolar responses were expressed as changes in arteriolar diameter as a percentage of the maximal dilation, defined as the passive diameter of the vessel at 80-mmHg intraluminal pressure in a Ca^{2+} -free medium, as previously described (34). Statistical analysis of agonist-induced vascular responses was performed by repeated-measures ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data are expressed as means \pm SE.

RESULTS

Clinical data. Clinical data are presented in Table 1. The mean age was 58 ± 12 yr in patients without diabetes and 64 ± 10 yr in patients with diabetes. As analyzed by Fisher exact test, there was no significant difference in sex, other comorbidities, and the surgical procedures between the two groups (Table 1). All patients with DM (including 5 patients with type 1 and 15 patients with type 2 DM) were on antidiabetic medication (insulin and/or oral antidiabetic drugs, Table 1).

Vasomotor responses of human coronary arterioles. In isolated coronary arterioles, a spontaneous tone developed in response to 80 mmHg intraluminal pressure, and there were no significant differences between the active (non-DM, 106 ± 9 μ m; and DM, 97 ± 12 μ m) and passive (in Ca^{2+} -free solution: non-DM, 131 ± 11 μ m; and DM, 133 ± 17 μ m) diameters.

We found that in coronary arterioles, ACh (1 nM–0.1 μ M) elicited diminished dilations, and it caused significant constrict-

Table 1. Patient demographics, diseases, and medications

	DM–	DM+
<i>n</i>	21	20
Men	14	10
Age, yr	58 ± 12	64 ± 10
Underlying disease, <i>n</i>		
Type 1 diabetes	0	5
Type 2 diabetes	0	15
Hypertension	17	18
Hypercholesterolemia	13	10
Coronary artery disease	9	16
Angina	10	15
Premyocardial infarction	2	7
Peripheral vascular disease	0	3
Heart failure	0	4
Valve disease	13	6
Medications, <i>n</i>		
Aspirin	11	13
Lipid lowering	15	13
Insulin	0	8
Oral antidiabetics	0	15
β -Blockers	16	16
ACE inhibitor	13	18
Diuretics	10	10
Anticoagulants	13	10
Calcium-channel blockers	6	4
Surgical procedures, %		
Coronary artery bypass graft	7	11
Valve replacement	13	7
Other causes	1	2

Data are means \pm SD; *n*, number of patients studied without (–) or with (+) diabetes mellitus (DM). ACE, angiotensin-converting enzyme.

tions in response to the highest (0.1 μM) concentrations of ACh with similar magnitude in patients with or without DM (Fig. 1A). The NO synthesis inhibitor L-NAME had no effect on these responses in either group of arterioles (Fig. 1B). The NO donor sodium nitroprusside-induced dilations were also similar in magnitude in coronary arterioles isolated from patients with or without DM (Fig. 1C).

In separate experiments coronary arterioles were incubated with N^G -hydroxy-L-arginine (L-NOHA, 10 μM), a selective inhibitor of arginase. L-NOHA had no significant effect on the basal diameter of arterioles (after incubation with L-NOHA, arteriolar diameter was 98 ± 10 and 91 ± 7 μm in patients without and with DM, respectively). We have found that in the presence of L-NOHA, ACh elicited significant dilation in coronary arterioles of patients with DM, but it had no effect on diminished coronary responses in patients without DM (Fig. 2A). Similarly, we found that in arterioles of patients with DM, the application of L-arginine (3 mM) restored vasodilation to ACh, but it had no effect on the diminished responses of vessels obtained from patients without diabetes (Fig. 2B). L-Arginine incubation increased basal diameters in both groups (after incubation with L-arginine, arteriolar diameter was 112 ± 9 and 113 ± 14 μm in patients without and with DM, respectively).

Expression of arginase 1 in human coronary arterioles. Protein expression of arginase 1 was detected by Western blot analysis in coronary arterioles isolated from the atrial appendages of patients with and without DM. We have found an increased arginase-1 expression in the coronary arterioles of patients with DM compared with subjects without DM (Fig. 3A).

With the use of fluorescence microscopy and immunocytochemistry approaches, the protein expression of eNOS and arginase 1 was also detected in endothelial cells in coronary arterioles of patients with or without DM. Arginase-1 immunostaining was prominent in the coronary endothelium of patients with DM, and arginase 1 was less abundantly expressed in those arterioles of subjects without DM. Importantly, we have found that arginase-1 immunostaining was colocalized with eNOS in the endothelial cells of coronary arterioles of patients with DM but not in subjects without DM (Fig. 3B).

DISCUSSION

This study demonstrates that in the coronary arterioles of patients with diabetes, arginase 1 is upregulated, which interferes with NO-mediated vasomotor responses. This conclusion is supported by the findings that in coronary arterioles dissected from the heart of patients with diabetes, ACh elicits a diminished vasodilation, which is not affected by the inhibition of NO synthesis, but it is restored by prior incubation with an arginase inhibitor or L-arginine. When compared with those of subjects without diabetes, coronary arterioles from patients with diabetes exhibit an increased protein expression of arginase 1, which is colocalized with eNOS in endothelial cells.

Although acute and chronic ischemic syndromes are commonly due to coronary flow-limiting atherosclerotic plaques in epicardial coronary arteries, about 10 to 20% of patients with prominent cardiac symptoms, and therefore undergoing cardiac catheterization, are found to have normal coronary angiograms

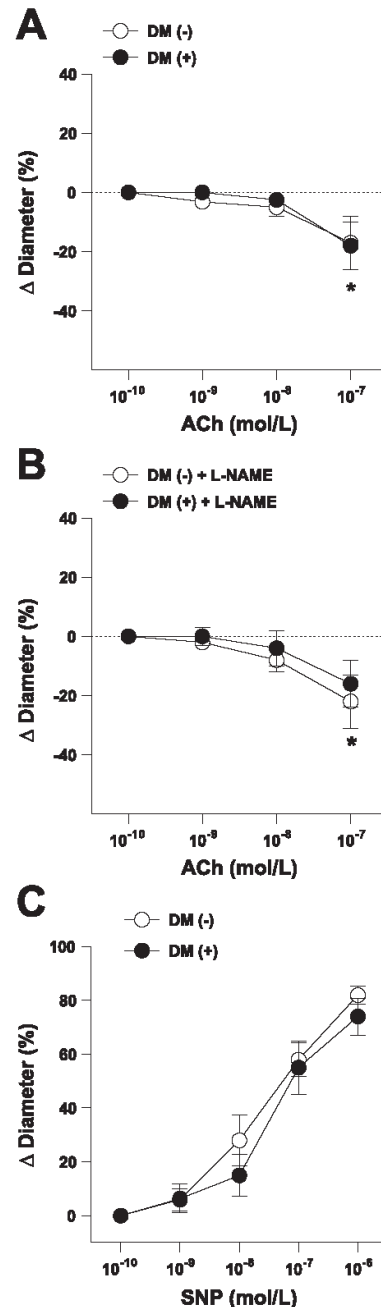


Fig. 1. Changes in diameter of coronary arterioles isolated from patients without diabetes mellitus (DM-, $n = 11$) and patients with DM (DM+, $n = 10$) in response to cumulative concentrations of ACh in the absence (A) or in the presence (B, $n = 6$ in each group) of nitric oxide synthesis inhibitor N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Changes in diameter of coronary arterioles isolated from subjects without (DM-, $n = 9$) and with diabetes (DM+, $n = 8$) in response to cumulative concentrations of sodium nitroprusside (SNP; C) are shown. Data are means \pm SE. * $P < 0.05$, significant changes in diameter from the baseline diameters on A and B.

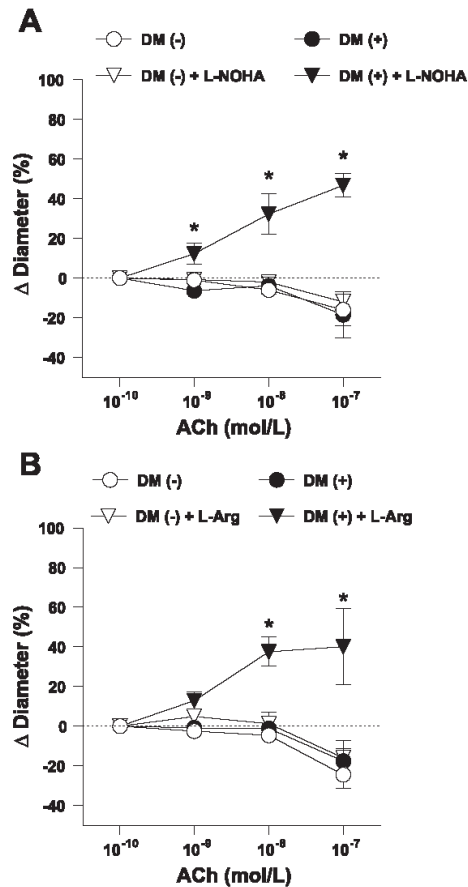


Fig. 2. Changes in diameter of coronary arterioles isolated from patients without (DM-) and with (DM+) diabetes in response to cumulative concentrations of ACh before and after incubation with *N*^G-hydroxy-L-arginine (L-NOHA, *n* = 5-5; A) or with L-arginine (L-Arg, *n* = 6-6; B). Data are means \pm SE. **P* < 0.05, significant differences in the diameter changes before and after incubation with L-NOHA or L-Arg.

(4). Nitenberg et al. (25) have demonstrated that coronary dilation is impaired in patients with diabetes with angiographically normal coronaries (25). The coronary flow reserve, as defined by the ratio of coronary flow under maximal drug-induced vasodilation to coronary flow under resting conditions, is reduced in patients with diabetes in the absence of significant stenosis of epicardial coronary arteries (26). Thus it is clear that epicardial atherosclerosis may not be the only underlying mechanism resulting in disturbed myocardial perfusion in patients with diabetes, but an important pathological role for functional alterations of coronary microvessels can also be assigned (24, 26). The underlying mechanism(s) of coronary arteriolar vasomotor dysfunction remains incompletely understood in patients with diabetes, so that effective preventive therapeutic strategies cannot be adopted in patients with DM.

The vascular endothelium produces and secretes numerous compounds that regulate a variety of physiological functions, including vasomotor tone, coagulation, inflammation, permea-

bility, and cell adhesion (37). Among others, NO is considered to be one of the key molecules in maintaining normal vascular homeostasis, and it is a major contributor to maintain adequate coronary microvascular tone (20). Solid experimental evidence indicates that diabetes is associated with impaired bioavailability of NO both in conduit vessels and resistance arteries (10, 13, 30, 33). In this study we have found that the inhibition of NO synthesis did not affect ACh-induced coronary vasomotor responses both in patients with or without diabetes. In this context, earlier we have found that coronary arterioles obtained from a small number of young individuals (undergoing only valve surgery and had no sign of coronary artery disease, such as patients with Marfan syndrome) develop vasodilation (maximum, ~60%) in response to ACh (10^{-7} M), a response that was diminished by a subsequent inhibition of NO synthesis with L-NAME (Z. Bagi, unpublished observation). Collectively, these aforementioned indicate that the coronary arterioles of patients involved in the current study lack NO mediation of ACh-induced vasomotor responses and suggest that patients with various other comorbidities already exhibit a compromised availability of NO, regardless of the presence or the absence of diabetes. On the other hand, our finding that the NO donor sodium nitroprusside-induced dilations were similar in the two groups indicates an intact downstream, soluble guanylate cyclase and cGMP-dependent signaling and shows a maintained ability of coronary vessels to dilate in response to the endothelium-independent agonist in both patient groups.

Oxidative stress has been proposed to be responsible for the diminished availability of NO in diabetes (5). In patients with diabetes, the administration of the antioxidant vitamin C prevented the decreases in methacholine-induced brachial artery dilations (3). However, other studies failed to demonstrate any significant beneficial effect of antioxidant therapy in the prevention of diabetes-induced vascular complications (21, 22). For example, vitamin-E supplementation for 8 wk did not improve the reduced ACh- and bradykinin-induced dilations of brachial arteries in patients with diabetes (11). We have also found earlier that the administration of the superoxide dismutase did not prevent the dilation of skeletal muscle arterioles isolated from diabetic rats (1). These aforementioned observations raised questions about the direct and only role for oxidative stress in diabetes-related vascular dysfunction. It is known that an adequate level of substrates and cofactors for NO syntheses, such as L-arginine (7) and tetrahydrobiopterin (BH_4), is essential for NO synthesis (35, 38) and NO-mediated vasodilation (1). Diabetes has been shown to interfere with the availability of these cofactors, thereby leading to a diminished NO synthesis. To provide experimental evidence for this scenario, Ihlemann et al. (15) demonstrated that in healthy humans, oral glucose challenge-induced reduction in forearm blood flow is restored by pretreatment with BH_4 (15). A coinfusion of BH_4 and L-arginine into the forearm of patients with diabetes prevented ischemia-reperfusion-induced endothelial dysfunction in the brachial artery (32). Oral L-arginine administration alone also improved brachial artery relaxation in women with diabetes (29). Thus it seems established that diabetes leads to impaired NO synthesis via interfering with the availability of eNOS cofactor BH_4 . Furthermore, the availability of the NO synthase substrate L-arginine seems also compromised in diabetes, which has been demonstrated in early investigations in diabetic animals (27, 28).

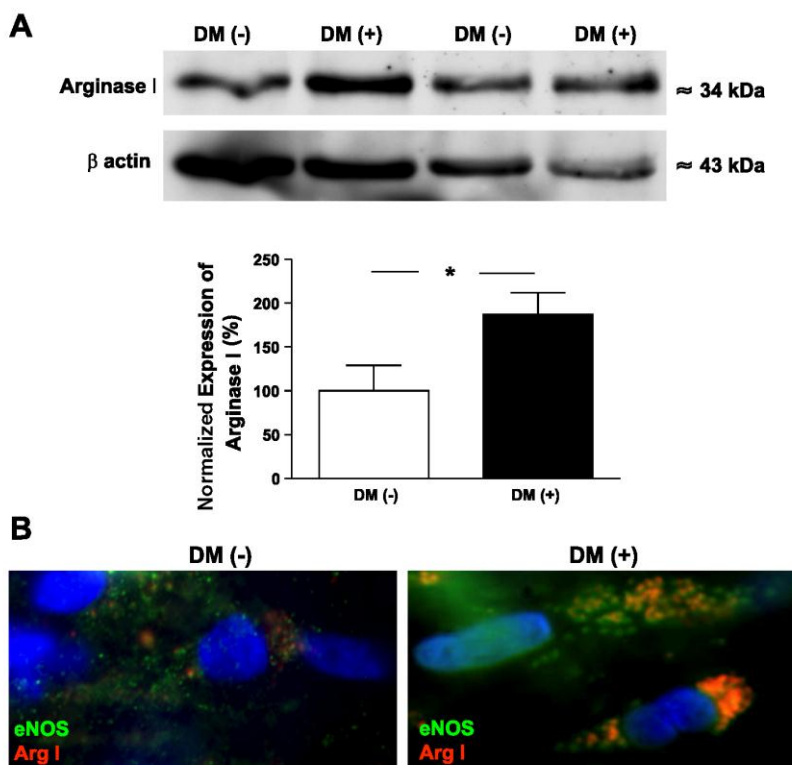


Fig. 3. A, top: Western blot analysis of the expression of arginase 1 (Arg 1) in coronary arterioles isolated from the atrial appendage of patients with ($n = 5$) and without ($n = 5$) DM. Anti- β -actin was used to normalize for loading variations. A, bottom: summary of normalized densitometric ratios. Data are means \pm SE. B: representative images of individual endothelial cells ($\times 100$, 1.4 numerical aperture objective) on acetone-fixed, en face coronary arteries obtained from patients without (DM-, $n = 4$; left) or with (DM+, $n = 4$; right) DM. Cells were immunolabeled with primary antibodies against endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and Arg 1. Fluorescent labeling of anti-eNOS was performed with Alexa 488 secondary antibody (shown in green) and Alexa 597 antibody (shown in red) for anti-Arg 1. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used for nuclear staining (shown in blue). Co-immunostaining is shown in orange/yellow in the merged images; cells represent 5 cells from 3 different regions in each patient.

However, the beneficial effect of L-arginine supplementation seemed controversial in light of the known K_m value of NO synthase for L-arginine, which is 2.9 μ M, and the intracellular concentrations of L-arginine can range from 0.1 to 1.0 mM, the arginine paradox. Interestingly, recent studies suggested that arginase, the focal enzyme of the urea cycle, may reduce L-arginine concentration in the close proximity of NO synthase, hence limiting NO synthesis (7). In this context, Romero et al. (31) demonstrated that increased arginase-1 activity leads to a reduced availability of L-arginine to NO synthase in coronary arteries of diabetic rats. In agreement with this observation and extending those toward human diabetes, in this study we have demonstrated that diabetes is associated with an increased expression of arginase 1 in the coronary arteriolar wall. Arginase-1 expression was abundant in endothelial cells and was colocalized with eNOS in coronary vessels of patients with diabetes but not in subjects without diabetes. To reveal the functional consequence(s) of the upregulated arginase 1, we demonstrated that the inhibition of arginase with L-NOHA caused a restoration of endothelium-dependent agonist-induced dilation in coronary arterioles of patients with diabetes. It should be noted that the arginase inhibitor L-NOHA does not have selectivity toward arginase isoforms (arginase 1 vs. arginase 2). Thus the functional role for arginase 2 in the development of coronary vasomotor dysfunction in patients with diabetes cannot be entirely excluded. In this regard, a previous study has found that an increased expression of arginase 2 may lead to a decreased NO synthesis in pulmonary endothelial

cells of patients with pulmonary arterial hypertension (39). The pathological role of arginase isoforms in diabetes-related coronary microvascular dysfunction has yet to be elucidated.

Moreover, the underlying mechanism(s) leading to selective upregulation of arginase 1 in coronary arterioles in patients with diabetes also remains unclear. It is known that insulin suppresses the expression and activity of enzymes of the urea synthesis pathway. Since insulin signaling can be impaired in diabetes (a majority of patients in this study had type 2 diabetes and likely exhibit insulin resistance), it is possible that the failure of insulin regulatory action contributes to the upregulations of arginase 1. Because of the limited number of patients with type 1 diabetes in this study, we have not analyzed the difference in the vasomotor function and arginase-1 expression between type 1 and type 2 diabetes, and we were also not able to statistically distinguish between responses that were obtained in patients receiving insulin supplementation or were on insulin sensitizer medication. Further studies are warranted to ascertain the role of insulin, insulin sensitization, and other pathological factors that could contribute to increased arginase-1 expression in diabetes. Interestingly, in patients without diabetes but suffering from other cardiovascular diseases and other comorbidities, arginase inhibition and also L-arginine supplementation failed to improve coronary dilation, suggesting that mechanism(s) other than the upregulated arginase can be responsible for the diminished ACh-induced response. We could only speculate whether in patients without diabetes an increased level of endogenous NO synthase inhibitor asymmet-

ric dimethylarginine (18) or perhaps a decreased level of other NO synthase cofactors, such as BH₄ (15), plays also, if not even a more significant role in this process. Nevertheless, based on our present observation, clinical studies may reveal whether L-arginine supplementation and/or arginase inhibition are beneficial in the prevention and treatment of coronary microvascular complications that are associated with diabetes and insulin resistance. In conclusion, this study is the first to provide experimental evidence for the pathological role of vascular arginase 1, which contributes to the diminished, NO-mediated coronary arteriolar dilation in patients with diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the technical assistance of Marta Balogh in performing Western blot and immunocytochemistry experiments.

GRANTS

This study was supported by National Heart, Lung, and Blood Institute Grants R01-HL-104126 and PO-HL-43023 and British Heart Foundation Grant RE/08/004.

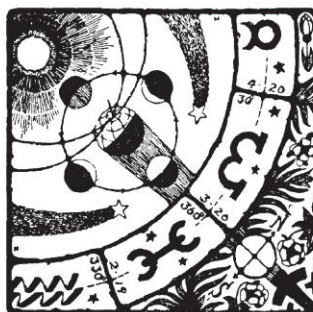
DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

1. Bagi Z, Koller A. Lack of NO-mediation of flow-dependent arteriolar dilation in diabetes is restored by sepiapterin. *J Vasc Res* 40: 47–57, 2003.
2. Bagi Z, Koller A, GK. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation, by reducing oxidative stress Increases NO bioavailability in coronary arterioles in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H742–H748, 2004.
3. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 103: 1618–1623, 2001.
4. Cannon RO 3rd, Camici PG, Epstein SE. Pathophysiological dilemma of syndrome X. *Circulation* 85: 883–892, 1992.
5. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van De Voorde J, Lameire NH, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130: 963–974, 2000.
6. Dubois-Rande JL, Zelinsky R, Roudot F, Chabrier PE, Castaigne A, Geschwind H, Adnot S. Effects of infusion of L-arginine into the left anterior descending coronary artery on acetylcholine-induced vasoconstriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Am J Cardiol* 70: 1269–1275, 1992.
7. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34: 906–911, 2007.
8. Enderle MD, Benda N, Schmuelling RM, Haering HU, Pfohl M. Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes Care* 21: 271–277, 1998.
9. Erdei N, Toth A, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Koller A, Bagi Z. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2107–H2115, 2006.
10. Frisbee JC, Stepp DW. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1304–H1311, 2001.
11. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 16: 304–311, 1999.
12. Gornik HL, Creager MA. Arginine and endothelial and vascular health. *J Nutr* 134: 2880S–2887S, 2004.
13. Henderson KK, Turk JR, Rush JW, Laughlin MH. Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high-fat, high-cholesterol diet: effect of exercise. *J Appl Physiol* 97: 1159–1168, 2004.
14. Huynh NN, Harris EE, Chin-Dusting JF, Andrews KL. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 156: 84–93, 2009.
15. Ihlemann N, Rask-Madsen C, Perner A, Dominguez H, Hermann T, Kober L, Torp-Pedersen C. Tetrahydrobiopterin restores endothelial dysfunction induced by an oral glucose challenge in healthy subjects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H875–H882, 2003.
16. Jebelovszki E, Kiraly C, Erdei N, Feher A, Pasztor ET, Rutkai I, Forster T, Edes I, Koller A, Bagi Z. High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2558–H2564, 2008.
17. Kaneda H, Taguchi J, Kuwada Y, Hangaishi M, Aizawa T, Yamakado M, Ogasawara K, Ohno M. Coronary artery spasm and the polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Circ J* 70: 409–413, 2006.
18. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Scherthaner G. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30: 1834–1839, 2007.
19. Lerman A, Burnett JC Jr, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR Jr. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 97: 2123–2128, 1998.
20. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 38: 87–104, 1995.
21. Marchioli R, Schweiger C, Levantesi G, Tavazzi L, Valagussa F. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Lipids* 36: S53–S63, 2001.
22. Maxwell S, Greig L. Anti-oxidants—a protective role in cardiovascular disease? *Expert Opin Pharmacother* 2: 1737–1750, 2001.
23. Miller FJ Jr, Dellsperger KC, Gutterman DD. Pharmacologic activation of the human coronary microcirculation in vitro: endothelium-dependent dilation and differential responses to acetylcholine. *Cardiovasc Res* 38: 744–750, 1998.
24. Nahser PJ Jr, Brown RE, Oskarsson H, Winniford MD, Rossen JD. Maximal coronary flow reserve and metabolic coronary vasodilation in patients with diabetes mellitus. *Circulation* 91: 635–640, 1995.
25. Nitenberg A, Paycha F, Ledoux S, Sachs R, Attali JR, Valensi P. Coronary artery responses to physiological stimuli are improved by deferoxamine but not by L-arginine in non-insulin-dependent diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and no other risk factors. *Circulation* 97: 736–743, 1998.
26. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes* 42: 1017–1025, 1993.
27. Pieper GM, Dondlinger LA. Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: acute arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 684–691, 1997.
28. Pieper GM, Siebeneich W, Moore-Hilton G, Roza AM. Reversal by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic BB rat. *Diabetologia* 40: 910–915, 1997.
29. Regensteiner JG, Popylisen S, Bauer TA, Lindenfeld J, Gill E, Smith S, Oliver-Pickett CK, Reusch JE, Weil JV. Oral L-arginine and vitamins E and C improve endothelial function in women with type 2 diabetes. *Vasc Med* 8: 169–175, 2003.
30. Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ. Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension* 36: 423–429, 2000.
31. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, Caldwell RB, Caldwell RW. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 102: 95–102, 2008.
32. Settergren M, Bohm F, Malmstrom RE, Channon KM, Pernow J. L-Arginine and tetrahydrobiopterin protects against ischemia/reperfusion-induced endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 204: 73–78, 2009.
33. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 34: 55–68, 1997.
34. Szerafin T, Erdei N, Fulop T, Pasztor ET, Edes I, Koller A, Bagi Z. Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ Res* 99: e12–e17, 2006.
35. Thony B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 347: 1–16, 2000.

36. **Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA.** Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 97: 22–28, 1996.
37. **Vane JR, Anggard EE, Botting RM.** Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323: 27–36, 1990.
38. **Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA.** Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9220–9225, 1998.
39. **Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC.** Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J* 18: 1746–1748, 2004.
40. **Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, Fossum TW, McDonald MM, Humphrey JD, Kuo L.** Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* 44: 935–943, 2004.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Vascular Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vph



Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation

Timea Beleznai^{a,b}, Zsolt Bagi^{a,*}^a Department of Pharmacology, University of Oxford, OX1 3QT, United Kingdom^b Division of Clinical Physiology, Institute of Cardiology, University of Debrecen, H-4032, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2011

Received in revised form 23 October 2011

Accepted 28 November 2011

Available online xxx

Keywords:

Hyperglycemia

Glucosamine

Hexosamine pathway

Diabetes mellitus

O-GlcNAcylation

Microvessel

ABSTRACT

We hypothesized that under high glucose conditions, activation of the hexosamine pathway leads to impaired nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilation. Skeletal muscle arterioles (diameter: ~160 μm) isolated from male Wistar rats were exposed to normal glucose (NG, 5.5 mmol/L) or high glucose concentrations (HG, 30 mmol/L, for 2 h) and agonist-induced diameter changes were measured with videomicroscopy. Western blots were performed to identify the vascular levels of protein O-linked-N-acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) and phosphorylated endothelial NO synthase (eNOS). In arterioles exposed to HG, dilations to histamine were abolished compared to those exposed to NG (max: -6 ± 6% and 69 ± 9%, respectively), while acetylcholine-induced responses were not affected. Inhibition of NO synthesis with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) reduced histamine-induced dilations in NG arterioles, but it had no effect on microvessels exposed to HG. Dilations to the NO donor, sodium nitroprusside and constrictions to norepinephrine and serotonin were similar in the two groups. In the presence of the inhibitor of hexosamine pathway, azaserine, histamine-induced dilations were significantly augmented in arterioles exposed to HG (max: 67 ± 2%). Moreover, exposure of vessels to glucosamine (5 mmol/L, for 2 h) resulted in reduced histamine-induced arteriolar dilations (max: 26 ± 3%). The level of protein O-GlcNAcylation was increased, whereas the P-eNOS (Ser-1177) was decreased in HG exposed vessels. These findings indicate that a high concentration of glucose may lead to glucosamine formation, which impairs histamine-induced, NO-mediated arteriolar dilations. We propose that interfering with the hexosamine pathway may prevent microvascular complications in diabetes.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Hyperglycemia is recognized as the primary cause in the pathogenesis of diabetic complications, such as abnormal microvascular reactivity, including impaired endothelium-dependent relaxation (Fulop et al., 2007a; Wells et al., 2003). Elevated blood glucose concentration results in increased intracellular glucose levels in various cell types, such as endothelial cells, because they are unable to limit glucose intake (Brownlee, 2005; Dominiczak, 2003; Gugliucci, 2000). Increased glucose concentration may lead to augmented glycosylation of various proteins that are important in the regulation of normal cellular homeostasis (Fulop et al., 2007b). Glycosylation is considered to be one of the key mechanisms responsible for the long-term consequences of diabetes. The O-linked enzymatic attachment of N-acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) on serine and threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins is a specific

form of glycosylation, which is a highly dynamic post-translational modification process (Hart et al., 2007). An increased O-GlcNAcylation of proteins is considered to be a major contributor to the etiology of various human diseases, such as hypertension (Lima et al., 2009b) and diabetes mellitus (Fulop et al., 2007a).

The level of O-GlcNAc formation is regulated, in part, by the metabolism of glucose via the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) (Buse et al., 2002; McClain, 2002; Ngoh et al., 2010; Patti et al., 1999; Ross et al., 2000). HBP is highly sensitive to changes in intracellular glucose concentration. Earlier studies in rodents have demonstrated that chronically elevated flux through the HBP leads to insulin resistance and glucose toxicity by hyperglycemia (Dias and Hart, 2007; Wang et al., 2007). There are two major nutrient inputs of glucose and glucosamine, and one rate-limiting enzyme glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) in the HBP (Hawkins et al., 1997; Traxinger and Marshall, 1991). It has been shown that adipocytes and muscle cells exposed to chronic high glucose levels in the presence of insulin develop insulin resistance, which can be prevented when adipocytes are incubated with a the inhibitor of GFAT (Marshall et al., 1991; McClain et al., 2002). An excessive flux through the HBP, results in many of the phenotypic characteristics of diabetes (McClain, 2002); however, the functional consequence of O-GlcNAcylation in microvessels is not clear.

Abbreviations: HBP, hexosamine biosynthetic pathway; GFAT, glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase; eNOS, endothelial NO synthase; O-GlcNAc, O-linked attachment of N-acetyl-glucosamine; OGT, O-linked N-acetylglucosaminyl-transferase.

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, University of Oxford, Mansfield Road, Oxford, OX1 3QT, UK. Tel.: +44 1865 271627; fax: +44 1865 271853.

E-mail address: zsolt.bagi@pharm.ox.ac.uk (Z. Bagi).

1537-1891/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.vph.2011.11.003

Please cite this article as: Beleznai, T., Bagi, Z., Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation, *Vascul. Pharmacol.* (2012), doi:10.1016/j.vph.2011.11.003

It has been shown that hyperglycemia impairs endothelium-dependent vasodilation in diabetic patients (Beleznai et al., 2011) and healthy human subjects (Picchi et al., 2010). Previously, we demonstrated that in the presence of chronic hyperglycemia (experimental type 1 diabetes) (Bagi and Koller, 2003) or acute elevation of glucose concentration elicits reduction of NO-mediated dilations in skeletal muscle arterioles of the rat, due to the impaired synthesis of NO (Bagi et al., 2004). The endothelial NO synthase (eNOS) is classified as a constitutive and Ca^{2+} /calmodulin-dependent enzyme. In addition to changes in intracellular levels of Ca^{2+} a number of post-translational mechanisms have been proposed to regulate eNOS activity, including phosphorylation of eNOS (Fleming and Busse, 1999). Interestingly, it has been found that high glucose and glucosamine caused a reduction in insulin-induced eNOS activity as a result of increased O-GlcNAcylation in human coronary endothelial cells in culture (Federici et al., 2002). Whether increased activation of HBP and augmented O-GlcNAcylation by high glucose concentrations affects NO-mediated vasomotor responses in resistance arteries is not known.

In this study we have tested the hypothesis that under high glucose conditions activation of the hexosamine pathway leads to O-GlcNAcylation of eNOS. This mechanism may prevent phosphorylation-dependent activation of eNOS and leads to a diminished NO-dependent arteriolar dilation. Isolated skeletal muscle arterioles were exposed to high glucose concentrations and agonist-induced changes in diameter were measured with videomicroscopy before and after interfering with NO synthesis and HBP pathway. Phosphorylation of eNOS was also detected to provide evidence for changes in phosphorylation of eNOS at Ser-1177, known to be associated with activation of enzyme activity.

2. Material and methods

Experiments were carried out on male Wistar rats ($n = 22$, weighing ~300 g). The animals were housed in the animal care facility and were fed standard rat chow and drank tap water *ad libitum* with a 12-h light–dark cycle. All experimental procedures were in compliance with the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. After overnight fasting, the rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg kg^{-1}) and the gracilis muscle was removed. The animals were then euthanized by an additional injection of sodium pentobarbital (150 mg kg^{-1}).

2.1. Measurement of diameter of isolated, cannulated and pressurized arterioles

With the use of microsurgical instruments and an operating microscope the gracilis muscle arteriole (~1.5 mm in length) was isolated and transferred into organ chambers containing two glass micropipettes filled with physiological salt solution (PSS), composed of (in mm) 110.0 NaCl, 5.0 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1.0 MgSO_4 , 1.0 KH_2PO_4 , 5.5 glucose and 24.0 NaHCO_3 , equilibrated with a gas mixture of 10% O_2 and 5% CO_2 , balanced with nitrogen, at pH 7.4. The vessels were cannulated at both ends and the micropipettes were connected with silicone tubing to a pressure servo control system (Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, U.S.A.) to set the intraluminal pressure to 80 mm Hg. The temperature was set at 37 °C by a circulating bath temperature controller (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, U.S.A.). Images were collected with a digital camera (CFW1310, Scion Corp., Frederick, MO, U.S.A.) connected to a microscope (Nikon, Eclipse 80i). The internal diameter at the midpoint of the isolated arteriole was measured offline by Image J software (NIH Image, Bethesda) (Bagi et al., 2002; Koller and Bagi, 2004).

2.2. Dilation to agonist

In the first series of experiments the gracilis muscle arterioles were exposed to PSS that contained 5.5 mmol/L glucose. During an

incubation period of 1 h at 37 °C, spontaneous myogenic tone developed in the isolated arterioles in response to the intraluminal pressure of 80 mm Hg. Cumulative concentrations of the endothelium-dependent vasodilator histamine (1 nmol/L–10 $\mu\text{mol/L}$), acetylcholine (Ach, 1 nmol/L–1 $\mu\text{mol/L}$) or endothelium-independent vasodilator sodium nitroprusside (SNP, 1 nmol/L–1 $\mu\text{mol/L}$) were administered to the vessels and changes in diameter were measured. Furthermore, vasoconstrictors that primarily act on smooth muscle cells, such as norepinephrine (NE, 0.3 nmol/L–1 $\mu\text{mol/L}$) and serotonin (5-HT, 0.1 nmol/L–1 $\mu\text{mol/L}$) were also applied. In a separate set of experiments the vessels were incubated with 30 mmol/L glucose or 5 mmol/L glucosamine (incubation time: 2 h) to investigate changes of agonist-induced arteriolar responses. As an osmotic control, mannitol (25 mmol/L) was administered and histamine-induced vasodilator response was reassessed. Histamine-induced dilations were also observed in the presence of inhibitor of NO-synthase, L-NAME (200 $\mu\text{mol/L}$, incubation for 20 min) with or without azaserine (20 μmol , incubation for 20 min), which is a glutamine analog and known to irreversibly inhibit fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) (Liu et al., 2007). Azaserine was also employed in glucosamine exposed arterioles and histamine-induced responses were reassessed.

2.3. Immunoblots

Branches of femoral arteries were dissected from Wistar rats, cleared of connective tissue. Vessels were exposed to normal and high glucose concentrations as well as glucosamine and incubated for 2 h after which they were snap frozen in liquid nitrogen. After the addition of 20 μl RIPA buffer (containing protease and phosphatase inhibitors) arteries were homogenized and 20 μl of Laemmli sample buffer was added (from Sigma Inc.). Immunoblot analysis was carried out as described before (Jebelovszki et al., 2008).

Primary antibodies were used for detection of O-GlcNAc (dilution 1:1000, CTD110.6, Conyance, USA) as well as for detection of protein expression of eNOS (anti-eNOS, Transduction, dilution 1:1000) and P-eNOS levels (anti-P-eNOS-Ser-1177, dilution 1:500, BD Biosciences). Anti- β -actin IgG obtained from Abcam Inc was used as loading control. Corresponding horseradish peroxidase labelled secondary antibodies were used and signals were revealed with chemiluminescence and visualized autoradiographically. Optical density of bands was quantified by using NIH Image software.

2.4. Drugs

All salts and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, U.S.A.). All solutions were prepared in distilled water and on the day of the experiment and final concentrations are reported.

2.5. Data analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (San Diego California USA) by two-way ANOVA repeated measures followed by Tukey's post-hoc test or Student's t-test as appropriate. Data are expressed as means \pm SEM. Agonist-induced arteriolar dilations were expressed as changes in arteriolar diameter as a percentage of the maximal dilation defined as the passive diameter of the vessel at 80-mm Hg intraluminal pressure in a Ca^{2+} -free medium. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of high glucose concentration on arteriolar dilations

In isolated, pressurized (80 mm Hg) gracilis muscle arterioles of the rat, active arteriolar tone developed (~30%) in response to intraluminal pressure without the use of any vasoactive agent. In comparison with

Please cite this article as: Beleznai, T., Bagi, Z., Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation, *Vascul. Pharmacol.* (2012), doi:10.1016/j.vph.2011.11.003

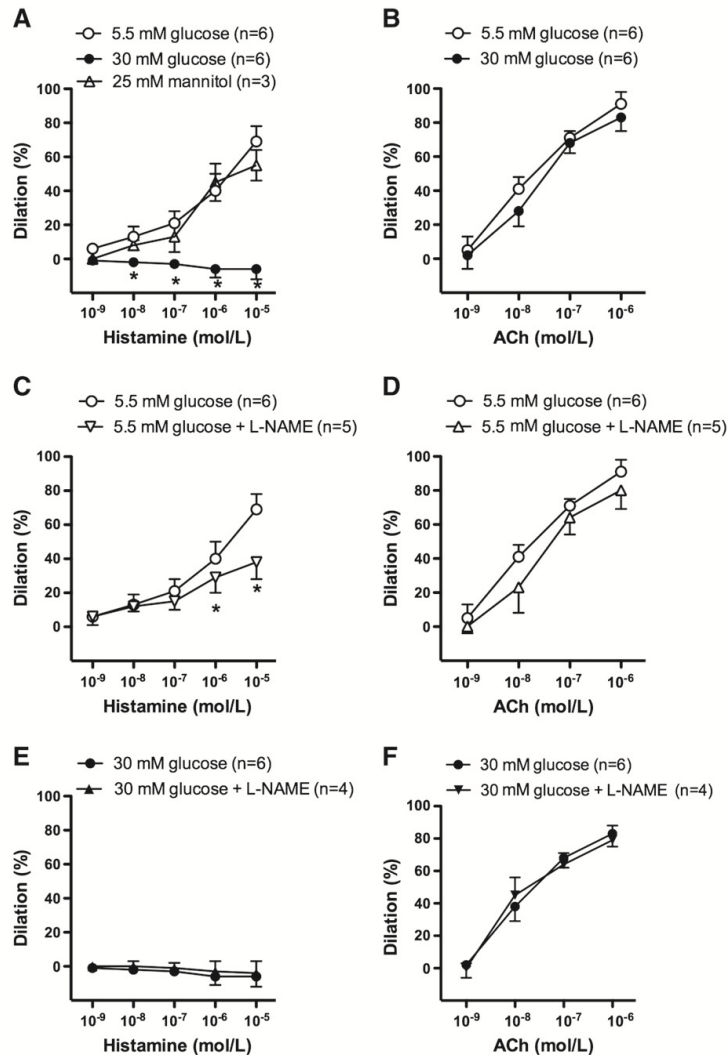


Fig. 1. Percent changes in diameter of gracilis muscle arterioles in response to cumulative concentration of histamine (1 nmol/L–10 μmol/L, Panels A, C and E) and acetylcholine (ACh, 1 nmol/L–10 μmol/L, Panels B, D and F) in the presence of normal (5.5 mmol/L) or high glucose concentrations (30 mmol/L) and in the absence or in the presence of NO synthase inhibitor L-NAME (100 μM). Data are in means ± S.E.M, significant differences: * $P \leq 0.05$.

the control responses, histamine-induced dilations were abolished in the presence of 30 mmol/L glucose (Fig. 1A), whilst response to another endothelium-dependent agonist, acetylcholine (ACh) was not affected (Fig. 1B). As an osmotic control, mannitol (25 mmol/L) was used and found without any effects on histamine-induced vasodilation (Fig. 1). Histamine-induced dilations were significantly reduced in the presence of the inhibitor of NO synthase (L-NAME, 200 μmol/L) (Fig. 1C), whereas L-NAME had no effect on high glucose-exposed vessels (Fig. 1E). L-NAME had no effect on ACh-induced arteriolar responses either in normal (Fig. 1D) or high glucose conditions (Fig. 1F).

There were no significant differences observed in response to the endothelium-independent vasodilator, sodium nitroprusside (Fig. 2A); furthermore, no differences were observed in vasoconstriction to norepinephrine (Fig. 2B) and serotonin (Fig. 2C) in normal and high glucose condition.

3.2. Activation of hexosamine-pathway contributes to abolished histamine-induced vasodilation in high glucose condition

The glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) is the rate-limiting enzyme in the conversion of fructose-6-phosphate to glucosamine-6-phosphate and can be irreversibly blocked by azaserine (Liu et al., 2007). We found that in the presence of azaserine (20 μmol/L), histamine-induced dilations were restored to the control level, even in the presence of high glucose (Fig. 3A). In the presence of azaserine, additional administration of NO synthase inhibitor, L-NAME significantly reduced the magnitude of histamine-induced dilations (Fig. 3A).

In separate experiments arterioles were incubated with glucosamine (5 mmol/L), a direct substrate of hexosamine-pathway. Glucosamine significantly reduced histamine-induced arteriolar dilations, to

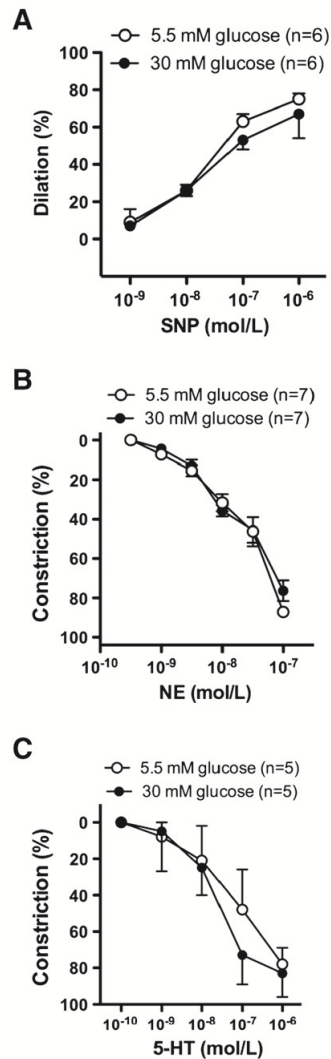


Fig. 2. Percent changes in diameter of gracilis muscle arterioles in response to cumulative concentration of sodium nitroprusside (SNP, 1 nmol/L–1 μ mol/L) (Panel A), norepinephrine (NE, 0.3 nmol/L–0.1 μ mol/L) (Panel B) and serotonin (0.1 nmol/L–1 μ mol/L) (Panel C) in the presence of normal (5.5 mmol/L) or high glucose concentration (30 mmol/L). Data are in means \pm S.E.M, significant differences: * $P < 0.05$.

similar extent, which was elicited by high glucose exposure (Fig. 3B). To test the specificity of azaserine we have examined histamine-induced dilations in the simultaneous presence of glucosamine and the GFAT-inhibitor azaserine. We have found that in the presence of glucosamine the abolished histamine-induced dilations were not significantly affected by azaserine treatment (Fig. 3B).

3.3. O-GlcNAc modification of proteins in arteries

In order to quantify the level of the protein O-GlcNAcylation, western blot analysis was performed in normal and high glucose conditions as well as in arteries exposed to glucosamine. For this assay we used larger femoral arteries for a more efficient and reliable detection of O-GlcNAcylation and P-eNOS levels in the vascular wall;

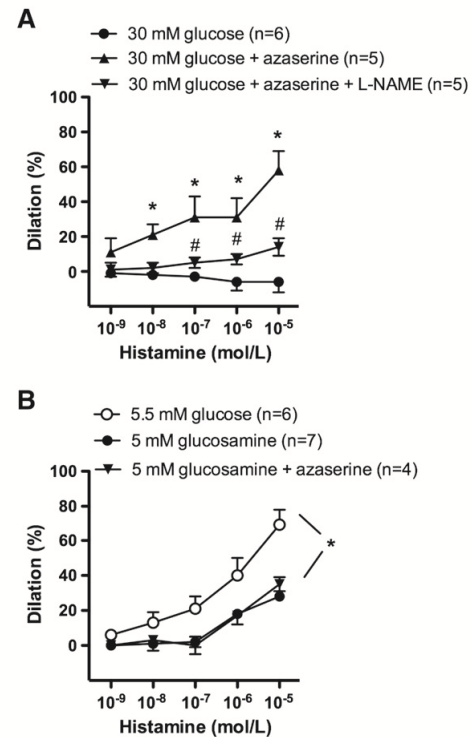


Fig. 3. Percent changes in diameter of gracilis muscle arterioles in response to cumulative concentration of histamine (1 nM–10 μ M) in the presence of high glucose concentration before and after incubations with GFAT inhibitor, azaserine (20 μ mol/L) or in combination with NO synthase inhibitor, L-NAME (Panel A). Percent changes in diameter of gracilis muscle arterioles in the presence of glucosamine (5 mmol/L) and in the simultaneous presence of glucosamine and the GFAT inhibitor, azaserine (Panel B). Data are in means \pm S.E.M, significant differences: * $P < 0.05$.

therefore these data could not directly be extrapolated to microvessels and as such should be interpreted cautiously. We found increases in protein O-GlcNAcylation in high glucose and also glucosamine exposed femoral arteries, when compared with the normal glucose condition (Fig. 4A and B). We observed increased protein O-GlcNAcylation of various proteins, including those ~140 kDa molecular weight proteins that could represent eNOS.

3.4. Detection of P-eNOS (Ser-1177) in rat arteries in the presence of high glucose

We sought to determine the effect of high glucose on the phosphorylation state of eNOS. To this end, arteries were exposed to 5.5 mmol/L and 30 mmol/L glucose concentration and then P-eNOS (Ser-1177) levels were detected by Western immunoblots. Whilst the level of eNOS protein remained unchanged (Fig. 4D), the level of P-eNOS (Ser-1177) was significantly decreased in high glucose exposed arteries compared to that of normal glucose exposed vessels (Fig. 4C and E).

4. Discussion

This study demonstrates that increased flux through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) leads to enhanced O-GlcNAcylation of eNOS under condition of high glucose, which interferes with NO-dependent arteriolar dilation (Beleznai et al., 2008). This conclusion is supported by the findings that 1) in gracilis muscle arterioles of the rat histamine caused an abolished vasodilation in the presence of high

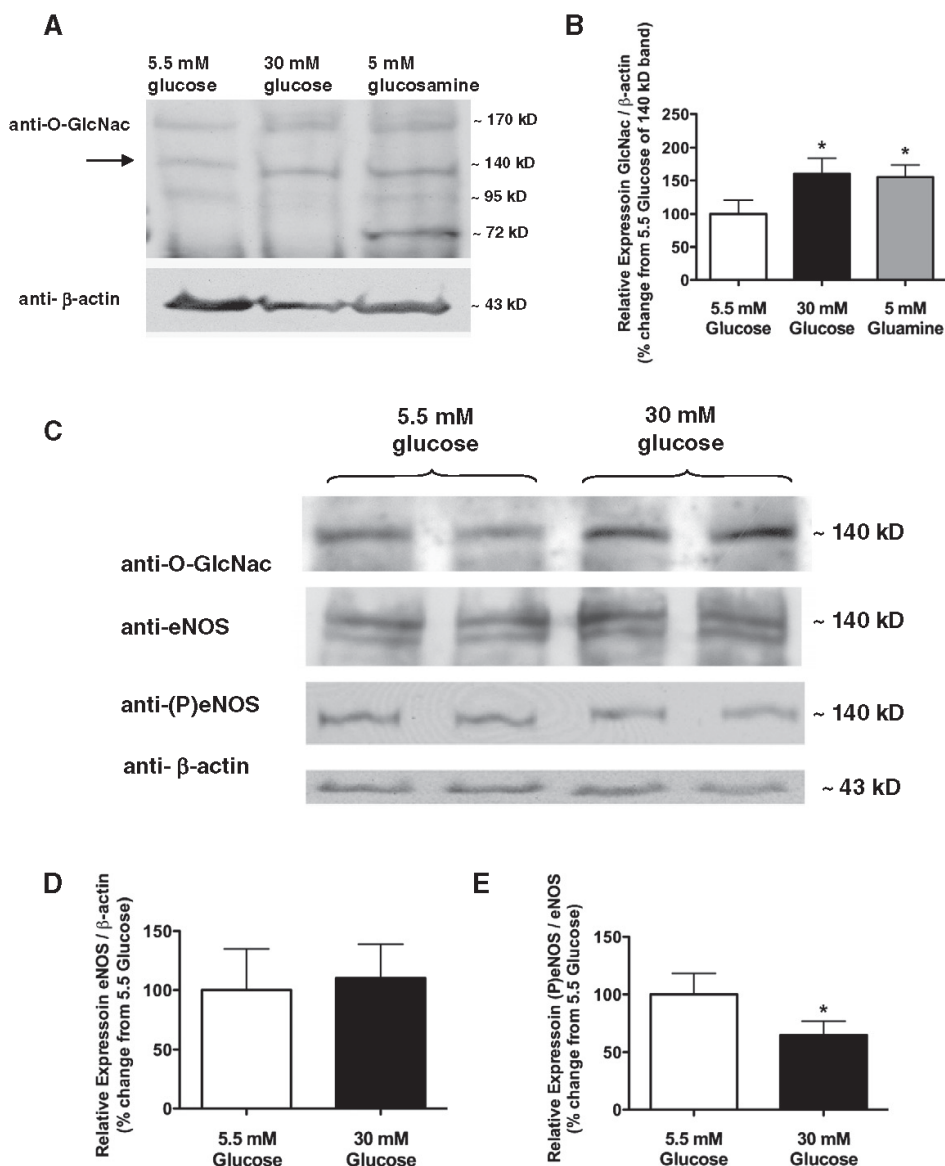


Fig. 4. Representative Western blots (Panel A) and summary data (Panel B) show O-GlcNac formation in skeletal muscle arteries exposed to normal (5.5 mmol/L), high glucose concentration (30 mmol/L) and also to glucosamine (5 mmol/L). Western blots (Panel C) and summary data (Panel D and E) of normalized densitometry ratios from four independent experiments show O-GlcNac, eNOS and P-eNOS-Ser1177 levels. β -actin was used for normalizing of loading variations.

glucose, 2) which was restored by incubation with azaserine, an inhibitor of GFAT. 3) A significant increase in protein O-GlcNAcylation was found in high glucose- and glucosamine-exposed vessels, when compared with the normal glucose. 4) Arteries exposed to high glucose exhibited a decreased phosphorylation of eNOS on the site of Ser-1177, whilst the level of eNOS remained unchanged.

The hexosamine biosynthetic pathway is a unique form of glycosylation and exemplifies one such accessory pathway for glucose metabolism (Marshall et al., 1991). The relative flux through HBP and consecutive O-GlcNAcylation of proteins is still not entirely understood in the vasculature. It has been shown that increased O-GlcNAc level is associated with increased vasoconstrictor reactivity and impaired endothelium-dependent relaxation in aorta of deoxycorticosterone acetate (DOCA)-

induced hypertensive rats (Lima et al., 2009a). Interestingly, aorta from these hypertensive rats also exhibited decreased levels of P-eNOS(Ser-1177) and P-Akt(Ser-473) (Lima et al., 2009a). There is experimental evidence of competitive occupancy at the same site for eNOS, which can be either O-GlcNAc modified or phosphorylated (Du et al., 2001). In this context, it was shown that elevated O-GlcNAcylation of eNOS inhibited its phosphorylation-dependent activation by Akt, suggesting that the site of O-GlcNAcylation is at or near the Akt phosphorylation site (Du et al., 2001). In diabetes, O-GlcNAcylation of eNOS has been implicated in erectile dysfunction; as it was demonstrated that erectile dysfunction is associated with hyperglycemia-induced increase in O-GlcNAc modification and decreased phosphorylation of eNOS at Ser-1177 in the penis of diabetic rats (Musicki et al., 2005). Furthermore, in the aorta of rats

Please cite this article as: Beleznai, T., Bagi, Z., Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation, *Vascul. Pharmacol.* (2012), doi:10.1016/j.vph.2011.11.003

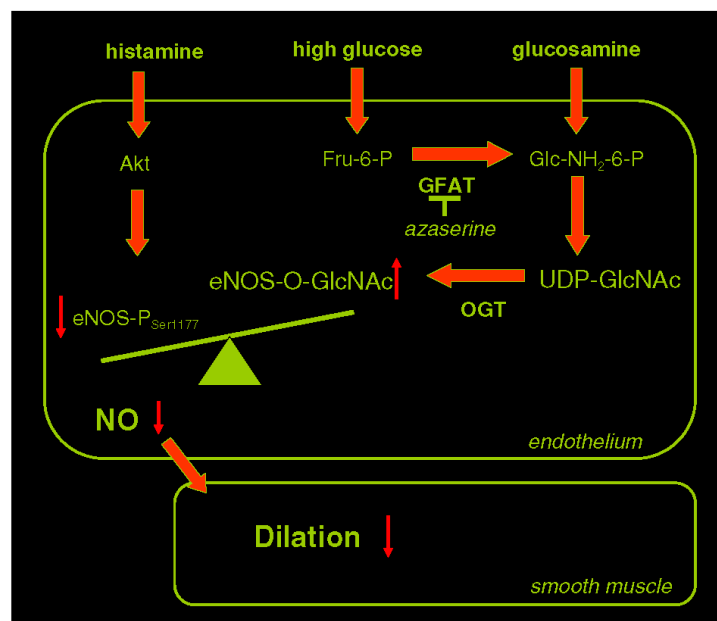


Fig. 5. Schematic draw demonstrates that increased flux through the hexosamine biosynthetic pathway leads to enhanced O-GlcNAcylation of eNOS in condition of high glucose, which interferes with eNOS-Ser1177 phosphorylation by Akt to reduce histamine-induced, NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles. GFAT: glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase, O-GlcNAc: O-linked attachment of N-acetylglucosamine, OGT: O-linked N-acetylglucosaminyl-transferase.

with streptozotocin (STZ)-induced diabetes, increased O-GlcNAc modification of eNOS and inhibition of its activity was observed (Du et al., 2001). In the study by Federici et al. impaired activation of eNOS by Akt was found in cultured human coronary artery endothelial cells exposed to hyperglycemia (Federici et al., 2002). Taken together, evidence indicates that eNOS activation could be limited by O-GlcNAcylation and consequent phosphorylation deficit. Yet, no study has demonstrated whether these mechanisms contribute to impaired endothelium-dependent dilation of intact microvessels and that this is responsible for high glucose-induced impairment of NO production.

Previously, we demonstrated that hyperglycemia impairs endothelium-dependent vasodilation in coronary arterioles of diabetic patients (Beleznai et al., 2011). We also showed that the presence of chronic hyperglycemia (Bagi and Koller, 2003) or acute, 1–2 hour elevation of glucose concentration elicits reduction of NO-mediated dilations in skeletal muscle arterioles of the rat, which is due to the impaired synthesis of NO (Bagi et al., 2004). Histamine has been shown to cause the release of NO in several vascular beds (Weksler et al., 1978). The histamine-induced relaxation is endothelium-dependent and it is mediated by endothelial H₁ receptors (Jansen-Olesen et al., 1997; Toda, 1990). Histamine was chosen to examine the effect of high glucose on eNOS activity because we have shown previously that NO synthase inhibitor, L-NAME had a more pronounced effect on histamine-induced dilation in skeletal muscle arterioles, which suggests NO as an important mediator of the histamine response (Erdei et al., 2006).

In the present study we found that exposure of skeletal muscle arterioles to high glucose or to glucosamine leads to abolished, histamine-induced, NO-mediated dilations. In contrast, arteriolar dilation to ACh, which is less dependent on NO, but mediated primarily by endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in skeletal muscle microvessel (Erdei et al., 2006), was not affected by high

glucose concentrations. The smooth muscle-dependent vasoregulatory pathways, such as those induced by NO donor or elicited by vasoconstrictors, such as norepinephrine or serotonin also were not affected by high glucose. Thus, it is plausible that high glucose-induced changes in vasomotor responsiveness of skeletal muscle arterioles are specific for altered NO synthesis and do not impair EDHF type of dilation or augment vasoconstrictor signaling pathways.

In addition to these functional changes we demonstrated an increased O-GlcNAcylation of proteins in the vascular wall upon exposure the vessels to high glucose. In parallel, a reduced phosphorylation of Ser-1177 of eNOS has been detected. In this context, Zhang et al. has recently demonstrated that exposure of porcine aortic endothelial cells to high glucose concentrations inhibited eNOS phosphorylation at Ser-1177 and also dephosphorylation at Thr-495 induced by bradykinin (Zhang et al., 2010). Thus, it is possible that O-GlcNAcylation interferes with both activation and inhibitory sites of eNOS. Based on our functional experiments it seems that the net results of high glucose-induced O-GlcNAcylation are the inhibitions of NO synthesis. Whether the Thr-495 inhibitory site is O-GlcNAcyated and whether this affects NO synthesis in microvessels has yet to be elucidated. Because inhibition of GFAT by azaserine restored the impaired NO-mediated dilation in high glucose condition, but did not prevent detrimental effects of glucosamine, we concluded that eNOS activation could be limited by the activation hexosamine pathway and subsequent O-GlcNAcylation of eNOS in skeletal muscle arterioles (Fig. 5). Our results are in accordance with previous observations obtained in large vessels (Du et al., 2001) or in cultured endothelial cells (Federici et al., 2002; Zhang et al., 2010) and extend these findings towards those intact resistance arteries. Further studies are needed to provide experimental evidence whether O-GlcNAcylation of eNOS and consequently impaired NO synthesis alters vasoreactivity of resistance arteries *in vivo* and whether this mechanism

could contribute to increased vascular resistance and the development of hypertension or other microvascular complications that are associated with diabetes mellitus.

5. Conclusions

Collectively, our present findings suggest an important functional role for O-GlcNAcylation in interfering with the phosphorylation of Ser-1177 site on eNOS in microvessels. Thus, in diabetes, interfering with hexosamine biosynthetic pathway may prevent or delay the development of dysfunction in resistance arteries.

Conflict of interest statement

For both authors, no conflict of interest is declared.

Acknowledgments

The technical assistance of Marta Balogh and Ibolya Rutkai is gratefully acknowledged. ZB acknowledges the support from the British Heart Foundation, Centre of Research Excellence, Oxford (RE/08/004).

References

- Bagi, Z., Koller, A., 2003. Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type I diabetes is restored by sepiapterin. *J. Vasc. Res.* 40 (1), 47–57.
- Bagi, Z., Ungvari, Z., Koller, A., 2002. Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species convert flow-induced arteriolar dilation to constriction in hyperhomocysteinemia: possible role of peroxynitrite. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (1), 28–33.
- Bagi, Z., Toth, E., Koller, A., Kaley, G., 2004. Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH(4). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (2), H626–H633.
- Beleznai, T., Feher, A., Rutkai, I., Edes, I., Bagi, Z., 2008. O-linked-n-acetylglucosamine formation reduces nitric oxide-dependent dilation in arterioles exposed to high glucose concentrations. *Circulation*, Vol. 118, p. S. 552.
- Beleznai, T., Feher, A., Spielvogel, D., Lansman, S.L., Bagi, Z., 2011. Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300 (3), H777–H783.
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54 (6), 1615–1625.
- Buse, M.G., Robinson, K.A., Marshall, B.A., Hresko, R.C., Mueckler, M.M., 2002. Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (2), E241–E250.
- Dias, W.B., Hart, G.W., 2007. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol. Biosyst.* 3 (11), 766–772.
- Dominiczak, M.H., 2003. Obesity, glucose intolerance and diabetes and their links to cardiovascular disease. Implications for laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (9), 1266–1278.
- Du, X.L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., Brownlee, M., 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J. Clin. Invest.* 108 (9), 1341–1348.
- Erdei, N., Toth, A., Pasztor, E.T., Papp, Z., Edes, I., Koller, A., Bagi, Z., 2006. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (5), H2107–H2115.
- Federici, M., Menghini, R., Mauriello, A., Hribal, M.L., Ferrelli, F., Lauro, D., Sbraccia, P., Spagnoli, L.G., Sesti, G., Lauro, R., 2002. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106 (4), 466–472.
- Fleming, I., Busse, R., 1999. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc. Res.* 43 (3), 532–541.
- Fulop, N., Marchase, R.B., Chatham, J.C., 2007a. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 73 (2), 288–297.
- Fulop, N., Mason, M.M., Dutta, K., Wang, P., Davidoff, A.J., Marchase, R.B., Chatham, J.C., 2007b. Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (4), C1370–C1378.
- Gugliucci, A., 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 100 (10), 621–634.
- Hart, G.W., Housley, M.P., Slawson, C., 2007. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446 (7139), 1017–1022.
- Hawkins, M., Barzilai, N., Liu, R., Hu, M., Chen, W., Rossetti, L., 1997. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 99 (9), 2173–2182.
- Jansen-Olesen, I., Ottosson, A., Cantera, L., Strunk, S., Lassen, L.H., Olesen, J., Mortensen, A., Engel, U., Edvinsson, L., 1997. Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human cranial arteries and detection of mRNA encoding H1- and H2-receptors by RT-PCR. *Br. J. Pharmacol.* 121 (1), 41–48.
- Jebelovszki, E., Kiraly, C., Erdei, N., Feher, A., Pasztor, E.T., Rutkai, I., Forster, T., Edes, I., Koller, A., Bagi, Z., 2008. High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (6), H2558–H2564.
- Koller, A., Bagi, Z., 2004. Nitric oxide and H2O2 contribute to reactive dilation of isolated coronary arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (6), H2461–H2467.
- Lima, V.V., Giachini, F.R., Choi, H., Carneiro, F.S., Carneiro, Z.N., Fortes, Z.B., Carvalho, M.H., Webb, R.C., Tostes, R.C., 2009a. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension* 53 (2), 166–174.
- Lima, V.V., Rigby, C.S., Hardy, D.M., Webb, R.C., Tostes, R.C., 2009b. O-GlcNAcylation: a novel post-translational mechanism to alter vascular cellular signaling in health and disease: focus on hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* 3 (6), 374–387.
- Liu, J., Marchase, R.B., Chatham, J.C., 2007. Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42 (1), 177–185.
- Marshall, S., Bacote, V., Traxinger, R.R., 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 266 (8), 4706–4712.
- McClain, D.A., 2002. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J. Diabetes Complications* 16 (1), 72–80.
- McClain, D.A., Libas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C., Hanover, J.A., 2002. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (16), 10695–10699.
- Musicki, B., Kramer, M.F., Becker, R.E., Burnett, A.L., 2005. Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (33), 11870–11875.
- Ngoh, G.A., Facundo, H.T., Zafir, A., Jones, S.P., 2010. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 107 (2), 171–185.
- Patti, M.E., Virkamaki, A., Landaker, E.J., Kahn, C.R., Yki-Jarvinen, H., 1999. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* 48 (8), 1562–1571.
- Picchi, A., Capobianco, S., Qiu, T., Focardi, M., Zou, X., Cao, J.M., Zhang, C., 2010. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: a review. *World J. Cardiol.* 2 (11), 377–390.
- Ross, S.A., Chen, X., Hope, H.R., Sun, S., McMahon, E.G., Broschat, K., Gulve, E.A., 2000. Development and comparison of two 313-L1 adipocyte models of insulin resistance: increased glucose flux vs glucosamine treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 (3), 1033–1041.
- Toda, N., 1990. Mechanism underlying responses to histamine of isolated monkey and human cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 258 (2 Pt 2), H311–H317.
- Traxinger, R.R., Marshall, S., 1991. Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *J. Biol. Chem.* 266 (16), 10148–10154.
- Wang, Z., Pandey, A., Hart, G.W., 2007. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics* 6 (8), 1365–1379.
- Weksler, B.B., Ley, C.W., Jaffe, E.A., 1978. Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *J. Clin. Invest.* 62 (5), 923–930.
- Wells, L., Vosseller, K., Hart, G.W., 2003. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol. Life Sci.* 60 (2), 222–228.
- Zhang, X.H., Yokoo, H., Nishioka, H., Fujii, H., Matsuda, N., Hayashi, T., Hattori, Y., 2010. Beneficial effect of the oligomerized polyphenol oligonol on high glucose-induced changes in eNOS phosphorylation and dephosphorylation in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 159 (4), 928–938.

Please cite this article as: Beleznai, T., Bagi, Z., Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation, *Vascul. Pharmacol.* (2012), doi:10.1016/j.vph.2011.11.003