

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A MIKROEREK VAZOMOTOR MŰKÖDÉSÉNEK
VIZSGÁLATA AZ ELHÍZÁS ÁLLATKÍSÉRLETES
MODELLJEIBEN**

DR. FEHÉR ATTILA



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2011**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1 Az endothel és a simaizomsejt keringésszabályozó szerepe élettani körülmények között....	6
2.2 Perifériás mikroerek működése elhízásban	9
2.3 Koronária mikroerek működése elhízásban	11
2.4 Megváltozott Rho kináz funkció elhízásban	14
2.5 A resveratrol vazoprotektív hatása	15
2.6 A caveolinok és a kalcium aktiválta kálium csatornák szerepe elhízásban.....	16
3. METODIKÁK.....	20
3.1 Az elhízás állatkísérletes modelljei	20
3.2 Analitikai módszerek.....	21
3.3 Izolált mikroértechnika.....	21
3.4 Az arterioláris funkció vizsgálata vazoaktív szerekkel	23
3.5 Az érfali szabadgyök termelés mérése	26
3.6 A Rho kináz aktivitás mérése	26
3.7 Immunohisztokémia	27
3.8 Western immunoblot	27
3.9 Statisztika	28
4. EREDMÉNYEK	29
4.1 Vázizom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízásban.....	29
4.2 Koronária arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízásban.....	38
4.3 A megtartott koronária mikroérműködés hátterében álló folyamatok vizsgálata.....	46
5. MEGBESZÉLÉS.....	52
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	66
7. IRODALOMJEGYZÉK	67
8. TÁRGYSZAVAK	80
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84
10. FÜGGELÉK.....	85

1. BEVEZETÉS

Az elhízás az anyagcsere-folyamatokban bekövetkező változás, amely során az emberi testben olyan mennyiségű zsírszövet halmozódik fel, amely számos megbetegedéshez vezethet, csökkent várható élettartammal, valamint megnövekedett mortalitással társul (Haslam, 2005). Az elhízás napjaink társadalmának igen nagy kihívást jelentő problémája. Világszerte 1,7 milliárd ember súlyosabb a kelleténél, és az elhízás prevalenciája folyamatosan nő; napjainkban már a fiatal felnőttek és a gyerekek körében is igen elterjedt (Deitel, 2003). Az elhízás definiálásában a testtömeg-index (BMI, body mass index) nyújt segítséget, amelyet a kilogrammban mért súly és a méterben mért magasság négyzetének hányadosa ad meg. Túlsúlyosnak tekinthető az a felnőtt, akinek BMI értéke 25 és 29,9 között van, míg elhízásról 30-nál nagyobb BMI esetén beszélhetünk. Egy nemrégiben elkészült széleskörű tanulmány alapján az Amerikai Egyesült Államokban az elhízottak aránya 33,8 %-nak bizonyult (Flegal, 2010). Ettől is megdöbbentőbb tény, hogy az amerikai társadalomban 68 % a túlsúlyosak és az elhízottak együttes (BMI nagyobb, mint 25) aránya (Flegal, 2010). Egy nemrégiben közölt tanulmány alapján Magyarországon az elhízottak aránya a férfiak körében 11,6 %, míg a nők körében 18,3 %-nak bizonyult (Devaux, 2011). Még riasztóbb adat, hogy Európaszerte 20 %-ra tudható a fiatalok körében az elhízottak és a túlsúlyosak aránya (van Stralen, 2011).

Jól ismert, hogy az elhízás megnövekedett szívérrendszeri morbiditással és mortalitással társul (Calle, 1999; Rexrode, 1998), és hogy a túlsúly a magas vérnyomás, a koronária szívbetegség és az angina pectoris kialakulásának megnövekedett kockázatával jár (Wilson, 2002). Az is általánosan elfogadott tény, hogy a hosszú ideig fennálló elhízás

talaján a koronária nagyerekben atheroszklerózis alakul ki, amely nagymértékben hozzájárul a kardiovaszkuláris mortalitás növekedéséhez. Újabb vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az elhízás során már a nagy erek atheroszklerózisa előtt elváltozások jelennek meg a mikroerek szintjében, azonban mindezekig nem tisztázott ezen elváltozások pontos mibenléte, illetve kialakulásuk mechanizmusa.

A rezisztencia erek sajátossága, hogy bizonyos élettani stimulusokra dilatációval illetve konstriktóval reagálnak, ezáltal biztosítva a változó metabolikus igényeknek megfelelő vérellátást illetve kialakítva az erek perifériás ellenállását, amely a szisztémás vérnyomás egyik legmeghatározóbb tényezője (Koller, 2002). Ismert, hogy a mikroerek átmérőjének befolyásolásában fontos szerepet játszanak azon folyamatok, amelyek különböző vazóaktív anyagok lokális, illetve szisztémás felszabadításán keresztül fejtik ki hatásukat. A mikroerek átmérőjének szabályzásában mindezek mellett kiemelkedően fontos szereppel bírnak az érfali simaizom és az endothel által közvetített folyamatok.

Korábbi vizsgálatok kísérletes eredménnyel szolgálnak arról, hogy magas vérnyomásbetegség illetve diabetes mellitus fennállása során károsodik a mikroerek simaizom és endothel által mediált vazomotor működése (Bagi, 2003; Koller, 1994). Meglehetősen kevés bizonyíték áll rendelkezésünkre azonban azzal kapcsolatban, hogy hogyan is alakul a mikroér működés elhízás során, különös tekintettel az eltérő szövetek mikrokeringésében fennálló potenciális különbségekre.

Mindezek alapján tudományos kutatásaim során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg.

1. Az elhízás állatmodelljében megvizsgáljam a rezisztencia erek - simaizom és endothel által közvetítette - vazomotor működésében

bekövetkező változásokat, különös tekintettel a vázizom és a koronária mikroérfunkcióra.

2. Feltárjam az elhízás során kialakuló rezisztenciaér elváltozásokban szerepet játszó lehetséges mechanizmusokat, tanulmányozzam a háttérben álló molekuláris folyamatokat.

3. Továbbá, hogy megvizsgáljam olyan farmakológiai anyagok mikroérműködésre gyakorolt hatását, amelyeknek szerepe lehet az elhízás során potenciálisan jelentkező mikroér diszfunkció helyreállításában.

Kísérleteim eredményei és az azokból levonható következtetések segíthetnek abban, hogy világosabb képet kapjunk az elhízás során jelentkező mikroérrendszeri elváltozások mibenlétéről és az azok háttérében zajló kórélettani folyamatok természetéről. A rezisztencia erek elváltozásainak pontos ismeretében lehetőség nyílhat a mikroérműködést befolyásoló célzott terápia kidolgozására, amely hozzájárulhat az elhízással járó társbetegségek megelőzéséhez, gyógyításához.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

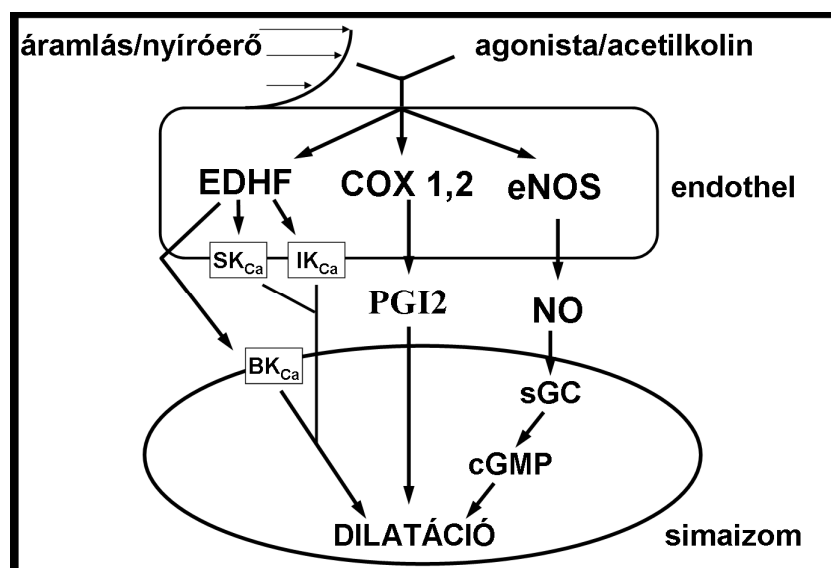
2.1 Az endothel és a simaizomsejt keringésszabályozó szerepe élettani körülmények között

A vaszkuláris endothel nem csak egy ereket bélelő barrier, amely kontrollálja a vérárvadási mechanizmusokat, a vérlemezke és a leukocita adhézio folyamatát, hanem fontos élettani feladata a vérkeringés lokális szabályozása. Az endothel különböző fiziológiás stimulusokra értágító és érszűkítő anyagok szintézisével, felszabadításával válaszol, amelyek a simaizomsejteken kifejtett hatásuk segítségével szabályozzák az adott terület vérellátását, a szöveti perfúziót. A mikroerek további sajátossága a szenzoros funkció, melynek során az endothel membrán-receptor-függő és független mechanizmusok révén érzékeli a hemodinamikai változásokat. A lokális keringésszabályozásnak fontos szerepe van a szövetek vérellátásának biztosításában, melyet a vérnyomás változása esetén a fokozódó anyagcsere igényekhez igazít, ezáltal a véráramlás függetlenné válik a vérnyomás pillanatnyi változásaitól. A mikroérműködés szoros metabolikus igényekhez való hangolódása az endothel és az érfali simaizomsejtek szoros együttműködése révén valósulhat meg.

Az ép endothel számos agonista válaszában kiváltásához elengedhetetlen fontosságú (Furchgott, 1980) és emellett részt vesz a koaguláció és a fibrinolízis közti egyensúly létrehozásában, a szubendotheliális mátrix kialakításában, a leukociták adhéziójában és extravazációjában, illetve az érfal gyulladásos folyamataiban (Schalkwijk, 2005). Az ép endothel jelenlétében a mikroerek átmérője szignifikánsan nagyobb, mint ugyanazon éren endothel fosztást követően. Ezen jelenség az endotheliális faktorok keringési ellenállás kialakításában

játszott szerepét bizonyítja. Az endothelium regulatórikus mediátorokat is szekretál, mint pl. nitrogén-monoxidot (NO), prosztanoidokat, endothelin-1-et, angiotenzin 2-t, szöveti plazminogén aktivátort, von Willebrand faktort, adhéziós molekulákat és citokineket.

Az endothelium mediálta dilatáció három fő útvonala a NO, a prosztaciklin (PGI₂) és az endothel eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) által kiváltott (1. ábra).



1. ábra. Az endothel dependens dilatáció fő útvonalai. EDHF: endothel eredetű hiperpolarizáló faktor, SK_{Ca} alacsony konduktanciájú kalcium aktiválta kálium csatorna, IK_{Ca} közepes konduktanciájú kalcium aktiválta kálium csatorna, BK_{Ca} nagy konduktanciájú kalcium aktiválta kálium csatorna, COX: ciklooxigenáz, PGI₂: prosztaciklin, eNOS: endotheliális nitrogén monoxid szintáz, NO: nitrogén monoxid, sGC: szolubilis guanilát cikláz, cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

A NO szignál útvonala az endotheliális NO szintáz (eNOS) aktivációjával indul, amely L-arginin és molekuláris oxigén felhasználásával NO-t és L-citrullint állít elő. A NO a simaizomsejtbe diffundálva aktiválja célfehérjét, a szolubilis guanilát cikláz. A NO nem csupán vazodilatációt idéz elő, de részt vesz más, a keringés számára nem kevésbé jelentős folyamatok kialakításában: pl. a vaszkuláris simaizomsejt migrációjának és növekedésének gátlásában, a trombocita aggregáció és a trombózis megakadályozásában, illetve a monocita és makrofág adhézió és az általuk kiváltott gyulladás gátlásában (Caballero, 2003).

A proszttaglandinok közül a prosztaciklin az endothel által szintetizált fő vazodilatátor prosztanoid, amelyet a ciklooxygenáz állít elő arachidonsavból. A prosztaciklin receptorához kötődve a simaizomban Gs-proteint aktivál, amely az adenilát-cikláz aktivitásának fokozódásán keresztül a cAMP szint emelkedéséhez, majd következményes vazodilatációhoz vezet. Mikroerek esetében azt feltételezik, hogy élettani körülmények között a ciklooxygenáz útvonal meglehetősen kevés szereppel bír az agonista indukált, endothelium-dependens dilatáció kiváltásában (Komaru, 2000).

Az endothel közvetítette dilatáció harmadik fő útvonala az endothel eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) által mediált. Az EDHF definíció szerűen a nem NO, nem prosztaciklin eredetű endothelből származó vazodilatátor faktor, amely vaszkuláris kálium-csatornák nyitásán keresztül vezet az érfal simaizomzatának hiperpolarizációjához (Triggle, 2004). Habár az EDHF természete mindezidáig nem tisztázott, a mikroerek átmérőjének szabályozásában betöltött szerepe vitathatatlan. Az EDHF háttérében álló jelöltek száma szinte megszámlálhatatlan, közülük talán a legfontosabbak az epoxieikozatriénsavak, az

izoprosztánok, az endogén kannabinoid anandamid, a kálium ion és a hidrogén-peroxid (Triggle, 2004).

Az endothel mellett az érfali simaizomsejtek játszanak kiemelten fontos szerepet a mikroérkeringésben bekövetkező érválaszok kialakításában. Az endothel által termelt vazoaktív anyagok a simaizomsejteken fejtik ki értágító illetve érszűkítő hatásukat. A NO útvonal során a NO a simaizomsejtbe diffundálva aktiválja célfehérjét, a szolubilis guanilat ciklázt, amely cGMP termelésén keresztül vezet a mikroerek dilatációjához. Míg az EDHF természetének mibenlétét továbbra is homály borítja, a kísérletes bizonyítékok arra utalnak, hogy a simaizomban található nagy konduktanciájú kálium csatornák illetve az endothel és a simaizom között fennálló mioepithelialis gap junction struktúrák kiemelt szerepet játszanak kialakításában. A keringő és a lokálisan felszabaduló vazokonstriktor hatású anyagok (noradrenalin, angiotenzin 2, tromboxán, endothelin) szintén a simaizomsejteken található receptorokon keresztül fejtik ki vazoaktív hatásukat.

Az endothel és a simaizom összetett, egymással együttműködő és kölcsönhatásban álló folyamatainak megbomlott egyensúlya bizonyos körülmények között a mikroerek kóros működéséhez, ún. mikroér diszfunkcióhoz vezethet. A mikroér diszfunkció során megbomlik a vazodilatátor (NO, prosztaciklin, EDHF) és vazokonstriktor (Ang 2, endothelin-1, vazokonstriktor prosztaglandinok) anyagok között fennálló egyensúly, amely a vazodilatátor mechanizmusok beszűküléséhez, illetve következményesen a szöveti perfúzió csökkenéséhez vezethet.

2.2 Perifériás mikroerek működése elhízásban

A humán elhízáshoz igen gyakran társulnak olyan társbetegségek, pl. magas vérnyomás, amelyek kritikus változásokat idézhetnek elő a

mikroérműködés szempontjából. Általánosan elfogadott tény, hogy a hosszú ideig fennálló hipertónia talaján a betegekben vaszkuláris diszfunkció alakul ki, amely nagy mértékben hozzájárulhat a fokozott kardiovaszkuláris rizikó kialakulásához (Ceravolo, 2003; Palombo, 2000). Több kísérletes bizonyíték utal arra, hogy az elhízás során a magas vérnyomás betegségtől függetlenül is károsodhat az endothelium által szabályozott vazomotor működés. Humán ereken kimutatták, hogy az elhízás során károsodik a hiperémia kiváltotta alkari áramlásnövekedés (Hashimoto, 1998; Vigili de Kreutzenberg, 2003) és ez az összefüggés már elhízott gyerekek esetében is megfigyelhető (Kapiotis, 2006). Nem elhízott egyéneknél már átlagosan 4,1 kg-os testsúlynövekedés károsítja az áramlás indukálta dilatációt, ami visszafordítható az említett testsúlygyarapodás elvesztésével (Romero-Corral, 2010). Ezek a megfigyelések bizonyítják, hogy az elhízás, kísérő társbetegségek jelenléte nélkül is a konduktív erek károsodott vazomotor működésével társulhat. Egy 90-es években elvégzett kísérletsorozat azt is kimutatta, hogy a perifériás érellenállás fordítottan arányos a BMI-vel, míg a nagyobb csípő-körfogat arány megnövekedett perifériás vaszkuláris rezisztenciával társul (Jern, 1992).

Az elhízás állatkísérletes modelljeiben megfigyelhető a rezisztencia erek károsodott funkciója, amely kiváló lehetőséget nyújt a háttérben zajló, emberben nehezen tanulmányozható patológiai folyamatok feltérképezésére. Az elhízott betegekhez hasonlóan, az obez Zucker patkányokból izolált mezenteriális (Oltman, 2006) és vázizom (Frisbee, 2001) arteriolák károsodott endothelium dependens dilatációval rendelkeznek. Obez Zucker patkányokban azt is kimutatták, hogy mezenteriális erekben az acetilkolin (ACh) kiváltotta, endothelium dependens dilatáció jóllehet 20 hetes korban még megtartott, de 32 hetes korban már károsodást mutat, ami a vazomotor diszfunkció korral

előrehaladó progressziójára utalhat (Subramanian, 2003). Elhízott JCRA:LA-cp patkányokban is kimutatták a mezenterialis erek károsodott ACh dependens dilatációját (O'Brien, 1998). Ezek alapján elmondható, hogy a kísérletes eredmények arra utalnak, hogy elhízás során károsodhat a perifériás rezisztencia erek működése, azonban a megváltozott mikroérműködés hátterében álló folyamatok, illetve az azt kiváltó tényezők nem kellőképpen tisztázottak.

2.3 Koronária mikroerek működése elhízásban

Ahhoz, hogy a szervezet meg tudjon felelni a testsúly növekedésével járó fokozott metabolikus igényeknek a kardiovaszkuláris rendszer szempontjából megnövelt perctérfogatot és fokozott intravaszkuláris vértérfogatot igényel (Lavie, 1986). Közismert, hogy az elhízás gyakran társul bal kamrai hipertrófiával (Abel, 2008), amely a megnövekedett hemodinamikus és metabolikus követelményekhez való alkalmazkodás első lépcsőfoka lehet. A megnövekedett igényekhez a koronária ereknek is alkalmazkodniuk kell, ami abból a szempontból is érdekes, mivel a koronária keringésben az oxigén kinyerése közel maximális szinten zajlik, így a metabolikus igény és a vérellátásban fellépő aránytalanság kritikus hatással lehet a szívizom kontraktilis funkciójára (Tune, 2004). Pozitron emissziós tomográfia (PET) segítségével menopauzán átesett, elhízott betegekben szignifikánsan csökkent szívizom vérátáramlást mutattak ki, amely negatívan korrelált a derék-csípő körfogat hányadossal (Martin, 2005). Ezzel ellentétben premenopauzális nőkben hasonló fokú elhízás növekedett szívizom vérátáramlással járt normál súlyú nőkhöz viszonyítva, míg nem mutatkozott különbség ilyen tekintetben férfiak esetében (Peterson, 2008). Megnövekedett koronaria áramlást elhízott,

koronária érbetegséggel nem rendelkező postmenopauzális nők esetén is megfigyeltek, habár a megnövekedett nyugalmi koronária áramlás szignifikánsan csökkent koronária áramlási tartalékkal (a koronária áramlás dipiridamol adása előtti és utáni hányadosa) társult (Motivala, 2008).

A koronária áramlás megváltozott metabolikus igényekhez való alkalmazkodása az érellenállás szabályzásával valósul meg, a koronária keringés eltérő szintjein több egymással együttműködő mechanizmus (pl. miogén áramlás vagy metabolikus érátmérő szabályzás) segítségével (Chilian, 1997; Jones, 1995). A nagy szívkoszorúserek igen alacsony (szinte elhanyagolható) ellenállást képviselnek a koronária keringésben; az áramlással szembeni ellenállás azonban megnő, ahogyan az érátmérő 300 μm alá csökken. Ezért is nagyon fontos a koronária arteriolák direkt vizsgálata, mivel világosabb képet kaphatunk az elhízás során a vaszkuláris rezisztencia koronária keringésben bekövetkező változásairól.

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy elhízott betegekből izolált koronária arteriolák miogén tónusa nem különbözik a normál súlyú betegekből izolált erek tónusától (Fulop, 2007), továbbá az intraluminális nyomás növelése hasonló érátmérő változást okozott normál és magas zsírtartalmú diétával táplált patkányok esetében (Erdei, 2006). Az elhízott betegekből izolált koronária arteriolák csökkent endothelium dependens, bradikinin kiváltotta dilatációt mutattak (Fulop, 2007).

Oltman és társai a károsodott koronária mikroérműködés progresszióját vizsgálták obez Zucker patkányok esetében. Míg az ACh kiváltotta dilatációt megtartottnak találták 16-24 hetes állatokban, a 28-36 hetes elhízott patkányokban már szignifikánsan csökkent ACh kiváltotta vazodilatációt tapasztaltak (Oltman, 2006). Katakam és társai 12 hetes obez Zucker patkányok izolált koronária ereiben találtak megtartott ACh kiváltotta érválaszt (Katakam, 2005). Henderson kollégáival együtt

magas zsírtartalmú diétával etetett disznók izolált koronária arterioláiban detektált enyhén károsodott bradikinin kiváltotta dilatációt (Thompson, 2004). Prakash és társai obez Zucker patkányokban megnövekedett ACh kiváltotta dilatációról számoltak be (több, mint 25 %-os átmérőnövekedés a kontroll állatokhoz viszonyítva) (Prakash, 2006). Az előbbieken részletezett kísérletek eredményei alapján úgy tűnik, jöllehet a nagy koronária erekkel kapcsolatos eredmények az elhízás koronária működésre kifejtett káros hatására utalnak (Hashimoto, 1998; Kapiotis, 2006), a mikroerek szintjén a vazomotor tónus és az agonista kiváltotta dilatációs működés akár megtartott is maradhat, különösképpen a betegség korai szakaszában. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az elhízás során a koronária keringésben a mikrovaskuláris rendszerhez tartozó érszabályozó mechanizmusok védett szerepet élveznek az elhízás során jelentkező káros hatásokkal szemben a perifériás keringés ereivel ellentétben.

Ismert, hogy a kis méretű koronária erek dilatációja lokális hatású anyagok – például: nitrogén monoxid (NO), prosztaciklin és endothel eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) endotheliális felszabadulása révén jön létre. Kísérletes eredmények azt sugallják, hogy elhízás esetén csökken a NO elérhetősége az endothel számára, ez azonban kompenzálódhat több más szabályozó működés által. Fokozott NO mediálta dilatációt figyeltek meg korábban magas zsírtartalmú diétával etetett disznókból származó koronária erekben (Woodman, 2004) és obez Zucker patkányokból izolált mezenterialis erekben egyaránt (Oltman, 2006). Kutatócsoportunk hasonló megfigyeléseket tett humán erek estében, azaz a NO donor által kiváltott arteria brachialis dilatációs válaszokat megnövekedettnek találtuk elhízott betegekben (Fulop, 2007). Ezen kísérletek alapján feltételezhető, hogy az elhízás során megtartott

koronária arterioláris dilatáció részben az NO útvonal fokozott működése révén valósul meg.

Egyre több bizonyítékra derül fény azzal kapcsolatban, hogy a reaktív oxidatív szabadgyökök (ROS), amelyek perifériás erekben károsítják a mikroérműködést, a koronária mikroerekben értágító hatással rendelkezhetnek. Ezzel kapcsolatban Matoba és társai kimutatták, hogy disznó koronária mikroerekben az egyik legfontosabb endothelből felszabaduló dilatáló faktor a hidrogén-peroxid (H_2O_2) (Matoba, 2003). A humán szívből származó koronária mikroerek ugyancsak felszabadítanak H_2O_2 -t, ami nagyban hozzájárul a koronária erek dilatációjához (Miura, 2003a), és ezzel szintén szerepet játszhat a koronária erek fenntartott működésében. Az ismertetett eredmények alapján elmondhatjuk, hogy elhízás során megtartott maradhat a koronária mikroerek dilatációs működése, a háttérben álló kompenzációs mechanizmusok azonban nem kellőképpen tisztázottak.

2.4 Megváltozott Rho kináz funkció elhízásban

A Rho kináz (ROK) egy szerin/treonin kináz GTP-Rho-kötő fehérje, amely elsősorban a sejtek alakjának és mozgásának befolyásolásában vesz részt a citoskeletonon kifejtett hatásának köszönhetően (Matsui, 1996). A ROK az inzulin receptor szubsztráttal történő interakciója révén szerepet játszik az inzulin jelátviteli folyamatában is (Farah, 1998). Újabb tanulmányok kimutatták, hogy a ROK génkiütött egerekben történő teljes delécioja inzulin rezisztenciát és a vázizomzat inzulin jelátviteli folyamatában bekövetkező károsodást idézheti elő (Choi, 2010). Az inzulin *in vivo* adagolása stimulálja a vázizomzat ROK aktivációját (Chun, 2010). Chun és társai inzulin rezisztens elhízott

betegekben csökkentnek találták az inzulin stimulálta ROK aktivitást a ROK fehérje mennyiségében észlelhető változás nélkül (Chun, 2010).

Didion és társai kimutatták a 2-típusú diabetes mellitus állatmodelljében, hogy izolált cerebrális arteriolákban károsodott endothel függő dilatáció figyelhető meg, amelynek hátterében a ROK fokozott aktivációja áll (Didion, 2005). Továbbá a Naik és társai által végzett kísérletek alapján feltételezhető, hogy a ROK részt vesz az obez Zucker patkányok vázizom arterioláiban megfigyelhető fokozott agonista kiváltotta vazokonstrikció létrehozásában is (Naik, 2006). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy jóllehet, diabetes mellitusban ismerten fokozott lehet a Rho kináz aktivitása, jelenleg nem áll rendelkezésünkre elegendő bizonyíték arról, hogy hogyan alakul a Rho kináz aktivitása elhízás során.

2.5 A resveratrol vazoprotektív hatása

A resveratrol (3,4',5-trihidroxistilbén) egy növényi eredetű polifenol, amellyel kapcsolatban elsősorban a várható élettartamot potenciálisan megnövelő hatása miatt végeztek kiterjedt kutatásokat. Epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a resveratrolban gazdag mediterrán diéta a kardiovaszkuláris rizikó kifejezett csökkenésével társul (de Lorgeril, 1999; Keys, 1986). A resveratrol vélhetően széleskörű anti-atherogén hatással bír, gátolja az LDL oxidációt és a vérlemezke aggregációt, szabályozza a vaszkuláris simaizom proliferációját és befolyásolja a NO termelődését (Labinsky, 2006; Wang, 2005b). A Baur és társai által elvégzett kísérletek során a resveratrol javította a magas kalóriatartalmú diéta hatására elhízó egerek egészségi állapotát és javította azok túlélését (Baur, 2006). Újabb tanulmányok arról is bizonyítékkal szolgálnak, hogy

rágcsálókban resveratrol kezelés hatására szignifikáns érvédő hatás fejlődik ki öregedés során (Pearson, 2008).

A resveratrol érműködésre kifejtett hatásának hátterében álló mechanizmusok nem teljesen ismertek, de az eddigi kísérletes bizonyítékok alapján úgy tűnik, hogy a szervezet resveratrol kezelésre adott válaszreakciója leginkább a kalória-bevitel csökkentésének biokémiai hatásaira hasonlít. Több tanulmány is kimutatta, hogy a resveratrol legfontosabb hatásait a Sirtuin-1 és a PGC-1 α aktivációján keresztül, a mitokondrium funkció javítása révén fejt ki (Lagouge, 2006). Robb és munkatársai azt is kimutatták, hogy resveratrol több mint 40-szeres növekedést idézhet elő a SOD2 aktivitásában (Robb, 2008). A SOD2 az elektron transzportlánc egyik melléktermékét, a szuperoxidot redukálja hidrogén peroxiddá, és így védelmet nyújt a mitokondriális diszfunkcióval és az apoptózissal szemben. Kísérletes adatok utalnak arra, hogy a Sirtuin-1 az Nrf2 transzkripciós faktor acetilációjának módosításával képes szabályozni annak transzkripciós aktivitását (Kawai, 2010).

Az ismertetett eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a resveratrol bizonyítottan csökkenti az elhízás során fokozódó kardiovaszkuláris rizikót, azonban az elhízás mikrovaskuláris elváltozásaira kifejtett hatása nem ismert.

2.6 A caveolinok és a kalcium aktiválta kálium csatornák szerepe elhízásban

A mikroerek tekintetében kitüntetett fontossággal bírnak az endotheliumtól függő, de NO-tól és prosztaciklintől független dilatációs mechanizmusok. A NO és a prosztaciklin szintézisét meggátolva a mikrovaskuláris simizomsejtekben különböző agonisták hatására

létrejövő hiperpolarizáció az endothel eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) hatásának tudható be. A NO-dal ellentétben az EDHF által létrejövő dilatáció kevésbé függ az oxidatív stressztől, így az részt vehet az elhízás során károsodott NO kiváltotta dilatáció kompenzációjában. Ezt a nézőpontot támogatva Wolfle és társai kimutatták magas koleszterin tartalmú táplálékkal etetett ApoE és LDL-receptor hiányos egereken, hogy a cremaster izom arterioláiban megtartott marad az EDHF kiváltotta dilatáció (Wolfle, 2005). Egy nemrégiben közölt tanulmányban magas zsírtartalmú diétán tartott vad típusú és LDL-receptor hiányos egerekből izolált kis mezenterialis ereken mutattak ki egyaránt fokozott EDHF mediálta dilatációt (Ellis, 2008).

Jóllehet az EDHF háttérében álló folyamatok mindezidáig nem tisztázottak, és azok mibenléte a mai napig heves viták tárgya, általánosan elfogadott tény, hogy az EDHF válasz kialakításában kiemelt szerepet játszanak kalcium aktiválta kálium (KCa) csatornák (Busse, 2002). Ezzel kapcsolatban korábban számos kutatócsoport kimutatta, hogy az intracelluláris kalcium koncentráció emelése alacsony és közepes vezetőképességű kálium csatornák (SKCa illetve IKCa) nyitását eredményezi, amelyek elengedhetetlen szereppel bírnak a EDHF mediálta vazodilatáció létrejöttében (Crane, 2003; Si, 2006; Sun, 2001; Weston, 2005). A simaizom sejteken expresszáldó magas vezetőképességű kálium csatornák (BKCa) szintén bizonyított részét képezik az EDHF által közvetített érválasznak (Si, 2006; Tanaka, 2004), de a hozzájárulásuk mértéke nem ennyire egyértelmű. Többek között publikálásra kerültek olyan korai tanulmányok is, amelyek kizárják a BKCa csatornák EDHF dilatációban való részvételét, vagy csak egészen minimális szerepet tulajdonítanak nekik (Zygmunt, 1996). Egy nemrégiben megjelent publikációban arra mutatnak rá, hogy a BKCa csatornák EDHF válaszban való részvétele nagyban függ a vizsgált ér

nagyságától, egészen pontosan nagyobb szerepet játszanak a nagyobb, elsőrendű mezenteriális artériákban, míg a negyedrendű mezenteriális arteriolákban a BKCa csatornák a kimutatható expresszió ellenére sem vesznek részt a dilatáció kialakításában (Hilgers, 2006). Az említett eltérések mögött álló különbségek mibenlétére mindeztáig nem derült fény.

Jónéhány nemrégiben született tanulmány próbál meg választ találni arra a kérdésre, hogy hogyan is szabályzódnak a BKCa csatornák normál és pathológiás körülmények között. A több lehetséges szabályozó mechanizmus közül az utóbbi időkben a figyelem egyre jobban a BKCa csatornák sejten belüli kompartmentalizációjára terelődött (Lu, 2006). Nemrégiben Graziani és társai megjelentették eredményeiket, melyben kimutatták, hogy az EDHF kiváltotta dilatáció létrejöttéhez elengedhetetlenül szükséges bizonyos érfali jelátviteli folyamatok caveolákba történő átrendeződése izolált sertés koronária arteriolák esetében (Graziani, 2004).

A caveolák 50-100-nm átmérőjű, palack alakú membrán betűródések, amelyek több kulcsfontosságú strukturális és scaffolding fehérje, többek közt a caveolin-1 (cav-1) összeállásával jönnek létre (Gratton, 2004; Patel, 2008). Egy nemrégiben közölt tanulmányban Saliez és társai kimutatták, hogy egerek mezenteriális ereiben a cav-1 génjének kiütésével (cav-1 KO) teljesen megszűnt az EDHF válasz (Saliez, 2008). Absi és társai kimutatták, hogy amennyiben mezenteriális illetve koronária ereket a caveolin szerkezetét felbontó metil- β -ciklodextrinnel (M β CD) inkubáltak, megszűnt az SKCa által mediált érválasz, míg az IKCa függő dilatációt nem befolyásolta az M β CD hozzáadása (Absi, 2007). Érdekes módon a Wang és társai által közölt közlemény alapján a BKCa csatornák a sejten belül szintén a caveolákban találhatóak meg, ahol a cav-1 a csatornák α alegységén keresztül kapcsolódva negatív

szabályozó hatást fejt ki azokra (Alioua, 2008; Cheng, 2006; Wang, 2005a). Az, hogy ennek a kölcsönhatásnak van-e bármilyen funkcionális hatása, illetve hogy befolyásolja-e bármilyen tekintetben az EDHF mediálta érválaszt, mindezidáig nem tisztázott.

Az elhízás progressziójával, az atherogén diszlipidémia és a diabetes kialakulásával a BKCa csatornák funkciója is megváltozhat. Magas fruktóztartalmú, atherogén étrenden tartott sertésekben a koronária erekben károsodott BKCa csatorna funkciót mutattak ki (Borbose, 2009; Dimitropoulou, 2002). Ezen megfigyelések azt sugallják, hogy az atherogén lipideltérések szerepet játszhatnak a BKCa csatorna funkció, és következményesen az endothel mediálta dilatáció károsításában.

Ismert, hogy a BKCa csatornák elsősorban a vaszkuláris simaizomsejtekben kerülnek expresszióra, ahol magas koncentrációjú lokális kalcium hatására (10-100 μ M) aktiválódnak (Jaggar, 2000). Lehetséges, hogy az elhízásban és diabetes során károsodott BKCa csatorna funkció a simaizom fokozott tónusával jár. Ebben az összefüggésben Mokelke és társai diabéteszes diszlipidémiás sertések izolált koronária simaizomsejtjeiben találtak károsodott BKCa csatorna működést és csökkent kifelé irányuló kálium áramot, amely csökkent bazális koronária áramlással társult (Mokelke, 2005).

Mindent együttvéve további tanulmányokra van szükség, hogy feltárjuk, hogy az elhízás során jelenkező elváltozások hogyan befolyásolják a mikroerekben megtalálható KCa csatornák működését és hogy ezen elváltozások hogyan illeszkednek az elhízás során megfigyelt folyamatok progressziójába.

3. METODIKÁK

Állatkísérleteink során az Állatkísérletes Etikai Bizottság által jóváhagyott protokolloknak megfelelően jártunk el, kísérleteinkben csak szakmailag jártas személyek vettek részt. Az állatokat 12 órás periódusokban sötét, illetve megvilágított környezetben tartottuk, lehetővé téve számukra a víz és a táplálék folyamatos hozzáférhetőségét. A kísérleti protokollok előtt az egy éjszakán át éheztetett állatokat nátrium pentobarbital (50 mg/tskg) intraperitoneális adásával altattuk el, amely után a rágcsálókból eltávolítottuk a gracilis izmot. Ezután az állatokon további 150 mg/tskg nátrium pentobarbital injekció adásával eutanáziát végeztünk. Az állatok szívének eltávolítására csak a halál teljes beállta után került sor.

3.1 Az elhízás állatkísérletes modelljei

Kísérleteink első részében az elhízás modelljeként 12 hetes hím obese Zucker (OZ) patkányokat és ezek kontrolljait (lean Zucker, LZ) használtuk (Charles River). Az OZ patkányok a leptin receptor gén homozigóta mutációját hordozzák magukban és 12 hetes korukra testtömegük szignifikánsan nagyobb a leptin receptor szempontjából heterozigóta, normál fenotípussal bíró LZ patkányokhoz képest.

Kísérleteink második részében magas zsírtartalmú diéta segítségével idéztünk elő elhízást egerekben. Kísérleteink során 20 hetes hím ECR vad típusú egereket (Nrf2^{+/+}) (Taconic) illetve Nrf2 génkiütött egereket (Nrf2^{-/-}) (a National Institute on Aging által fenntartott kolóniából beszerzett állatok) használtunk. Az Nrf2 transzkripció faktor több gén expressziójának szabályozásáért felelős, amelyek közt több antioxidáns enzim is szerepel, így fontos szerepet játszhat az oxidatív stressz

szabályozásában. Az állatokat 16 héten keresztül standard AIN-93G diétán (SD), módosított (a kalóriaértéket 60 %-ban zsírból fedező) AIN-93G (high fat diet, HFD), valamint egy resveratrollal kiegészített HFD (2,4 g resveratrol / táp/kg) diétán tartottuk.

Kísérleteink következő részében hím Wistar patkányokat használtunk (Charles River), amelyekben az elhízást magas zsírtartalmú diéta (HFD; Testdiet; PMI Nutrition International) segítségével idéztük elő. A HFD állatok magas (60%-os) zsírtartalmú tápot kaptak 10 héten keresztül. A kontrollként használt patkányokat 10 hétig normál zsírtartalmú táppal etettük.

A továbbiakban az elhízás következtében fellépő érelváltozások háttérében álló folyamatok vizsgálatára 12-14 hetes hím cav-1 génkiütött egereket (Cavtm1Mls/J) valamint azok kontrolljait (B6129SF2/J) vizsgáltuk (Jackson Laboratories, USA).

3.2 Analitikai módszerek

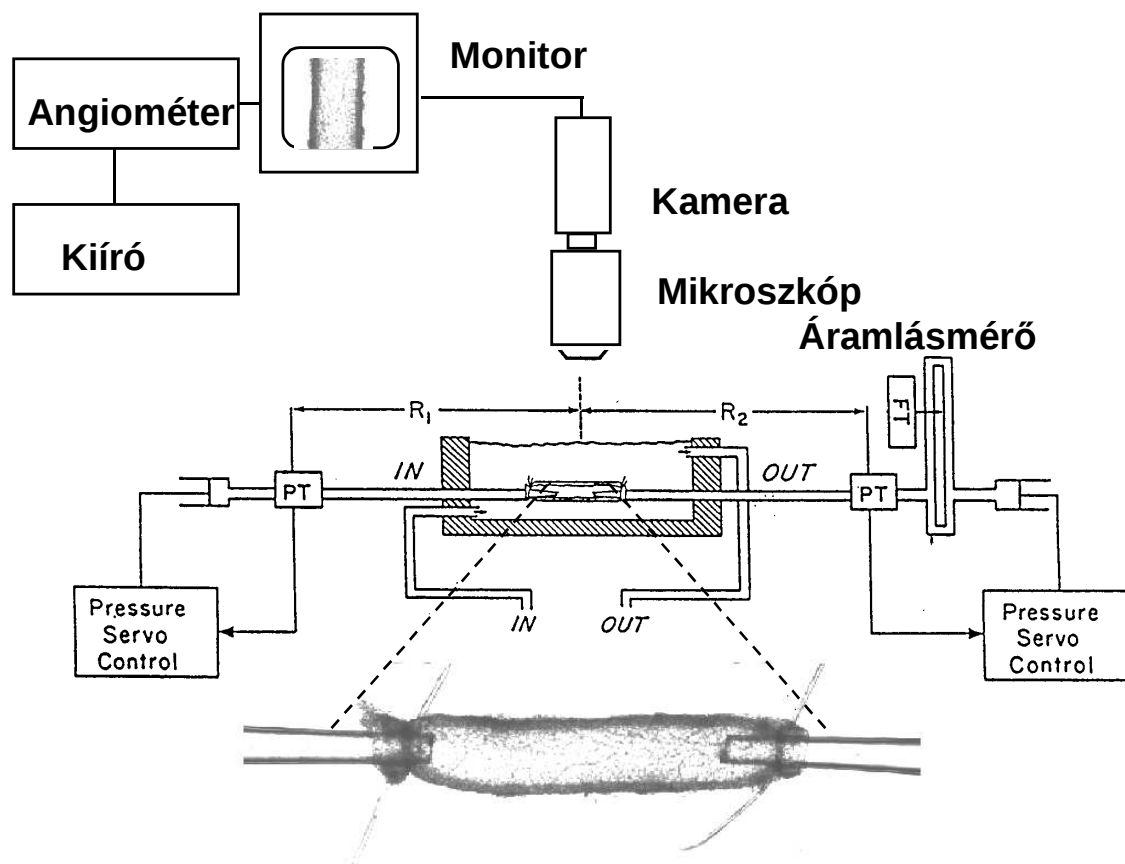
A kontroll és HFD patkányokból nyert plazmából teljes koleszterin és glükóz meghatározás történt kolorimetriás esszé segítségével (Cobas Integra, Roche). Az inzulin szintet radioimmun alapú esszé segítségével mértük (BYK Sangtec).

3.3 Izolált mikroértechnika

Izolált mikroér kísérleteinket koronária illetve gracilis arteriolákon (~120 μm) végeztük. A kísérletek során a mellkas megnyitását követően steril körülmények között eltávolított szívet és a gracilis izmot egy hideg (0-4 °C, pH 7.4) Krebs oldatot (összetétel mmol/L-ben: 110 NaCl, 5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1 MgSO₄, 1 KH₂PO₄, 5 glükóz és 24 NaHCO₃) tartalmazó,

szilikon alapú Petri-csészében tűkkel rögzítettük. Kísérleteinkhez a gracilis arteriola elsőrendű ágának, illetve a szeptális artéria intramuszkulárisan futó másodrendű ágának 1-2 mm-es szakaszát izoláltuk.

Az arteriolákat mindig azonos körülmények között preparáltuk. A preparálás során létrejöhet egy olyan stresszállapot, amely fokozhatja a reaktív oxidatív gyökök termelését. A pontos, mindenben megegyező preparálási technikával igyekeztük kizárni, hogy az eltérő stresszállapot következtében kialakuló eredményeket kapjunk. A preparálás után az izolált arteriolát egy hideg, oxigenizált Krebs oldatot tartalmazó szervedénybe helyeztük, majd egy sztereomikroszkóp (Nikon, Eclipse 80i) segítségével, mikrosebészeti eszközöket használva először egyik oldalán kanuláltuk, rögzítettük, majd 20 Hgmm-es perfúziós nyomással a lumenből a vérsejteket eltávolítottuk. Ezután az ér disztális végét is kanuláltuk, egy mikrocsonk segítségével beállítottuk az eredeti érhosszt, majd egy állandó hőmérsékletű ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$), oxigenizált szervfürdőbe helyeztük. A szervkamrát folyamatosan oxigenizált (O_2 : 10%, CO_2 : 5%, N_2 : 85%) Krebs oldattal áramoltattuk át (40 ml/perc). Az intraluminális nyomást visszacsatolásos elven működő nyomásszabályozó (Livingssystem) segítségével lassan 80 Hgmm-re emeltük és 60 percig azon tartottuk, miközben az intraluminális nyomást folyamatosan nyomástranzducerekkel mértük. Az inkubációs idő elteltével az arteriolákban spontán miogén tónus fejlődött ki. A belső érátmérő változását egy videomikroszkóphoz (Nikon, Eclipse 80i) rögzített digitális kamerával (CFW1310, Scion Corp) detektáltuk és számítógép segítségével mértük (2. ábra).



2. ábra. A videomikroszkópos rendszer vázlatos rajza

3.4 Az arterioláris funkció vizsgálata vazoaktív szerekkel

Kísérleteink során elhízott és kontroll állatokból izolált gracilis, illetve koronária arteriolákon vizsgáltuk meg a 80 Hgmm-es intraluminális nyomás hatására kialakuló spontán értónust, illetve a különböző vazoaktív szerek hatására bekövetkező érátmérő változást. A kísérletekben az alkalmazott vazoaktív anyagokat a spontán miogén tónus kialakulását követően az ismert térfogatú (15 mL) perfundált kádba, megfelelő végkoncentrációkban, kumulatív dózisokban adtuk. A szer

kádba juttatását követően folyamatosan regisztráltuk az adott anyag különböző koncentrációinak érátmérőre gyakorolt hatásait, és kumulatív dózis-hatás görbéket készítettünk. Az egyes kumulatív dózis-hatás görbéket kimosási periódus követte, melynek során az arteriolák visszanyerték kiindulási tónusukat. Ennek megfelelően az egyes dózis-hatás görbék között minimum 10 percet vártunk.

Kísérleteinkben elsőként obez Zucker (OZ) és kontroll (lean Zucker, LZ) patkányokból izolált gracilis arteriolákon vizsgáltuk meg az angiotenzin 2 (Ang 2) és a noradrenalin ismételt adásának hatására kialakuló érválaszt. Az Ang 2 (10 pmol/L-10 nmol/L, Sigma) és a noradrenalin (1-100 nmol/L, Sigma) kumulatív koncentrációinak hozzáadása (első applikáció) után félórás várakozási időt követően újra felvettük az agonista indukálta válaszokat (második applikáció). Bizonyos protokollok során az érválaszokat a második hozzáadást követő félórás várakozást követően ismét rögzítettük (harmadik applikáció). Kísérleteink különálló részében az Ang 2 és noradrenalin kiváltotta ismételt érválaszokat a Rho kináz gátló Y27632 (1 μ mol/L, Sigma) 30 perces inkubációját követően is rögzítettük.

További kísérleteink során magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{+/+} és Nrf2^{-/-} egereken teszteltük a resveratrol endotheliális funkcióra gyakorolt hatását az állatokból izolált gracilis arteriolákon acetilkolin (ACh, 1 nmol/L – 10 μ mol/L, Sigma) segítségével.

A továbbiakban az ACh (1 nmol/L – 10 μ mol/L) kiváltotta dilatáció mértékét regisztráltuk a kontroll és magas zsírtartalmú diétával táplált patkányokból izolált koronária arteriolákon. Az ACh kiváltotta válaszokat a NO szintáz gátló N ω -nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME, 200 μ mol/L) történő 30 perces inkubáció után is rögzítettük. Az EDHF kiváltotta válaszok vizsgálatára a koronária arteriolák ACh kiváltotta dilatációját az L-NAME (200 μ mol/L) és a ciklooxygenáz gátló

indomethacin (10 μ mol/L, Sigma) együttes jelenlétében is megvizsgáltuk. Mivel további kísérleteink során csak az EDHF által kiváltott dilatációra voltunk kíváncsiak, így további kísérleteinket az L-NAME (200 μ mol/L) és indomethacin (10 μ mol/L) folyamatos jelenlétében végeztük. Az ACh kiváltotta válaszokat a BKCa gátló iberiotoxin (IBTX, 100 nmol/L), az SKCa gátló apamin (100 nmol/L, Sigma) és az IKCa gátló 1-[(2-klórphenil) difenilmetil]-1H-pirazol (TRAM34, 10 mmol/L, Sigma) jelenlétében is megvizsgáltuk. Az ACh kiváltotta dilatációt a citokróm P450 blokkoló szulfafenazol jelenlétében is teszteltük. Az izolált koronária arteriolákon a BKCa csatornák szelektív aktivátora, az NS-1619 (100 nmol/L – 10 μ mol/L, Sigma) hatására kialakuló érválaszokat is rögzítettük.

További kísérleteink során kontroll állatokból izolált koronária arteriolákat 90 percen keresztül *in vitro*, a caveolákat szétromboló metil- β -ciklodextrinnel (3 mmol/L, Sigma) inkubáltuk, majd megvizsgáltuk az ACh kiváltotta dilatációt IBTX (100 nmol/L) jelenlétében és hiányában egyaránt. A szelektív BKCa nyitó NS-1619 hatására kialakuló érválaszokat is rögzítettük.

Hogy tovább bizonyítsuk a cav-1 és a BKCa között fennálló interakciót gracilis arteriolákat izoláltunk cav-1 génkiütött és vad típusú egerekből és megvizsgáltuk azok ACh (1 nmol/L – 10 μ mol/L) kiváltotta dilatációs válaszait. Mivel kísérleteink során csak az EDHF által kiváltott dilatációra voltunk kíváncsiak, így kísérleteinket az L-NAME (200 μ mol/L) és indomethacin (10 μ mol/L) folyamatos jelenlétében végeztük. Az ACh kiváltotta válaszokat IBTX, apamin és TRAM34 jelenlétében is megvizsgáltuk. Ezt követően az izolált arteriolákon a BKCa csatornák szelektív nyitójának, az NS-1619 hatására kialakuló érválaszokat is rögzítettük.

3.5 Az érfali szabadgyök termelés mérése

Az érfali szabadgyök termelést arteria femoralis ereken mértük Amplex Vörös Hidrogén Peroxid/Peroxidáz Esszé Kit (Molecular Probes, USA) segítségével fluorometriás módszerrel, ahol az extracellulárisan generált H_2O_2 -t a torna peroxidázzal kapcsolt Amplex Vörös fluoreszcencia esszével detektáltuk. Az esszé során zajló reakcióban a torna peroxidáz elektron donorként Amplex vöröst használ fel a hidrogén peroxid vízzé való átalakítására. A folyamat végeredményeképpen egy erősen fluoreszcens anyag, a resurofin keletkezik. 50 μM Amplex Vöröst és 0,1 egység/ml torna peroxidázt adtunk hozzá az előzetesen izolált femorális artériák homogenizátumaihoz. A fluoreszcens méréseket '96 lyukú' mikroplate-en 530/580 nanométeren 200 μl -es mintamennyiséggel végeztük Tecan Infinite M200 plate reader segítségével. A fluoreszcens méréseket minden egyes minta esetén háromszor ismételtük meg.

3.6 A Rho kináz aktivitás mérése

A Rho kináz aktivitást Cyclex Rho kináz aktivitás esszé (Cyclex Co. Ltd) felhasználásával mértük. Femorális artériák elsőrendű ágait jéghideg, 1 mmol/L fenil-metil-szulfonil-fluoriddal, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptinnel, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotoninnal, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstainnal és 1 mmol/L Na_3VO_4 -al gazdagított radioimmunoprecipitációs esszé pufferben (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 mmol/L NaCl, 0,25% deoxikólsav, 1% NP-40 és 1 mmol/L EDTA) homogenizáltuk, majd meghatároztuk a protein koncentrációt (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA). A Rho kináz aktivitást az MYPT1 695-ös treonin homogenizátumok általi foszforilációja révén detektáltuk. Az azonos mennyiségű arteriális lizátumokat 96 lyukú, gyárilag szubsztrátot tartalmazó lyukakba

helyeztünk. A torna peroxidázzal jelölt foszfospecifikus antitesttel való 1 órás inkubáció után hozzáadtuk a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin szubsztrátot. A reakció hatására keletkező színváltozást spektrofotométer segítségével detektáltuk és a mintában lévő relatív Rho kináz aktivitás arányában reprezentáltuk. A Rho kináz gátlására a kísérleteink során 10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632-t használtunk.

3.7 Immunohisztokémia

A kontroll és HFD patkányokból származó szeptális koronária darabokat (n=4-4) fagyasztó médiumba ágyasztuk be (OCT compound, Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences, USA) és lefagyasztottuk. Az acetonnal fixált, 10 μm vastagságú konszekutív metszeteket poliklonális cav-1 ellenes antitesttel (1:50-es hígítás, Sigma) és simaizom aktin ellenes antitesttel (1:200 hígítás, Novocastra) vagy poliklonális BKCa csatorna ellenes antitesttel (1:50-es hígítás, Alomone Labs) és simaizom aktin ellenes antitesttel (1:200 hígítás, Novocastra) jelöltük. Az immunofluoreszcens jelölést Alexa-488-cal vagy Alexa-597-tel jelölt másodlagos antitest (Invitrogen) segítségével hajtottuk végre. A sejtmagok festésére DAPI-t használtunk. A nem specifikus kötődést az elsődleges antitest elhagyásával vizsgáltuk. A metszetekről Olympus BX61 mikroszkóphoz kapcsolt elektron sokszorozó CCD kamerával (LucaEM-S, Andor) készítettünk felvételeket.

3.8 Western immunoblot

A kontroll és HFD állatok szívéből koronária artériákat izoláltunk, majd a kötőszövet eltávolítása után az ereket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és további felhasználásig -80°C -on tároltuk. A kipreparált

koronária érdarabokat később 20 μ l SDS-mintapufferben homogenizáltuk, majd 5 percig főztük. A mintákban lévő fehérjéket 8%-os SDS-poliakrilamid gélen történő gélelektroforézissel szeparáltuk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A vizsgált fehérjék detektálására caveolin-1 elleni IgG antitestet (Abcam, 1:1000 higítás), illetve BKCa csatorna-ellenes IgG antitestet (Amersham, 1:1000 higítás) alkalmaztunk. Másodlagos antitestként torma peroxidázzal jelölt nyúl ellenes antitestet használtunk (Amersham, 1:5000 higítás). Normalizáció céljából β -aktin ellenes antitestet (Abcam, 1:5000 higítás) használtunk a minták felvitele során az eltérő fehérjemennyiségek miatt jelentkező esetleges különbségek kiküszöbölésére. A kemilumineszcenciával kapott jelet autoradiográfia segítségével rögzítettük. A sávok optikai denzitását NIH Image szoftver segítségével mértük.

3.9 Statisztika

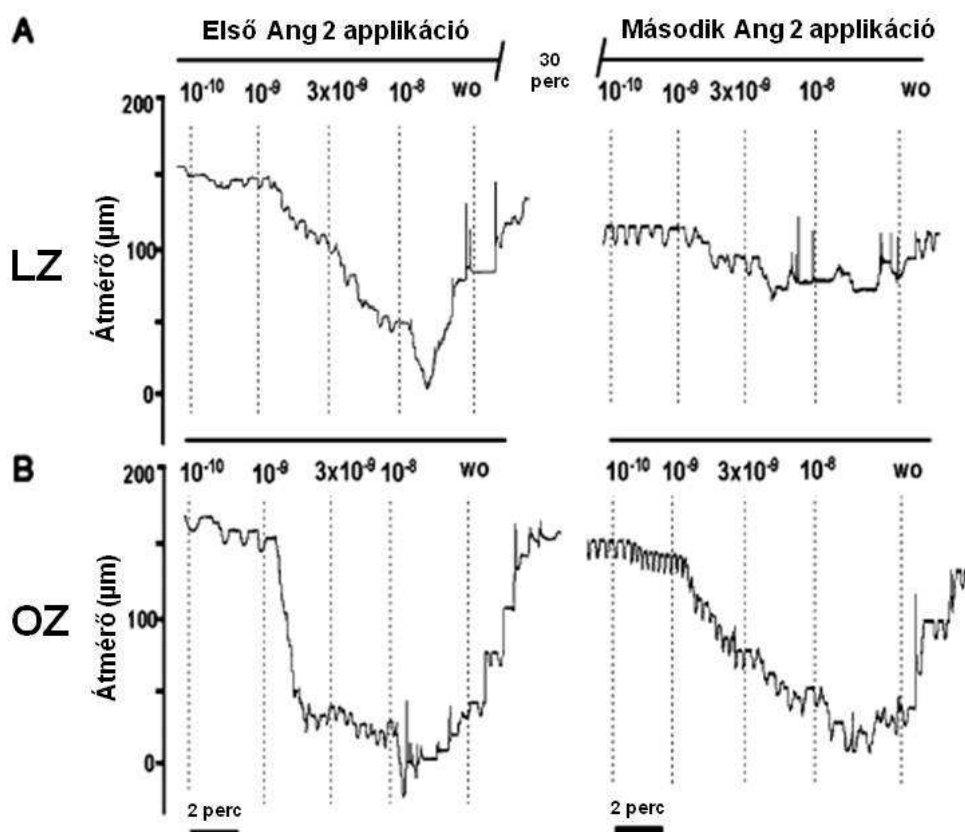
Az izolált erekben vazoaktív szerek hatására kialakuló átmérő-változásokat a maximális dilatáció százalékában fejeztük ki. Maximális dilatációként az ér 80 Hgmm-en, kalcium mentes Krebs oldatban mért passzív átmérőjét vettük. Az ábrákon a nyert adatok átlagértékei $\pm$ S.E.M szerepelnek. Statisztikai elemzéseinkhez Student féle t-próbát használtunk. Az értékeket akkor tekintettük szignifikánsan különbözőnek, ha a $p < 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Vázizom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízásban

Gracilis izom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízott Zucker patkányokban

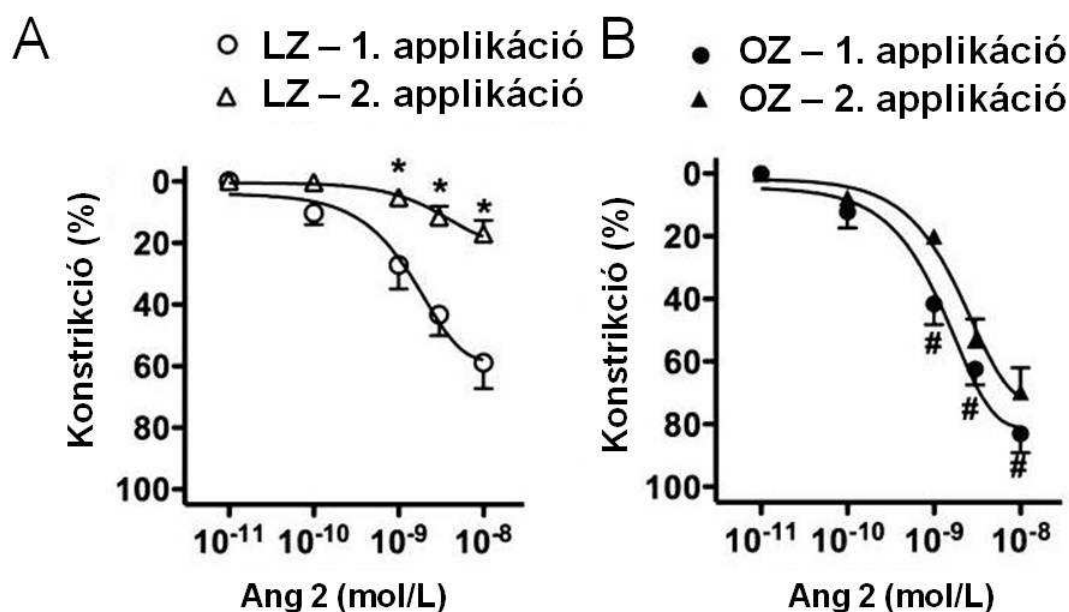
Kísérleteink első részében elhízott Zucker patkányokból izolált gracilis arteriolákon vizsgáltuk meg az angiotenzin 2 (Ang 2) ismételt adásának (kétszeri applikáció egymástól 30 perces inkubációval elválasztva) hatására kialakuló érválaszt. 12 hetes állatokban az obese Zucker (OZ) állatok testtömege (413 ± 15 g) szignifikánsan nagyobb volt a kontroll (lean Zucker, LZ) állatok testtömegéhez (349 ± 17 g) viszonyítva. Az állatokból izolált gracilis arteriolákban a 80 Hgmm-es intraluminális nyomás hatására spontán tónus fejlődött ki, amely szignifikánsan nagyobb volt az OZ patkányok arterioláiban ($42 \pm 2\%$ -a a passzív átmérőnek) a LZ erekben detektáltakhoz viszonyítva ($31 \pm 6\%$). Az Ang 2 dózis függő konstriktiót okozott mindkét csoportból izolált gracilis arteriolák esetében (3. ábra).



3. ábra Angiotenzin 2 (Ang 2; 100 pmol/L–10 nmol/L) ismételt adásának hatására kialakuló konstriktós válaszok eredeti regisztrátumai obez zucker (OZ) és kontroll (lean Zucker, LZ) patkányokból izolált gracilis arteriolákon.

A kontroll állatokból (lean Zucker, LZ) izolált arteriolákban az angiotenzin 2 dózis függő módon konstriktiót váltott ki, amelynek mértéke szignifikáns csökkenést mutatott az Ang 2 újbóli adminisztrációja során (4. ábra). Ezzel szemben a noradrenalin hatására létrejövő vazokonstriktió mértéke nem mutatott változást ismételt applikációt követően (1. táblázat). Az OZ arteriolákon az Ang 2 első applikációjára kialakuló konstriktió szignifikánsan nagyobb volt a LZ erekben tapasztaltaknál. Az elhízott Zucker patkányokból izolált gracilis arteriolákon ugyanakkor szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a

konstrikció mértékében az Ang 2 második dózis hatásgörbéjének regisztrációja során (4. ábra).



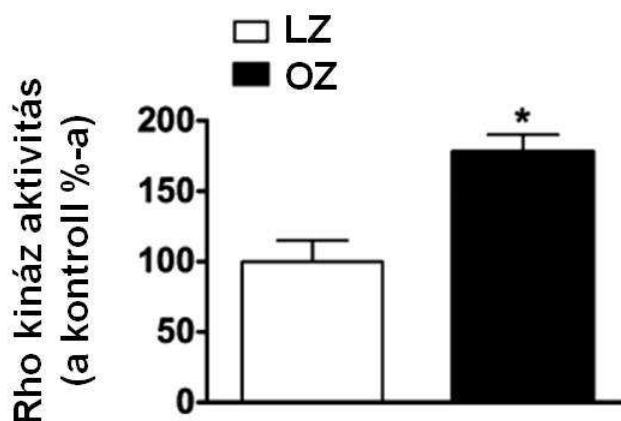
4. ábra Kontroll (lean Zucker, LZ; n=7) és obese Zucker (OZ; n=7) patkányokból izolált gracilis arteriolák Angiotenzin 2 (Ang 2; 10 pmol/L–10 nmol/L) ismételt adásának hatására kialakuló konstriktív válaszai. A * az első választól való szignifikáns eltérést, a # a kontroll (LZ) válaszoktól való szignifikáns eltérést jelöli.

Nem találtunk további csökkenést az angiotenzin 2 harmadszori adagolásának hatására bekövetkező konstriktó mértékében (maximum konstriktó az első, második és harmadik applikáció alkalmával: $59 \pm 4\%$, $23 \pm 5\%$ és $27 \pm 5\%$ értelemszerűen).

	LZ (n= 7)		OZ (n= 7)	
	1. applikáció	2. applikáció	1. applikáció	2. applikáció
NA (1 nM)	3 ± 2	3 ± 2	8 ± 4	7 ± 4
NA (10 nM)	25 ± 7	30 ± 6	38 ± 9	26 ± 8
NA (100 nM)	76 ± 7	81 ± 8	86 ± 10	74 ± 10

1. táblázat Noradrenalin (NA; 1–100 nM) ismételt hatására kialakuló konstriktós válaszok (%-ban kifejezve) LZ (n=7) és OZ (n=7) patkányokból izolált gracilis arteriolákon.

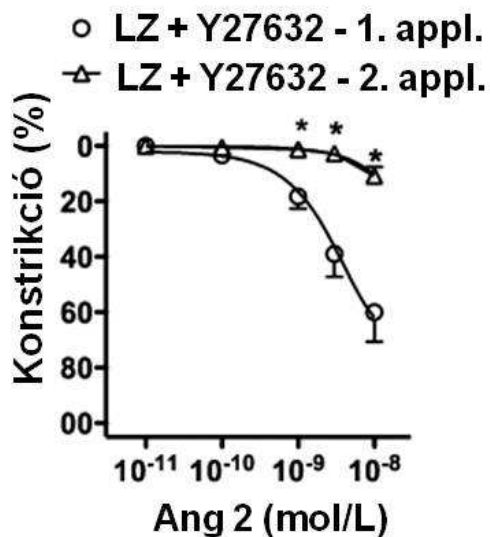
Az ezt követő kísérletünk során Rho kináz esszé segítségével detektáltuk a Rho kináz aktivitását OZ és LZ állatokból izolált femorális artériák homogenizátumaiból. Az OZ állatok ereiből származó homogenizátumok fokozott Rho kináz aktivitást mutattak a LZ erekből származó homogenizátumokhoz képest (5. ábra).



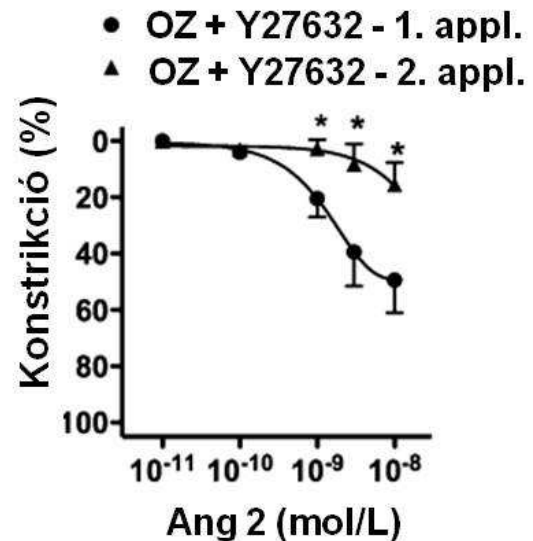
5. ábra Kontroll (LZ, n=4) és obese Zucker (OZ, n=4) patkányokból izolált femorális artériák Rho kináz aktivitása. A * a LZ erek Rho kináz aktivitásától való szignifikáns eltérést jelöli.

A fokozott Rho kináz funkcionális szerepének kimutatására a Rho kináz gátló Y27632 jelenlétében is megvizsgáltuk a gracilis arteriolák Ang 2 kiváltotta konstrikióját. Az Y27632-vel történő inkubáció lecsökkentette mind az OZ ($28 \pm 4\%$ -ra), mind a LZ arteriolák ($16 \pm 5\%$ -ra) nyomás indukálta miogén tónusát, de a miogén tónusok közt fennálló különbség megmaradt a 2 csoport között. A kontroll (LZ) állatokból származó arteriolákban az Y27632-vel történő inkubáció nem volt hatással sem az elsőként, sem az ismételten adagolt Ang 2 hatására létrejövő vazokonstrikió tekintetében (6. ábra A panel). Ezzel szemben az OZ állatokból izolált gracilis arteriolákban az Y27632 jelenlétében csökkent az Ang 2 kiváltotta konstrikió mértéke az első adminisztráció során, míg az ismételt adás hatására kialakuló válasz szinte teljesen megszűnt (6. ábra B panel).

A



B



6. ábra Kontroll (*lean* Zucker, LZ; $n=5$) és *obez* zucker (OZ; $n=5$) patkányokból izolált gracilis arteriolák angiotenzin 2 (Ang 2; 10 pmol/L – 10 nmol/L) ismételt adásának hatására kialakuló konstriktációs válaszai a Rho kináz inhibitor Y27632 ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$) jelenlétében. A * az első választól való szignifikáns eltérést jelöli.

Az Y27632 nem befolyásolta a noradrenalin hatására kialakuló konstriktiót sem az OZ, sem az LZ állatokból izolált arteriolákban (2. táblázat).

	LZ (n= 5)		OZ (n= 5)	
	1. applikáció	2. applikáció	1. applikáció	2. applikáció
NA (1 nM)	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 4	2 ± 3
NA (10 nM)	25 ± 3	41 ± 11	18 ± 3	24 ± 8
NA (100 nM)	65 ± 10	78 ± 8	57 ± 13	64 ± 7

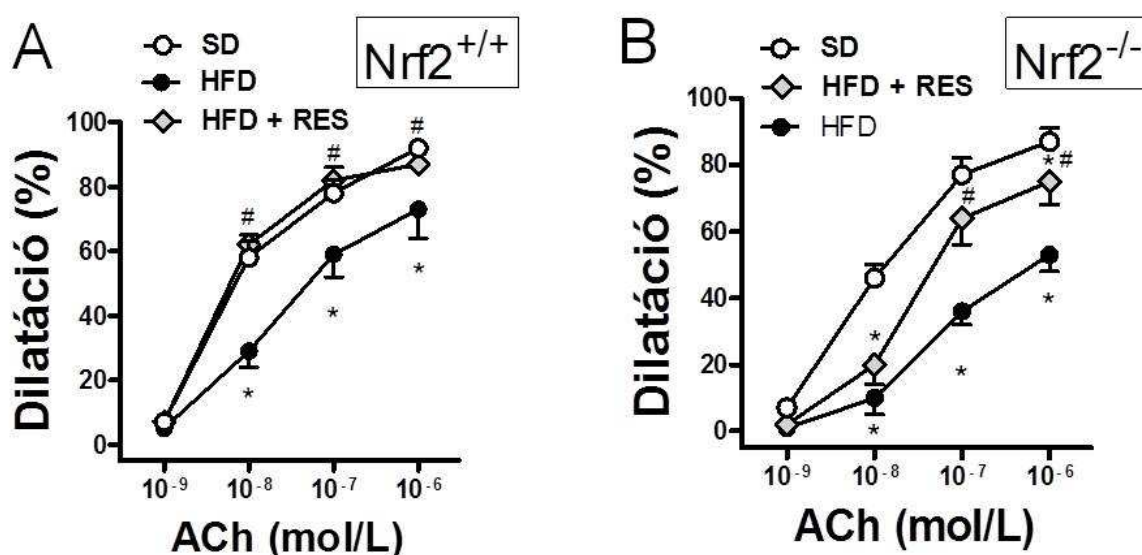
2. táblázat Noradrenalin (NA; 1–100 nM) ismételt hatására kialakuló konstriktós válaszok (%-ban kifejezve) LZ (n=7) és OZ (n=7) patkányokból izolált gracilis arteriolákon a Rho kináz inhibitor Y27632 (1 µmol/L) jelenlétében.

Gracilis izom arteriolák endothel függő dilatációjának vizsgálata magas zsírtartalmú diétával táplált egerekben

A magas zsírtartalmú diéta mind az Nrf2 transzkripciós faktort expresszáló (Nrf2^{+/+}) és az azt nélkülöző (Nrf2^{-/-}) egerekben szignifikáns testsúlynövekedést idézett elő (43,0 ± 3,0 %-os illetve 42,0 ± 4,6%-os testsúlynövekedés a kiindulási testtömeghez képest). Ezen testsúlynövekedés csökkenő tendenciát mutatott amennyiben az állatok a magas zsírtartalmú diéta mellett resveratrolt is kaptak napi étrendjükben (a testsúlynövekedés 33,0 ± 4,3%-nak illetve 31,8 ± 4,3%-nak bizonyult Nrf2^{+/+} és Nrf2^{-/-} egerek esetében).

A magas zsírtartalmú diéta hatására mind a Nrf2^{+/+}, mind a Nrf2^{-/-} állatokból izolált gracilis erek esetében károsodott az acetilkolin kiváltotta vazodilatáció (7. ábra). A resveratrol kezelés a normál diéta

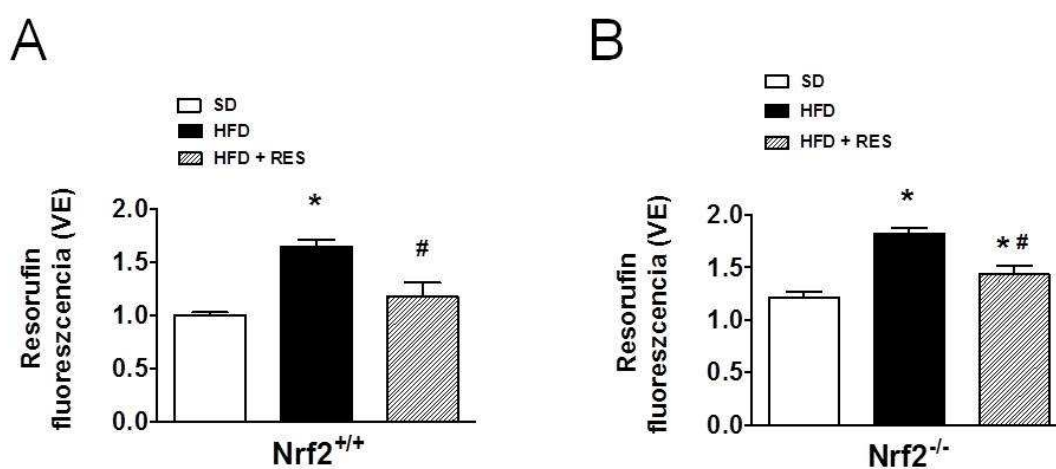
esetén megfigyelhető szintre állította vissza az acetilkolin kiváltotta dilatációt a magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{+/+} egerek esetében (7. ábra A panel). Ezzel szemben a resveratrol kezelés csak részben eredményezett javulást az ACh kiváltotta dilatációban magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{-/-} egerekben, így a kontroll étrenden lévő Nrf2^{-/-} egerekhez képest fennálló ACh kiváltotta dilatációban meglévő különbség továbbra is fennmaradt (7. ábra B panel).



7. ábra Vad típusú (Nrf2^{+/+}; A panel) és Nrf2 génkiütött (Nrf2^{-/-}; B panel) egerekből izolált gracilis arteriolák acetilkolin (ACh; 1nmol/L – 1mmol/L) kiváltotta dilatációs válaszai. Az állatokat standard diétán (SD), magas zsírtartalmú diétán (high fat diet, HFD) illetve resveratrollal kiegészített magas zsírtartalmú diétán tartottuk (HFD + RES) (n=5 minden csoportban). A * a SD-től való szignifikáns eltérést, a # a resveratrollal nem kezelt HFD-től való szignifikáns eltérést jelöli.

Az érfali reaktív oxidatív szabadgyökök termelődését Amplex vörös / torma peroxidáz ROS módszer segítségével detektáltuk. Kísérleteink

eredményei azt mutatják, hogy a magas zsírtartalmú diéta a Nrf2^{+/+} és Nrf2^{-/-} egerekben egyaránt szignifikánsan fokozza a ROS termelődést. HFD Nrf2^{+/+} egerek esetében a resveratrol kezelés a SD esetén megfigyelhető szintre csökkentette az érfali ROS termelődését (8. ábra A panel). Ezzel ellentétben a resveratrol kezelés csak részben csillapította a magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{-/-} egerek érfali ROS termelését (8. ábra B panel).



8. ábra Vad típusú (Nrf 2 ^{+/+}; A panel) és Nrf2 génkiütött (Nrf2 ^{-/-}; B panel) egerekből izolált femorális artériák Amplex vörös/ torna peroxidáz esszéinek eredményei. Az adatok a resurofin fluoreszcenciára normalizált formában vannak feltüntetve. Az állatokat standard diétán (SD), magas zsírtartalmú diétán (HFD) illetve resveratrollal kiegészített magas zsírtartalmú diétán tartottuk (HFD + RES) (n=5 minden csoportban). VE: viszonylagos egység. A * a SD-től való szignifikáns eltérést, a # a resveratrollal nem kezelt HFD-től való szignifikáns eltérést jelöli.

4.2 Koronária arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízásban

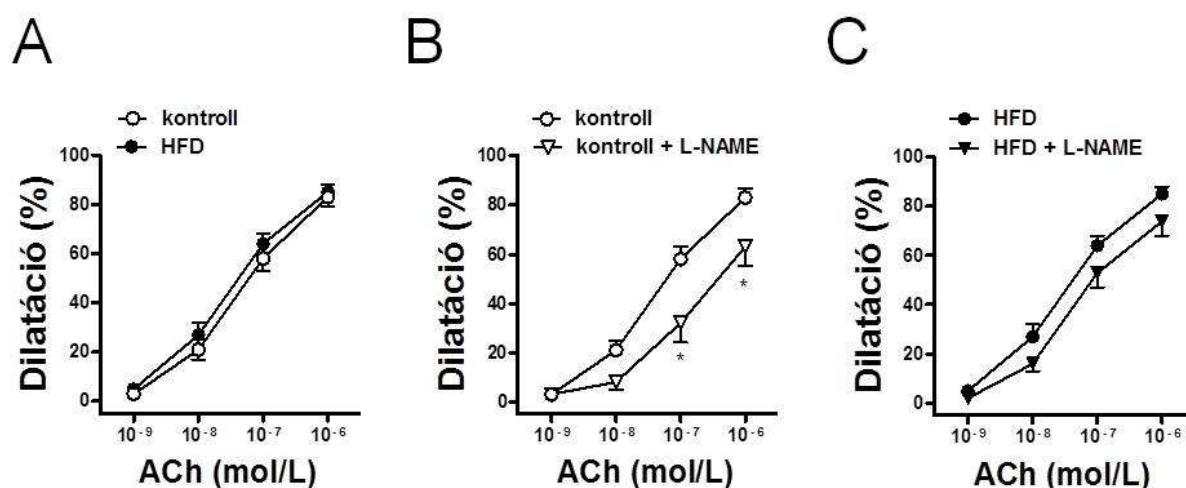
10 hét magas zsírtartalmú táp fogyasztását követően, a kutatócsoportunk által korábban tapasztaltakhoz hasonló módon (Erdei, 2006), a patkányok testtömege, szérum inzulin, glükóz és totál koleszterin szintje szignifikánsan magasabb értéket mutatott, mint a standard diétán tartott patkányok hasonló adatai (3. táblázat).

	kontroll (n= 15)	HFD (n= 15)
Testtömeg (gramm)	398 ± 16	495 ± 17 *
Szérum glükóz (mmol/L)	6,9 ± 0,5	8,2 ± 0,5 *
Szérum inzulin (pmol/L)	82 ± 20	241 ± 8 *
Szérum teljes koleszterol (mmol/L)	1,18 ± 0,06	1,72 ± 0,08 *

3. táblázat A HFD hatása a patkányok élettani paramétereire. A * a szignifikáns különbséget jelöli.

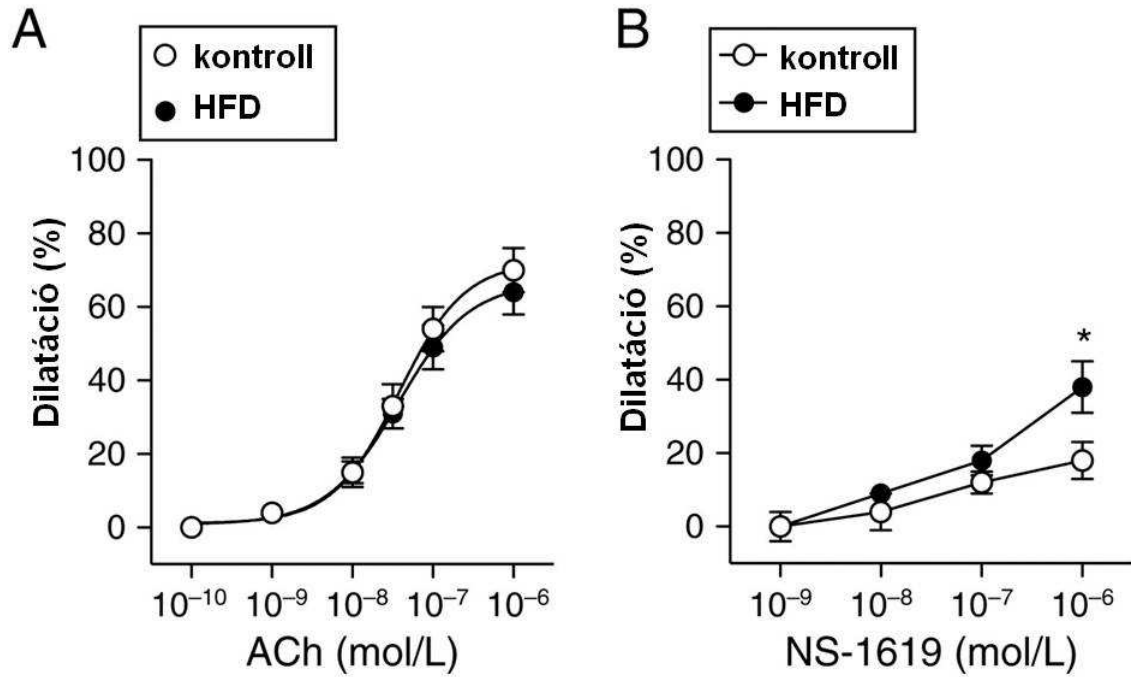
Elsőként az ACh kiváltotta dilatáció mértékét regisztráltuk a kontroll és HFD állatokból izolált koronária arteriolákon. A kontroll és HFD patkányokból izolált koronária arteriolákban nem találtunk különbséget a spontán miogén tónus hatására kialakuló aktív (86 ± 6 és 97 ± 6 μm , értelemszerűen) és a kalcium mentes oldatban kialakuló passzív arterioláris átmérő (153 ± 9 és 149 ± 7 μm , értelemszerűen) tekintetében. Meglepő módon azonban az ACh kiváltotta endothelium dependens dilatáció nagyságában sem találtunk különbséget a kontroll és HFD állatokból izolált koronária arteriolákban (9. ábra A panel). A NO

szintézisét gátló L-NAME csökkentette az ACh kiváltotta dilatációt a kontroll koronária erek esetében (9. ábra B panel), míg nem volt hatással a HFD arteriolák ACh válaszaire (9. ábra C panel).



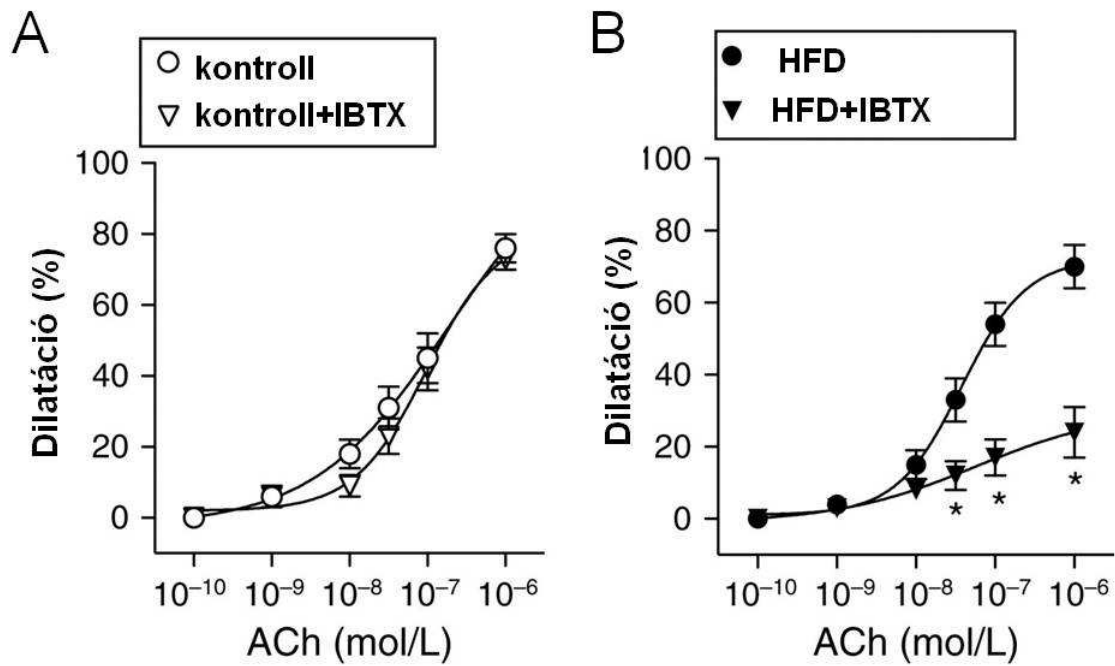
9.ábra a panel Kontroll (n=18) és magas zsírtartalmú diétán tartott (HFD, n=19) patkányokból izolált koronária arteriolák ACh (1 nmol/L - $1\text{ }\mu\text{mol/L}$) kiváltotta dilatációs válaszai. Kontroll (n=9, B panel) és HFD (n=9, C panel) patkányokból izolált koronária arteriolák ACh kiváltotta dilatációs válaszai a nitrogén monoxid szintáz inhibitor *N* ω -nitro-L-arginin metil észter jelenlétében (L-NAME, $200\text{ }\mu\text{mol/L}$) és hiányában. A * az L-NAME hiányához képesti szignifikáns különbséget jelöli.

A kontroll és elhízott patkányokból izolált koronária arteriolák L-NAME és indomethacin jelenlétében nem mutattak különbséget az ACh kiváltotta EDHF dependens dilatáció tekintetében (10. ábra A panel). Érdekes módon a BKCa csatorna nyitó NS-1619 szignifikánsan nagyobb nagyobb értágulást okozott az elhízott patkányok ereiben a kontroll erek dilatációjához viszonyítva (10. ábra B panel).



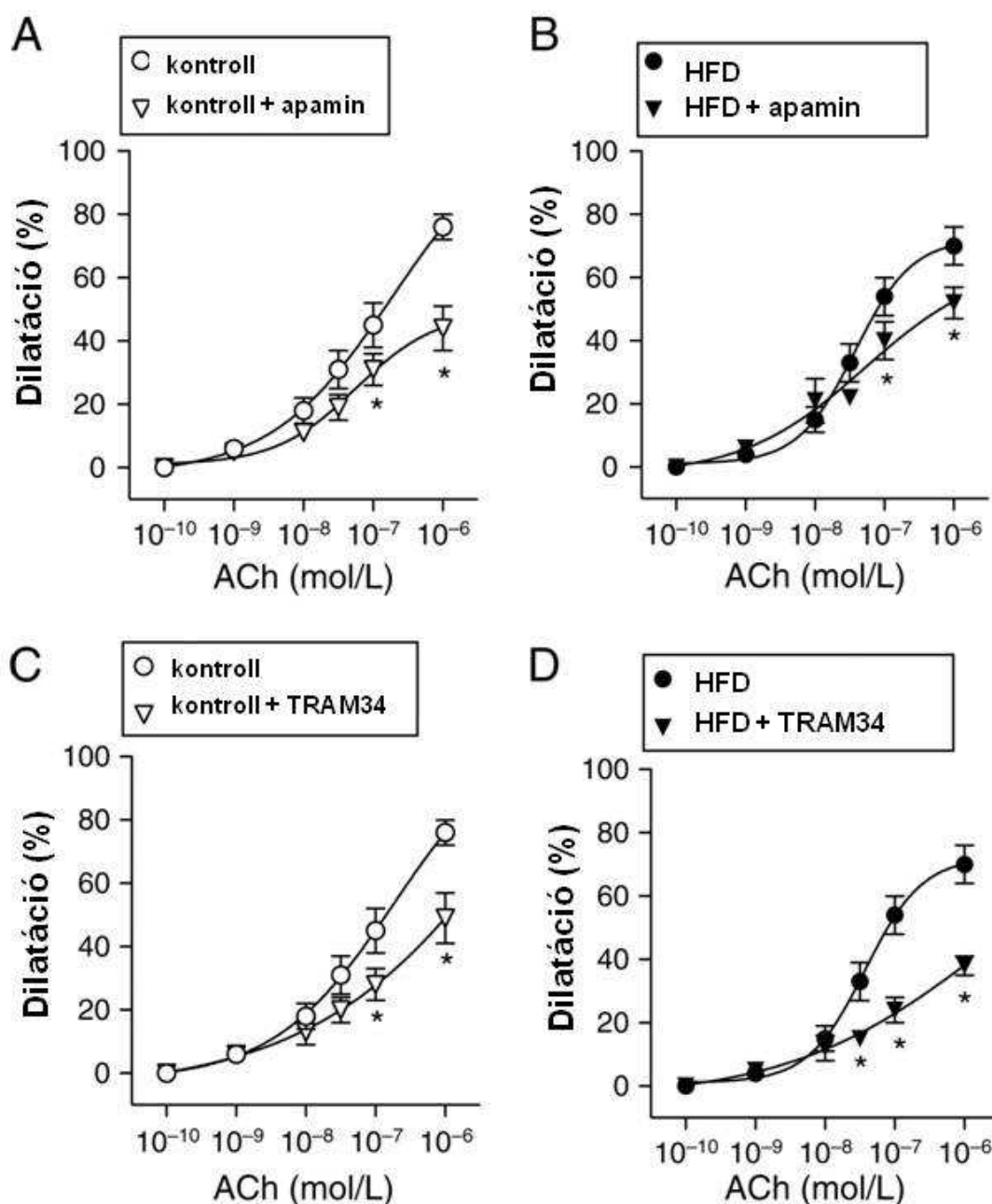
10. ábra Kontroll ($n=15$) és HFD patkányokból ($n=15$) izolált koronária arteriolák ACh (A panel) és NS-1619 (B panel) kiváltotta dilatációs válaszai. A * a kontroll választól való szignifikáns eltérést jelöli.

A BKCa gátló iberiotoxin (100 nM) szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentette a dilatáció mértékét az elhízott patkányokból izolált koronária arteriolákban, mint a kontroll állatokból izolált erek esetében (11. ábra A és B panel).



11. ábra Kontroll (A panel, $n=9$) és HFD patkányokból (B panel, $n=9$) izolált koronária arteriolák ACh kiváltotta dilatációs válaszai iberiotoxinnal (IBTX) történő inkubáció előtt és után. A * az IBTX inkubáció előtti választól való szignifikáns eltérést jelöli.

Az SKCa gátló apamin és a IKCa gátló TRAM-34 inkubációja szignifikánsan csökkentette a ACh kiváltotta dilatációt kontroll és elhízott állatokban egyaránt (12. ábra).



12. ábra Kontroll és HFD patkányokból izolált koronária arteriolák ACh kiváltotta dilatációs válaszai apaminnal (A és B panel, $N=7-7$) illetve TRAM-34-gyel (C és D panel, $N=7-7$) történő inkubáció előtt és után. A * a gátlószer inkubációja előtti választól való szignifikáns eltérést jelöli.

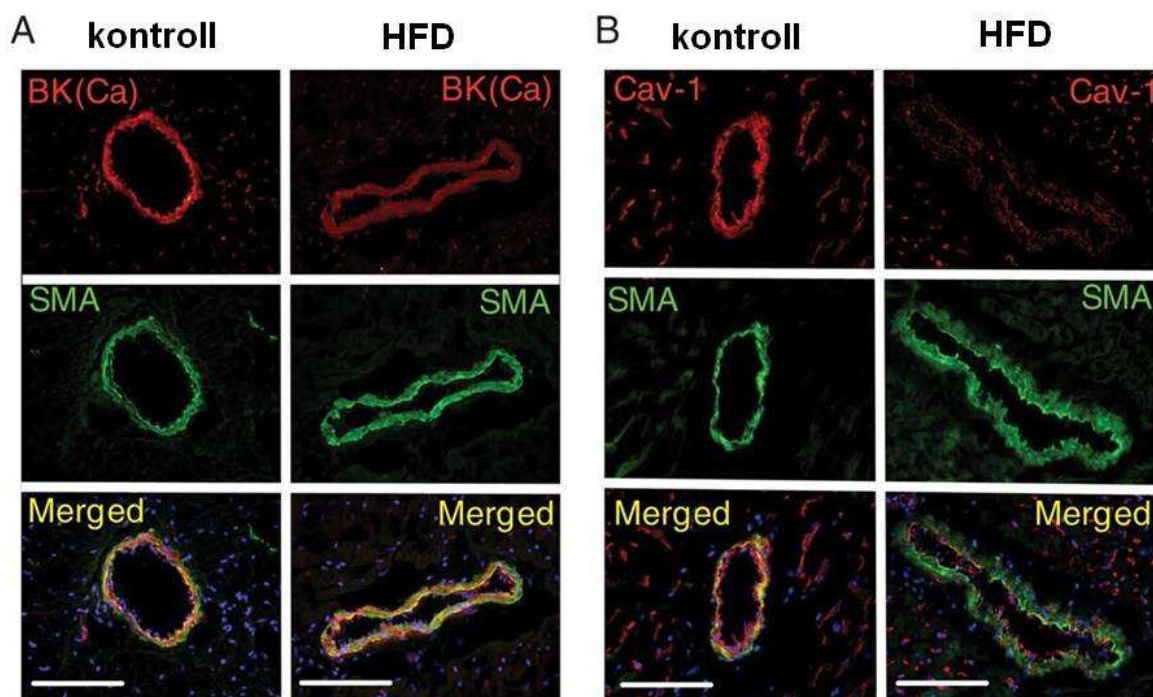
Az ACh kiváltotta dilatáció effektív koncentrációjának tekintetében nem mutatkozott szignifikáns különbség a 2 csoport között (4. táblázat). Egy külön tanulmány során az ACh kiváltotta dilatációt a CYP450 gátló szulfafenazol (10 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében is megvizsgáltuk. A szulfafenazol nem befolyásolta az ACh kiváltotta dilatáció és az effektív koncentráció mértékét sem kontroll, sem elhízott állatok esetében (4. táblázat).

	Log EC ₅₀		maximális dilatáció (%)	
	kontroll	HFD	kontroll	HFD
ACh	-7,24 $\pm$ 0,24	-7,42 $\pm$ 0,14	70 $\pm$ 6	64 $\pm$ 6
ACh + IBTX	-7,04 $\pm$ 0,14	-7,25 $\pm$ 1,05	73 $\pm$ 3	24 $\pm$ 7* #
ACh + apamin	-7,22 $\pm$ 0,35	-7,39 $\pm$ 0,12	44 $\pm$ 7*	52 $\pm$ 5*
ACh + TRAM-34	-7,20 $\pm$ 0,34	-7,64 $\pm$ 0,26	49 $\pm$ 8*	38 $\pm$ 3*
ACh + szulfafenazol	-7,08 $\pm$ 0,34	-5,83 $\pm$ 0,91	77 $\pm$ 12	68 $\pm$ 7

4. táblázat Kontroll és HFD koronária arteriolák kalkulált EC₅₀ értékei és az 1 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációjú ACh hatására kialakuló maximális dilatációs értékei különböző gátlószerek jelenlétében és hiányában. A * kontroll és HFD arteriolák esetében a gátlószerek hiányában észlelt választól való szignifikáns eltérést, a # a kontroll és HFD arteriolák közötti szignifikáns különbséget jelöli.

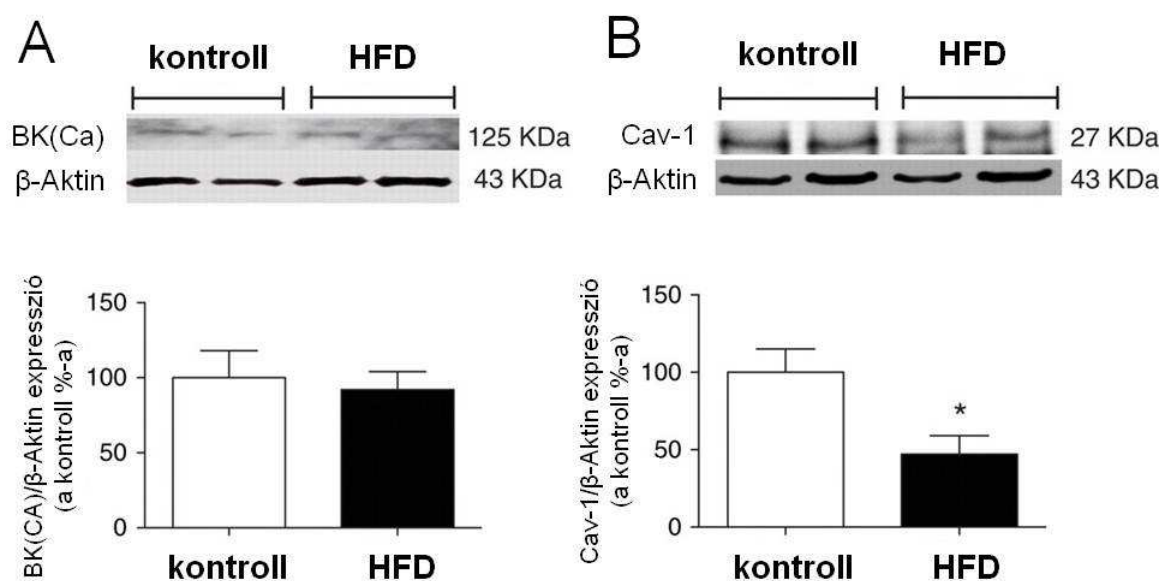
A BKCa csatorna és a caveolin-1 expresszióját kontroll és elhízott patkányok szíveiből készült metszeteken mutattuk ki immunohisztokémia segítségével. A BKCa protein expressziója a kontroll és elhízott patkányokban egyaránt a simaizomsejtekbe lokalizálódott, amit az α -

aktinnal való közös festődés jelez (13. ábra). Az elhízott állatokban a cav-1 immunfestődés markáns csökkenése volt megfigyelhető (13. ábra B panel).



13. ábra Kontroll ($n=4$) és HFD ($n=4$) állatokból származó szívmin­ták reprezentatív immunohisztokémiai festése. Az A panelen a koronáriákról készült képeken a BKCa csatornákat (BK(Ca)) vörös, a simaizom aktint (smooth muscle actin, SMA) zöld festődéssel jelöltük. A B panelen a caveolin-1 fehérjét (cav-1) vörös, a simaizom aktint (smooth muscle actin, SMA) zöld színnel jelöltük. A fúziós képek (Merged) a BKCa és a SMA illetve a cav-1 és a SMA koronária arteriolák falaira lokalizálódó együttes festődését mutatják. A sejtmagok jelölésére DAPI-t használtunk (kék szín). Az alsó képeken látható fehér csík 50 μm -es távolságot jelöl.

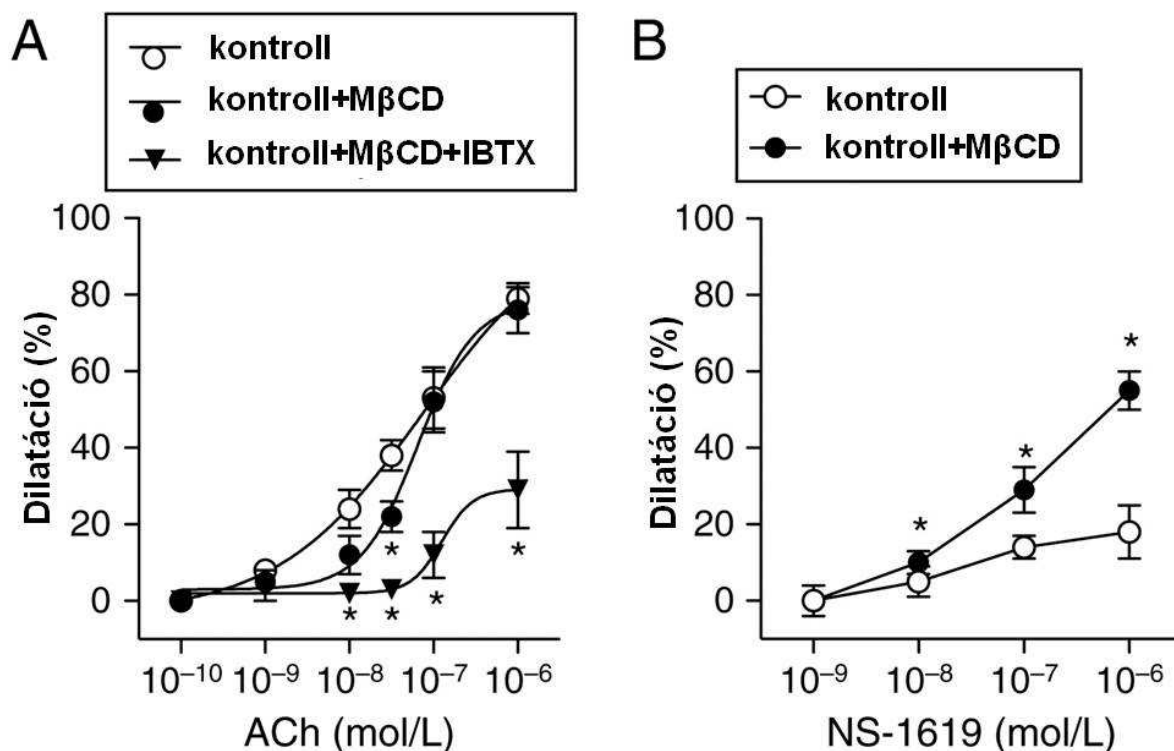
A fehérje expresszió detektálására elsőrendű szeptális koronária ereket izoláltunk kontroll és elhízott patkányokból. Az elhízott állatok ereiben csökkent caveolin-1 expressziót detektáltunk, míg nem észleltünk különbséget a BKCa csatorna fehérje kifejeződésének tekintetében (14. ábra).



14. ábra Kontroll (n=5) és HFD (n=5) patkányokból izolált koronária arteriolák BKCa csatorna (A panel) illetve caveolin-1 (B panel) expresszióját mutató reprezentatív Western blotok. Normalizáció céljából anti- β -aktint használtunk a minták felvitele során az eltérő fehérjemennyiségek miatt jelentkező esetleges különbségek kiküszöbölésére. A hasábok a normalizált denzitometriás adatok összegzését ábrázolják. A * a kontroll ereken talált expressziótól való szignifikáns különbséget jelöli.

4.3 A megtartott koronária mikroérműködés háttérében álló folyamatok vizsgálata

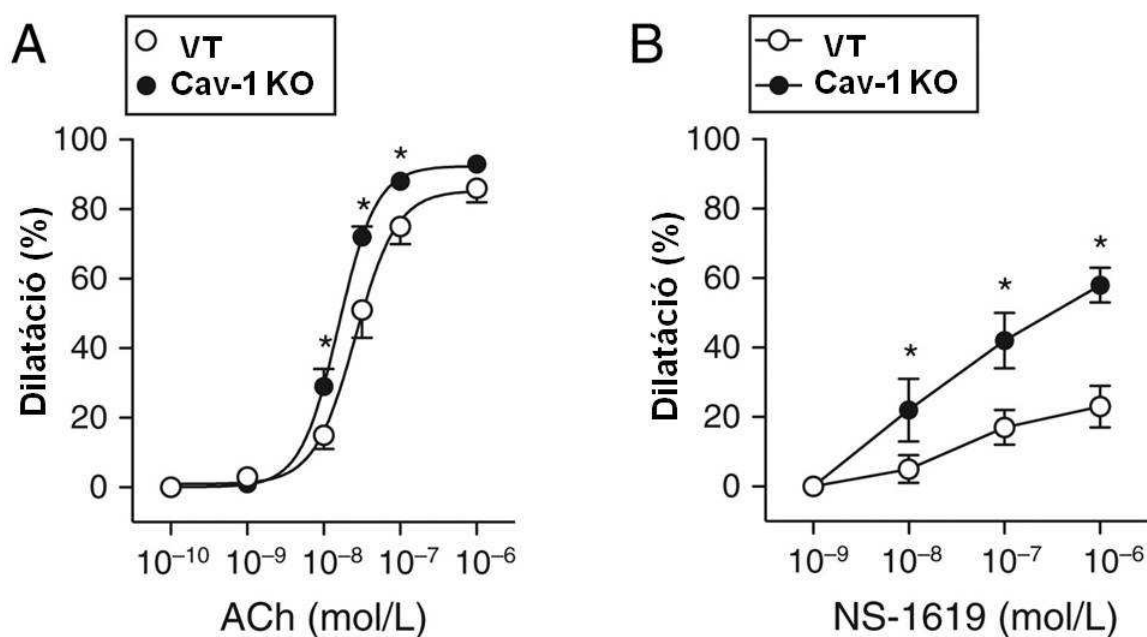
A cav-1 és a BKCa között fennálló interakció bizonyítására kontroll patkányok koronária ereit metil-béta-cyclodextrinnel (M β CD) inkubáltuk, amely kísérletes körülmények között a caveolák szétrombolását eredményezi. *In vitro* M β CD (3 mmol/L) hatására a kontroll koronária arteriolákban kissé csökkent az Ach kiváltotta dilatáció nagysága (15. ábra A panel). Figyelemre méltóan a M β CD jelenlétében az iberiotoxin gátolta az Ach kiváltotta dilatációt (15. ábra A panel), és megnőtt az NS-1619 kiváltotta érválasz nagysága, az elhízott patkányok koronária ereiben megfigyeltékhez hasonló módon (15. ábra B panel).



15. ábra Normál diétán tartott patkányokból izolált koronária arteriolák ACh (A panel) és NS-1619 (B panel) kiváltotta dilatációs válaszai metil-béta-cyclodextrin (MβCD) jelenlétében és hiányában. Az A panelen az ACh kiváltotta dilatációs válaszokat az iberiotoxin (IBTX) és a MβCD együttes jelenlétében is feltüntettük. A * a szignifikáns eltérést jelöli a MβCD inkubáció nélküli válaszhoz képest.

A caveolin-1 és a BKCa csatornák között fennálló interakció további feltárására caveolin-1 génkiütött egereket használtunk. A Cav-1 KO egerekből izolált gracilis izom arteriolákon az ACh kiváltotta EDHF (L-NAME és indomethacin jelenlétében) mediálta dilatáció kis, de szignifikáns mértékben fokozottnak mutatkozott a vad típusú egerekben észlelt válaszokhoz viszonyítva (16. ábra A panel). Ezzel párhuzamosan a szelektív BKCa csatorna nyitó NS-1619 hatására kialakuló dilatációt szignifikánsan megnövekedettnek tapasztaltuk cav-1 KO egerek

arterioláiban (16. ábra B panel). Az ACh-ra vonatkozó EC_{50} tekintetében szintén szignifikáns különbség mutatkozott a 2 csoport között; az ACh-ra sokkal érzékenyebbek bizonyultak a cav-1 KO egerekből izolált arteriolák a vad típusú állatokból izolált ereknél (5. táblázat).

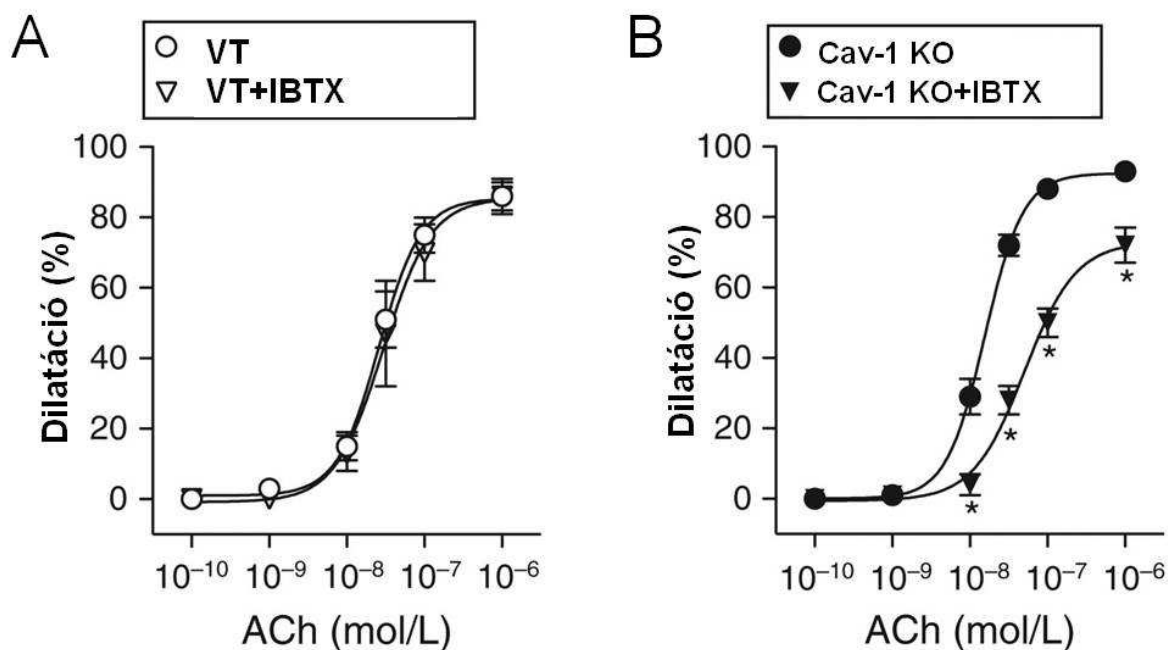


16. ábra Vad típusú (VT, $n=8$) és caveolin-1 génkiütött (cav-1 KO, $n=8$) egerekből izolált gracilis arteriolák ACh (A panel) és NS-1619 (B panel) kiváltotta dilatációs válaszai. A * a vad típusú egerek válaszaitól való szignifikáns eltérést jelöli.

	Log EC ₅₀		maximális dilatáció (%)	
	vad típusú	cav-1 KO	vad típusú	cav-1 KO
ACh	-7,58 ± 0,07	-7,81 ± 0,03 [#]	86 ± 4	93 ± 2*
ACh + IBTX	-7,53 ± 0,12	-7,31 ± 0,07*	86 ± 5	72 ± 5* [#]
ACh + apamin	-7,14 ± 0,16*	-7,51 ± 0,07*	63 ± 10*	91 ± 2 [#]
ACh + TRAM-34	-7,44 ± 0,13	-7,34 ± 0,06*	78 ± 6	84 ± 4*

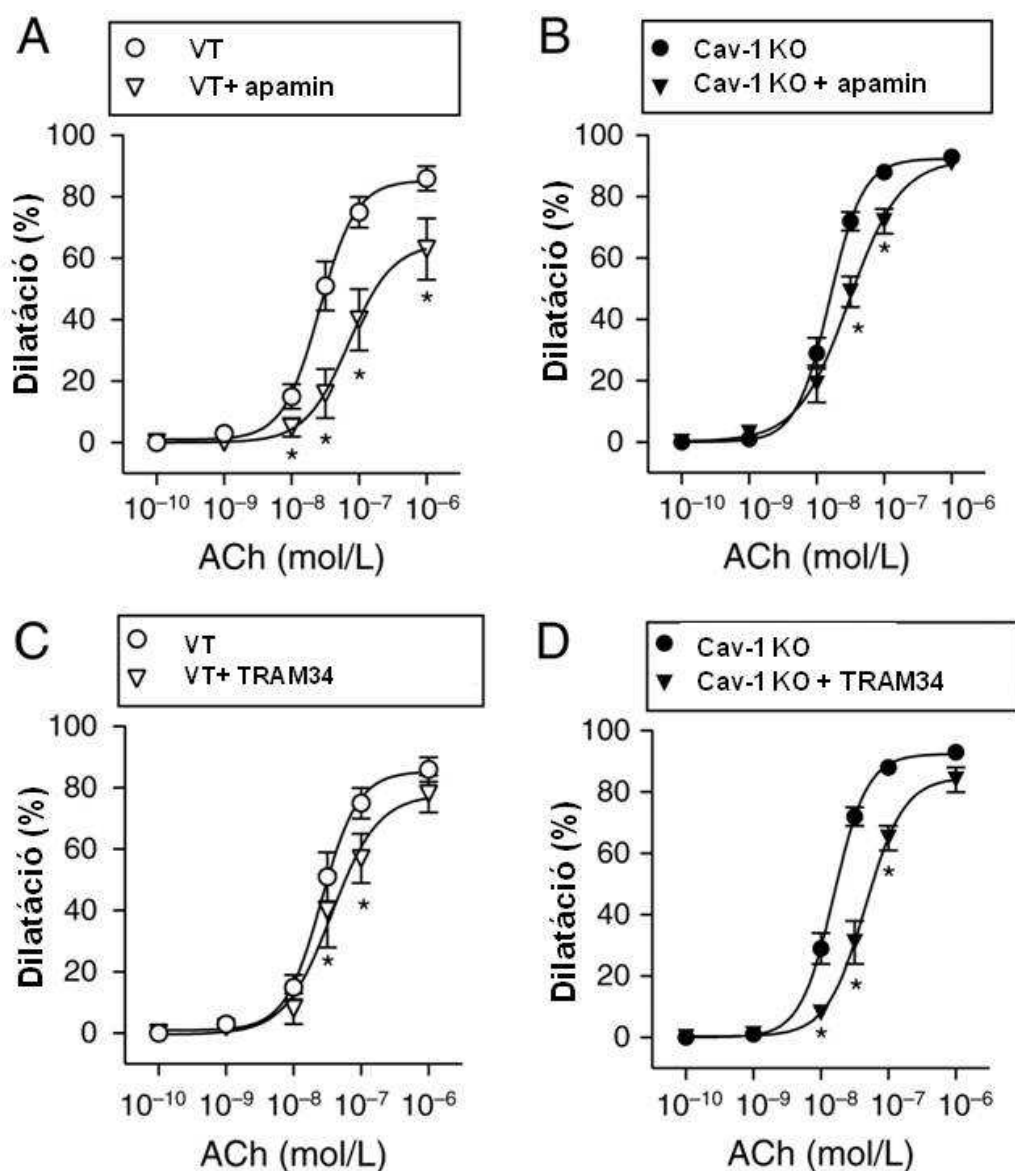
5. táblázat Vad típusú és cav-1 KO gracilis arteriolák kalkulált EC₅₀ értékei és az 1 µmol/L koncentrációjú ACh hatására kialakuló maximális dilatációs értékei különböző gátlószerek jelenlétében és hiányában. A * vad típusú és cav-1 KO arteriolák esetében a gátlószerek hiányában észlelt választól való szignifikáns eltérést, a # a vad típusú és cav-1 KO arteriolák közötti szignifikáns különbséget jelöli.

A BKCa csatornák szerepének megvizsgálására az EDHF mediálta válaszokat a BKCa csatorna blokkoló iberiotoxin jelenlétében is regisztráltuk. A vad típusú erekben kiváltott hatáshoz viszonyítva az iberiotoxin kifejezetten nagyobb arányú csökkenést okozott az ACh kiváltotta dilatációban és növekedéssel járt az erre vonatkozó EC₅₀-ben (17. ábra illetve 5. táblázat).



17. ábra Vad típusú (VT, $n=8$) és caveolin-1 génkiütött (*cav-1* KO, $n=8$) izolált *gracilis arteriolák* ACh kiváltotta dilatációs válaszai iberiotoxinnal (IBTX) történő inkubáció előtt és után. A * az IBTX inkubáció előtti választól való szignifikáns eltérést jelöli.

Ahhoz, hogy tovább tanulmányozzuk más KCa csatornák szerepét az EDHF mediálta arterioláris válasz kialakításában, az ACh kiváltotta dilatációt a szelektív SKCa csatorna blokkoló apamin és az IKCa gátló TRAM-34 jelenlétében is megvizsgáltuk. Apamin hatására szignifikánsan csökkent az ACh kiváltotta dilatáció nagysága, amely csökkenés nagyobb volt vad típusú egerekben, mint *cav-1* KO egerek esetében (18. ábra A és B panel). Az apamin jelenléte növelte az ACh effektív koncentrációját, de ebben a tekintetben nem találtunk különbséget a két csoport között (5. táblázat). A TRAM-34 szintén csökkentette az ACh kiváltotta dilatációt, azonos mértékben a vad típusú és *cav-1* KO egerekben (18. ábra C és D panel).



18. ábra Vad típusú és caveolin-1 KO gracilis arteriolák ACh kiváltotta dilatációs válaszai apaminnal (A és B panel, $n=8-8$) illetve TRAM-34-gyel (C és D panel, $n=8-8$) történő inkubáció előtt és után. A * a gátlószer inkubációja előtti választól való szignifikáns eltérést jelöli.

5. MEGBESZÉLÉS

Az elhízás megnövekedett kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással járó kórállapot (Calle, 1999; Rexrode, 1998), mely komoly népegészségügyi problémát jelent az egész világon. Jól ismert, hogy az elhízás során a nagyerekben atheroszklerózis alakul ki, azonban újabb tanulmányok azt is kimutatták, hogy az elhízás során már a nagyerekben jelentkező érrendszeri elváltozások előtt eltérések jelentkeznek a mikrocirkuláció szintjén, amely szintén fontos szerepet tölthet be a kardiovaszkuláris rizikó befolyásolásában. Korábbi kísérletes eredmények arra utalnak, hogy elhízás során megváltozhat a mikroerek vazomotor működése. Az intenzív klinikai és kísérletes kutatások ellenére az elhízás során jelentkező mikrocirkulációs elváltozások pontos mibenléte és azoknak az elhízás során keringésszabályozásban betöltött szerepe nem kellőképpen tisztázott.

Tudományos kutatásaimban ezért célul tűztem ki, hogy tanulmányozzam a rezisztencia erekben elhízás során létrejövő elváltozásokat, illetve hogy feltárjam hogy hogyan alakul az eltérő szövetekből (különös tekintettel a vázizomzatra és a szívre) izolált mikroerek működése. A cél elérése érdekében az elhízás különböző állatkísérletes modelljeiből származó vázizom és koronária mikroereken vizsgáltam meg az endothelium és az érfali simaizom által közvetített érválaszokat.

Gracilis izom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízott Zucker patkányokban

Kísérleteink első részében elhízott Zucker patkányokból izolált gracilis arteriolákon vizsgáltuk meg az angiotenzin 2 (Ang 2) ismételt adásának hatására kialakuló érválaszt. Az obese Zucker (OZ) patkányokat az 1980-as évek óta széleskörűen használják az elhízással kapcsolatosan jelentkező elváltozások vizsgálatára. Kísérleteinkben az OZ patkányok testsúlya szignifikánsan nagyobb volt a kontroll állatok (LZ) súlyához viszonyítva. Jóllehet, vizsgálataink szempontjából potenciális limitáló tényező lehet, hogy a testsúly szignifikáns megváltozása mellett az OZ patkányokban hiperlipidémiát, glükóz intoleranciát, sőt megemelkedett glükóz szinteket is leírtak, így nem jelenthető ki teljes biztonsággal, hogy az általunk megfigyelt elváltozások az elhízás következményeképpen alakulnak ki.

Az elhízás során létrejövő mikroér vazomotor működésbeli elváltozásokat először OZ állatok m. gracilis izmaiból izolált arteriolákon végeztük. Elsőként az OZ arteriolák ún. bazális tónusának mértékét vizsgáltuk meg. Az OZ állatokból izolált gracilis arteriolákban a 80 Hgmm-es intraluminális nyomás hatására szignifikánsan nagyobb tónus fejlődött ki a LZ erekben tapasztaltakhoz viszonyítva. Ebből arra következtetünk, hogy vázizom mikroerekben az elhízás során fokozódhat az elsősorban érfali simaizom sejtek által kialakított alaptónus.

Az elhízás igen gyakran társul magas vérnyomással, amelynek kialakulásában kitüntetett szerepet játszhat a renin angiotenzin rendszer fokozott aktivációja. Kutatócsoportunk korábban az elhízás diétával indukált modelljében számolt be a szisztolés vérnyomás emelkedéséről (Erdei, 2006). Az Oltman és társai által elvégzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy obese Zucker patkányok ACE blokkoló kezelését

követően javul az elhízáskor jelentkező endotheliális diszfunkció (Oltman, 2008). Eltérő kutatócsoportoktól származó közlemények utalnak arra, hogy az angiotenzin 2 hatására kialakuló fokozott konstriktív válasz hozzájárulhat a fokozott perifériás ellenállás kialakításához a magas vérnyomás betegség kialakulása során (Cai, 2000; Mehta, 2007; Ungvari, 2004). Emellett több publikációban az angiotenzin 2 fokozott konstriktív válaszáról számoltak be, konduktív és rezisztencia erek esetében egyaránt (Siddiqui, 2007; Zhang, 2005). A mások által tapasztaltakhoz hasonlóan kísérleteink során az izolált gracilis arteriolákon az angiotenzin 2 hatására OZ arteriolákon kialakuló konstriktív szignifikánsan nagyobb volt a LZ erekben tapasztaltaknál. Felvetettük azt a hipotézist, hogy a megnövekedett angiotenzin 2 által előidézett konstriktív az 1-es típusú angiotenzin 2 (AT1) receptorok fokozott és fenntartott funkcionális elérhetőségének köszönhető. Ismert, hogy az AT1 receptorok folyamatos vándorlásban vannak a sejtfelszín és az endoplazmatikus retikulum között (Hunyady, 2000). Ez a folyamat határozza meg a következő stimulusok számára elérhető aktív AT1 receptorok számát és ez szabályozza (negatív visszacsatolás révén) az AT1 receptorok elérhetőségét (Hunyady, 2000). Kísérleteink során feltételeztük, hogy az AT1 receptorok mozgásának élettani körülmények között fennálló egyensúlya megváltozik elhízás során, amely folyamat az AT1 receptorok fokozott elérhetőségéhez, és ezáltal fokozódó vazokonstriktívhoz vezethet. Az intakt arteriolákon funkcionálisan elérhető, "aktív" AT1 receptorok funkciójának detektálására az Ang 2 kiváltotta érválaszokat 30 perc utáni várakozást követő ismételt adagolás során is megvizsgáltuk. Normál körülmények között az Ang 2 ismételt adása tachifilaxissal jár (Juul, 1987; Vicaute, 1989). Ennek hátterében az Ang 2 által előidézett deszenzitizáció és az AT1 receptorok következményes internalizációja áll (Hunyady, 2000; Thomas, 1996).

Ennek megfelelően kísérleteink során LZ arteriolákon szignifikánsan csökkent az Ang2 ismételt hatására kialakuló konstriktó mértéke. Érdekes módon ezzel szemben az elhízott OZ állatokból izolált gracilis arteriolákban az Ang 2 kiváltotta konstriktó megtartott maradt az ismételt applikáció során, ami a tachifilaxis elmaradását jelzi. Mivel a noradrenalin esetében nem tapasztaltunk tachifilaxist az elhízott állatokban, így arra következtetünk, hogy valószínűleg nem a simaizom kontraktilis rendszerében, például a kalcium érzékenységben fennálló különbség áll a fenntartott Ang 2 válasz hátterében.

A korábbiakban Naik és társai kísérleteik során demonstrálták, hogy az obese Zucker patkányokban tapasztalt fokozott $\alpha 1$ -adrenoceptor mediálta vazokonstriktó hátterében a Rho kináz fokozott aktivációja áll (Naik, 2006). Kísérleteink során mi nem tapasztaltunk eltérést a noradrenalin kiváltotta konstriktó mértékében az OZ és LZ patkányokból izolált arteriolák között. A különbség hátterében a kísérletek során használt eltérő agonisták (míg mi a kísérleteink során noradrenalint, addig Naik és társai fenilefrint használtak), illetve a kísérlet eltérő körülményei állhatnak. Jóllehet Naik és társai eredményeihez hasonlóan kísérleteink során az OZ állatok ereiből származó homogenizátumok fokozott Rho kináz aktivitást mutattak a LZ erekből származó homogenizátumokhoz képest. Felvetettük azt a hipotézist, hogy a Rho kináz jelátviteli folyamata részt vesz az AT1 receptorok internalizációjában és így hozzájárulhat az elhízás során megjelenő fenntartott Ang 2 válaszhoz. Ahhoz, hogy felmérjük a Rho kináz aktivációjának funkcionális következményeit, az Ang 2 kiváltotta válaszokat Rho kináz gátlóval történő gátlást követően is megvizsgáltuk. Kontroll állatokban a Rho kináz gátló Y27632 jelenlétében az Ang 2 hozzáadására konstriktó alakult ki, és a megfigyelt válasz az Ang 2 másodszori hozzáadásakor szignifikáns csökkenést mutatott. Ez arra

utalhat, hogy élettani körülmények között a vázizom arteriolákban a Rho kináz elhanyagolható szerepet játszik az Ang 2 kiváltotta válasz létrehozásában. Érdekes módon az elhízott állatokban a Rho kináz gátló jelenlétében lecsökkent az Ang 2 ismételt hozzáadására kialakuló, korábban fenntartott Ang 2 válasz. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az elhízott patkányok gracilis arterioláiban a Rho kináz fokozott aktivációja szerepet játszhat a fenntartott Ang 2 kiváltotta válasz kialakulásában.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az elhízás genetikai modelljében a Rho kináz fokozott aktivációja figyelhető meg, amely hozzájárul az Ang 2 ismételt adására kialakuló vazokonstrikció fenntartásában vázizom arteriolákban. Úgy gondoljuk, hogy az Ang 2 ismételt adagolásának hatására kialakuló fokozott konstrikció szerepet játszhat az elhízásban jelentkező perifériás szöveti perfúziózavar és a következményes komplikációk, mint például a magas vérnyomás betegség kialakulásában.

Gracilis izom arteriolák endothel függő dilatációjának vizsgálata magas zsírtartalmú diétával táplált egerekben

Kísérleteink további részében magas zsírtartalmú diéta segítségével idéztünk elő elhízást egerekben. A magas zsírtartalmú étrend hatására az egerekből izolált gracilis arteriolákban károsodott az acetilkolin kiváltotta dilatáció a normál diétán tartott állatokhoz képest. Érdekes módon, amennyiben az egereket a magas zsírtartalmú diéta mellett resveratrol kezelésnek is alávetettük, abban az esetben a resveratrol hatékonyan csökkentette a magas zsírtartalmú diéta által előidézett ACh válaszban fellépő károsodást. Kísérleteink eredménye összhangban áll a Zhang és társai által korábban tapasztaltakkal, akik elhízott 2-es típusú diabeteses

egerekben bizonyították a resveratrol jótékony szerepét az aorta károsodott endothel mediálta dilatációjával kapcsolatban (Zhang, 2009b).

A magas zsírtartalmú diéta és a resveratrol hatását Nrf2 génkiütött állatokon is megvizsgáltuk. Az Nrf2 transzkripciós faktor több gén expressziójának szabályzásáért felelős, amelyek közt több antioxidáns enzim is szerepel, így fontos szerepet játszhat az oxidatív stressz szabályozásában. Az Nrf2 transzkripciós faktor szempontjából genetikailag hiányos állatokban normál diétát követően nem találtunk csökkenést a gracilis arteriolák dilatációjában a génkiütés nélküli állatok ereinek dilatációihoz viszonyítva. Ezek alapján arra következtetünk, hogy az Nrf2 transzkripciós faktor élettani körülmények között nem játszik jelentős szerepet az acetilkolin által kiváltott dilatáció befolyásolásában. Az Nrf2 génkiütött egerekben a magas zsírtartalmú diéta hatására a vad típusú egerekhez viszonyítva kifejezettebb mértékben károsodott az ACh dilatáció, ami arra enged következtetni, hogy az Nrf2 transzkripciós faktor protektív tényező a magas zsírtartalmú diéta hatásaival szemben. Ezzel párhuzamosan a resveratrol kezelés csak részben eredményezett javulást az ACh kiváltotta dilatációban magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{-/-} egerekben, így a kontroll étrenden lévő Nrf2^{-/-} egerekhez képest meglévő ACh kiváltotta dilatációban fennálló különbség továbbra is fennmaradt. Ezen eredményünk arra utalhat, hogy az Nrf2 transzkripciós faktor fontos szerepet játszhat a resveratrol vazoprotektív hatásának kialakításában. Korábbi tanulmányok a resveratrol bizonyos vaszkuláris hatásait az ösztrogén receptorok aktivációjának tulajdonították (Klinge, 2008), azonban ezeknek Nrf2 aktiválásában betöltött szerepe kevésbé ismert. Fontos megemlíteni azonban, hogy a resveratrol valószínűleg az érfali Nrf2 direkt aktiválásától független folyamatok segítségével is kifejtheti vazoprotektív hatását. Például több kutatócsoport is igazolta, hogy a resveratrol aktiválhatja a NO szintázt, fokozza a NO szintézisét és

biológiai elérhetőségét (Csiszar, 2008; Zhang, 2009b) valamint gátolhatja a NADPH oxidáz aktivációját (Chen, 2005; Zhang, 2009b). Mindemellett a resveratrol a mikroérműködést a zsírszövet parakrin/endokrin funkciójának módosításával indirekt módon is befolyásolhatja (Zhang, 2009a).

Az érfali szabadgyök (ROS) termelődés jelentős mértékben részt vesz az elhízás során tapasztalható érfali elváltozások kialakításában. Kutatócsoportunk korábbi kísérletek során bizonyította, hogy magas zsírtartalmú diétával előidézett elhízás során a xantin oxidáz eredetű szuperoxid produkció következtében károsodik a gracilis arteriolák NO mediálta dilatációja (Erdei, 2006). Ezek alapján feltételeztük, hogy a magas zsírtartalmú diétán tartott egerek femorális artéria homogenizátumaiban hasonló módon megnövekedett ROS produkciót találunk, és hogy ennek mértéke lecsökken resveratrol adását követően. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a magas zsírtartalmú diéta a $\text{Nrf2}^{+/+}$ és $\text{Nrf2}^{-/-}$ egerekben egyaránt szignifikánsan fokozza a ROS termelődést. A magas zsírtartalmú étrenden tartott $\text{Nrf2}^{+/+}$ egerek esetében a resveratrol kezelés a kontroll szintre csökkentette az érfali ROS termelődését, ami alapján kézenfekvőnek tűnik, hogy a resveratrol a szabadgyöktermelődés gátlásán keresztül fejti ki hatását. Eredményeink ebben a tekintetben összhangban állnak más kutatócsoportok által tapasztaltakkal (Chow, 2007; Wung, 2005). Az $\text{Nrf2}^{+/+}$ egerekkel ellentétben a resveratrol kezelés csak részben csillapította a magas zsírtartalmú diétával táplált $\text{Nrf2}^{-/-}$ egerek érfali ROS termelését.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a magas zsírtartalmú diéta hatására a vázizom mikroerekben károsodik az endothel mediálta dilatáció. A resveratrol az Nrf2 transzkripciós faktor aktivációjával az érfali szabadgyök termelődésének csökkentésén keresztül csillapítja a magas zsírtartalmú diéta hatására fellépő endothel diszfunkciót.

Kálium aktiválta kalcium csatornáknban bekövetkező elváltozások elhízás során

Ismert, hogy a magas zsírtartalmú nyugati diétával társuló elhízás inzulin rezisztenciához, hiperinzulinémiához és hiperkoleszterolémiához vezethet, amelyek fontos szerepet játszhatnak az endotheliális diszfunkció kialakulásában. Korábbi klinikai megfigyelések rávilágítottak arra, hogy egészséges egyénekben akár egyszeri magas zsírtartalmú étkezés hatására átmeneti csökkenés jöhet létre az arteria brachialis áramlás indukálta dilatációjában (Cuevas, 2000; Plotnick, 1997). Ezen klinikai megfigyelések arra hívják fel a figyelmet, hogy az étkezéssel bevitt zsírmennyiség jelentős befolyással lehet a mikroerek dilatációs funkciójára. Éppen ezért kísérleteink során 10 héten át tartó magas zsírtartalmú diétával idéztünk elő elhízást hím Wistar patkányokban. Korábbi tapasztalatainkkal megegyezően (Erdei, 2006) 10 hét elteltével a magas zsírtartalmú étrenden tartott patkányok testtömege, szérum glükóz, inzulin és koleszterinszintje szignifikáns növekedést mutatott a kontroll, normál diétát fogyasztó patkányokhoz viszonyítva.

Érdekes módon kísérleteinkben az elhízott patkányok koronária arterioláiban a kontroll erekhez viszonyítva megtartott ACh-kiváltotta dilatációt tapasztaltunk, a korábban kutatócsoportunk által ugyanebben a modellben gracilis arteriolákban megfigyelt károsodott dilatációval ellentétben (Fulop, 2007). Eredményeinkhez hasonlóan bizonyos közlemények megtartott (Henderson, 2004; Knudson, 2006), sőt fokozott (Prakash, 2006) koronária vazodilatációról is beszámolnak az elhízás különböző állatmodelljeiben. A megőrzött, illetve fokozott koronária dilatáció hátterében álló mechanizmusok azonban nem kerültek kellőképpen tisztázásra.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a NO szintáz gátlása szignifikánsan csökkentette a dilatációt kontroll erekben, míg a HFD aretriolák esetében ezzel ellentétben nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést L-NAME inkubációt követően. Ez arra utalhat, hogy elhízás során a koronária mikroérkeringésben károsodhat a NO mediálta dilatáció útvonala, azonban nem ismert kompenzációs folyamatok segítségével fenntartott maradhat az endothel mediálta dilatáció.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy elhízott állatokban megtartott marad az EDHF mediálta dilatáció. Eredményeink arról tanuskodnak, hogy elhízott állatokban a BKCa csatornák részt vesznek az EDHF válasz kialakításában és ezzel párhuzamosan azt is rögzítettük, hogy a BKCa csatorna specifikus nyitószere kifejezetten nagyobb dilatációt okozott elhízott állatokból izolált koronáriák esetében. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a BKCa csatornák fokozott aktivációja és az EDHF válaszból való fokozott részvétele is szerepet játszhat a koronária arteriolák dilatációs funkciójának megtartásában elhízás során.

Már régóta ismert, hogy a BKCa csatornák részét képezik egy olyan makromolekuláris jelátviteli komplexusnak, amely különböző enzimeket és ioncsatornákat foglal magába és amely a lokális válaszáért, illetve a térben elkülönülő jelátviteli folyamatokért felelős (Lu, 2006). Ezzel kapcsolatosan Wang és társai (Wang, 2005a) bebizonyították marha aorta endotheliális sejtenyészeten, hogy a BKCa csatornák a caveola mikrodoménekbe lokalizálódnak. Szacharóz grádiens sejtfractionálás és koimmunoprecipitáció segítségével kimutatták, hogy a BKCa csatornák a caveolin gazdag lipid raftokban találhatóak meg a cav-1 fehérjéhez kapcsolódva. Közleményükben többek között arról is bizonyítékkal szolgálnak, hogy a cav-1-gyel való kölcsönhatás negatív szabályozó hatással bír a BKCa csatornák izoproterenollal való aktivációjára (Wang, 2005a). Érdekes módon Cheng és társai cav-1 génkiütött egerekben

megnövekedett BKCa csatorna sűrűséget találtak az agyi artériák simaizomsejtjeinek felszínén, míg az egyedi BKCa csatornák által vezetett tranziens áram nem különbözött a vad típusú egerek esetében mérhetőtől (Cheng, 2006). Alioua és társai azt is kimutatták, hogy patkány aorta simaizom sejtjeiben a cav-1 és a BKCa csatorna kolokalizációja ellenére ez a kölcsönhatás nem változtatja meg a BKCa csatornák kapunyitási karakterisztikáját (Alioua, 2008). Ezen tanulmányok alapján kijelenthető, hogy a cav-1 fizikálisan kapcsolatba lép a BKCa csatornákkal, de a cav-1 gátló hatása nem a BKCa csatornák funkciójának direkt gátlásán keresztül, hanem azok caveolákba történő összpontosításán át valósul meg. A cav-1 – BKCa kölcsönhatás funkcionális következményei és az EDHF közvetítette arterioláris dilatációra kifejtett hatása mindeztáig nem voltak ismertek.

Felvetettük azt a hipotézist, hogy az elhízott patkányokban a BKCa csatornák EDHF mediálta dilatációban való fokozott szerepvállalásának hátterében a cav-1 gátló hatásának megszűnése állhat. Érdekes módon azt találtuk, hogy a cav-1 immunofestődés kifejezett csökkenést mutatott az elhízott patkányok koronária arterioláinak simaizomsejtjeiben. Ezen megfigyelésünkkel összhangban csökkent cav-1 fehérje expressziót mutattunk ki az elhízott patkányok koronária artériáiban a kontroll állatok koronáriáihoz hasonlítva. Érdekes módon egyes tanulmányok hiperkoleszterolémiás állatokban a cav-1 csökkent érfali expressziójáról számolnak be (Lin, 2006), míg más megfigyelések magas zsírtartalmú diétával etetett állatokon a cav-1 változatlan (Roberts, 2005), vagy akár fokozott kifejeződéséről (Thompson, 2004; Yang, 2007) adnak hírt. Az egymásnak ellentmondó megfigyelések magyarázatára illetve az elhízás során megváltozott cav-1 expresszió hátterében álló folyamatok tisztázására további kísérletek elvégzésére van szükség.

Ahhoz, hogy funkcionálisan igazoljuk a cav-1 BKCa csatornákra kifejtett gátló hatását, további funkcionális kísérleteket terveztünk, amelyek során cav-1 génkiütött állatokból izolált arteriolákon vizsgáltuk meg a BKCa csatornák EDHF mediálta dilatációban betöltött szerepét. Érdekes módon, annak ellenére, hogy a cav-1 KO egerek több táplálékot fogyasztanak a vad típusú egerekhez viszonyítva, védettek a fokozott kalóriabevitel által kiváltott elhízással szemben (Razani, 2002). Mivel a cav-1 génkiütéses modellje jelenleg csak egerekben elérhető és az egér koronária erek izolációjával kapcsolatban nehézségekbe ütköztünk, így egérkísérleteink során gracilis izomból izolált arteriolákat használtunk fel. Kísérleteink során a cav-1 KO egerek arterioláiban az EDHF kiváltotta dilatáció mértékét kissé, de szignifikánsan fokozottnak találtuk a vad típusú egerekben tapasztalt dilatációval összehasonlítva. Érdekes módon a cav-1 KO állatokból izolált arteriolákban a BKCa csatornák kifejezett mértékben járultak hozzá az EDHF válaszhoz, ugyanakkor ennek hiányát tapasztaltuk vad típusú egerek esetében. Ezen felül az SKCa csatornák csökkent EDHF válaszhoz való hozzájárulását találtuk cav-1 KO egerek mikroereiben, az Absi és társai által tapasztaltakhoz (Absi, 2007) hasonlóan. Ez alapján úgy tűnik, hogy a cav-1 fehérje hozzájárulhat a különböző KCa csatornák szabályozásához, az egyes csatornák funkciójának aktiválásával (SKCa) vagy gátlásával (BKCa). Az ezen szabályozó funkció hátterében álló molekuláris mechanizmusok egyelőre nem kellőképpen ismertek, de szerepe lehet a KCa csatornák cav-1 általi caveolákba történő átcsoportosításának, ahol módosulhat ezen csatornák funkciója (Alioua, 2008; Wang, 2005a). Ebből az elképzelésből kiindulva, teoretikusan a cavelák szétrombolásával modellezni lehet a cav-1 hiányának BKCa csatorna funkcióra kifejtett hatását. Ennek megfelelően kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy amennyiben a kontroll patkányokból izolált koronária arteriolákat M β CD kezelésnek (ez

az anyag ismerten szétrombolja a caveolákat (Absi, 2007; Graziani, 2004)) vetettük alá, a BKCa csatornák EDHF közvetítette dilatációhoz való hozzájárulása és a BKCa csatornák farmakológiai aktiválására kialakuló dilatáció is szignifikáns mértékben megnövekedett. Ezáltal funkcionális bizonyítékkal szolgáltunk arról, hogy a BKCa csatornák cav-1 általi caveolákba történő elrendeződése lehet az a kulcsfolyamat, amely normál körülmények között a BKCa csatornák EDHF mediálta dilatációjában való limitált részvételének hátterében áll.

Mindent együttevén a cav-1 BKCa csatornára kifejtett feltételezett gátló hatásának tudatában a cav-1 expresszió csökkenése megmagyarázhatja a BKCa csatornák elhízás során felerősödő EDHF közvetítette koronária dilatációban betöltött szerepét. Kézenfekvőnek tűnik, hogy a cav-1 expressziójának csökkenése a BKCa csatornák caveoláris lokalizációjának csökkenésével jár, így növelve azok aktiválásának lehetőségét és az EDHF válaszhoz való hozzájárulásukat. Ez a folyamat kulcsszerepet játszhat a diétával előidézett elhízás során megfigyelt megőrzött koronária arterioláris dilatáció létrejöttében. Az, hogy a koronária arteriolák ezen kompenzációs mechanizmusa az elhízás korai szakaszára lehet-e jellemző jelenleg spekuláció tárgya. Valószínű, hogy az elhízással kapcsolatos metabolikus és hemodinamikai elváltozások szükségessé teszik a koronária rezisztencia erek dilatációs funkciójának adaptációját, ami elengedhetetlen a szívizom megnövekedett metabolikus igényeinek kiszolgálásához (Bagi, 2009). Jóllehet, a koronária keringés ezen adaptív folyamatainak hatása a metabolikus betegség előrehaladtával és egyéb társbetegségek megjelenésével (úgy mint inzulin rezisztencia, magas vérnyomás, cukorbetegség) fokozatosan csökkenhet, amely fokozatosan a vazodilatációs működés beszűküléséhez vezethet. Ezzel kapcsolatosan a 2-es típusú diabetes (elhízás és hiperglikémia) állatmodelljeiben írtak le

csökkent BKCa funkciót (Burnham, 2006b; Dong, 2008) illetve más kálium által szabályozott csatornák, úgymint a KATP (Miura, 2003b) és az SKCa (Burnham, 2006a) csatornák károsodását.

Összegezve kísérleteink során elsőként szolgáltunk funkcionális bizonyítékkal a cav-1 BKCa csatornán kifejtett gátló hatásáról intakt ereken, amely magyarázatul szolgálhat a BKCa csatornák EDHF válaszban való minimális részvételére kontroll körülmények között. Magas zsírtartalmú diétával előidézett elhízásban a cav-1 gátló hatásának elvesztésével megnő a BKCa csatornák EDHF közvetítette dilatációban betöltött szerepe. Ez a folyamat elengedhetetlennek tűnik a koronária arterioláris dilatáció fenntartásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elhízás során megváltozik a rezisztencia erek vazomotor működése, azonban ennek természete és a háttérben álló folyamatok pontos mibenléte nem kellőképpen ismert. Kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy az elhízás állatkísérletes modelljeiben megvizsgáljuk a vázizom és koronária mikroerek vazomotor működését. Kísérleteink során az alábbi új megállapításokat tettük: 1) Vázizom arteriolákban az elhízás során a Rho kináz fokozott aktivációjának következtében fokozott marad az Ang 2 ismételt adására bekövetkező vazokonstrikció. 2) Elhízás hatására a vázizom ereken károsodik az endothel közvetítette dilatáció, amelyet a resveratrol az Nrf2 transzkripciós faktor aktivációjával, és ezáltal az érfa szabadgyök termelődésének csökkentésével csillapítani képes. 3. Koronária arteriolákban az elhízás során megtartott marad az endothelium közvetítette dilatáció. A cav-1 gátló hatásának elvesztésével megnő a BKCa csatornák EDHF válaszban betöltött szerepe, amely kulcsszerepet játszik a koronária mikroérműködés fenntartásában.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az elhízás során vázizom arteriolákban károsodhat a mikroérműködés, míg a koronária mikroerek a keringés fenntartására irányuló adaptációs mechanizmusok segítségével aktívan alkalmazkodnak a megnövekedett metabolikus igényhez. Úgy gondoljuk, hogy a BKCa csatornákon, a Rho kinázon ható értágító anyagoknak, illetve a resveratrolnak potenciális szerepe lehet az elhízással társuló kórállapotok terápiájában.

SUMMARY

It is well known that resistance vessel vasomotor function is altered in obese conditions, however the underlying mechanisms are not completely understood. Therefore, we aimed to study the vasomotor function in isolated skeletal muscle and coronary arterioles in animal models of obesity. Our key observations were the following:

1) Obesity is associated with sustained constriction in response to repeated application of angiotensin 2 in isolated skeletal muscle arterioles, likely due to an activation of the Rho kinase pathway.

2) Impairment of endothelium mediated vasodilation in skeletal muscle arterioles isolated from obese rodents can be prevented by resveratrol administration, likely via Nrf2 transcription factor activation and consequent inhibition of reactive oxygen species generation.

3) Coronary arterioles exhibit preserved endothelium mediated dilation in obesity. BKCa channels gain function in mediating EDHF dependent vasodilator responses via the loss of inhibition by caveolin-1, a process that seems to be essential for preserving coronary microvascular function.

Based on our findings, we believe that vascular responses can be impaired in the skeletal muscle microcirculation, while coronary arterioles can actively adapt to the higher metabolic demand. We believe that different vasodilator agents acting on BKCa channels, Rho kinase, or resveratrol play a potential role in the future treatment of obesity associated microvascular dysfunction.

7. IRODALOMJEGYZÉK

AZ ELŐZŐ FEJEZETEK BEN HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK:

Abel, ED, Litwin, SE, Sweeney, G (2008) Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev* 88(2): 389-419.

Absi, M, Burnham, MP, Weston, AH, Harno, E, Rogers, M, Edwards, G (2007) Effects of methyl beta-cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries; association between SK(Ca) channels and caveolin-rich domains. *Br J Pharmacol* 151(3): 332-340.

Alioua, A, Lu, R, Kumar, Y, Eghbali, M, Kundu, P, Toro, L, Stefani, E (2008) Slo1 caveolin-binding motif, a mechanism of caveolin-1-Slo1 interaction regulating Slo1 surface expression. *J Biol Chem* 283(8): 4808-4817.

Bagi, Z (2009) Mechanisms of coronary microvascular adaptation to obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(3): R556-567.

Bagi, Z, Koller, A, Kaley, G (2003) Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(4): H1404-1410.

Baur, JA, Pearson, KJ, Price, NL, Jamieson, HA, Lerin, C, Kalra, A, Prabhu, VV, Allard, JS, Lopez-Lluch, G, Lewis, K, Pistell, PJ, Poosala, S, Becker, KG, Boss, O, Gwinn, D, Wang, M, Ramaswamy, S, Fishbein, KW, Spencer, RG, Lakatta, EG, Le Couteur, D, Shaw, RJ, Navas, P, Puigserver, P, Ingram, DK, de Cabo, R, Sinclair, DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444(7117): 337-342.

Borhouse, L, Dick, GM, Asano, S, Bender, SB, Dincer, UD, Payne, GA, Neeb, ZP, Bratz, IN, Sturek, M, Tune, JD (2009) Impaired function of coronary BK(Ca) channels in metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(5): H1629-1637.

Burnham, MP, Johnson, IT, Weston, AH (2006a) Impaired small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel-dependent EDHF responses in Type II diabetic ZDF rats. *Br J Pharmacol* 148(4): 434-441.

Burnham, MP, Johnson, IT, Weston, AH (2006b) Reduced Ca^{2+} -dependent activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels from arteries of Type 2 diabetic Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4): H1520-1527.

Busse, R, Edwards, G, Feletou, M, Fleming, I, Vanhoutte, PM, Weston, AH (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23(8): 374-380.

Caballero, AE (2003) Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* 11(11): 1278-1289.

Cai, H, Harrison, DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10): 840-844.

Calle, EE, Thun, MJ, Petrelli, JM, Rodriguez, C, Heath, CW, Jr. (1999) Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 341(15): 1097-1105.

Ceravolo, R, Maio, R, Pujia, A, Sciacqua, A, Ventura, G, Costa, MC, Sesti, G, Perticone, F (2003) Pulse pressure and endothelial dysfunction in never-treated hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 41(10): 1753-1758.

Chen, CY, Jang, JH, Li, MH, Surh, YJ (2005) Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331(4): 993-1000.

Cheng, X, Jaggar, JH (2006) Genetic ablation of caveolin-1 modifies Ca^{2+} spark coupling in murine arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(6): H2309-2319.

Chilian, WM (1997) Coronary microcirculation in health and disease. Summary of an NHLBI workshop. *Circulation* 95(2): 522-528.

Choi, K, Kim, YB (2010) Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 25(2): 119-129.

Chow, SE, Hshu, YC, Wang, JS, Chen, JK (2007) Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol* 102(4): 1520-1527.

Chun, KH, Choi, KD, Lee, DH, Jung, Y, Henry, RR, Ciaraldi, TP, Kim, YB (2010) In vivo activation of ROCK1 by insulin is impaired in skeletal muscle of humans with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(3): E536-542.

Crane, GJ, Gallagher, N, Dora, KA, Garland, CJ (2003) Small- and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol* 553(Pt 1): 183-189.

Csiszar, A, Labinskyy, N, Podlutzky, A, Kaminski, PM, Wolin, MS, Zhang, C, Mukhopadhyay, P, Pacher, P, Hu, F, de Cabo, R, Ballabh, P, Ungvari, Z (2008) Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6): H2721-2735.

Cuevas, AM, Guasch, V, Castillo, O, Irribarra, V, Mizon, C, San Martin, A, Strobel, P, Perez, D, Germain, AM, Leighton, F (2000) A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids* 35(2): 143-148.

de Lorgeril, M, Salen, P, Martin, JL, Monjaud, I, Delaye, J, Mamelle, N (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99(6): 779-785.

Deitel, M (2003) Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg* 13(3): 329-330.

Devaux, M, Sassi, F (2011) Social inequalities in obesity and overweight in 11 OECD countries. *Eur J Public Health*.

Didion, SP, Lynch, CM, Baumbach, GL, Faraci, FM (2005) Impaired endothelium-dependent responses and enhanced influence of Rho-kinase in cerebral arterioles in type II diabetes. *Stroke* 36(2): 342-347.

Dimitropoulou, C, Han, G, Miller, AW, Molero, M, Fuchs, LC, White, RE, Carrier, GO (2002) Potassium (BK(Ca)) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(3): H908-917.

Dong, L, Zheng, YM, Van Riper, D, Rathore, R, Liu, QH, Singer, HA, Wang, YX (2008) Functional and molecular evidence for impairment of calcium-activated potassium channels in type-1 diabetic cerebral artery smooth muscle cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(2): 377-386.

Ellis, A, Cheng, ZJ, Li, Y, Jiang, YF, Yang, J, Pannirselvam, M, Ding, H, Hollenberg, MD, Triggle, CR (2008) Effects of a Western diet versus high glucose on endothelium-dependent relaxation in murine micro- and macro-vasculature. *Eur J Pharmacol* 601(1-3): 111-117.

Erdei, N, Toth, A, Pasztor, ET, 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): H2107-2115.

Farah, S, Agazie, Y, Ohan, N, Ngsee, JK, Liu, XJ (1998) A rho-associated protein kinase, ROKalpha, binds insulin receptor substrate-1 and modulates insulin signaling. *J Biol Chem* 273(8): 4740-4746.

Flegal, KM, Carroll, MD, Ogden, CL, Curtin, LR (2010) Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 303(3): 235-241.

Frisbee, JC, Stepp, DW (2001) Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(3): H1304-1311.

Fulop, T, Jebelovszki, E, Erdei, N, Szerafin, T, Forster, T, Edes, I, Koller, A, Bagi, Z (2007) Adaptation of vasomotor function of human coronary arterioles to the simultaneous presence of obesity and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11): 2348-2354.

Furchgott, RF, Zawadzki, JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789): 373-376.

Gratton, JP, Bernatchez, P, Sessa, WC (2004) Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* 94(11): 1408-1417.

Graziani, A, Bricko, V, Carmignani, M, Graier, WF, Groschner, K (2004) Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A2-dependent EDHF formation. *Cardiovasc Res* 64(2): 234-242.

Hashimoto, M, Akishita, M, Eto, M, Kozaki, K, Ako, J, Sugimoto, N, Yoshizumi, M, Toba, K, Ouchi, Y (1998) The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(5): 477-484.

Haslam, DW, James, WP (2005) Obesity. *Lancet* 366(9492): 1197-1209.

Henderson, KK, Turk, JR, Rush, JW, Laughlin, MH (2004) 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(3): 1159-1168.

Hilgers, RH, Todd, J, Jr., Webb, RC (2006) Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H216-222.

Hunyady, L, Catt, KJ, Clark, AJ, Gaborik, Z (2000) Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept* 91(1-3): 29-44.

Jaggard, JH, Porter, VA, Lederer, WJ, Nelson, MT (2000) Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2): C235-256.

Jern, S, Bergbrant, A, Bjorntorp, P, Hansson, L (1992) Relation of central hemodynamics to obesity and body fat distribution. *Hypertension* 19(6 Pt 1): 520-527.

Jones, CJ, Kuo, L, Davis, MJ, Chilian, WM (1995) Regulation of coronary blood flow: coordination of heterogeneous control mechanisms in vascular microdomains. *Cardiovasc Res* 29(5): 585-596.

Juul, B, Aalkjaer, C, Mulvany, MJ (1987) Responses of femoral resistance vessels to angiotensin in vitro. *Eur J Pharmacol* 135(1): 61-68.

Kapiotis, S, Holzer, G, Schaller, G, Haumer, M, Widhalm, H, Weghuber, D, Jilka, B, Roggla, G, Wolzt, M, Widhalm, K, Wagner, OF (2006) A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(11): 2541-2546.

Katakam, PV, Tulbert, CD, Snipes, JA, Erdos, B, Miller, AW, Busija, DW (2005) Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary

arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(2): H854-860.

Kawai, Y, Garduno, L, Theodore, M, Yang, J, Arinze, IJ (2010) Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization. *J Biol Chem* 286(9): 7629-7640.

Keys, A, Menotti, A, Karvonen, MJ, Aravanis, C, Blackburn, H, Buzina, R, Djordjevic, BS, Dontas, AS, Fidanza, F, Keys, MH, (1986) The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 124(6): 903-915.

Klinge, CM, Wickramasinghe, NS, Ivanova, MM, Dougherty, SM (2008) Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 22(7): 2185-2197.

Knudson, JD, Rogers, PA, Dincer, UD, Bratz, IN, Araiza, AG, Dick, GM, Tune, JD (2006) Coronary vasomotor reactivity to endothelin-1 in the prediabetic metabolic syndrome. *Microcirculation* 13(3): 209-218.

Koller, A (2002) Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension. *Microcirculation* 9(4): 277-294.

Koller, A, Huang, A (1994) Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 74(3): 416-421.

Komaru, T, Kanatsuka, H, Shirato, K (2000) Coronary microcirculation: physiology and pharmacology. *Pharmacol Ther* 86(3): 217-261.

Labinskyy, N, Csiszar, A, Veress, G, Stef, G, Pacher, P, Oroszi, G, Wu, J, Ungvari, Z (2006) Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem* 13(9): 989-996.

Lagouge, M, Argmann, C, Gerhart-Hines, Z, Meziane, H, Lerin, C, Daussin, F, Messadeq, N, Milne, J, Lambert, P, Elliott, P, Geny, B, Laakso, M, Puigserver, P, Auwerx, J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127(6): 1109-1122.

Lavie, CJ, Messerli, FH (1986) Cardiovascular adaptation to obesity and hypertension. *Chest* 90(2): 275-279.

Lin, WW, Lin, YC, Chang, TY, Tsai, SH, Ho, HC, Chen, YT, Yang, VC (2006) Caveolin-1 expression is associated with plaque formation in hypercholesterolemic rabbits. *J Histochem Cytochem* 54(8): 897-904.

Lu, R, Alioua, A, Kumar, Y, Eghbali, M, Stefani, E, Toro, L (2006) MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* 570(Pt 1): 65-72.

Martin, JW, Briesmiester, K, Bargardi, A, Muzik, O, Mosca, L, Duvernoy, CS (2005) Weight changes and obesity predict impaired resting and endothelium-dependent myocardial blood flow in postmenopausal women. *Clin Cardiol* 28(1): 13-18.

Matoba, T, Shimokawa, H, Morikawa, K, Kubota, H, Kunihiro, I, Urakami-Harasawa, L, Mukai, Y, Hirakawa, Y, Akaike, T, Takeshita, A (2003) Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(7): 1224-1230.

Matsui, T, Amano, M, Yamamoto, T, Chihara, K, Nakafuku, M, Ito, M, Nakano, T, Okawa, K, Iwamatsu, A, Kaibuchi, K (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15(9): 2208-2216.

Mehta, PK, Griendling, KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C82-97.

Miura, H, Bosnjak, JJ, Ning, G, Saito, T, Miura, M, Gutterman, DD (2003a) Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 92(2): e31-40.

Miura, H, Wachtel, RE, Loberiza, FR, Jr., Saito, T, Miura, M, Nicolosi, AC, Gutterman, DD (2003b) Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 92(2): 151-158.

Mokelke, EA, Dietz, NJ, Eckman, DM, Nelson, MT, Sturek, M (2005) Diabetic dyslipidemia and exercise affect coronary tone and differential

regulation of conduit and microvessel K⁺ current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(3): H1233-1241.

Motivala, AA, Rose, PA, Kim, HM, Smith, YR, Bartnik, C, Brook, RD, Muzik, O, Duvernoy, CS (2008) Cardiovascular risk, obesity, and myocardial blood flow in postmenopausal women. *J Nucl Cardiol* 15(4): 510-517.

Naik, JS, Xiang, L, Hester, RL (2006) Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(1): R154-161.

O'Brien, SF, McKendrick, JD, Radomski, MW, Davidge, ST, Russell, JC (1998) Vascular wall reactivity in conductance and resistance arteries: differential effects of insulin resistance. *Can J Physiol Pharmacol* 76(1): 72-76.

Oltman, CL, Davidson, EP, Coppey, LJ, Kleinschmidt, TL, Lund, DD, Yorek, MA (2008) Attenuation of vascular/neural dysfunction in Zucker rats treated with enalapril or rosuvastatin. *Obesity (Silver Spring)* 16(1): 82-89.

Oltman, CL, Richou, LL, Davidson, EP, Coppey, LJ, Lund, DD, Yorek, MA (2006) Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(4): H1780-1787.

Palombo, C, Kozakova, M, Magagna, A, Bigalli, G, Morizzo, C, Ghiadoni, L, Virdis, A, Emdin, M, Taddei, S, L'Abbate, A, Salvetti, A (2000) Early impairment of coronary flow reserve and increase in minimum coronary resistance in borderline hypertensive patients. *J Hypertens* 18(4): 453-459.

Patel, HH, Murray, F, Insel, PA (2008) Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 359-391.

Pearson, KJ, Baur, JA, Lewis, KN, Peshkin, L, Price, NL, Labinskyy, N, Swindell, WR, Kamara, D, Minor, RK, Perez, E, Jamieson, HA, Zhang, Y, Dunn, SR, Sharma, K, Pleshko, N, Woollett, LA, Csiszar, A, Ikeno, Y, Le Couteur, D, Elliott, PJ, Becker, KG, Navas, P, Ingram, DK, Wolf, NS, Ungvari, Z, Sinclair, DA, de Cabo, R (2008) Resveratrol delays age-

related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8(2): 157-168.

Peterson, LR, Soto, PF, Herrero, P, Mohammed, BS, Avidan, MS, Schechtman, KB, Dence, C, Gropler, RJ (2008) Impact of gender on the myocardial metabolic response to obesity. *JACC Cardiovasc Imaging* 1(4): 424-433.

Plotnick, GD, Corretti, MC, Vogel, RA (1997) Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA* 278(20): 1682-1686.

Prakash, R, Mintz, JD, Stepp, DW (2006) Impact of obesity on coronary microvascular function in the Zucker rat. *Microcirculation* 13(5): 389-396.

Razani, B, Combs, TP, Wang, XB, Frank, PG, Park, DS, Russell, RG, Li, M, Tang, B, Jelicks, LA, Scherer, PE, Lisanti, MP (2002) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 277(10): 8635-8647.

Rexrode, KM, Carey, VJ, Hennekens, CH, Walters, EE, Colditz, GA, Stampfer, MJ, Willett, WC, Manson, JE (1998) Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 280(21): 1843-1848.

Robb, EL, Page, MM, Wiens, BE, Stuart, JA (2008) Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem Biophys Res Commun* 367(2): 406-412.

Roberts, CK, Barnard, RJ, Sindhu, RK, Jurczak, M, Ehdaie, A, Vaziri, ND (2005) A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 98(1): 203-210.

Romero-Corral, A, Sert-Kuniyoshi, FH, Sierra-Johnson, J, Orban, M, Gami, A, Davison, D, Singh, P, Pusalavidyasagar, S, Huyber, C, Votruba, S, Lopez-Jimenez, F, Jensen, MD, Somers, VK (2010) Modest visceral fat gain causes endothelial dysfunction in healthy humans. *J Am Coll Cardiol* 56(8): 662-666.

Saliez, J, Bouzin, C, Rath, G, Ghisdal, P, Desjardins, F, Rezzani, R, Rodella, LF, Vriens, J, Nilius, B, Feron, O, Balligand, JL, Dessy, C (2008) Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca^{2+} signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* 117(8): 1065-1074.

Schalkwijk, CG, Stehouwer, CD (2005) Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 109(2): 143-159.

Si, H, Heyken, WT, Wolfle, SE, Tysiac, M, Schubert, R, Grgic, I, Vilianovich, L, Giebing, G, Maier, T, Gross, V, Bader, M, de Wit, C, Hoyer, J, Kohler, R (2006) Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Circ Res* 99(5): 537-544.

Siddiqui, AH, Hussain, T (2007) Enhanced AT_1 receptor-mediated vasocontractile response to ANG II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(4): H1722-1727.

Subramanian, R, MacLeod, KM (2003) Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol* 477(2): 143-152.

Sun, D, Huang, A, Koller, A, Kaley, G (2001) Endothelial $\text{K}(\text{ca})$ channels mediate flow-dependent dilation of arterioles of skeletal muscle and mesentery. *Microvasc Res* 61(2): 179-186.

Tanaka, Y, Koike, K, Toro, L (2004) MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* 40(4-5): 125-153.

Thomas, WG, Thekkumkara, TJ, Baker, KM (1996) Molecular mechanisms of angiotensin II (AT_1A) receptor endocytosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 3: S74-80.

Thompson, MA, Henderson, KK, Woodman, CR, Turk, JR, Rush, JW, Price, E, Laughlin, MH (2004) Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J Appl Physiol* 96(3): 1114-1126.

Triggle, CR, Ding, H, Anderson, TJ, Pannirselvam, M (2004) The endothelium in health and disease: a discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes. *Mol Cell Biochem* 263(1-2): 21-27.

Tune, JD, Gorman, MW, Feigl, EO (2004) Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J Appl Physiol* 97(1): 404-415.

Ungvari, Z, Csiszar, A, Kaminski, PM, Wolin, MS, Koller, A (2004) Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol* 165(1): 219-226.

van Stralen, MM, te Velde, SJ, Singh, AS, De Bourdeaudhuij, I, Martens, MK, van der Sluis, M, Manios, Y, Grammatikaki, E, Chinapaw, MJ, Maes, L, Bere, E, Jensen, J, Moreno, L, Jan, N, Molnar, D, Moore, H, Brug, J (2011) European Energy balance Research to prevent excessive weight Gain among Youth (ENERGY) project: Design and methodology of the ENERGY cross-sectional survey. *BMC Public Health* 11: 65.

Vicaut, E, Montalescot, G, Hou, X, Stucker, O, Teisseire, B (1989) Arteriolar vasoconstriction and tachyphylaxis with intraarterial angiotensin II. *Microvasc Res* 37(1): 28-41.

Vigili de Kreutzenberg, S, Kiwanuka, E, Tiengo, A, Avogaro, A (2003) Visceral obesity is characterized by impaired nitric oxide-independent vasodilation. *Eur Heart J* 24(13): 1210-1215.

Wang, XL, Ye, D, Peterson, TE, Cao, S, Shah, VH, Katusic, ZS, Sieck, GC, Lee, HC (2005a) Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 280(12): 11656-11664.

Wang, Z, Zou, J, Cao, K, Hsieh, TC, Huang, Y, Wu, JM (2005b) Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med* 16(4): 533-540.

Weston, AH, Feletou, M, Vanhoutte, PM, Falck, JR, Campbell, WB, Edwards, G (2005) Bradykinin-induced, endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries: involvement of potassium channel

activation and epoxyeicosatrienoic acids. *Br J Pharmacol* 145(6): 775-784.

Wilson, PW, D'Agostino, RB, Sullivan, L, Parise, H, Kannel, WB (2002) Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med* 162(16): 1867-1872.

Wolfle, SE, de Wit, C (2005) Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J Vasc Res* 42(6): 475-482.

Woodman, CR, Turk, JR, Rush, JW, Laughlin, MH (2004) Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs. *J Appl Physiol* 96(3): 1105-1113.

Wung, BS, Hsu, MC, Wu, CC, Hsieh, CW (2005) Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sci* 78(4): 389-397.

Yang, N, Ying, C, Xu, M, Zuo, X, Ye, X, Liu, L, Nara, Y, Sun, X (2007) High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats. *Cardiovasc Res* 76(1): 167-174.

Zhang, C, Knudson, JD, Setty, S, Araiza, A, Dincer, UD, Kuo, L, Tune, JD (2005) Coronary arteriolar vasoconstriction to angiotensin II is augmented in prediabetic metabolic syndrome via activation of AT1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5): H2154-2162.

Zhang, H, Zhang, C (2009a) Regulation of Microvascular Function by Adipose Tissue in Obesity and Type 2 Diabetes: Evidence of an Adipose-Vascular Loop. *Am J Biomed Sci* 1(2): 133-142.

Zhang, H, Zhang, J, Ungvari, Z, Zhang, C (2009b) Resveratrol improves endothelial function: role of TNF{alpha} and vascular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(8): 1164-1171.

Zygmunt, PM, Hogestatt, ED (1996) Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 117(7): 1600-1606.

Iktatószám: DEENKÉTK /186/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Fehér Attila

Neptun kód: IUX2O4

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bagi, Z., **Fehér, A.**, Cassuto, J., Akula, K., Labinsky, N., Kaley, G., Koller, Á.: Increased availability of angiotensin AT1 receptors leads to sustained arterial constriction to angiotensin II in diabetes - role for Rho-kinase activation.
Br. J. Pharmacol. 163 (5), 1059-1068, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01307.x>
IF:4.925 (2010)
2. **Fehér, A.**, Rutkai, I., Belezna, 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
3. Ungvári, Z., Bagi, Z., **Fehér, A.**, Recchia, F.A., Sonntag, W.E., Pearson, K., de Cabo, R., Csiszár, A.: Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2.
Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol. 299 (1), H18-H24, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2010>
IF:3.88
4. Jebelovszki, É., Király, C., Erdei, N., **Fehér, A.**, Pasztor, T.É., Rutkai, I., Forster, T., Édes, I., Koller, Á., 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 (6), H2558-H2564, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01198.2007>
IF:3.643

További Közlemények

5. Bagi, Z., **Fehér, A.**, Cassuto, J.: Microvascular responsiveness in obesity: Implications for therapeutic intervention.
Br. J. Pharmacol. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01606.x>
IF:4.925 (2010)
6. 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)
7. 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
8. Rutkai, I., **Fehér, A.**, Erdei, N., Henrion, D., Papp, Z., Édes, I., Koller, Á., Kaley, G., Bagi, Z.: Activation of prostaglandin E2 EP1 receptor increases arteriolar tone and blood pressure in mice with type 2 diabetes.
Cardiovasc. Res. 83 (1), 148-154, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp098>
IF:5.801

Összesített impakt faktor: 35,191

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 18,499

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, 2011.09.06



8. TÁRGYSZAVAK

elhízás

vazomotor működészavar

endothel

miogén tónus

koronária mikrocirkuláció

angiotenzin 2

Rho kináz

resveratrol

endothel eredetű hiperpolarizációs faktor

cavolin-1

BK(Ca) csatorna

KEY WORDS

obesity

vasomotor dysfunction

endothel

myogenic tone

coronary microcirculation

angiotensin 2

Rho kinase

resveratrol

endothelium derived hyperpolarizing factor

caveolin-1

BK(Ca) channel

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügyi Centrum Kardiológiai Intézet munkatársainak, kiemelten Dr. Édes István Intézet Igazgató Úrnak, hogy mindenkoron segítették tudományos kutatásaimat.

Köszönetet nyilvánítok a Laki Kálmán Doktori Iskola dolgozóinak, különösképpen Dr. Muszbek László professzor Úrnak a Ph.D. képzésem keretében végzett munkámban nyújtott segítségért.

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

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

10. FÜGGELÉK

A függelék az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények különlenyomatait tartalmazza.

Eva Jebelovszki, Csaba Kiraly, Nora Erdei, Attila Feher, Eniko T. Pasztor, Ibolya Rutkai, Tamas Forster, Istvan Edes, Akos Koller and Zsolt Bagi
Am J Physiol Heart Circ Physiol 294:2558-2564, 2008. First published Apr 11, 2008;
doi:10.1152/ajpheart.01198.2007

You might find this additional information useful...

This article cites 37 articles, 25 of which you can access free at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/294/6/H2558#BIBL>

This article has been cited by 1 other HighWire hosted article:

Mechanisms of coronary microvascular adaptation to obesity

Z. Bagi

Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, September 1, 2009; 297 (3): R556-R567.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/294/6/H2558>

Additional material and information about *AJP - Heart and Circulatory Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpheart>

This information is current as of November 16, 2009 .

High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation

Eva Jebelovszki,¹ Csaba Kiraly,² Nora Erdei,² Attila Feher,² Eniko T. Pasztor,² Ibolya Rutkai,² Tamas Forster,¹ Istvan Edes,² Akos Koller,^{3,4} and Zsolt Bagi^{2,4}

¹Second Department of Medicine and Center of Cardiology, University of Szeged, Szeged; ²Institute of Cardiology, University of Debrecen, Debrecen; ³Department of Pathophysiology and Gerontology, University of Pecs, Pecs, Hungary; and ⁴Department of Physiology, New York Medical College, Valhalla, New York

Submitted 15 October 2007; accepted in final form 7 April 2008

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. First published April 11, 2008; doi:10.1152/ajpheart.01198.2007.—The impact of obesity on nitric oxide (NO)-mediated coronary microvascular responses is poorly understood. Thus NO-mediated vasomotor responses were investigated in pressurized coronary arterioles (~100 μ m) isolated from lean (on normal diet) and obese (fed with 60% of saturated fat) rats. We found that dilations to acetylcholine (ACh) were not significantly different in obese and lean rats (lean, $83 \pm 4\%$; and obese, $85 \pm 3\%$ at 1 μ M), yet the inhibition of NO synthesis with *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester reduced ACh-induced dilations only in vessels of lean controls. The presence of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor oxadiazolo-quinoxaline (ODQ) elicited a similar reduction in ACh-induced dilations in the two groups of vessels (lean, $60 \pm 11\%$; and obese, $57 \pm 3\%$). Dilations to NO donors, sodium nitroprusside (SNP), and diethylenetriamine (DETA)-NONOate were enhanced in coronary arterioles of obese compared with lean control rats (lean, $63 \pm 6\%$ and $51 \pm 5\%$; and obese, $78 \pm 5\%$ and $70 \pm 5\%$, respectively, at 1 μ M), whereas dilations to 8-bromo-cGMP were not different in the two groups. In the presence of ODQ, both SNP and DETA-NONOate-induced dilations were reduced to a similar level in lean and obese rats. Moreover, SNP-stimulated cGMP immunoreactivity in coronary arterioles and also cGMP levels in carotid arteries were enhanced in obese rats, whereas the protein expression of endothelial NOS and the sGC β_1 -subunit were not different in the two groups. Collectively, these findings suggest that in coronary arterioles of obese rats, the increased activity of sGC leads to an enhanced sensitivity to NO, which may contribute to the maintenance of NO-mediated dilations and coronary perfusion in obesity.

microcirculation; nitric oxide; guanosine 3',5'-cyclic monophosphate; dilation

THERE IS A GENERAL AGREEMENT that obesity confers increased risk for developing cardiovascular disease and its complications, such as coronary heart disease (17). Vasomotor dysfunction of the coronary microvessels is considered to be one of the early developing alterations in obesity, contributing to the disturbed regulation of tissue perfusion and predisposing patients to myocardial ischemia (9). Studies have shown that any increase in body mass requires higher cardiac output and consequently increased coronary blood flow (14, 20, 22). Given that, an impairment of

coronary vasomotor function is likely to be more detrimental on myocardial perfusion in obese subjects. In contrast, it has been reported that cardiovascular function in obese and hypertensive patients may not be impaired compared with that in lean and hypertensive individuals, and it has been proposed that obesity, in some cases, may protect patients from the deleterious vascular effect of hypertension by decreasing hypertensive target organ damage (4, 22). Thus it is likely that a functional adaptation of the vascular system develops in obesity, which, at least in the early phase, provides an adequate tissue perfusion to meet the higher metabolic requirements (22).

The existence of such vascular adaptive mechanisms in coronary vessels was substantiated by our recent observations showing an enhanced dilator capacity of coronary microvessels isolated from diabetic patients (31) and also in obese patients with hypertension (15). Particularly, we have found that coronary arteriolar dilations to bradykinin and also to the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) were augmented in obese patients and were positively correlated with the body mass index (15). In line with our observations, there are few recent reports showing not only preserved (18, 19, 21, 34) but even enhanced (26) coronary vasodilations in different animal models of obesity, although the underlying mechanisms remain obscure.

These aforementioned findings led us to the hypothesis that obesity activates, as yet unknown, adaptive mechanisms intrinsic to the coronary arteriolar wall, aiming to maintain adequate tissue perfusion of the myocardium. Accordingly, in this study, we set out to characterize the impact of obesity on coronary arteriolar vasomotor function, hence to furnish evidence for vascular adaptation and to explore the possible cellular mechanisms involved. Since NO plays an important role in regulating coronary blood flow, we have focused the investigation on the possible alterations in NO-mediated vasomotor function in isolated, pressurized coronary arterioles of lean and high-fat diet-induced obese rats (10).

METHODS

Animal model of obesity. Male Wistar rats ($n = 50$) were purchased from Charles River. The rats were maintained in the animal care facility at our university with a 12-h:12-h light-dark cycle and were given free access to food and water. The rats were maintained on standard rat chow ($n = 25$) or on high-fat diet ($n = 25$; European Union-modified rodent diet with 60% fat; 58Y1, TestDiet; PMI Nutrition) for 10 wk (10). All protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

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

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Isolation of rat coronary arterioles. With the use of microsurgical instruments and an operating microscope, the second branch of the septal artery (~1.5 mm in length) running intramuscularly was isolated and cannulated. The cannulated arteriole was connected with silicone tubing to a pressure servo control system (Living Systems Instrumentation) to set the intraluminal pressure to 80 mmHg. Changes in arteriolar diameter were continuously recorded with a digital camera (CFW1310; Scion) connected to a microscope (Eclipse 80i; Nikon) (2).

Assessment of coronary arteriolar responses. During an incubation period of 1 h, a spontaneous myogenic tone developed in the isolated coronary arterioles in response to the intraluminal pressure of 80 mmHg. Cumulative concentrations of the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine (ACh; 1 nmol/l–1 μ mol/l) were administered to the coronary arterioles from lean and obese rats in the presence and absence of *N*^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 200 μ mol/l for 30 min), an inhibitor of the NO synthase, and changes in diameter were measured. Arterioles were then incubated with the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor oxadiazolo-quinoxaline (ODQ; 10 μ mol/l for 30 min), and arteriolar responses to ACh were obtained again in the two groups. In a separate set of experiments, dilations to cumulative concentrations of NO donors SNP (1 nmol/l–10 μ mol/l) and DETA-NONOate (1 nmol/l–10 μ mol/l) were investigated in isolated coronary arterioles of lean and obese rats. The arterioles were then incubated with ODQ (10 μ mol/l for 30 min), and arteriolar responses to NO donors were reassessed. In another series of experiments, increasing concentrations of 8-bromo-cGMP, a cell-permeable cGMP analog (1 nmol/l–10 μ mol/l), were administered and changes in diameter were measured.

cGMP immunocytochemistry. The sGC activity was detected in coronary arterioles through the identification of basal and NO donor-stimulated increases in cGMP immunoreactivity by using antibody against cGMP similarly as it was described previously (12). Briefly, the left ventricle including the coronary arteriole was embedded and frozen in optimal cutting temperature compound (Tissue Tek; Electron Microscopy Sciences). Unfixed consecutive sections (10 μ m thick) were transferred to a solution containing 1 μ M SNP in PBS and incubated for 15 min at 37°C. Other sections remained in PBS solution during the 15-min incubation period and served as unstimulated controls. Sections were then fixed with acetone and immunolabeled with a monoclonal anti-cGMP primary antibody (dilution 1:2,000; Sigma). Immunostainings were visualized by using an avidin-biotin horseradish peroxidase visualization system (Vectastain kit; Vector) and stained with diaminobenzidine (DAB). For nonspecific binding, the primary antibody was omitted. Images of the sections were collected with a digital camera (CFW 1310C; Scion) connected to a Nikon Eclipse 80i microscope. For a semiquantitative analysis of the cGMP immunoreactivity, in defined areas of the arteriolar wall (6 separate regions in each arteriole with diameter of ~100–150 μ m), the amount of the brown product (DAB) was estimated by measuring optical density using the National Institutes of Health (NIH) Image software. The background (absence of the first antibody) was subtracted, and the averaged optical density was then calculated and compared in coronary arterioles of lean and obese rats.

cGMP ELISA. The sGC activity was detected in the carotid artery through the identification of basal and NO donor, SNP-stimulated increases in cGMP levels, which was measured with a commercially available ELISA kit (Assay Design) following the instructions by the manufacturer.

Immunoblots. Single coronary arteries (1 vessel from each animal) were dissected from the hearts of lean and obese rats, cleared of connective tissue, and briefly rinsed in ice-cold physiological salt solution. After the addition of 20 μ l of Laemmli sample buffer (Sigma), the tissues were homogenized. Immunoblot analysis was carried out as described before (3). The antibodies used for the detection of protein expression [anti-endothelial NOS (eNOS) IgG and anti-sGC β ₁-subunit IgG] were obtained from Sigma. Anti- β -

actin IgG obtained from Abcam was used as a loading control. Signals were revealed with chemiluminescence and visualized autoradiographically. The optical density of the bands was quantified and normalized for β -actin by using NIH Image software.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (San Diego, CA) by two-way repeated-measures ANOVA, followed by Tukey's post hoc test or Student's *t*-test as appropriate. Data are expressed as means $\pm$ SE. In isolated vessels, 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 Ca²⁺-free medium. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

After a commencement of the high-fat diet for 10 wk, the body weight, serum insulin, glucose, and total cholesterol levels of rats became significantly greater compared with those of rats fed the standard diet (Table 1), similar to the findings observed in our previous study (10). We have also found that the C-reactive protein (CRP) levels were similar in the two groups of animals (Table 1). It should be noted that we have found a significant elevation in fasting glucose levels in this model of diet-induced obesity. However, the glucose levels were only slightly elevated in obese rats (Table 1) compared with other animal models of Type 2 diabetes, such as the *db/db* mice (2) or the diabetic Zucker rats (13), in which animals have about four times higher fasting glucose levels.

Coronary arteriolar responses to ACh. In coronary arterioles isolated from lean and obese rats, there were no significant differences between the spontaneously developed arteriolar tone (86 ± 6 and 97 ± 6 μ m, respectively) and in the passive arteriolar diameters (in Ca²⁺-free medium, 153 ± 9 and 149 ± 7 μ m at 80 mmHg intraluminal pressure, respectively). We have found that endothelium-dependent dilations to ACh were not significantly different between the coronary arterioles of lean and obese rats (Fig. 1A). The inhibition of NO synthesis with L-NAME decreased ACh-induced dilation in coronary arterioles isolated from lean animals (Fig. 1B), whereas it had no significant effect on ACh-induced responses in arterioles of obese rats (Fig. 1C). The administration of ODQ, an inhibitor of sGC, elicited a similar reduction in ACh-induced dilations in the coronary arterioles of the two groups of animals (Fig. 1D).

Coronary arteriolar responses to NO donors. Dilations to the NO donors, SNP, and DETA-NONOate were also tested and interestingly found to be significantly increased in the arterioles isolated from obese compared with lean rats (Fig. 2, A and B). SNP- and DETA-NONOate-induced dilations were also obtained after the administration of ODQ, an inhibitor of sGC.

Table 1. Characteristics of rats after 10 wk of normal and high-fat diet

	Lean	Obese
Body weight, g	376 $\pm$ 16	569 $\pm$ 17*
Serum glucose, mmol/l	6.5 $\pm$ 0.3	9.6 $\pm$ 0.7*
Serum insulin, pmol/l	91 $\pm$ 11	221 $\pm$ 19*
Serum total cholesterol, mmol/l	1.20 $\pm$ 0.08	1.62 $\pm$ 0.07*
C-reactive protein, mg/l	0.12 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01

Values are means $\pm$ SE; *n* = 20 lean (normal) and 20 obese (high fat diet) rats per group. **P* < 0.05, significant difference.

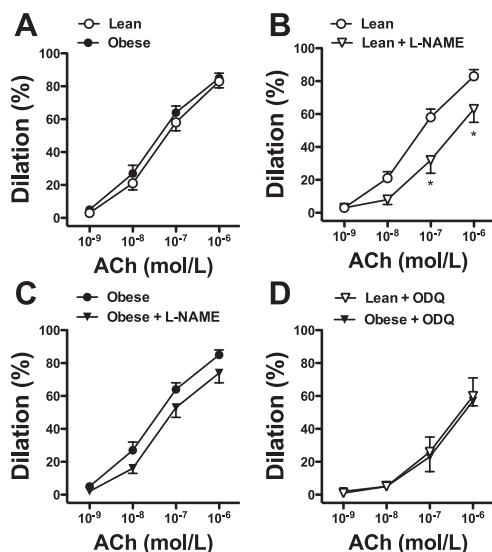


Fig. 1. Changes in diameter of coronary arterioles isolated from lean ($n = 18$ experiments per group) and high-fat diet-induced ($n = 19$) obese rats in response to cumulative concentrations of ACh before (A) and after incubation with *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; $n = 9$; B and C) or oxadiazolo-quinoxaline (ODQ; $n = 9$; D). Data are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$, significant difference.

ODQ decreased SNP- and DETA-NONOate-induced dilations in both groups to the same level, thereby eliminating the NO donor-evoked differences in dilations between the two groups (Fig. 2, A and B). In a separate series of experiments, arteriolar responses were obtained to 8-bromo-cGMP, a cell-permeable, stable cGMP analog. We found that 8-bromo-cGMP elicited substantial dilations in coronary arterioles, which were not, however, significantly different in the two groups of vessels (Fig. 2C).

Immunocytochemistry. Basal and SNP-stimulated cGMP immunoreactivity were detected in a native coronary arteriolar section in lean and obese rats. No specific labeling was detected in the section in which the first antibody was omitted. We have found that SNP-stimulated cGMP immunoreactivity was increased in the coronary arterioles of lean and obese rats, and the enhancement was found to be greater in the coronary arterioles of obese rats (Fig. 3, A and B).

cGMP ELISA. Basal and SNP-stimulated cGMP levels were directly measured in the carotid artery of lean and obese rats. We have found that basal cGMP levels were similar in vessels from lean and obese rats (Fig. 3C). The NO donor SNP elicited marked increases in cGMP levels in both groups, which tended to be increased in those of vessels from obese rats (Fig. 3C).

Western immunoblots. Western blot analysis was performed in single coronary arteries from both lean and obese rats. We have found that there were no significant differences in the eNOS protein expression (Fig. 4A) or in the sGC β_1 -subunit protein levels in the coronary arterioles of lean and obese rats (Fig. 4B).

DISCUSSION

In this study, we set out to characterize the impact of high-fat diet-induced obesity on NO-mediated coronary arteriolar dilations, known to contribute substantially to the regulation of coronary blood flow (33). We have found that when

we compared responses of lean and obese rats, coronary arteriolar dilations to the endothelium-dependent dilator ACh in the obese rat were essentially preserved but not significantly affected by NO synthase inhibition, whereas the dilations to NO donors, SNP, and DETA-NONOate were significantly enhanced and reduced by the sGC inhibitor ODQ to the control level. In addition, we have found that NO donor-stimulated vascular cGMP immunoreactivity and cGMP levels were increased in obese rats. Collectively, these findings indicate that in high-fat diet-induced obesity, due to the increased sGC activity, the NO sensitivity of coronary arterioles is enhanced. Thus, despite the impaired NO bioavailability, this adaptive mechanism may contribute to the preserved ACh-induced vasodilation and also to the maintenance of NO-mediated vascular signaling.

It seems well established that obesity and Type 2 diabetes are associated with the impaired bioavailability of NO both in conduit vessels and resistance arteries of the periphery (2, 18, 27–29, 32). In this context, previous studies have demonstrated that impaired NO availability ultimately leads to reduced

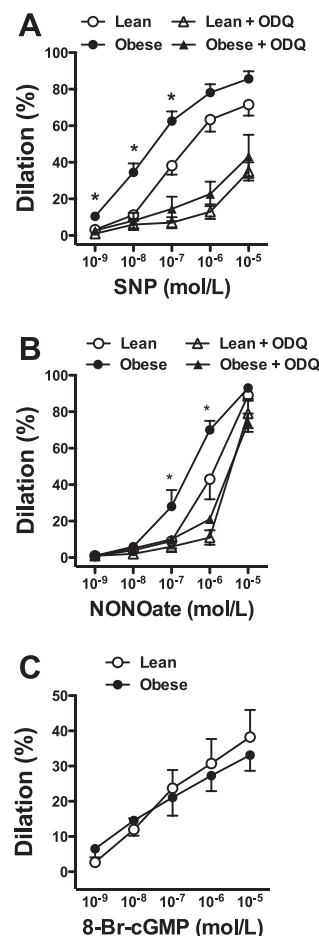


Fig. 2. Changes in diameter of coronary arterioles isolated from lean ($n = 18$ experiments per group) and high-fat diet-induced obese ($n = 19$) rats in response to cumulative concentrations of sodium nitroprusside (SNP; A) and DETA-NONOate (NONOate; B) in the absence and presence of ODQ ($n = 7$ in each protocol). C: changes in diameter of coronary arterioles isolated from lean and obese rats in response to cumulative concentrations of 8-bromo-cGMP (8-Br-cGMP; $n = 7$). Data are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$, significant difference.

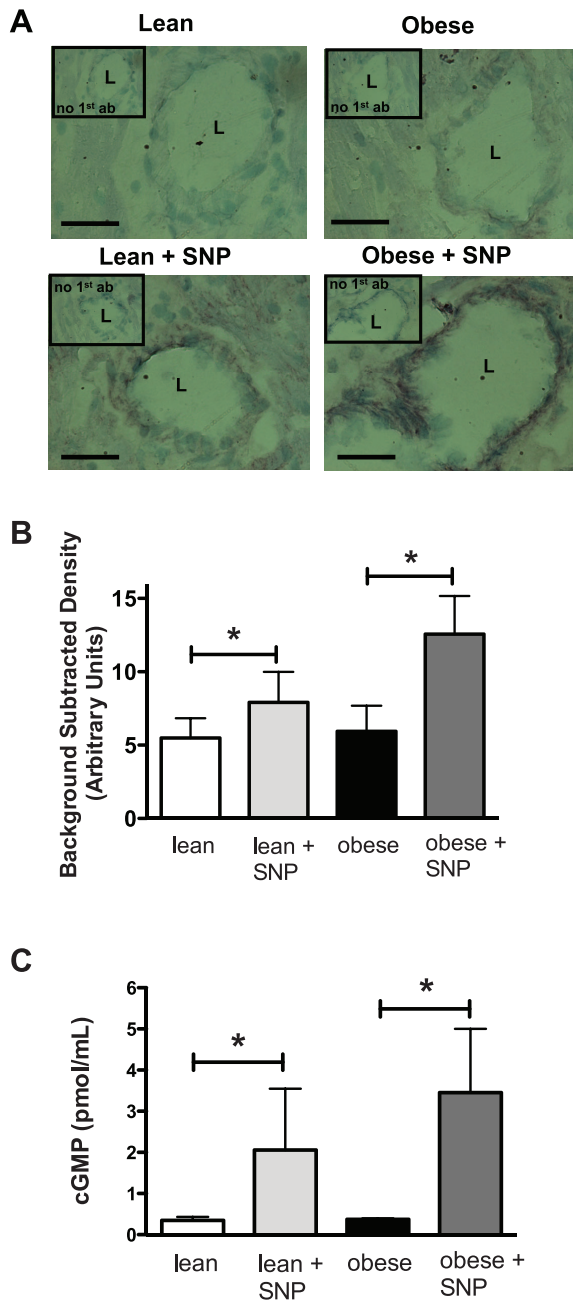


Fig. 3. Representative photomicrographs of immunocytochemistry (A) and summarized data of densitometry analysis of 3 separate experiments (B) showing cGMP immunoreactivity (indicated by the brown product) in the coronary arteriolar wall of lean and obese rats with or without stimulation with SNP. Insets: experiments in which the first antibody (Ab) was omitted (no first Ab). Scale bar, 50 μ m. L, arteriolar lumen. C: basal and SNP-stimulated cGMP levels measured with ELISA in carotid arteries isolated from lean ($n = 5$ experiments per group) and obese ($n = 5$) rats. * $P < 0.05$, significant difference.

agonist-induced dilations of cerebral, mesenteric (11, 24), and skeletal muscle microvessels (13). Recently, we have reported that in high-fat diet-induced obese rats, skeletal muscle arterioles also exhibit reduced endothelium-dependent agonist (ACh and histamine)-induced, NO-mediated dilations (10).

In contrast, studies obtained on coronary vessels in various pathological conditions are seemingly inconsistent in the liter-

ature. Impaired coronary dilations have been found in animal models of diabetes and prediabetes (16, 25, 37). In contrast, our recent observations show an enhanced dilator capacity of coronary microvessels isolated from diabetic patients (31) and also in obese patients with hypertension (15). Similarly, there are reports showing not only preserved (18, 21) but even enhanced (26) coronary vasodilations in animal models of obesity and diabetes mellitus. The possible mechanisms explaining these aforementioned discrepancies, however, remained obscure and may be explained by the various models (i.e., animals vs. humans) or the different disease states used (obesity, prediabetes, and manifest Type 2 diabetes) in those of the aforementioned experiments.

In this study, we have found that in coronary arterioles (active diameter, $<100 \mu$ m) obtained from high-fat diet-treated obese rats, ACh-induced dilation was essentially preserved (Fig. 1A). No significant changes in the protein expression of eNOS were also detected by Western blot analysis in these coronary microvessels (Fig. 4A). Interestingly, we have found that in the coronary arterioles of the obese rats, the pharmacological inhibition of NOS had no significant effect of ACh-induced dilations (Fig. 1C), whereas it reduced those

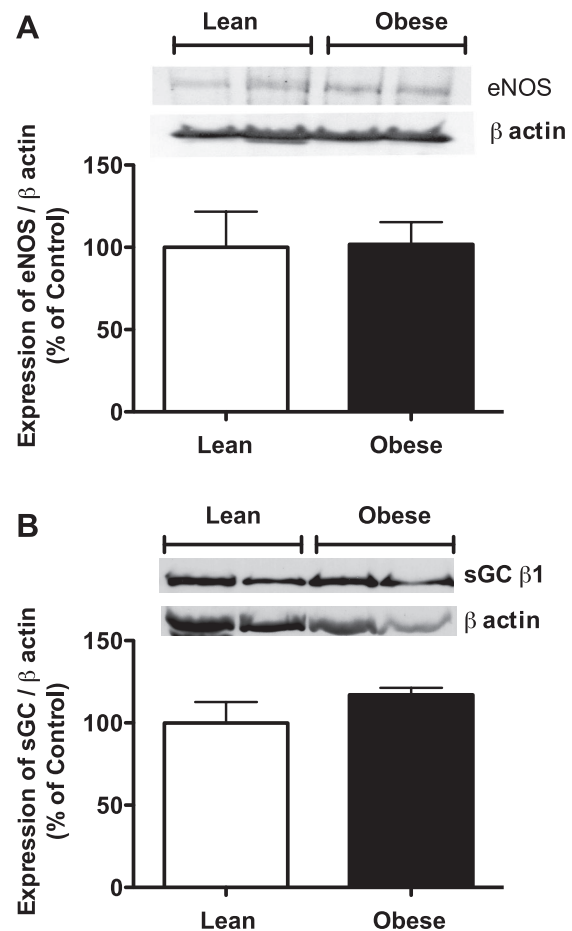


Fig. 4. Western blot analysis of endothelial NOS (eNOS; A) and soluble guanylate cyclase (sGC) β 1-subunit (B) protein expression in single coronary arterioles of lean ($n = 5$ experiments per group) and obese ($n = 5$) rats. Anti- β -actin was used to normalize for loading variations. A and B, bottom: summary data of normalized densitometric ratios (1 vessel from each animal was used).

responses in control vessels (Fig. 1B). This finding suggested either the lack of NO mediation or a reduction of the amount of the NO production in obese animals, which cannot, however, be detected by measuring diameter changes of arterioles in the presence of a NOS inhibitor. On the other hand, this finding also raised the possibility that in coronary arterioles of obese rats, unlike those of arteriolar responses in the skeletal muscle, mechanisms intrinsic to the vascular wall are activated to compensate for the reduced NO availability. In the coronary circulation, oxygen extraction is near maximal (33), and an impairment of arteriolar dilator function could have a significant consequence on tissue perfusion, leading to ischemia. It is also known that any increase in body mass (muscular or adipose tissue) requires a higher cardiac output and expanded intravascular volume to meet the elevated metabolic requirements (22). Given that, in obesity, coronary resistance vessels should adopt to increased coronary blood flow and metabolic requirements to maintain adequate tissue perfusion during the disease development. Our recent study provided evidence for the existence of an adaptation of human coronary microvessels isolated from obese patients by showing enhanced dilations to the NO donor SNP compared with those of lean individuals (15). Collectively, our previous and present findings suggest that in obesity, both in humans and animal models, adaptive mechanisms are activated in the wall of coronary microvessels to maintain or enhance their dilator capacity.

It should be noted that the overall vasodilator capacity of coronary circulation has not been determined in this study, which can be only evaluated *in vivo*. It is known that alterations in the morphology of coronary microvessels, such as changes in the lumen cross-sectional area or vascular rarefaction, all may have an impact on the overall blood flow capacity in the coronary circulation (6). On the basis of our present findings obtained in isolated vessels, we can only speculate whether the overall coronary dilator capacity is preserved or even enhanced *in vivo*, an idea that has yet to be tested in future studies of obesity.

In the present study, an attempt was also made to elucidate the possible underlying mechanism contributing to the observed functional adaptation of coronary microvessels in obese rats. Our findings show that in obese rats, the sensitivity of coronary arterioles to NO was significantly enhanced, as demonstrated by augmented vasodilations to NO donors, SNP, and DETA-NONOate (Fig. 2). Interestingly, in obese patients, we have obtained similar results, namely that NO donor-induced coronary arteriolar and also brachial artery dilations were significantly enhanced (15). Enhanced dilations of coronary arteries to the NO donor SNP have also been described in female pigs fed with high-fat diet (36). Collectively, these data suggest that an impaired NO availability in coronary microvessels of obese subjects can be associated with an enhanced NO sensitivity of the coronary arterioles, and this mechanism may be responsible for the maintained agonist-induced dilations, also found in the present study. Increased sensitivity for NO has been already proposed in previous observations in different conditions associated with impaired NO availability. For instance, Brandes et al. (7) reported that both the acute cessation of endothelial NO production in wild-type mice and the chronic deficiency of NO in eNOS knockout mice increase the NO sensitivity of vascular smooth muscle cells in response to nitrovasodilator agents. They concluded that an enhanced sen-

sitivity of the downstream sGC to NO may compensate for the reduced NO availability (7). In this context, it has also been found that the acute administration of exogenous NO decreased sGC activity and, long term, its protein expression (30). These findings indicate that NO may play an important, negative feedback regulatory role on the catalytic activity of its effector sGC; hence, any reduction of the NO level may lead to an enhancement of the sensitivity of sGC to NO.

To demonstrate the possible involvement of enhanced sGC activation, our present study revealed that the inhibition of sGC by ODQ reduced both ACh- and also NO donor (SNP and NONOate)-induced arteriolar dilations and, importantly, eliminated differences between the responses of coronary arterioles of lean and obese rats (Figs. 1C and 2B). We have also found that the stable cGMP analog 8-bromo-cGMP elicited substantial dilations in coronary arterioles, which were not, however, significantly different in the two groups of vessels (Fig. 2C). These findings indicate the potential involvement of enhanced sGC activation in mediating the enhanced sensitivity of smooth muscle cells for NO in coronary arterioles of obese rats. On the basis of the present findings, only a minor, if any, role can be ascribed for the contribution of other mechanisms, such as the peroxynitrite-dependent, S-glutathiolation-mediated activation of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, which may also lead to an enhanced NO sensitivity, independent of sGC activation, as suggested previously (1). Furthermore, our cytochemistry data suggested a maintained or even enhanced SNP-stimulated cGMP immunoreactivity in the coronary arterioles of obese rats (Fig. 3, A and B). To quantitate this observation in parallel experiments, basal and stimulated cGMP contents were also measured in carotid arteries of lean and obese rats with cGMP ELISA. In this assay, we have found no significant differences in the basal cGMP content but detected elevated cGMP levels in SNP-stimulated vessels of lean and obese rats (Fig. 3C). Although the results obtained in a conduit vessel cannot be directly extrapolated to those of coronary microvessels, these data are in accordance with immunocytochemistry data obtained in coronary arterioles and suggest maintained or even increased sGC activation in obese animals. The results showing no changes in the protein expression of the sGC β_1 -subunit (Fig. 4B), along with the findings that 8-bromo-cGMP-evoked coronary dilations were similar in lean and obese rats (Fig. 2C), suggest a primary role for an enhanced activity of sGC enzyme in the coronary arterioles of obese rats.

An intriguing question, namely, what are the exact origin and nature of factor(s) that may contribute to the activation of sGC, is still open. It seems plausible that the lack of NO may lead to enhanced sGC sensitivity (7). It has been shown that TNF- α -mediated vascular inflammation has important consequences with respect to the downstream signaling of NO (25). In this study, an attempt was made to estimate the level of systemic inflammation likely to be present in obese rats. To this end, we have measured the serum levels of CRP, which was found, however, to be comparable in lean and obese animals (Table 1). This data suggest that in this model, a manifest systemic inflammation is unlikely present, although a possible involvement of inflammation localized in the vascular wall cannot be entirely excluded and has yet to be elucidated in future studies.

Moreover, it has been proposed that oxidative and/or nitrosative stress may lead to the inactivation of both sGC and

cGMP-dependent protein kinase I. On the other hand, it has been demonstrated that acute exposure of hydrogen peroxide can lead to the direct activation of sGC, contributing to the relaxation of healthy bovine pulmonary arteries (8, 35). Moreover, Bauersachs et al. (5) have shown that myocardial infarct-induced ischemic heart failure in rats leads to the upregulation of both vascular eNOS and sGC expression in association with an increased vascular superoxide production. Our previous study showed that high-fat diet-treated rats exhibit an enhanced xanthine oxidase-derived superoxide anion production (10). Thus it is likely that reactive oxygen species, in addition to its well-known effect on NO availability, may play a role in the upregulation of the downstream enzyme sGC in the coronary microvessels, a hypothesis that has yet to be tested in future investigations. Furthermore, the questions that also remain to be answered are to what extent and how long the upregulation of sGC may contribute to the maintenance of NO-mediated arteriolar vasomotor responses to provide adequate perfusion of the myocardium during the disease development.

In summary, the findings of the present study suggest that in coronary arterioles of high-fat diet-induced obese rats, an increased activity of sGC leads to the enhanced sensitivity of smooth muscle cells to NO, a mechanism that may contribute to preserved coronary arteriolar dilations. We suggest that this mechanism could contribute to the early adaptation of coronary arterioles for providing adequate blood flow to meet the enhanced metabolic demand due to obesity.

ACKNOWLEDGMENTS

Z. Bagi holds a Bolyai Fellowship.

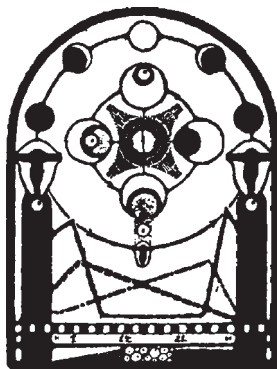
GRANTS

This study was supported by the Hungarian National Scientific Research Fund Grants F-048837, T-48376, and T-67984; Health Science Committee Zsigmond Diabetes Fund of the Hungarian Academy of Sciences (Committee for Health Research) Grant 454/2006; and the American Heart Association Founders Affiliate Grants 0555897-T and 0735540-T.

REFERENCES

- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C, Cohen RA. S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 10: 1200–1207, 2004.
- Bagi Z, Koller A, Kaley G. Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1404–H1410, 2003.
- Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPAR γ activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H742–H748, 2004.
- Barrett-Connor E, Khaw KT. Is hypertension more benign when associated with obesity? *Circulation* 72: 53–60, 1985.
- Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 100: 292–298, 1999.
- Behnke BJ, Prishy RD, Lesniewski LA, Donato AJ, Olin HM, Delp MD. Influence of ageing and physical activity on vascular morphology in rat skeletal muscle. *J Physiol* 575: 617–626, 2006.
- Brandes RP, Kim D, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Godecke A, Mulsch A, Busse R. Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35: 231–236, 2000.
- Burke TM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 252: H721–H732, 1987.
- Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* 11: 1278–1289, 2003.
- 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.
- Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired endothelium-mediated relaxation in isolated cerebral arteries from insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H2060–H2065, 2002.
- Fessenden JD, Schacht J. Localization of soluble guanylate cyclase activity in the guinea pig cochlea suggests involvement in regulation of blood flow and supporting cell physiology. *J Histochem Cytochem* 45: 1401–1408, 1997.
- 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.
- Frohlich ED. Obesity and hypertension. Hemodynamic aspects. *Ann Epidemiol* 1: 287–293, 1991.
- Fulop T, Jebelovszki E, Erdei N, Szerafin T, Forster T, Edes I, Koller A, Bagi Z. Adaptation of vasomotor function of human coronary arterioles to the simultaneous presence of obesity and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2348–2354, 2007.
- Gao X, Belmadani S, Picchi A, Xu X, Potter BJ, Tewari-Singh N, Capobianco S, Chilian WM, Zhang C. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice. *Circulation* 115: 245–254, 2007.
- Grundey SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation* 105: 2696–2698, 2002.
- 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.
- Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H854–H860, 2005.
- Kenchaiah S, Gaziano JM, Vasan RS. Impact of obesity on the risk of heart failure and survival after the onset of heart failure. *Med Clin North Am* 88: 1273–1294, 2004.
- Knudson JD, Rogers PA, Dincer UD, Bratz IN, Araiza AG, Dick GM, Tune JD. Coronary vasomotor reactivity to endothelin-1 in the prediabetic syndrome. *Microcirculation* 13: 209–218, 2006.
- Lavie CJ, Messerli FH. Cardiovascular adaptation to obesity and hypertension. *Chest* 90: 275–279, 1986.
- Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1551–1557, 2005.
- Naderali EK, Pickavance LC, Wilding JP, Williams G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. *Clin Sci (Lond)* 100: 635–641, 2001.
- Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, Zhang C. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res* 99: 69–77, 2006.
- Prakash R, Mintz JD, Stepp DW. Impact of obesity on coronary microvascular function in the Zucker rat. *Microcirculation* 13: 389–396, 2006.
- Reil TD, Barnard RJ, Kashyap VS, Roberts CK, Gelabert HA. Diet-induced changes in endothelial-dependent relaxation of the rat aorta. *J Surg Res* 85: 96–100, 1999.
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdiaie A, Vaziri ND. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 98: 203–210, 2005.
- 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.
- Scott WS, Nakayama DK. Sustained nitric oxide exposure decreases soluble guanylate cyclase mRNA and enzyme activity in pulmonary artery smooth muscle. *J Surg Res* 79: 66–70, 1998.
- 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.
- Thompson MA, Henderson KK, Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Price E, Laughlin MH. Exercise preserves endothelium-dependent relax-

- ation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J Appl Physiol* 96: 1114–1126, 2004.
33. **Tune JD, Gorman MW, Feigl EO.** Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J Appl Physiol* 97: 404–415, 2004.
34. **Wolfe SE, de Wit C.** Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J Vasc Res* 42: 475–482, 2005.
35. **Wolin MS, Burke TM.** Hydrogen peroxide elicits activation of bovine pulmonary arterial soluble guanylate cyclase by a mechanism associated with its metabolism by catalase. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 20–25, 1987.
36. **Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Laughlin MH.** Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs. *J Appl Physiol* 96: 1105–1113, 2004.
37. **Zhao G, Zhang X, Smith CJ, Xu X, Ochoa M, Greenhouse D, Vogel T, Curran C, Hintze TH.** Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H268–H278, 1999.



Caveolin-1 limits the contribution of BK(Ca) channel to EDHF-mediated arteriolar dilation: implications in diet-induced obesity

Attila Feher^{1,2}, Ibolya Rutkai², Timea Beleznai^{2,3}, Zoltan Ungvari⁴,
Anna Csiszar⁴, Istvan Edes², and Zsolt Bagi^{1,3*}

¹Department of Physiology, New York Medical College, Valhalla, NY 10595, USA; ²Division of Clinical Physiology, University of Debrecen, 4032-Debrecen, Hungary; ³Department of Pharmacology, University of Oxford, Mansfield Road, Oxford OX1 3QT, UK; and ⁴Reynolds Oklahoma Center on Aging, Department of Geriatric Medicine, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK 73104, USA

Received 13 August 2009; revised 3 March 2010; accepted 12 March 2010

Time for primary review: 40 days

Aims

Caveolin-1 (Cav-1) interacts with large conductance Ca^{2+} -activated potassium channels (BKCa) and likely exerts a negative regulatory effect on the channel activity. We investigated the role of Cav-1 in modulating BK(Ca) channel-mediated, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-dependent arteriolar dilation in normal condition and in an experimental model of obesity.

Methods and results

In isolated, pressurized (80 mmHg) gracilis muscle arterioles ($\sim 100 \mu\text{m}$) of Cav-1 knockout mice, acetylcholine (ACh)-induced, EDHF-mediated dilations were enhanced and were significantly reduced by the BK(Ca) channel inhibitor, iberiotoxin (IBTX), whereas IBTX had no effect on EDHF-mediated dilations in the wild-type mice. Dilations to the selective BK(Ca) channel opener, NS-1619 were augmented in the Cav-1 knockout mice. In high-fat diet-treated, obese rats ACh-induced coronary arteriolar dilations were preserved, whereas IBTX-sensitive, ACh-induced and also NS-1619-evoked vasodilations were augmented when compared with lean animals. In coronary arterioles of obese rats a reduced protein expression of Cav-1 was detected by western immunoblotting and immunohistochemistry. Moreover, in coronary arterioles of lean rats, disruption of caveolae with methyl- β -cyclodextrin augmented IBTX-sensitive, ACh-induced, and also NS-1619-evoked dilations.

Conclusion

Thus, under normal conditions, Cav-1 limits the contribution of the BK(Ca) channel to EDHF-mediated arteriolar dilation. In obesity, a reduced expression of Cav-1 leads to greater contribution of the BK(Ca) channel to EDHF-mediated response, which seems essential for maintained coronary dilation.

Keywords

Coronary • Microcirculation • EDHF • MaxiK channel • Caveolae

1. Introduction

A crucial role for the nitric oxide (NO)- and prostacyclin-independent component of endothelium-dependent dilation has been demonstrated in microvessels. In the presence of inhibitors of NO and prostacyclin synthesis, hyperpolarization of microvascular smooth muscle cells is attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). The exact nature and origin of EDHF are still debated, but there is an accepted view that opening of Ca^{2+} -activated potassium [K(Ca)] channels mediate the response.¹ Correspondingly, previous studies demonstrated that increases in Ca^{2+} concentration result in

opening of small and intermediate conductance K(Ca) channels [SK(Ca) and IK(Ca)] in endothelial cells, which were found to be essential for EDHF-mediated arteriolar dilations.^{2–6} Functional expression of large conductance K(Ca) channels [BK(Ca)] in vascular smooth muscle cells is also implicated in EDHF-mediated arterial responses,^{3,7} but their contribution remains controversial. There are earlier studies showing no or minimal involvement of BK(Ca) channels in mediating the EDHF response.⁸ A recent study has found that the contribution of BK(Ca) channels to the EDHF response may vary with the size of vessels, having a greater contribution in larger, first-order mesenteric arteries and no contribution in

* Corresponding author. Tel: +1 914 594 4089; fax: +1 914 594 4655, Email: zsolt_bagi@nyc.edu

smaller, fourth-order mesenteric arterioles, even though expression of BK(Ca) channels were similar in the two types of vessels.⁹ The underlying mechanisms for these aforementioned discrepant observations remained obscure.

Several recent studies strive on elucidating mechanisms by which BK(Ca) channels are regulated under physiological and pathological conditions. Among potential mechanisms, compartmentalization-dependent regulation of BK(Ca) channel activity has recently received a great deal of attention.¹⁰ Interestingly, it has been posited that caveolar compartmentalization of specific vascular signalling pathways are required for the EDHF-mediated dilations in the pig coronary artery.¹¹ Caveolae are 50–100-nm cell membrane invaginations that are composed of several key structural and scaffolding proteins, such as caveolin-1 (Cav-1).^{12,13} A recent study by Saliez et al.¹⁴ has found that relaxation of mesenteric arteries from Cav-1 knockout mice exhibited a complete loss of EDHF-mediated relaxation. Absi et al.¹⁵ provided evidence that exposure of mesenteric and coronary arteries to methyl- β -cyclodextrin (M β CD), an agent known to disrupt caveolae, diminished SK(Ca) channel-mediated hyperpolarization, whereas IK(Ca)-dependent responses were unaffected.¹⁵ Interestingly, BK(Ca) channels are also targeted to caveolae microdomains, where Cav-1 interacts with BK(Ca) channels through their α -subunit and exerts a negative regulatory effect on the channel activity.^{16–18} The functional consequence of this interaction and its impact on EDHF-mediated arteriolar dilation is not known. Also, it is unclear whether changes in regulatory function of Cav-1 on BK(Ca) channels have an impact on vasomotor activity in pathological conditions. Thus, in this study we set out to examine the role of Cav-1 in modulating the contribution of BK(Ca) channels to EDHF-mediated arteriolar dilations under normal conditions and in an experimental model of obesity.

2. Methods

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

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at New York Medical College (Valhalla, NY, USA). The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). After overnight fasting, the animals (mice and rats) were anaesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg) and the gracilis muscle was removed. The animals were then euthanized by an additional injection of sodium pentobarbital (150 mg/kg) and the hearts were excised. With the use of microsurgical instruments and an operating microscope, the second branches of the septal coronary artery and the first branches of the gracilis muscle artery (~1.5 mm in length) were 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 CaCl₂, 1.0 MgSO₄, 1.0 KH₂PO₄, 5.5 glucose, and 24.0 NaHCO₃, equilibrated with a gas mixture of 10% O₂ and 5% CO₂, 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, VT, USA) to set the intraluminal pressure to 80 mmHg. The temperature was set at 37°C by a circulating bath temperature controller (Cole Parmer, USA). Changes in arteriolar diameter were continuously recorded with a CCD camera, connected to a microscope (Nikon, Eclipse 80i).^{19,20}

2.2 Assessment of EDHF-mediated arteriolar dilation in Cav-1 knockout mice

In the first series of experiments gracilis muscle arterioles were isolated from Cav-1 knockout ($n = 8$) and wild-type mice ($n = 8$). Caveolin-1 knockout mice (Cavtm1Mls/J) and its wild-type controls with the same strain background (B6129SF2/J) were purchased from the Jackson Laboratory. All the experiments were performed in the presence of inhibitors of NO synthase, L-NAME (200 μ mol/L) and cyclooxygenase, indomethacin (10 μ mol/L). During an incubation period of 1 h, a spontaneous myogenic tone developed in the isolated arterioles in response to the intraluminal pressure of 80 mmHg. Cumulative concentrations of the endothelium-dependent vasodilator, acetylcholine (ACh, 1 nmol/L to 1 μ mol/L) were administered to the vessels and changes in diameter were measured. ACh-induced dilations were also observed in the presence of selective BK(Ca) inhibitor iberiotoxin (IBTX, 100 nmol/L) and inhibitors of SK(Ca) or IK(Ca) channels by apamin (100 nmol/L) and 1-[(2-chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole (TRAM34, 10 μ mol/L), respectively. In separate set of experiments, dilations to cumulative concentrations of the selective BK(Ca) opener NS-1619 (100 nmol/L to 10 μ mol/L) were also investigated.

2.3 Experimental model of obesity

In a separate group of experiments 8-weeks-old male Wistar rats were maintained on standard rat chow ($n = 20$), while one group of rats were fed a high-fat diet ($n = 20$, rodent diet with 60% of saturated fat, 58Y1, TestDiet, PMI Nutrition) for additional 10 weeks, as described previously.^{21,22} In similar protocols as described above, ACh-induced, EDHF-mediated (in the presence of L-NAME and indomethacin) dilations were investigated in isolated coronary arterioles from lean and obese rats after incubation with the BK(Ca) channel inhibitor, IBTX, the SK(Ca) channel inhibitor, apamin or IK(Ca) channel inhibitor, TRAM34. Moreover, ACh-induced dilations were obtained in the presence of CYP450 inhibitor, sulphaphenazole (10 μ mol/L). Dilations to cumulative concentrations of the selective BK(Ca) opener NS-1619 were also investigated in coronary arterioles of lean and obese rats.

Other sets of experiments were carried out on isolated coronary arterioles from lean Wistar rats ($n = 11$). Arterioles were exposed *in vitro* to M β CD (3 mmol/L for 90 min), an agent known to disrupt caveolae,^{11,15} and ACh-induced dilations (1 nmol/L to 1 μ mol/L) were obtained in the absence or in the presence of BK(Ca) inhibitor, IBTX (100 nmol/L). Arteriolar dilations to selective BK(Ca) opener, NS-1619 (100 nmol/L to 10 μ mol/L), were also investigated.

2.4 Immunohistochemistry

Left ventricular slices from lean ($n = 4$) and obese Wistar rats ($n = 4$) were embedded and frozen in OCT compound (Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences). Acetone-fixed consecutive sections (10 μ m thick) were immunolabelled with a polyclonal anti-Cav-1 primary antibody (dilution 1:50, Sigma) and smooth muscle actin (dilution 1:200, Novocastra) or with a polyclonal anti-BK(Ca) channel (dilution 1:50, Alomone Labs) and smooth muscle actin (dilution 1:200, Novocastra). Immunofluorescent labelling was performed with Alexa-488 or Alexa-597 labelled secondary antibodies (Invitrogen). DAPI was used for nuclear staining. For non-specific binding, the primary antibody was omitted. Images of the sections were collected with an electron multiplying CCD camera (Luca^{EM}-S, Andor) connected to an Olympus BX61 microscope.

2.5 Immunoblots

Single coronary arteries (the first-order septal coronary artery, one vessel from each animal) were dissected from the hearts of lean ($n = 5$) and obese Wistar rats ($n = 5$), cleared of connective tissue and briefly rinsed in ice-cold PSS. After the addition of 20 μ L of Laemmli sample buffer (from Sigma Inc.) tissues were homogenized. Immunoblot analysis was carried out as described before.²² The primary antibodies used for

detection of protein expression of Cav-1 (Abcam, dilution 1:1000) were obtained from Sigma Inc. and for detection of BK(Ca) channel (dilution 1:1000) were obtained from Alomone Labs. Horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-rabbit antibody (dilution 1:5000, Amersham) was used as a secondary antibody. Anti- β -actin IgG (dilution 1:5000) obtained from Abcam was used as loading control. Signals were revealed with chemiluminescence and visualized autoradiographically. Optical density of bands was quantified and normalized for β -actin by using NIH image software.

2.6 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (San Diego California USA) by two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey's post-hoc test or Student's *t*-test as appropriate. Data are expressed as means $\pm$ SEM. In isolated vessels, 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-mmHg intraluminal pressure in a Ca^{2+} -free medium. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 K(Ca) channels in EDHF-mediated arteriolar dilations in Cav-1 knockout mice

In isolated, pressurized (80 mmHg) gracilis muscle arterioles from Cav-1 knockout mice, ACh-induced, EDHF-mediated dilations (presence of L-NAME and indomethacin) were slightly but significantly augmented, when compared with the responses in the wild-type mice (Figure 1A). The EC_{50} of ACh found to be also significantly different

between the two groups; dilator responses are being more sensitive to ACh stimulation in arterioles of Cav-1 knockout mice, compared with wild types (Table 2).

To assess the potential role of BK(Ca) channels in EDHF-mediated vasodilation the selective BK(Ca) channel inhibitor IBTX (100 nM) was used. In comparison with the control responses, IBTX gave rise to a greater reduction in the magnitudes and also increased the effective concentrations of the ACh-induced dilations in Cav-1 knockout mice (Figure 1C and D). Correspondingly, we have found that arteriolar dilations to the selective BK(Ca) channel opener, NS-1619 were significantly enhanced in Cav-1 knockout mice, when compared with responses of wild-type animals (Figure 1B).

In order to elucidate the role of other K(Ca) channels in the EDHF-mediated arteriolar responses, a selective SK(Ca) channel blocker, apamin and in other set of experiments the selective IK(Ca) channel blocker, TRAM-34 were employed. The magnitudes of ACh-induced arteriolar dilations were significantly reduced by apamin, with a greater extent in the wild-type mice, when compared with Cav-1 knockout mice (Figure 2 and Table 2). Presence of apamin also increased the effective concentrations of ACh but there were no significant differences between the two groups of animals (Table 2). TRAM-34 also resulted in reduction of the magnitudes of ACh-induced dilations to a similar extent in the wild-type and Cav-1 knockout mice (Figure 2 and Table 2).

3.2 K(Ca) channels in EDHF-dependent coronary arteriolar dilation in obese rats

After commencing of high-fat diet for 10 weeks, the body weight, serum insulin, glucose, and total cholesterol levels of rats became

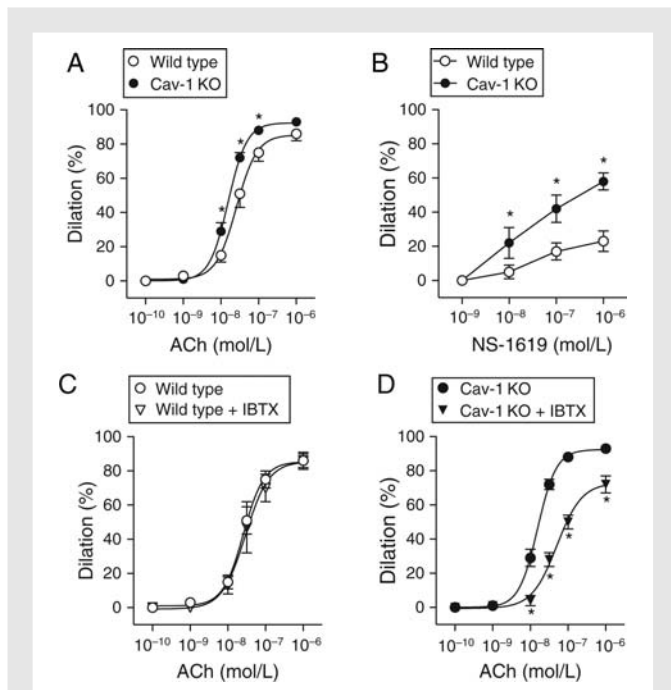


Figure 1 Percentage dilations of skeletal (gracilis) muscle arterioles isolated from Cav-1 knockout (KO, $n = 8$) or wild-type mice ($n = 8$) in response to cumulative concentrations of ACh (A) or NS-1619 (B). Percentage arteriolar dilations to ACh before and after incubation with iberiotoxin (IBTX, $n = 8$ in each group) in the wild-type (C) and Cav-1 KO mice (D). Data are means $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

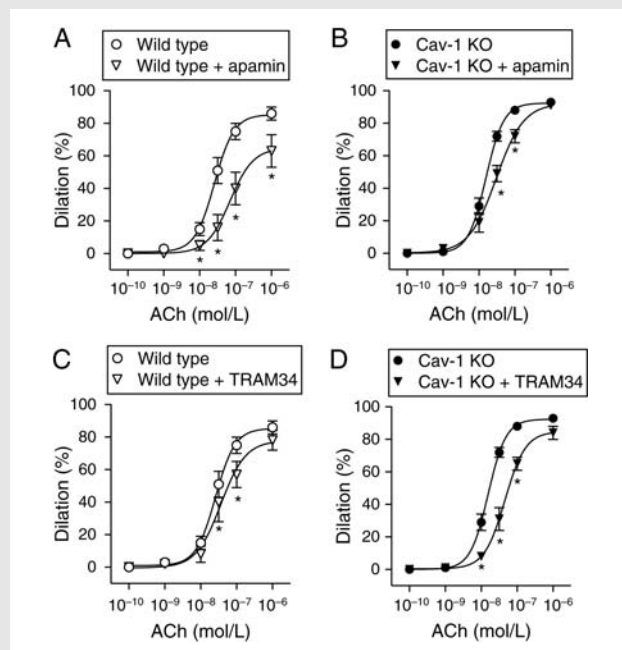


Figure 2 Percentage dilations of skeletal (gracilis) muscle arterioles to ACh before and after incubation with apamin in the wild-type (A) and Cav-1 knockout (KO) mice (B) ($n = 8$ in each group). Percentage arteriolar dilations to ACh before and after incubation with TRAM34 in the wild-type (C) and Cav-1 KO mice (D2), ($n = 8$ in each group). Data are means $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

significantly greater, when compared with those of rats fed a standard diet (Table 1), similar to our previous findings.^{21,22}

In coronary arterioles isolated from lean and obese rats no significant difference in the magnitude of ACh-induced, EDHF-mediated dilations were observed (Figure 3A). However, the BK(Ca) inhibitor, IBTX elicited a significantly greater reduction in ACh-induced dilation in coronary arterioles of obese rats, than in lean animals (Figure 3C and D). Correspondingly, dilations to the BK(Ca) channel opener NS-1619 were significantly increased in coronary arterioles of obese rats, when compared with lean controls (Figure 3B). ACh-induced arteriolar dilations were inhibited by the SK(Ca) channels blocker, apamin or by the IK(Ca) channel blocker, TRAM-34 in lean and obese animals (Figure 4). Effective concentrations of the ACh-induced dilations before and after K(Ca) inhibitors were not significantly different between the two groups (Table 3). In a separate set of experiments, ACh-induced dilations were also obtained in the presence of CYP450 inhibitor, sulphaphenazole (10 μ mol/L). Sulphaphenazole did not affect ACh-induced dilation and effective concentrations of ACh either in lean and obese animals (Table 3).

3.3 Expression of BK(Ca) channels and Cav-1 in coronary arterioles of lean and obese rats

Both BK(Ca) channel and Cav-1 expression were detected in coronary arteriolar sections of lean and obese rats by immunohistochemistry. Protein expression of BK(Ca) channels was detected in the smooth muscle layers in both lean and obese rats, as indicated by co-staining with smooth muscle α -actin (Figure 5A). In coronary arterioles of lean rats Cav-1 immunostaining was also detected in smooth muscle cells, similar to that of BK(Ca) channel staining (Figure 5B).

Table 1 Characteristic of male Wistar rats after 10 weeks of normal diet (lean) and high-fat diet (obese)

	Lean (n = 15)	Obese (n = 15)
Body weight (g)	398 $\pm$ 16	495 $\pm$ 17*
Serum glucose (mmol/L)	6.9 $\pm$ 0.5	8.2 $\pm$ 0.5*
Serum insulin (pmol/L)	82 $\pm$ 20	241 $\pm$ 8*
Serum total cholesterol (mmol/L)	1.18 $\pm$ 0.06	1.72 $\pm$ 0.08*

*Significant difference, $P < 0.05$.

However, we observed a marked reduction of Cav-1 immunostaining in coronary arterioles of obese rats (Figure 5B).

In order to quantify the changes of the protein expression, western blot analysis was performed in the first-order coronary arteries of lean and obese rats. We found a significant decrease in protein expression of Cav-1, but not in the BK(Ca) channel in coronary arteries isolated from obese rats, when compared with lean controls (Figure 5C and D).

3.4 Effect of M β CD on EDHF-mediated coronary dilation

Methyl β -cyclodextrin, an agent known to disrupt caveolae, has also been shown to interfere with K(Ca) channel-mediated vasorelaxation.^{11,15} Therefore, in separate experiments ACh-induced, EDHF-mediated dilations and also NS-1619-induced responses were examined in coronary arterioles exposed to M β CD (3 mmol/L), *in vitro*. In arterioles isolated from control, lean rats, M β CD treatment elicited a modest reduction in the magnitude of ACh-induced dilation (Figure 6A). Of note, in the presence of M β CD, IBTX inhibited ACh-induced dilation (Figure 6A) and also augmented NS-1619-induced response in coronary arterioles of lean rats (Figure 6B), similar to that of seen in coronary vessels of obese animals.

4. Discussion

This study shows that under physiological conditions, Cav-1 limits the contribution of BK(Ca) channels to EDHF-mediated arteriolar dilations, whereas the contribution becomes prominent in the obese rats, a compensatory mechanism, which seems essential for maintained coronary vasodilation in this pathological condition. These conclusions are supported by the findings that: (i) BK(Ca) channels play no or only a minimal role in EDHF-mediated arteriolar dilations in mouse gracilis muscle and rat coronary arterioles under normal condition; (ii) however, the contribution of BK(Ca) channels to EDHF response is prominent in mice with genetic ablation of Cav-1 protein or in normal microvessels after pharmacological disruption of caveolae; and (iii) in coronary arterioles of obese rats a reduced expression of Cav-1 is associated with greater contribution of BK(Ca) channels to the EDHF response.

BK(Ca) channels are expressed in almost every tissue and participate in many physiological functions, such as regulation of vascular tone.⁷ It is believed that small and intermediate conductance K(Ca) channels (SKCa and IKCa) are essential for EDHF-mediated arterial dilation,^{2–5} whereas the contribution of BK(Ca) channels

Table 2 Calculated logEC₅₀ and maximal arteriolar dilations to ACh (10⁻⁶ M) in the absence and in the presence of various inhibitors of K⁺ channels in the wild-type and Cav-1 knockout (KO) mice

	logEC ₅₀		Maximum dilation (%)	
	Wild type	Cav-1 KO	Wild type	Cav-1 KO
ACh	-7.58 $\pm$ 0.07	-7.81 $\pm$ 0.03 [#]	86 $\pm$ 4	93 $\pm$ 2*
ACh + IBTX	-7.53 $\pm$ 0.12	-7.31 $\pm$ 0.07*	86 $\pm$ 5	72 $\pm$ 5 [#]
ACh + apamin	-7.14 $\pm$ 0.16*	-7.51 $\pm$ 0.07*	63 $\pm$ 10*	91 $\pm$ 2 [#]
ACh + TRAM-34	-7.44 $\pm$ 0.13	-7.34 $\pm$ 0.06*	78 $\pm$ 6	84 $\pm$ 4*

Values are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. control response (absence of inhibitors either in the wild-type or Cav-1 KO mice). [#] $P < 0.05$ wild type vs. Cav-1 KO.

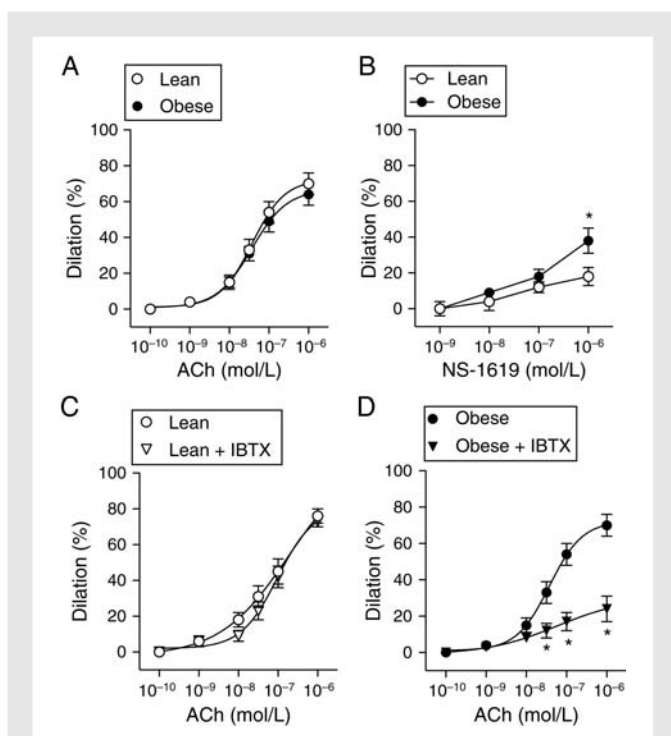


Figure 3 Percentage dilations of coronary arterioles isolated from lean ($n = 15$) and high-fat diet-treated, obese Wistar rats ($n = 15$) in response to cumulative concentrations of ACh (A) or NS-1619 (B). Percentage arteriolar dilations to ACh before and after incubation with iberiotoxin (IBTX, $n = 9$ in each group) in lean (C) and obese rats (D). Data are means $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

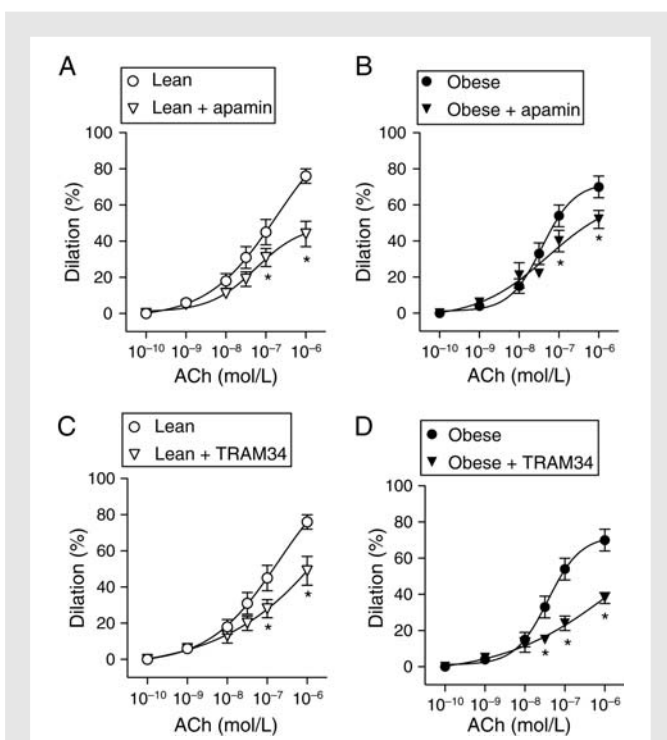


Figure 4 Percentage dilations of coronary arterioles isolated from lean ($n = 7$, A) and high-fat diet-treated, obese Wistar rats ($n = 7$, B) in response to cumulative concentrations of ACh before and after incubation with apamin. Percentage arteriolar dilations to ACh before and after incubation with TRAM34 in lean (C) and obese rats (D) ($n = 7$ in each group). Data are means $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

to the EDHF response is questioned.⁸ Interestingly, Hilgers *et al.*⁹ demonstrated that fourth-order mesenteric arterioles of rats lack BK(Ca) channel involvement in EDHF-mediated dilation, which is present only in larger, first-order mesenteric arteries, even though the expression profile of the pore-forming and regulatory subunits of BK(Ca) channels was similar to the two types of vessels. Moreover, Weston *et al.*³ have found that a putative EDHF activates BK(Ca) channels in smooth muscle cells of large, conduit coronary arteries of the pig, an action which shares with 11,12-epoxyeicosatrienoic acid (11,12-EET). In the present study we have found that resistance-sized arteries obtained from the two different species (mouse and rat) exhibit a lack of the contribution of BK(Ca) channels to the EDHF response. Moreover, inhibition of cytochrome P450, hence production of EETs, that are believed to be involved in the BK(Ca) channel activation, did not affect EDHF response in these arterioles. Along with the aforementioned study by Hilgers *et al.* our findings indicate that although BK(Ca) channels are expressed in resistance arteries their function can be mitigated. The molecular mechanism(s), which regulates the contribution of BK(Ca) channels to EDHF response in microvessels, however, remained obscure.

It is known that BK(Ca) channels are part of macromolecular signalling complexes that include enzymes and ion channels to mediate local and spatially directed signalling.¹⁰ In this context, Wang *et al.*¹⁶ provided evidence that BK(Ca) channels are targeted to caveolae microdomains in cultured bovine aortic endothelial cells. Using sucrose

gradient cell fractionation and co-immunoprecipitation they demonstrated that BK(Ca) channels are present in the cholesterol-rich lipid rafts and they are physically associated with Cav-1 protein.¹⁶ They also demonstrated that the interaction of Cav-1 with BK(Ca) channels exerts a negative regulatory effect on BK(Ca) channel activation by isoproterenol.¹⁶ Interestingly, in the Cav-1 knockout mice an increased BK(Ca) channel density was found on the cell surface of vascular smooth muscle cells of cerebral arteries, but the magnitude of transient current driven by individual BK(Ca) channels was not different from cells of wild-type animals.¹⁷ Later, Alioua *et al.*¹⁸ demonstrated that even though Cav-1 and BK(Ca) channels are co-localized at the plasma membrane of smooth muscle cells of the intact rat aorta, this interaction did not alter voltage activation properties of BK(Ca) channels and had no apparent effect on its gating characteristics. Based on these aforementioned studies it has been concluded that Cav-1 physically interacts with BK(Ca) channels, but the inhibitory action by Cav-1 is independent of altering BK(Ca) channel function directly and can be attributed to targeting BK(Ca) channels to caveolae. The functional consequences of the Cav-1 and BK(Ca) channel interaction and caveolae targeting and its impact on EDHF-mediated arteriolar dilation is not known.

In the present study, we have found that the magnitude of EDHF-mediated dilations were slightly, but significantly enhanced in gracilis muscle arterioles of the Cav-1 knockout mice, when compared with responses of wild-type animals. More importantly, arterioles from Cav-1 knockout mice exhibited a prominent contribution of

Table 3 Calculated logEC₅₀ and maximal arteriolar dilations to ACh (10⁻⁶ M) in the absence and in the presence of various inhibitors in lean and obese rats

	LogEC ₅₀		Maximum dilation (%)	
	Lean	Obese	Lean	Obese
ACh	-7.24 ± 0.24	-7.42 ± 0.14	70 ± 6	64 ± 6
ACh + IBTX	-7.04 ± 0.14	-7.25 ± 1.05	73 ± 3	24 ± 7* [#]
ACh + apamin	-7.22 ± 0.35	-7.39 ± 0.12	44 ± 7*	52 ± 5*
ACh + TRAM-34	-7.20 ± 0.34	-7.64 ± 0.26	49 ± 8*	38 ± 3*
ACh + sulphaphenazole	-7.08 ± 0.34	-5.83 ± 0.91	77 ± 12	68 ± 7

Values are means ± SEM. **P* < 0.05 vs. control response (absence of any inhibitor in lean or obese rats). [#]*P* < 0.05 lean vs. obese.

BK(Ca) channels to EDHF-mediated arteriolar dilation, which was absent in the wild-type animals. Moreover, the contribution of SK(Ca) channels to EDHF response were reduced in microvessels from Cav-1 knockout mice, a finding similar to that of earlier observation by Absi et al.¹⁵ Thus, it seems Cav-1 protein may contribute to the regulation of various K(Ca) channels either by facilitating their activation state (SK channels) or yielding to their inhibition (BK channels), as demonstrated in the present study in intact resistance arteries. The exact molecular mechanisms behind this regulatory function of Cav-1 are not entirely understood but as pointed out can be attributed to Cav-1-mediated targeting of K(Ca) channels to caveolae, where their activation can be modulated.^{16,18} Considering this scenario, disruption of caveolae alone would mimic the effect of the absent Cav-1 protein on BK(Ca) channel activation. Correspondingly, in the present study we have found that when arterioles from normal animals were exposed to MβCD, an agent known to disrupt caveolae,^{11,15} the contribution of BK(Ca) channels to EDHF-mediated arteriolar dilation and also pharmacological activation of BK(Ca) channels become augmented. Thus, we have furnished functional evidence that Cav-1-directed caveolar compartmentalization of BK(Ca) channels is one of the key underlying mechanisms, which leads to their limited contribution to EDHF-mediated arteriolar dilations under normal conditions.

In this study we were also interested whether the regulatory function of Cav-1 on K(Ca) channels can be altered in pathological conditions and whether this affects their contribution to EDHF-mediated arteriolar dilation. Our recent studies involve the investigation of arteriolar vasomotor dysfunction in obesity and type 2 diabetes.^{21–24} Interestingly, unlike NO, EDHF-mediated arteriolar dilation can persist during the progression of a pathological condition. In this context, a study by Ellis et al.²⁵ has found that EDHF-mediated vasodilation was augmented in small mesenteric arteries both in the wild-type and LDL receptor knockout obese mice when fed a high-fat diet. They found that the augmented, EDHF-mediated dilations were effectively blocked by K(Ca) channel inhibitors.²⁵ On the other hand, in mesenteric arteries of obese, but type 2 diabetic rats, Burnham et al.^{26,27} demonstrated that BK(Ca) and SK(Ca) channel-mediated arteriolar dilation were impaired, but no abnormalities in BK(Ca) and SK(Ca) channel function were detected in younger (5–6 week old) animals. Based on these aforementioned studies existence of certain compensatory mechanism(s) was envisioned, which may maintain or even augment K(Ca) channel function in obesity, especially before the development of type 2 diabetes.

In this study we have tested the specific hypothesis that changes in the regulatory function of Cav-1 on BK(Ca) channels contribute to the maintenance of EDHF-mediated vasodilatation in obesity. Interestingly despite being hyperphagic, Cav-1 knockout mice show overt resistance to diet-induced obesity.²⁸ Moreover, compared with rats, mice frequently develop hyperglycemia early on in obesity. Therefore, in this study rats were fed a high-fat diet to induce obesity without developing severe hyperglycemia, similar to our recent studies.^{21,22}

We have found that coronary arterioles of obese rats exhibited a preserved ACh-induced, EDHF-mediated dilation, when compared with lean controls. Importantly, we demonstrated that the contribution of BK(Ca) channels to the EDHF response and also dilations to the selective BK(Ca) channel opener were significantly augmented in coronary arterioles of obese rats. Thus, it seems that an augmented activation of BK(Ca) channels and their enhanced contribution to EDHF response is one of the mechanisms that may maintain vasodilator function of coronary microvessels in obesity. Then, we have raised the possibility that a loss of the inhibitory action of Cav-1 may be responsible for the augmented contribution of BK(Ca) channels to EDHF-mediated vasodilation in obese rats. Interestingly, we have found that Cav-1 immunostaining was markedly reduced in smooth muscle layers of coronary arterioles of obese rats. In accordance with this observation we have found decreased protein expression Cav-1 in coronary arteries of obese rats, when compared with lean controls. Interestingly reduced vascular expression of Cav-1 has been reported in hypercholesterolemic animals,²⁹ whereas no change³⁰ or even increased vascular expression of Cav-1 have been found in animals fed a high-fat diet.^{31,32} Further studies are needed to explain these inconsistent findings and also to elucidate the underlying mechanisms responsible for changes in the vascular expression of Cav-1 in diet-induced obesity. Nevertheless, in view of the proposed inhibitory action of Cav-1 on BK(Ca) channels, a reduced expression of Cav-1 explains the enhanced contribution of BK(Ca) channels to EDHF-mediated coronary dilations in obese rats. It is plausible that a reduced expression of Cav-1 may result in a diminished caveolar localization of BK(Ca) channels, hence facilitating their availability for activation and also contribution to the EDHF-mediated vasodilation. Importantly, this mechanism seems essential in maintaining agonist-induced coronary dilations in diet-induced obesity. At this point we can only speculate whether this compensatory response in the coronary arteriolar wall is characteristic to early phases of obesity. It is likely that obesity-related metabolic and

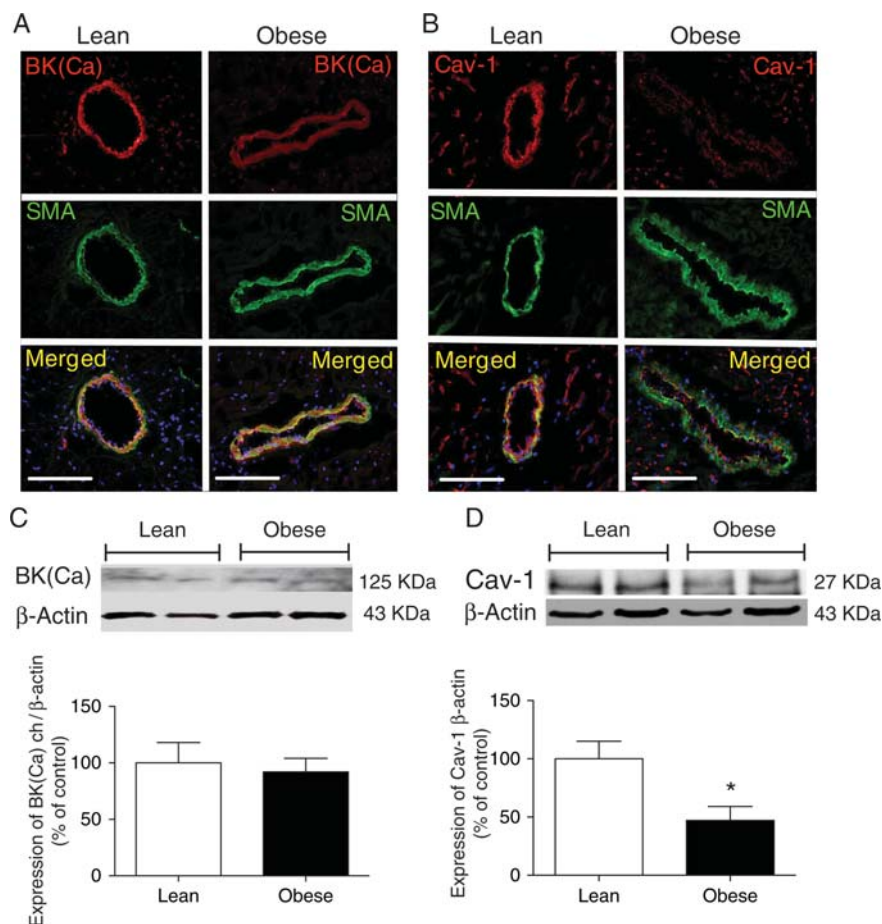


Figure 5 Representative pictures of immunohistochemical staining of BK(Ca) channel (red) and smooth muscle α -actin (SMA, green) are shown in (A), whereas staining of Cav-1 (red) and smooth muscle α -actin (green) are shown in (B), in coronary arterioles of lean (n = 4) and obese rats (n = 4). Merged images show co-staining of BK(Ca) and SMA and also Cav-1 and SMA in the coronary arteriolar wall. DAPI was used to stain the nuclei (blue). Scale bar, 50 μ m. (C) and (D) show representative western blots of BK(Ca) channel and Cav-1, respectively, in coronary arteries of lean (n = 5) and obese (n = 5) rats. Anti- β -actin was used to normalize for loading variations. Bar graphs are summary data of normalized densitometry ratios.

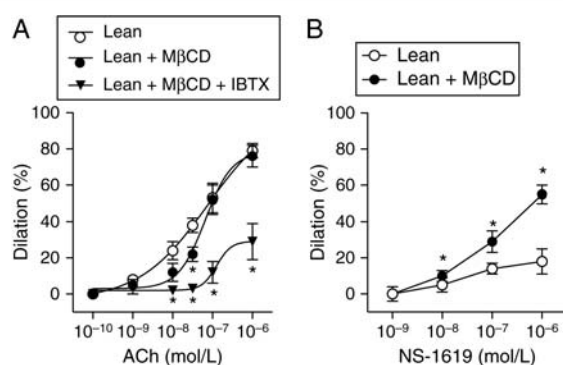


Figure 6 Percentage dilations of coronary arterioles isolated from lean Wistar rats in response to cumulative concentrations of ACh in the absence or in the presence of methyl- β -cyclodextrin (M β CD) and before and after incubation with iberoitoxin (IBTX) (n = 8 in each group, A). Percentage arteriolar dilations to NS-1619 in the absence or in the presence of M β CD (n = 8, B). Data are means $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant differences (P < 0.05).

hemodynamic changes necessitate initial adaptation of the dilator function of coronary resistance vessels that are primarily responsible for adjusting cardiac perfusion to actual metabolic demand.³³ However, such adaptive responses in the coronary circulation may decline as the metabolic disease progresses and other co-morbid diseases develop, such as, severe insulin resistance, hypertension and fasting hyperglycemia (diabetes). This may lead to limited vasodilator function in advanced stages of metabolic disease. In this context it has been shown that in animal models of type 2 diabetes (presence obesity and hyperglycemia) function of BK(Ca) channels^{27,34} and also other K⁺ channels, such as K_{ATP},³⁵ SK(Ca)²⁶ channels is impaired.

Taken together, the present study is the first to provide functional evidence for the inhibitory action of Cav-1 on BK(Ca) channels in intact microvessels, which may explain the lack of contribution of BK(Ca) channels to the EDHF response in normal conditions. Because of the loss of the inhibitory action of Cav-1, the contribution of BK(Ca) channels to EDHF-mediated dilations become prominent in diet-induced obesity, a compensatory mechanism, which seems essential for maintained agonist-induced coronary arteriolar dilation.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work is supported by grants from the American Heart Association (0735540T) and NIH 43023.

References

- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;**23**:374–380.
- Crane GJ, Gallagher N, Dora KA, Garland CJ. Small- and intermediate-conductance calcium-activated K^+ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol* 2003;**553**:183–189.
- Weston AH, Feletou M, Vanhoutte PM, Falck JR, Campbell WB, Edwards G. Bradykinin-induced, endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries: involvement of potassium channel activation and epoxyeicosatrienoic acids. *Br J Pharmacol* 2005;**145**:775–784.
- Si H, Heyken WT, Wolfle SE, Tysiac M, Schubert R, Grgic I et al. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Circ Res* 2006;**99**:537–544.
- Brahler S, Kaistha A, Schmidt VJ, Wolfle SE, Busch C, Kaistha BP et al. Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation* 2009;**119**:2323–2332.
- Sun D, Huang A, Koller A, Kaley G. Endothelial $K(ca)$ channels mediate flow-dependent dilation of arterioles of skeletal muscle and mesentery. *Microvasc Res* 2001;**61**:179–186.
- Tanaka Y, Koike K, Toro L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* 2004;**40**:125–153.
- Zygmunt PM, Hogestatt ED. Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K^+ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**291**:H216–H222.
- Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, Toro L. MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* 2006;**570**:65–72.
- Graziani A, Brisco V, Carmignani M, Graier WF, Groschner K. Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A2-dependent EDHF formation. *Cardiovasc Res* 2004;**64**:234–242.
- Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* 2004;**94**:1408–1417.
- Patel HH, Murray F, Insel PA. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;**48**:359–391.
- Saliez J, Bouzin C, Rath G, Ghisdal P, Desjardins F, Rezzani R et al. Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca^{2+} signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* 2008;**117**:1065–1074.
- Absi M, Burnham MP, Weston AH, Harno E, Rogers M, Edwards G. Effects of methyl beta-cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries: association between $SK(Ca)$ channels and caveolin-rich domains. *Br J Pharmacol* 2007;**151**:332–340.
- Wang XL, Ye D, Peterson TE, Cao S, Shah VH, Katusic ZS et al. Caveolae targeting and regulation of large conductance $Ca(2+)$ -activated K^+ channels in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;**280**:11656–11664.
- Cheng X, Jaggar JH. Genetic ablation of caveolin-1 modifies Ca^{2+} spark coupling in murine arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**290**:H2309–H2319.
- Alioua A, Lu R, Kumar Y, Eghbali M, Kundu P, Toro L et al. Slo1 caveolin-binding motif, a mechanism of caveolin-1-Slo1 interaction regulating Slo1 surface expression. *J Biol Chem* 2008;**283**:4808–4817.
- Bagi Z, Frangos JA, Yeh JC, White CR, Kaley G, Koller A. PECAM-1 mediates NO-dependent dilation of arterioles to high temporal gradients of shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1590–1595.
- Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Edes I, Bagi Z. The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the $K(ATP)$ and $BK(Ca)$ channels in rat isolated arterioles. *Br J Pharmacol* 2006;**148**:696–702.
- Erdei N, Toth A, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Koller A 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**:H2107–H2115.
- Jebelovszki E, Kiraly C, Erdei N, Feher A, Pasztor ET, Rutkai I et al. 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* 2008;**294**:H2558–H2564.
- Fulop T, Jebelovszki E, Erdei N, Szerafin T, Forster T, Edes I et al. Adaptation of vasomotor function of human coronary arterioles to the simultaneous presence of obesity and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:2348–2354.
- Szerafin T, Erdei N, Fulop T, Pasztor ET, Edes I, Koller A et al. Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ Res* 2006;**99**:e12–e17.
- Ellis A, Cheng ZJ, Li Y, Jiang YF, Yang J, Pannirselvam M et al. Effects of a Western diet versus high glucose on endothelium-dependent relaxation in murine micro- and macro-vasculature. *Eur J Pharmacol* 2008;**601**:111–117.
- Burnham MP, Johnson IT, Weston AH. Impaired small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel-dependent EDHF responses in Type II diabetic ZDF rats. *Br J Pharmacol* 2006;**148**:434–441.
- Burnham MP, Johnson IT, Weston AH. Reduced Ca^{2+} -dependent activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels from arteries of Type 2 diabetic Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**290**:H1520–H1527.
- Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 2002;**277**:8635–8647.
- Lin WW, Lin YC, Chang TY, Tsai SH, Ho HC, Chen YT et al. Caveolin-1 expression is associated with plaque formation in hypercholesterolemic rabbits. *J Histochem Cytochem* 2006;**54**:897–904.
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdiaie A, Vaziri ND. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 2005;**98**:203–210.
- Thompson MA, Henderson KK, Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Price E et al. Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J Appl Physiol* 2004;**96**:1114–1126.
- Yang N, Ying C, Xu M, Zuo X, Ye X, Liu L et al. High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats. *Cardiovasc Res* 2007;**76**:167–174.
- Bagi Z. Mechanisms of coronary microvascular adaptation to obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;**297**:R556–R567.
- Dong L, Zheng YM, Van Riper D, Rathore R, Liu QH, Singer HA et al. Functional and molecular evidence for impairment of calcium-activated potassium channels in type-1 diabetic cerebral artery smooth muscle cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;**28**:377–386.
- Miura H, Wachtel RE, Loberiza FR Jr, Saito T, Miura M, Nicolosi AC et al. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 2003;**92**:151–158.

Zoltan Ungvari, Zsolt Bagi, Attila Feher, Fabio A. Recchia, William E. Sonntag, Kevin Pearson, Rafael de Cabo and Anna Csiszar

Am J Physiol Heart Circ Physiol 299:18-24, 2010. First published Apr 23, 2010;
doi:10.1152/ajpheart.00260.2010

You might find this additional information useful...

This article cites 49 articles, 30 of which you can access free at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/299/1/H18#BIBL>

This article has been cited by 1 other HighWire hosted article:

Vasoprotective Effects of Life Span-Extending Peripubertal GH Replacement in Lewis Dwarf Rats

Z. Ungvari, T. Gautam, P. Koncz, J. C. Henthorn, J. T. Pinto, P. Ballabh, H. Yan, M. Mitschelen, J. Farley, W. E. Sonntag and A. Csiszar

J Gerontol A Biol Sci Med Sci, November 1, 2010; 65A (11): 1145-1156.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/299/1/H18>

Additional material and information about *AJP - Heart and Circulatory Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpheart>

This information is current as of October 14, 2010 .

Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2

Zoltan Ungvari,¹ Zsolt Bagi,² Attila Feher,² Fabio A. Recchia,^{2,5} William E. Sonntag,¹ Kevin Pearson,^{3,4} Rafael de Cabo,³ and Anna Csiszar¹

¹Reynolds Oklahoma Center on Aging, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma;

²Department of Physiology, New York Medical College, Valhalla, New York; ³Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, Baltimore, Maryland; ⁴Graduate Center for Nutritional Sciences, University of Kentucky, Lexington, Kentucky; and ⁵Sector of Medicine, Scuola Sant'Anna, Pisa, Italy.

Submitted 12 March 2010; accepted in final form 20 April 2010

Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, de Cabo R, Csiszar A. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H18–H24, 2010. First published April 23, 2010; doi:10.1152/ajpheart.00260.2010.—Epidemiological studies suggest that Mediterranean diets rich in resveratrol are associated with reduced risk of coronary artery disease. Resveratrol was also shown to confer vasoprotection in animal models of type 2 diabetes and aging. However, the mechanisms by which resveratrol exerts its antioxidative vasculoprotective effects are not completely understood. Using a nuclear factor-E₂-related factor-2 (Nrf2)/antioxidant response element-driven luciferase reporter gene assay, we found that in cultured coronary arterial endothelial cells, resveratrol, in a dose-dependent manner, significantly increases transcriptional activity of Nrf2. Accordingly, resveratrol significantly upregulates the expression of the Nrf2 target genes NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, γ -glutamylcysteine synthetase, and heme oxygenase-1. Resveratrol treatment also significantly attenuated high glucose (30 mM)-induced mitochondrial and cellular oxidative stress (assessed by flow cytometry using MitoSox and dihydroethidine staining). The aforementioned effects of resveratrol were significantly attenuated by the small interfering RNA downregulation of Nrf2 or the overexpression of Kelch-like erythroid cell-derived protein 1, which inactivates Nrf2. To test the effects of resveratrol in vivo, we used mice fed a high-fat diet (HFD), which exhibit increased vascular oxidative stress associated with an impaired endothelial function. In HFD-fed Nrf2^{+/+} mice, resveratrol treatment attenuates oxidative stress (assessed by the Amplex red assay), improves acetylcholine-induced vasodilation, and inhibits apoptosis (assessed by measuring caspase-3 activity and DNA fragmentation) in branches of the femoral artery. In contrast, the aforementioned endothelial protective effects of resveratrol were diminished in HFD-fed Nrf2^{-/-} mice. Taken together, our results indicate that resveratrol both in vitro and in vivo confers endothelial protective effects which are mediated by the activation of Nrf2.

endothelial cell; gracilis; resveratrol; nuclear factor-E₂-related factor-2

RECENT STUDIES PROVIDE strong evidence that the treatment of laboratory rodents with resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene), a plant-derived polyphenolic compound, exerts significant vasoprotective effects both in type 2 diabetes and during aging (29, 44, 48). Recent studies also revealed that resveratrol improves the health and survival of mice with metabolic syndrome (1, 23). In addition, epidemiological studies sug-

gest that Mediterranean diets which are rich in resveratrol are associated with a significantly reduced risk of cardiovascular disease in humans as well (16, 19). However, the molecular mechanisms that underlie the beneficial effects of resveratrol on cardiovascular function remain incompletely understood (35).

Nuclear factor-E₂-related factor-2 (Nrf2) is a transcription factor that regulates the expression of numerous reactive oxygen species (ROS) detoxifying and antioxidant genes. Recent studies suggest that the Nrf2/antioxidant response element (ARE) pathway can be activated both pharmacologically and by dietary means (30). Under basal nonactivated conditions, Nrf2 interacts with Kelch-like erythroid cell-derived protein 1 (Keap-1), a cytosolic repressor protein, and limits Nrf2-mediated gene expression. Upon activation, the Keap-1-Nrf2 complex is dissociated and Nrf2 triggers the expression of genes mediated by the ARE to attenuate cellular oxidative stress. When Nrf2 is released from Keap-1 and translocates to the nucleus, it binds to ARE and activates ARE-dependent transcription of phase II and antioxidant defense enzymes, including NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and heme oxygenase-1 (Hmox1). The Nrf2/ARE pathway also controls the expression of γ -glutamylcysteine synthetase (GCLC), the rate-limiting enzyme for glutathione (GSH) synthesis.

The present study was designed to determine whether the vasoprotective effects of resveratrol are mediated, at least in part, by the activation of Nrf2. We base this hypothesis on several lines of evidence. First, we have shown that resveratrol in cultured coronary arterial endothelial cells (CAECs) upregulates Nrf2/ARE-dependent antioxidant enzymes, including Hmox1 and glutathione peroxidase (40) and effectively decreases oxidative stress induced by inflammatory stimuli and metabolic stressors (40, 43). Second, resveratrol upregulates cellular antioxidant defense mechanisms protecting endothelial cells against oxidative stress in aging, diabetes (29, 48), and cigarette smoking (9, 21) in vivo. Third, resveratrol increases cellular GSH levels in cultured CAECs (43), as well as in other cell types (21). Fourth, resveratrol appears to act as a "caloric restriction mimetic" in model organisms (17, 46) as well as in mammalian systems (29). In that regard it is important that the antioxidant effects of caloric restriction are, at least in part, mediated by Nrf2 (30).

To test our hypotheses, we assessed Nrf2 activation in response to resveratrol treatment in cultured primary human CAECs. We characterized the effect of disruption of the Nrf2/ARE pathway on resveratrol-induced attenuation of endothelial ROS production and induction of antioxidant gene

Address for reprint requests and other correspondence: Z. Ungvari, Reynolds Oklahoma Ctr. on Aging, Dept. of Geriatric Medicine, Univ. of Oklahoma HSC, 975 NE 10th St., BRC 1303, Oklahoma City, OK 73104 (e-mail: zoltan-ungvari@ouhsc.edu).

expression. We also determined whether resveratrol, via Nrf2, inhibits the induction of apoptosis by oxidative stress in cultured endothelial cells. For oxidative stressors we used high glucose, which generates large amounts of ROS in the mitochondria (25, 31), and TNF- α , which activates NAD(P)H oxidases (36). The relevance of the effects of resveratrol in vivo was tested on high-fat diet (HFD)-induced endothelial dysfunction, vascular oxidative stress, and apoptosis in wild-type and Nrf2^{-/-} mice.

METHODS

Cell cultures, knockdown of Nrf2, and Keap-1 overexpression. Cultured primary human CAECs (purchased from Cell Applications) were treated with resveratrol (purchased from Sigma-Aldrich) as previously described (6, 8, 12, 40). To disrupt Nrf2 signaling, Nrf2 was downregulated by RNA interference using proprietary small interfering RNA (siRNA) sequences (Origen) and the electroporation-based Amaxa Nucleofector technology (Amaxa, Gaithersburg, MD), as we have previously reported (5, 6, 43). Cell density at transfection was 30%. Experiments were performed on day 2 after the transfection, when gene silencing was optimal. Keap-1 overexpression was achieved in CAECs by transfection with a Keap-1 full-length cDNA-encoding plasmid (Origen) as previously described (9).

Transient transfection and luciferase assays. The effect of resveratrol on Nrf2 activity in CAECs was tested by a reporter gene assay. We used an ARE reporter comprised of tandem repeats of the ARE transcriptional response element upstream of firefly luciferase (SA Biosciences, Frederick, MD) and a renilla luciferase plasmid under the control of the cytomegalovirus promoter (as an internal control). Transfections in CAECs were performed using the Amaxa Nucleofector technology (Amaxa), as we have previously reported (5, 13, 15). Firefly and renilla luciferase activities were assessed after 24 h using the Dual Luciferase Reporter Assay Kit (Promega) and a Tecan Infinite M200 plate reader.

Quantitative real-time RT-PCR. The quantitative real-time RT-PCR technique was used to analyze mRNA expression of the Nrf2/ARE target genes *Nqo1*, *Gclc*, and *Hmox1* in resveratrol-treated CAECs, as previously reported (10, 14, 42, 44). In brief, total RNA was isolated with a Mini RNA Isolation Kit (Zymo Research, Orange, CA) and was reverse transcribed using Superscript III RT (Invitrogen) as previously described (12, 14). A real-time RT-PCR technique was used to analyze mRNA expression using the Stratagen MX3000, as previously reported (12). Amplification efficiencies were determined using the dilution series of a standard vascular sample. Quantification was performed using the efficiency-corrected $\Delta\Delta C_q$ method. The relative quantities of the reference genes *Gapdh*, *Hprt*, and *ACTB* (β -actin) were determined, and a normalization factor was calculated based on the geometric mean for internal normalization. Oligonucleotides used for quantitative real-time RT-PCR are listed in Table 1. Fidelity of the PCR reaction was determined by melting temperature analysis and visualization of product on a 2% agarose gel.

Measurement of resveratrol-induced changes in mitochondrial and cellular ROS production in CAECs. CAECs were treated with high glucose (30 mM for 24 h) to assess the protective effect of resveratrol on mitochondrial ROS production. Mitochondrial O₂⁻ production in endothelial cells was assessed by flow cytometry (Millipore/Guava EasyCyte) using MitoSox red (Invitrogen, Carlsbad CA), a mitochondrial-specific hydroethidine-derivative fluorescent dye, as previously reported (22, 43). Cell debris (low forward and side scatter), dead cells (Sytox Green and annexin V positive), and apoptotic cells (annexin V positive) were gated out for analysis (25, 26). The effects of Nrf2 knockdown or Keap-1 overexpression on resveratrol-induced attenuation of high glucose-induced mitochondrial O₂⁻ production were also determined. The data are presented as the fold change in the median intensity of MitoSox fluorescence when compared with the respective controls.

In other experiments oxidative stress was induced in CAECs by TNF- α treatment (10 ng/ml for 24 h). To assess the effects of resveratrol on TNF- α -induced cellular ROS production, we used the cell-permeant oxidative fluorescent indicator dye dihydroethidine (DHE, Invitrogen) as we previously reported (7). In brief, the cells were washed with warm PBS and incubated with DHE (3 μ M at 37°C for 30 min). The buildup of DHE fluorescence over time was compared by flow cytometry (Guava EasyCyte). The effects Nrf2 knockdown or Keap-1 overexpression on resveratrol-induced attenuation of TNF- α -induced cellular ROS production were also determined.

Assessment of resveratrol-induced inhibition of apoptotic cell death in CAECs. To determine the efficacy of resveratrol to protect against oxidative stress-induced apoptosis, CAECs grown in 96-well plates were treated with high glucose (30 mM for 72 h). After the treatment period, the ratio of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL)-positive cells, a marker of apoptosis, was determined by flow cytometry (Guava EasyCyte) using the Guava TUNEL Assay (Millipore) according to the manufacturer's guidelines. The effects of Nrf2 knockdown or Keap-1 overexpression on resveratrol-induced attenuation of high glucose-induced apoptosis were determined.

Animal studies. Male ICR wild-type mice (Nrf2^{+/+}) were purchased from Taconic, and male Nrf2 knockout mice on an ICR background (Nrf2^{-/-}) were obtained from a well-characterized colony (30) at the National Institute on Aging. In this study only male mice were studied to exclude the possible confounding effects of the estrous cycle in females. The mice were housed in an environmentally controlled vivarium with unlimited access to water and a controlled photoperiod (12-h light:12-h dark). Body weight was recorded bi-weekly. All mice were maintained according to National Institutes of Health's guidelines, and all animal use protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of the participating institutions. At 20 wk of age, mice were assigned to three groups and were fed a standard AIN-93G diet or AIN-93G modified to provide 60% of calories from fat (HFD) or a HFD plus resveratrol (2.4 g resveratrol per kg diet), as described previously (29). The Nrf2^{+/+} ($n = 10$) and Nrf2^{-/-} ($n = 16$) mice fed the HFD gained 43.0 $\pm$ 3.0% and 42.0 $\pm$ 4.6% of their starting weight, respectively. The Nrf2^{+/+}

Table 1. Oligonucleotides for real-time RT-PCR

mRNA Targets	Description	Sense	Antisense
<i>Nqo1</i>	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1), human	AGACCTTGATATTCAGTTC	GGCAGCGTAAGTGTAAAGC
<i>Gclc</i>	γ -glutamylcysteine synthetase (glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit), human	CAGTGGTGGATGGTGTGTG	ATTGATGATGGTGTCTATGC
<i>Hmox1</i>	heme oxygenase-1, human	AAGTATCCTTGTTGACACG	TGAGCCAGGAACAGAGTG
<i>Hprt</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, human	CCGTGTGTTAGAAAAGTAAGAAGC	AACTGCTGACAAAGATTCACTGG
<i>Gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, human	AACGAATTTGGCTACAGC	AGGGTACTTTATTGATGGTACAT
<i>Actb</i>	β -actin, human	CGGTGAAGGTGACAGCAG	TGTGTGGACTTGGGAGAGG

($n = 10$) and Nrf2^{-/-} ($n = 15$) mice fed HFD + resveratrol trended toward a decrease with weight gains of $33.0 \pm 4.3\%$ and $31.8 \pm 4.3\%$, respectively. Resveratrol significantly decreased body weight gain percentage when the genotypes were pooled ($P < 0.05$). There was considerable variation in weight gain in the mice, and the intent of the studies was to determine the influence of resveratrol and Nrf2 on endothelial function, independent of body weight gain differences. Therefore, we selected a cohort of mice ($n = 6$) from the larger population with a mean body weight percent gain of $\sim 40\%$. The mean body weight percent gain of the cohort analyzed in Figs. 3 and 4 was $40.6 \pm 4.7\%$ and $40.3 \pm 4.6\%$ for Nrf2^{+/+} mice fed the HFD and HFD + resveratrol diets, respectively, whereas the HFD-fed Nrf2^{-/-} mice gained $42.3 \pm 4.1\%$ and resveratrol-fed Nrf2^{-/-} mice gained $41.8 \pm 4.6\%$. There were no significant differences in body weight percentage gained for this cohort ($P = 0.987$), which indicates that the results in Figs. 3 and 4 are independent of body weight gain differences.

Assessment of the effect of resveratrol treatment on microvascular endothelial function. The animals were euthanized at 36 wk of age, and skeletal muscle arterioles were prepared as previously described (37, 38, 41). In brief, the gracilis muscle was removed and arterioles were isolated using microsurgery instruments. The arterioles were mounted onto two glass micropipettes in a vessel chamber and pressurized to 60 mmHg. The inner arteriolar diameter was measured with a video micrometer system and continuously recorded using a computerized data acquisition system. All vessels were allowed to stabilize for 60 min in oxygenated (21% O₂-5% CO₂, balanced with N₂) Krebs buffer (at 37°C). After the equilibration period, during which spontaneous myogenic tone ($\sim 50\%$) developed, the arteriolar dilation to cumulative doses of acetylcholine (10^{-9} to 10^{-6} mol/l) was measured.

Measurement of vascular ROS production. Cellular ROS production was measured fluorometrically in femoral arterial segments using the Amplex red/horseradish peroxidase assay in the presence of PEG-SOD as previously described (11). The H₂O₂ generation rate, normalized to tissue mass, was compared by measuring the time course of the buildup of resorufin fluorescence for 60 min by a Tecan Infinite M200 plate reader.

Assessment of apoptotic cell death in vascular tissue. To determine the effect of Nrf2 depletion on the antiapoptotic effects of resveratrol in vivo, segments of the femoral arteries were lysed and cytoplasmic histone-associated DNA fragments, which indicate apoptotic cell death, were quantified by the Cell Death Detection ELISA^{Plus} kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's protocol as previously described (10, 40). The results are reported as arbitrary optical density units normalized to protein concentration.

Caspase-3/7 activities in tissue lysates were measured using Caspase-Glo 3/7 assay kits according to the manufacturer's instruction (Promega, Madison, WI) as previously reported (10, 40). In 96-well plates, a 50- μ l sample was gently mixed for 30 s with 50 μ l Caspase-Glo-3/7 reagent and incubated for 2 h at room temperature. The lysis buffer with the reagent served as blank. Luminescence of the samples was measured using an Infinite M200 plate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC). Luminescent intensity values were normalized to the sample protein concentration.

Data analysis. Gene expression data were normalized to the respective control mean values. Statistical analyses of data were performed by Student's *t*-test or by two-way ANOVA followed by the Tukey's post hoc test, as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data are expressed as means $\pm$ SE.

RESULTS

Resveratrol increases transcriptional activity of Nrf2 and upregulates Nrf2/ARE-driven genes in CAECs. To determine the effect of resveratrol on Nrf2 activation, we transiently transfected CAECs with a Nrf2/ARE-driven reporter gene

construct and then treated the cells with resveratrol. A significant, concentration-dependent increase in luciferase activity over the vector control was noted upon stimulation with resveratrol (Fig. 1A). Resveratrol, in a concentration-dependent manner, also significantly increased mRNA expression of the known Nrf2 targets Nqo1, Gclc, and Hmox1 (Fig. 1B). Overexpression of Keap-1 or siRNA knockdown of Nrf2 prevented resveratrol-induced upregulation of Nqo1, Gclc, and Hmox1 (Fig. 1C).

Nrf2 contributes to the antioxidative effects of resveratrol in CAECs. A series of experiments was conducted to examine the role of Nrf2 in the effects of resveratrol on the production of ROS in CAECs. First, MitoSox fluorescence intensities in CAECs were compared using flow cytometry (Fig. 2A). We found that high-glucose treatment elicited substantial increases in MitoSox fluorescence in CAECs (Fig. 2A). Pretreatment of cells with resveratrol (for 24 h) significantly attenuated MitoSox fluorescence in CAECs treated with high glucose (Fig. 2A). In contrast, in CAECs with an overexpression of Keap-1 or siRNA knockdown of Nrf2, resveratrol failed to significantly attenuate

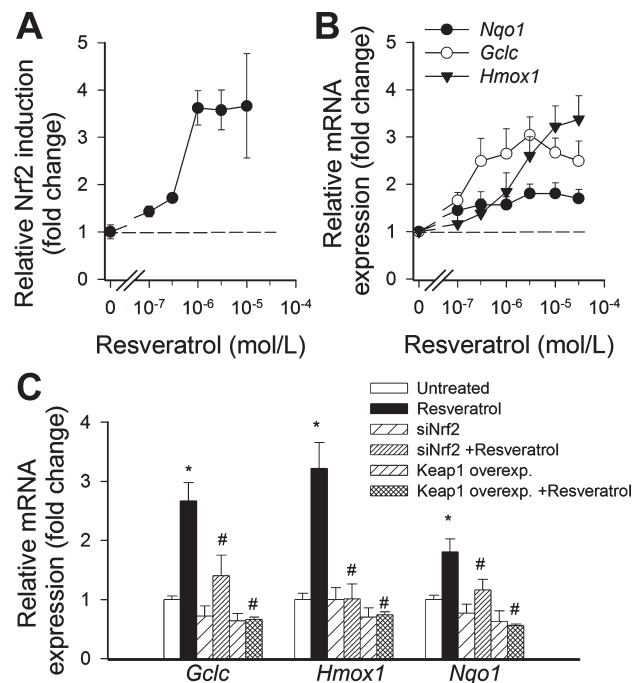


Fig. 1. A: reporter gene assay showing the effects of resveratrol on nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf2)/antioxidant response element reporter activity in cultured primary human coronary arterial endothelial cells. Cells were transiently cotransfected with antioxidant response element-driven firefly luciferase and cytomegalovirus-driven renilla luciferase constructs followed by resveratrol (Res) treatment. Cells were then lysed and subjected to luciferase activity assay. After normalization, relative luciferase activity was obtained from 4 to 6 independent transfections. Data are means $\pm$ SE. The effect of Res was significant ($P < 0.05$) at each concentration used. B: effect of Res on mRNA expression of NAD(P)H:quinone-oxidoreductase 1 (Nqo1), γ -glutamylcysteine synthetase (GCLC), and heme oxygenase-1 (Hmox1) in cultured primary human coronary arterial endothelial cells. Data are means $\pm$ SE; $n = 5$ in each group. The effect of Res was significant ($P < 0.05$) at each concentration used. C: the effects of small interfering RNA (siRNA) downregulation of Nrf2 (siNrf2) or overexpression (Overexp) of Kelch-like erythroid cell-derived protein 1 (Keap-1) on Res (10 μ mol/l)-induced mRNA expression of Nqo1, Gclc, and Hmox1 in cultured primary human coronary arterial endothelial cells. Data are means $\pm$ SE; $n = 5$ in each group. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. Res only.

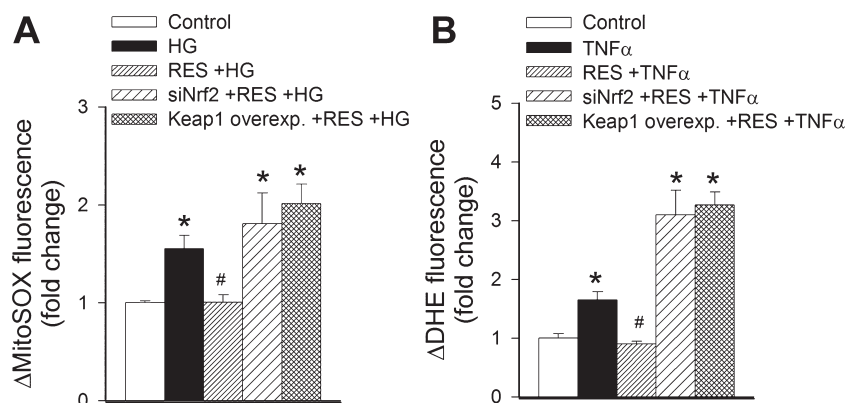


Fig. 2. In primary human coronary arterial endothelial cells, high glucose (HG, 30 mmol/l; A) and TNF- α (10 ng/ml; B) induce mitochondrial and cellular oxidative stress, as shown by the significant increases in the mean fluorescence intensity of oxidized MitoSOX (A) and dihydroethidine (DHE; B), respectively. Res treatment significantly attenuates both HG-induced mitochondrial oxidative stress (A) and decreases TNF- α -induced cellular O $_2^{\cdot-}$ levels (B). Both of these effects are prevented by siRNA downregulation of Nrf2 and overexpression of Keap-1. Data are means $\pm$ SE; $n = 6$ in each group. * $P < 0.05$ vs. baseline; # $P < 0.05$ vs. no Res.

high glucose-induced increases in MitoSOX fluorescence (Fig. 2A). Similar results were obtained when DHE fluorescence was compared in CAECs (Fig. 2B). We found that treatment with TNF- α elicited substantial increases in DHE fluorescence in CAECs (Fig. 2B). Pretreatment of CAECs with resveratrol prevented TNF- α -induced increases in DHE fluorescence (Fig. 2B). In contrast, in CAECs with an overexpression of Keap-1 or siRNA knockdown of Nrf2, resveratrol failed to attenuate significantly TNF- α -induced increases in DHE fluorescence (Fig. 2B).

Nrf2 contributes to the vasoprotective effects of resveratrol in HFD-fed mice. We compared male Nrf2^{+/+} and Nrf2^{-/-} mice ($n = 6$ in each group) with similar initial body weights after 16 wk of the HFD. Fasting blood glucose levels significantly differed between the two strains on the control diet (Nrf2^{+/+}, 5.5 ± 0.6 mmol/l; and Nrf2^{-/-}, 2.8 ± 0.2 mmol/l), yet both strains developed comparable relative hyperglycemia on the HFD (Nrf2^{+/+}, 8.6 ± 0.4 mmol/l; and Nrf2^{-/-}, 5.7 ± 0.8 mmol/l). Resveratrol treatment did not result in significant differences in fasting blood glucose levels in Nrf2^{+/+} and Nrf2^{-/-} mice on HFD (Nrf2^{+/+}, 8.6 ± 0.9 mmol/l; and Nrf2^{-/-}, 5.7 ± 0.3 mmol/l, not significant vs. HFD alone), but glucose tolerance was not assayed.

The HFD elicited significant vasodilator dysfunction in arteriolar branches of the femoral artery in both Nrf2^{+/+} and Nrf2^{-/-} mice, as shown by the impaired dilator responses to acetylcholine (Fig. 3, A and B). Resveratrol treatment restored acetylcholine-induced dilations to control levels in arterioles of HFD-fed Nrf2^{+/+} mice (Fig. 3A). In contrast, resveratrol treatment resulted only in a partial improvement of acetylcholine-induced dilations in arterioles of HFD-fed Nrf2^{-/-} mice, and the difference between acetylcholine-induced responses in these vessels and those from control diet-fed Nrf2^{-/-} mice remained significant (Fig. 3B).

Vascular ROS generation was measured by the Amplex red/horseradish peroxidase method. We found that a HFD significantly increased ROS production in the femoral arteries of both Nrf2^{+/+} mice and Nrf2^{-/-} mice. Resveratrol treatment restored vascular ROS production to control levels in Nrf2^{+/+} mice (Fig. 3C). In contrast, resveratrol treatment resulted only in a partial attenuation of ROS production in vessels of HFD-fed Nrf2^{-/-} mice, and the difference between ROS production in these vessels and those from control diet-fed Nrf2^{-/-} mice remained significant (Fig. 3C).

Nrf2 contributes to the antiapoptotic effects of resveratrol. In CAECs, high-glucose treatment elicited substantial in-

creases in the rate of apoptotic cell death, as indicated by the increased number of TUNEL-positive cells (Fig. 4A). Resveratrol treatment significantly decreased the number of apoptotic cells, an effect that was prevented by siRNA knockdown of Nrf2 (Fig. 4A). To assess the in vivo relevance of our findings, we assessed markers of apoptosis in homogenates of femoral arteries from mice in each group. We found that the HFD promoted apoptosis, indicated by the increased rate of DNA fragmentation (Fig. 4B) and caspase-3 activity (not shown) in vessels of both Nrf2^{+/+} mice and Nrf2^{-/-} mice. Resveratrol treatment prevented vascular apoptotic cell death in Nrf2^{+/+} mice, indicated by the normal levels of DNA fragmentation (Fig. 4B) and caspase-3 activity (not shown). In contrast, resveratrol treatment failed to prevent apoptosis in vessels of HFD-fed Nrf2^{-/-} mice (Fig. 4B).

DISCUSSION

Resveratrol exerts significant vasoprotective effects in pathophysiological conditions associated with the increased production of ROS (4, 9, 27, 29, 39, 48). However, the mechanisms that contribute to the endothelial protective effects of resveratrol are only partially understood. Here we provide evidence that in human CAECs, resveratrol increases the transcriptional activity of Nrf2 and upregulates several ARE-regulated genes involved in free radical metabolism in an Nrf2-dependent manner (Fig. 1). The concentrations of resveratrol, which elicit significant Nrf2 activation (Fig. 1) and Nrf2-dependent induction of major cellular antioxidant enzymes (39, 40), effectively attenuate cellular and mitochondrial oxidative stress in cultured endothelial cells (Fig. 2). The findings that the knockdown of Nrf2 or the overexpression of Keap-1 abrogate the protective effects of resveratrol against high glucose- and TNF- α -induced oxidative stress (Fig. 2, A and B) provide direct evidence that in vascular endothelial cells, Nrf2 contributes to the antioxidative action of resveratrol. The concentration range of resveratrol in which it activates Nrf2 is physiologically relevant. Although such levels are not generally achieved through the consumption of Mediterranean diets or red wine, when resveratrol is used as a dietary supplement, it can achieve micromolar levels in the plasma (2). It is significant that in endothelial cells and other cell types (3, 18, 24, 32), resveratrol activates Nrf2 and attenuates oxidative stress at lower concentrations than the resveratrol levels needed for activation/induction of silent information regulator 2/sirtuin 1 (SIRT1) in vitro (17, 46). Interestingly, recent studies called

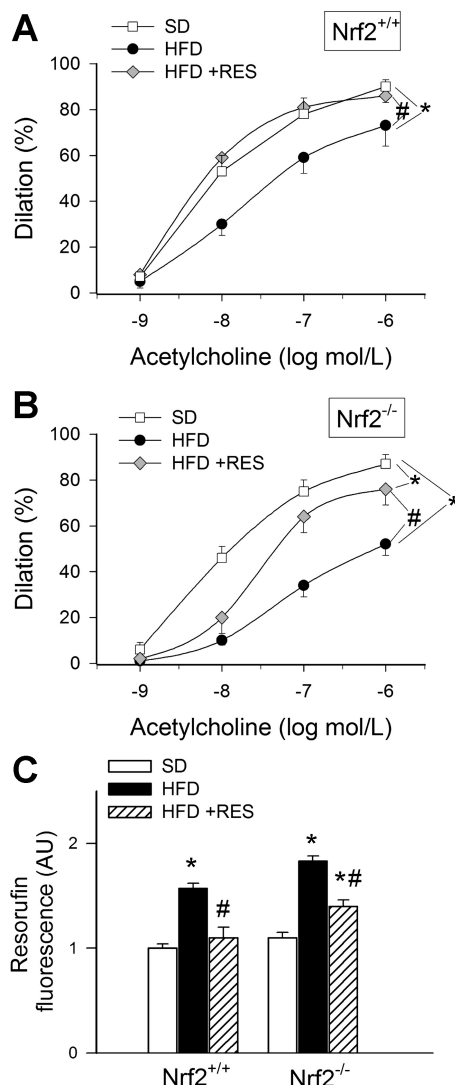


Fig. 3. Dilation of skeletal muscle arterioles isolated from Nrf2^{+/+} mice (A) and Nrf2^{-/-} mice (B) in response to increasing concentrations of acetylcholine. Mice were fed a standard diet (SD), high-fat diet (HFD), or HFD enriched with Res. Data are means $\pm$ SE; $n = 5$ in each group. C: results from Amplex red/horseradish peroxidase assay. Data are normalized resorufin fluorescence, representing ROS production by segments of the femoral arteries of Nrf2^{+/+} mice and Nrf2^{-/-} mice, fed a SD, HFD or HFD enriched with Res. AU, arbitrary units. * $P < 0.05$ vs. untreated; # $P < 0.05$ vs. no Res.

into question the ability of resveratrol to directly activate SIRT1, raising the possibility that resveratrol acts on a target upstream from SIRT1 (28). Because the interaction between Nrf2 and SIRT1 in endothelial cells is not well understood, future studies are warranted to elucidate whether Nrf2 contributes to the resveratrol-induced upregulation of SIRT1 in endothelial cells.

As noted previously, we have demonstrated that resveratrol effectively attenuates vascular oxidative stress and improves endothelial function in animal models of type 2 diabetes and the metabolic syndrome (29, 48). Results from the present study show for the first time that the genetic depletion of Nrf2 abrogates the ability of resveratrol to improve endothelial function (Fig. 3, A and B) and prevent oxidative stress in HFD-fed mice (Fig. 3C). These findings demonstrate that Nrf2

is a physiologically important mediator of the vasoprotective effects of resveratrol. Previous studies have attributed some of the vascular effects of resveratrol to the activation of estrogen receptors (20), but their role in resveratrol-induced Nrf2 activation is not understood. Recent studies suggest that resveratrol can recapitulate many of the molecular events downstream of caloric restriction in vivo (29, 33). In that context, it is significant that caloric restriction also induces Nrf2-driven genes in various tissues (30). It should be noted, however, that resveratrol is also likely to exert vasoprotective effects, which are likely to be independent of the direct induction of Nrf2 in the vascular wall. For example, resveratrol was reported to induce endothelial nitric oxide synthase, increasing the synthesis and bioavailability of nitric oxide (8, 45, 48), and to downregulate NAD(P)H oxidases, which likely also contribute to the vasoprotective effects of resveratrol in type 2 diabetes (34, 48) and aging (29). In addition, resveratrol may also regulate microvascular function indirectly through the modulation of the paracrine/endocrine function of adipose tissue (47, 49).

In addition to clarifying the role of Nrf2 with respect to the attenuation of endothelial oxidative stress and the improvement of endothelial function by resveratrol, the results of our studies provide strong evidence that Nrf2-dependent mechanisms also contribute to the prevention of programmed endothelial cell

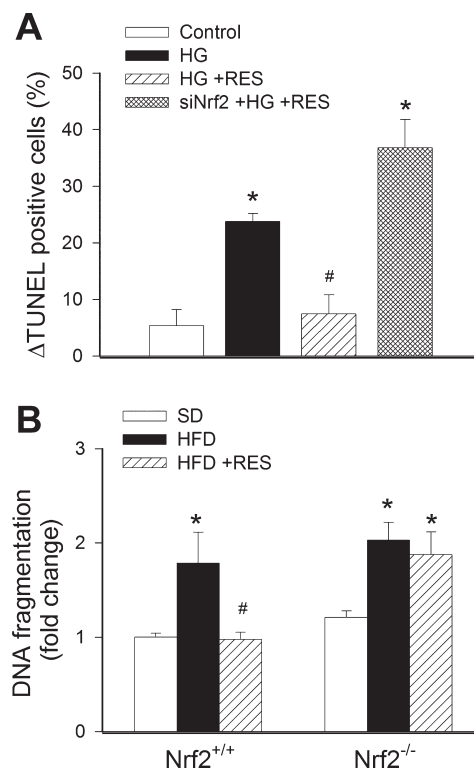


Fig. 4. A: in primary human coronary arterial endothelial cells, HG significantly ($P < 0.05$ vs. control) increased apoptotic cell death as shown by the increased terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) positivity (flow cytometry). Treatment with Res prevented HG-induced endothelial apoptosis (# $P < 0.05$ vs. HG only). By contrast, in endothelial cells with siNrf2, Res failed to inhibit HG-induced endothelial apoptosis. Data are means $\pm$ SE; $n = 6$ for each group. B: DNA fragmentation in femoral arterial branches of Nrf2^{+/+} mice and Nrf2^{-/-} mice fed a SD, HFD, or HFD enriched with Res. Data are means $\pm$ SE; $n = 6$ for each group. * $P < 0.05$ vs. untreated; # $P < 0.05$ vs. no Res.

death by resveratrol treatment. Several lines of evidence support this intriguing point of view. First, the molecular disruption of Nrf2 signaling abrogates the antiapoptotic effects of resveratrol in cultured endothelial cells (Fig. 4A). Second, our previous studies demonstrated that in human CAECs, resveratrol induces the Nrf2 targets catalase, glutathione peroxidase, and heme oxygenase and the pharmacological inhibition of these enzymes also significantly attenuates resveratrol-mediated protection against oxidative stress-induced apoptosis (40). In keeping with this point of view, we previously found that resveratrol treatment in vivo also attenuates endothelial apoptosis in HFD-fed mice, which is associated with a reduction of oxidative stress (29). The findings that the genetic depletion of Nrf2 abrogates the antiapoptotic effects of resveratrol in vascular tissues of HFD-fed mice (Fig. 4B) provide further evidence that resveratrol exerts its vasoprotective effects, at least in part, via Nrf2-dependent pathways.

Conclusion. The results of this study suggest that the activation of the Nrf2/ARE pathway has a critical role in the endothelial protective effects of resveratrol both in vitro and in laboratory animals. Resveratrol concentrations sufficient to activate Nrf2 in vitro are achievable in humans by the consumption of dietary supplements containing resveratrol (2). Thus we posit that the activation of Nrf2-driven pathways by resveratrol treatment can importantly contribute to an intervention strategy for the prevention of cardiovascular diseases in humans as well.

GRANTS

This work was supported by National Institutes of Health (NIH) Grants HL-077256 and P01-AG-11370 and grants from the American Diabetes Association (to Z. Ungvari), the American Federation for Aging Research (to A. Csizsar), and the Intramural Research Program of the NIH (to R. de Cabo).

DISCLOSURES

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

REFERENCES

- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337–342, 2006.
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5: 493–506, 2006.
- Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 993–1000, 2005.
- Chow SE, Hshu YC, Wang JS, Chen JK. Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol* 102: 1520–1527, 2007.
- Csizar A, Ahmad M, Smith KE, Labinskyy N, Gao Q, Kaley G, Edwards JG, Wolin MS, Ungvari Z. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *Am J Pathol* 168: 629–638, 2006.
- Csizar A, Labinskyy N, Jimenez R, Pinto JT, Ballabh P, Losonczy G, Pearson KJ, de Cabo R, Ungvari Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mech Ageing Dev* 130: 518–527, 2009.
- Csizar A, Labinskyy N, Perez V, Recchia FA, Podlitsky A, Mukhopadhyay P, Losonczy G, Pacher P, Austad SN, Bartke A, Ungvari Z. Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1882–H1894, 2008.
- Csizar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, Pearson K, de Cabo R, Pacher P, Zhang C, Ungvari Z. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H13–H20, 2009.
- Csizar A, Labinskyy N, Podlitsky A, Kaminski PM, Wolin MS, Zhang C, Mukhopadhyay P, Pacher P, Hu F, de Cabo R, Ballabh P, Ungvari Z. Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2721–H2735, 2008.
- Csizar A, Labinskyy N, Smith K, Rivera A, Orosz Z, Ungvari Z. Vasculoprotective effects of anti-TNF- α treatment in aging. *Am J Pathol* 170: 388–398, 2007.
- Csizar A, Labinskyy N, Zhao X, Hu F, Serpillon S, Huang Z, Ballabh P, Levy RJ, Hintze TH, Wolin MS, Austad SN, Podlitsky A, Ungvari Z. Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity. *Ageing Cell* 6: 783–797, 2007.
- Csizar A, Smith K, Labinskyy N, Orosz Z, Rivera A, Ungvari Z. Resveratrol attenuates TNF- α -induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1694–H1699, 2006.
- Csizar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor- κ B activation by tumor necrosis factor- α , H₂O₂, and high intravascular pressure. *Circulation* 111: 2364–2372, 2005.
- Csizar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 90: 1159–1166, 2002.
- Csizar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, Kaley G. Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging. *Physiol Genomics* 17: 21–30, 2004.
- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99: 779–785, 1999.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191–196, 2003.
- Hsieh TC, Lu X, Wang Z, Wu JM. Induction of quinone reductase NQO1 by resveratrol in human K562 cells involves the antioxidant response element ARE and is accompanied by nuclear translocation of transcription factor Nrf2. *Med Chem* 2: 275–285, 2006.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedeljkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 124: 903–915, 1986.
- Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor α -Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 22: 2185–2197, 2008.
- Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L478–L488, 2008.
- Labinskyy N, Mukhopadhyay P, Toth J, Szalai G, Veres M, Losonczy G, Pinto JT, Pacher P, Ballabh P, Podlitsky A, Austad SN, Csizar A, Ungvari Z. Longevity is associated with increased vascular resistance to high glucose-induced oxidative stress and inflammatory gene expression in *Peromyscus leucopus*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H946–H956, 2009.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127: 1109–1122, 2006.
- Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res* 53: 6–15, 2006.

25. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Haskó G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc* 2: 2295–2301, 2007.
26. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G, Pacher P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 203–208, 2007.
27. Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc* 67: 42–47, 2008.
28. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrunk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 285: 8340–8351, 2010.
29. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csizsar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8: 157–168, 2008.
30. Pearson KJ, Lewis KN, Price NL, Chang JW, Perez E, Cascajo MV, Tamashiro KL, Poosala S, Csizsar A, Ungvari Z, Kensler TW, Yamamoto M, Egan JM, Longo DL, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. Nrf2 mediates cancer protection but not longevity induced by caloric restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2325–2330, 2008.
31. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Hasko G, Liaudet L, Drel VR, Obrosova IG, Pacher P. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H610–H619, 2007.
32. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol* 591: 66–72, 2008.
33. Smith JJ, Kenney RD, Gagne DJ, Frushour BP, Ladd W, Galonek HL, Israelian K, Song J, Razvadauskaite G, Lynch AV, Carney DP, Johnson RJ, Lavu S, Iffland A, Elliott PJ, Lambert PD, Elliston KO, Jirousek MR, Milne JC, Boss O. Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by caloric restriction in vivo. *BMC Syst Biol* 3: 31, 2009.
34. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, Forstermann U, Li H. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol* 60, Suppl 4: 111–116, 2009.
35. Su HC, Hung LM, Chen JK. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1339–E1346, 2006.
36. Ungvari Z, Csizsar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, Koller A. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor- α , NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 418–424, 2003.
37. Ungvari Z, Csizsar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol* 165: 219–226, 2004.
38. Ungvari Z, Koller A. Endothelin and PGH₂/TXA₂ enhances myogenic constriction in hypertension by increasing Ca²⁺ sensitivity of arteriolar smooth muscle. *Hypertension* 36: 856–861, 2000.
39. Ungvari Z, Labinskyy N, Mukhopadhyay P, Pinto JT, Bagi Z, Ballabh P, Zhang C, Pacher P, Csizsar A. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1876–H1881, 2009.
40. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, Podlutzky A, Csizsar A. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2417–H2424, 2007.
41. Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1899–1904, 1999.
42. Ungvari Z, Labinskyy N, Gupte S, Chander PN, Edwards JG, Csizsar A. Dysregulation of mitochondrial biogenesis in vascular endothelial and smooth muscle cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2121–H2128, 2008.
43. Ungvari Z, Labinskyy N, Mukhopadhyay P, Pinto JT, Bagi Z, Ballabh P, Zhang C, Pacher P, Csizsar A. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1876–H1881, 2009.
44. Ungvari Z, Orosz Z, Labinskyy N, Rivera A, Xiangmin Z, Smith K, Csizsar A. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H37–H47, 2007.
45. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Forstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 1652–1658, 2002.
46. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430: 686–689, 2004.
47. Zhang H, Zhang C. Regulation of microvascular function by adipose tissue in obesity and type 2 diabetes: evidence of an adipose-vascular loop. *Am J Biomed Sci* 1: 133–142, 2009.
48. Zhang H, Zhang J, Ungvari Z, Zhang C. Resveratrol improves endothelial function: role of TNF α and vascular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1164–1171, 2009.
49. Zhu J, Yong W, Wu X, Yu Y, Lv J, Liu C, Mao X, Zhu Y, Xu K, Han X, Liu C. Anti-inflammatory effect of resveratrol on TNF- α -induced MCP-1 expression in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 471–477, 2008.

RESEARCH PAPER

Increased availability of angiotensin AT₁ receptors leads to sustained arterial constriction to angiotensin II in diabetes – role for Rho-kinase activation

Zsolt Bagi¹, Attila Feher^{1,2}, James Cassuto¹, Komala Akula¹,
Nazar Labinskyy¹, Gabor Kaley¹ and Akos Koller^{1,3}

¹Department of Physiology, New York Medical College, Valhalla, NY, USA, ²Division of Clinical Physiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, and ³Department of Pathophysiology and Gerontology, University of Pécs, Pécs, Hungary

Correspondence

Zsolt Bagi, Department of Pharmacology, University of Oxford, Oxford OX1 3QT, UK.
E-mail:
zsolt.bagi@pharm.ox.ac.uk

Keywords

diabetes mellitus; hyperglycaemia; arteriolar constriction; AT₁ receptor; Rho-kinase

Received

14 May 2010

Revised

22 December 2010

Accepted

27 January 2011

BACKGROUND AND PURPOSE

Antagonists of angiotensin AT₁ receptors elicit beneficial vascular effects in diabetes mellitus. We hypothesized that diabetes induces sustained availability of AT₁ receptors, causing enhanced arterial constriction to angiotensin II.

EXPERIMENTAL APPROACH

To assess functional availability of AT₁ receptors, constrictions to successive applications of angiotensin II were measured in isolated skeletal muscle resistance arteries (~150 µm) of Zucker diabetic fatty (ZDF) rats and of their controls (+/Fa), exposed acutely to high glucose concentrations (HG, 25 mM, 1 h). AT₁ receptors on cell membrane surface were measured by immunofluorescence.

KEY RESULTS

Angiotensin II-induced constrictions to first applications were greater in arteries of ZDF rats (maximum: 82 ± 3% original diameter) than in those from +/Fa rats (61 ± 5%). Constrictions to repeated angiotensin II administration were decreased in +/Fa arteries (20 ± 6%), but were maintained in ZDF arteries (67 ± 4%) and in +/Fa arteries vessels exposed to HG (65 ± 6%). In ZDF arteries and in HG-exposed +/Fa arteries, Rho-kinase activities were enhanced. The Rho-kinase inhibitor, Y27632 inhibited sustained constrictions to angiotensin II in ZDF arteries and in +/Fa arteries exposed to HG. Levels of surface AT₁ receptors on cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs) were decreased by angiotensin II but were maintained in VSMCs exposed to HG. In VSMCs exposed to HG and treated with Y27632, angiotensin II decreased surface AT₁ receptors.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

In diabetes, elevated glucose concentrations activate Rho-kinase which inhibits internalization or facilitates recycling of AT₁ receptors, leading to increased functional availability of AT₁ receptors and sustained angiotensin II-induced arterial constriction.

Abbreviations

HG, high glucose concentration; HMG CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; PKC, protein kinase C; RAS, renin–angiotensin system; VSMCs, vascular smooth muscle cells; ZDF, Zucker diabetic fatty

Introduction

The systemic and vascular renin–angiotensin systems (RAS) play important roles in regulating vasomotor tone and arte-

rial blood pressure. Several earlier clinical studies demonstrated the effectiveness of antagonists of angiotensin AT₁ receptors (receptor nomenclature follows Alexander *et al.*, 2009) in the treatment and/or prevention of vascular

complications related to diabetes mellitus (Mathur *et al.*, 2007). Enhanced AT₁ receptor signalling elicits increased vasomotor tone and peripheral vascular resistance and, in chronic conditions, it could contribute to diabetes-related vascular remodelling, pathological alterations and cardiovascular morbidity. Thus, it is possible that diabetes alters the function of AT₁ receptors in the vessel wall, although the exact mechanisms are not entirely understood.

In this context, an augmented angiotensin II-induced vascular contractility has been reported in arteries of animals with type 1 and type 2 experimental diabetes. For example, in streptozotocin-induced diabetic rats an increased contraction of the thoracic aorta to angiotensin II has been demonstrated by Arun *et al.* (2005). Similarly, others have found an enhanced angiotensin II-induced contraction in the aorta of obese Zucker rats (Nishimatsu *et al.*, 2005; Siddiqui and Hussain, 2007) and also in db/db mice, known experimental models of type 2 diabetes (Guo *et al.*, 2005). It has been proposed that alterations in downstream cell signalling mechanisms, such as increased calcium sensitivity of vascular smooth muscle cells (VSMCs), may be responsible for the enhanced vascular contraction to angiotensin II (Nishimatsu *et al.*, 2005). Other studies demonstrated that augmented release of constrictor prostanoids (Guo *et al.*, 2005) and/or an excess production of reactive oxygen species in VSMCs (Viswanad *et al.*, 2006) play a key role in the augmented, angiotensin II-induced contractility. Mechanism(s) by which diabetes alters the function of AT₁ receptors have received less attention and remained unclear.

It has been suggested that the augmented angiotensin II-mediated vascular responsiveness is due to increased expression of AT₁ receptors in the aorta of diabetic rats (Siddiqui and Hussain, 2007). However, a study by Nishimatsu *et al.* has found no significant changes in AT₁ receptor expression in the aorta of diabetic rats, although an enhanced angiotensin II-induced vascular contractility was still detected (Nishimatsu *et al.*, 2005). To solve this discrepancy, in this study we have raised the hypothesis that, without changes in its expression level, an increased availability of AT₁ receptors on the cell surface plays the major role in the enhanced angiotensin II-induced vasoconstriction in diabetes. It is known that upon stimulation by angiotensin II, AT₁ receptors are rapidly desensitized and then internalized, becoming unavailable for further stimulation (Hunyady *et al.*, 2000). This negative-feedback regulation of AT₁ receptor availability is an important physiological mechanism to prevent prolonged effects of angiotensin II. This mechanism can be followed on the functional level. On first application, angiotensin II, via the AT₁ receptors, elicits pronounced vasoconstriction, which however is markedly diminished upon repeated application. This phenomenon is known as tachyphylaxis to angiotensin II (Juul *et al.*, 1987; Vicaut *et al.*, 1989). This normal vasoregulatory mechanism could be altered in pathological conditions, such as diabetes. Our recent study demonstrated that even a short-term (30 min) exposure of arteries to hydrogen peroxide, elicited sustained angiotensin II-induced arterial constriction, without changing AT₁ receptor expression and also without affecting downstream contractile signalling, such as calcium sensitization (Bagi *et al.*, 2008). Because we have previously demonstrated that diabetes (Bagi and Koller, 2003; Bagi *et al.*, 2003; 2004a)

and acute elevation in glucose concentration (Bagi *et al.*, 2004b) are both accompanied by enhanced vascular production of reactive oxygen species, we have proposed that high glucose concentration alters the functional availability of the AT₁ receptors and reduces angiotensin II tachyphylaxis in diabetes.

Furthermore, it has been suggested that activation of Rho-kinase is involved in the augmented agonist-induced vasoconstriction in obese Zucker rats (Naik *et al.*, 2006). It is known that various Rho family members are involved in the regulation of intracellular vesicle trafficking (Schmalzing *et al.*, 1995; Symons and Rusk, 2003). Because Rho-kinase has found to be directly activated by high glucose concentrations (Naik *et al.*, 2006), we have also raised the possibility that Rho-kinase signalling plays an important role in the altered regulation of AT₁ receptor function.

However, the potential impact of Rho-kinase on trafficking of AT₁ receptors has not yet been demonstrated. Elucidating the underlying mechanism(s) that are responsible for augmented angiotensin II-induced vasoconstriction and also leads to enhanced surface availability of AT₁ receptors is important, because these alterations could contribute not only to the enhanced vasomotor tone but other, angiotensin II-mediated pathological abnormalities in the vasculature in diabetes mellitus.

Methods

Isolation of skeletal muscle arteries and experimental protocols

All animal care and experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at New York Medical College, Valhalla. We used 12-week-old hyperglycaemic Zucker diabetic fatty (ZDF) and normoglycaemic control +/Fa rats ($n = 15$ of each strain). The ZDF rats exhibit homozygous mutation in the leptin receptor gene and develop hyperlipidaemia, hyperglycaemia and diabetes by 12 weeks, while their heterozygous controls, the +/Fa rats show normal phenotype. Rats were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg·kg⁻¹, i.p.). Under anaesthesia, the gracilis muscles were excised and placed in ice-cold, oxygenated Krebs solution. Animals were killed with additional pentobarbital sodium (150 mg·kg⁻¹, i.p.). With the use of microsurgical instruments and an operating microscope, the third-order branches of femoral artery (~1.5 mm in length and ~150 µm in internal diameter) of rats were isolated and cannulated, as described previously (Huang *et al.*, 1993; Koller and Huang, 1994; 1999; Huang and Koller, 1997). The cannulated small arteries were connected with silicone tubing (filled with normal Krebs solution) to a pressure servo control system (Living Systems Instrumentation, VT, USA) in order to set intraluminal pressure to 80 mmHg, at zero intraluminal flow rate. The whole preparation was continuously superfused with Krebs solution with a flow rate of 10 mL·min⁻¹ and the temperature was maintained at 37°C by a circulating bath temperature controller (Cole Parmer, USA). The internal diameter at the midpoint of the isolated arteries was continuously measured with videomicroscopy.

In the first series of experiments cumulative concentrations of angiotensin II (10 pM–10 nM; Sigma) and

noradrenaline (1–100 nM; Sigma) were administered to the superfusion solution (final concentrations are reported) and changes in diameter of arteries from control, +/Fa and ZDF rats were continuously measured. Thirty minutes after washout, agonist-induced responses were repeated (second applications). In selected protocols, after the second application, angiotensin II was applied again in a similar fashion (third application) to reveal if further applications cause changes in the vasomotor responsiveness.

In separate protocols, repeated agonist (angiotensin II and noradrenaline)-induced responses were also obtained in vessels from +/Fa rats, which were exposed to high glucose concentration (25 mM glucose in the superfusion solution for 1 h) and vessels were kept in this high glucose condition during the repeated administration of agonists. To reveal whether the effect of high glucose on angiotensin II-induced responses were reversible we performed additional protocols, in which after the 1 h high glucose exposure, superfusion solution was changed back to normal, 5.5 mM glucose containing physiological salt solution for an additional 1 h and repeated angiotensin II-induced vascular responses were obtained.

In other sets of experiments, repeated agonist-induced vasomotor responses were obtained in the presence of Y27632 (1 μ M, for 30 min; Sigma), a known inhibitor of Rho-kinase (Naik *et al.*, 2006) both in vessels of ZDF and in those from normal rats, exposed to high glucose.

Rho-kinase activation assay

Assay of Rho-kinase was performed as described previously (Galaria *et al.*, 2004; Lee and Ragolia, 2006) using the Cyclex Rho-kinase activity assay as instructed by the manufacturer (Cyclex Co. Ltd). Briefly, first branches of the femoral artery were homogenized in ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 mM NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40 and 1 mM EDTA) enriched with 1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 1 μ g·mL⁻¹ leupeptin, 1 μ g·mL⁻¹ aprotinin, 1 μ g·mL⁻¹ pepstatin and 1 mM Na₃VO₄. Protein concentration was determined (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA). Rho-kinase activity was measured based on the phosphorylation of threonine-695 of MYPT1 with tissue lysates. Equal amounts of arterial lysates were incubated with each substrate precoated on 96-well plates. Phosphospecific antibody labelled with horseradish peroxidase was then incubated for 1 h before the addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate. The developed colour was quantified by spectrophotometry and represented the relative amount of Rho-kinase activity in the sample. The Rho-kinase inhibitor, Y27632 (10 μ M) was used to inhibit Rho-kinase activity in each experiment.

Assessment of cell surface AT₁ receptors in cultured VSMCs

The VSMCs (SV40LT-transfected cells, purchased from American Cell Type Culture Collection) were cultured under condition indicated by the provider. After passage 4, cells were cultured in six-well plates in normal (5 mM) or high glucose (25 mM) containing media for an additional 24 h. Cells were exposed to angiotensin II (100 nM) for 10 min, washed in ice-cold phosphate buffer solution and fixed with 5% form-

aldehyde. Surface AT₁ receptors were labelled with an anti-AT₁ receptor antibody that binds only to the extracellular region of the receptor (1:100, BML-SA608, Biomol, USA). Immunofluorescent detection was performed with Alexa488-labelled secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For non-specific binding, the primary antibody was omitted. Fluorescence was directly measured with an electron multiplying charge-coupled device camera (Luca^{EM}-S, Andor, UK) connected to an Olympus BX61 microscope. Y27632 (10 μ M) was used to inhibit Rho-kinase activity in VSMC cultures.

Data analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM. Agonist-induced constrictions were expressed as percent changes of the initial arterial diameter at 80 mmHg pressure. Myogenic tone of arteries was calculated from the active diameter (in Ca²⁺-containing Krebs solution), expressed as percent of the corresponding passive diameter (in Ca²⁺-free Krebs solution). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 Software (San Diego, CA, USA) by repeated measures ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Repeated administration of angiotensin II to assess the functional availability of AT₁ receptors in isolated arteries

In this study, we first demonstrated that sequential administration of cumulative concentrations of angiotensin II (two applications 30 min apart) resulted in reduced constrictions of arteries in the +/Fa rats (Figure 1), whereas constrictions to two successive applications of noradrenaline showed no tachyphylaxis (Table 1). There was no further reduction to the third application of angiotensin II (maximum constrictions to first, second and third applications of angiotensin II were: 59 $\pm$ 4%, 23 $\pm$ 5% and 27 $\pm$ 5% respectively). Removal of endothelium did not significantly affect the repeated vasoconstrictions to angiotensin II or noradrenaline (data not shown).

Augmented and sustained angiotensin II-induced arterial constrictions in diabetes

In this study, we have used a known experimental model of diabetes, the ZDF rats, which have hyperglycaemia. In non-fasted 12-week-old ZDF rats, there was a fourfold increase in glucose levels compared with normoglycaemic, control, non-fasted +/Fa rats (32.4 $\pm$ 3.1 mM vs. 7.6 $\pm$ 1.1 mM respectively). In isolated skeletal muscle arteries from ZDF rats, a spontaneous tone developed in response to 80 mmHg intraluminal pressure. The magnitude of pressure-induced myogenic tone was significantly greater in ZDF arteries (at 80 mmHg: 42 $\pm$ 2% of passive diameter), compared with control, +/Fa arteries (31 $\pm$ 6%).

In arteries from ZDF rats, constrictions to the first application of cumulative concentrations of angiotensin II were greater than those in arteries of control +/Fa rats (Figure 1). Moreover, compared with the arteries of +/Fa rats, angiotensin II-induced constrictions in ZDF arteries were maintained on the second application of angiotensin II (Figure 1).

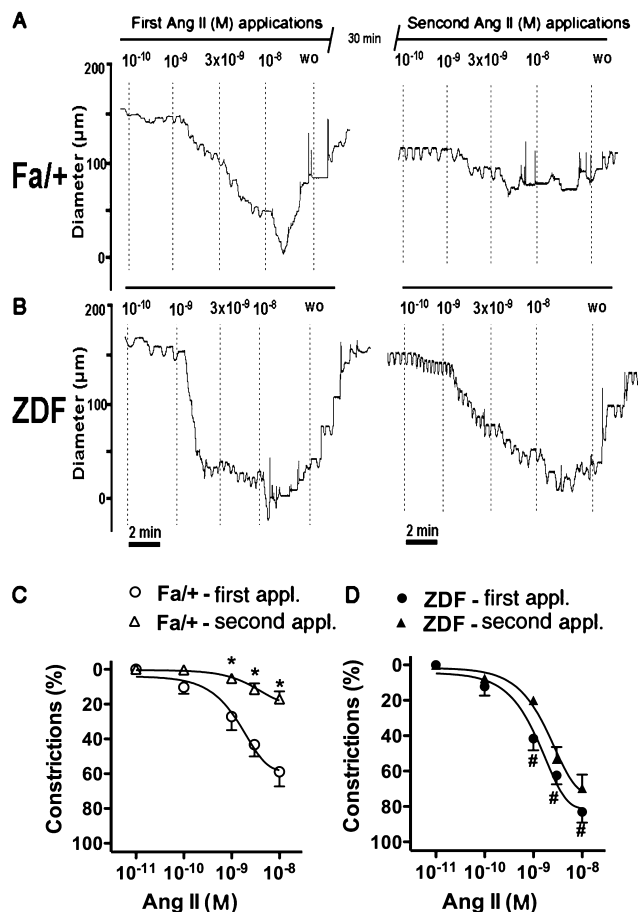


Figure 1

Original records (A,B) and summary data (C,D) of constrictions (%) to repeated applications of angiotensin II (Ang II; 10 pM–10 nM, $n = 9$) in skeletal muscle arteries from control heterozygous (+/Fa, $n = 7$) or Zucker diabetic fatty (ZDF, $n = 7$) rats. Data are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, significantly different from first application. # indicate differences from control (+/Fa).

Arterial constrictions to noradrenaline were not significantly increased in arteries from ZDF rats nor was there any tachyphylaxis (Table 1).

Effects of high glucose concentration on angiotensin II-induced arterial constrictions

To test the hypothesis that, in diabetes the high concentration of plasma glucose is the underlying cause, leading to the augmentation of vascular constrictions to angiotensin II, arteries from normal +/Fa rats were exposed to high glucose concentration (25 mM for 1 h). After this incubation and in the presence of high glucose solutions, arterial constrictions to the first application of angiotensin II were augmented at the highest angiotensin II dose applied (Figure 2). Importantly, these constrictions were maintained in response to the second (Figure 2) and third applications of angiotensin II (maximum constriction: $67 \pm 6\%$, $n = 5$, not significantly different from that of first response), compared with arteries exposed to normal level of glucose. In contrast,

noradrenaline-induced constrictions were not significantly affected by high glucose concentrations (Table 1).

In additional protocols, we have also tested the reversibility of the effect of high glucose on the sustained angiotensin II response. To this end, after 1 h of exposure to high glucose, the arteries were returned to normal (5.5 mM) glucose solutions for another hour and then the effects of repeated doses of angiotensin II tested. Interestingly, even after this time at normal glucose concentrations, constrictions were still maintained to repeated applications of angiotensin II (maximum constrictions to first and second applications of angiotensin II: $65 \pm 7\%$ and $54 \pm 5\%$, respectively, $n = 4$, $P > 0.05$).

Role of Rho-kinase activation in the enhanced and sustained angiotensin II-induced vasoconstrictions in diabetes

First, the level of the Rho-kinase activation was assessed in homogenates of branches of femoral arteries of +/Fa and ZDF rats and in arteries from +/Fa rats, exposed *in vitro* to high glucose concentration (25 mM for 1 h) by Rho-kinase assay (Cyclex). Samples from ZDF rats and those from normal arteries treated with high glucose concentrations exhibited increased Rho-kinase activity (Figure 3), compared with samples from normal arteries in normal glucose solutions. Rho-kinase activity in arteries from ZDF rats and in those of high glucose exposed normal vessels was fully inhibited by the selective Rho-kinase inhibitor, Y27632 (10 μM) (Naik *et al.*, 2006; data not shown).

To assess a functional role for enhanced Rho-kinase in augmenting the vascular availability of AT₁ receptors, angiotensin II-induced constrictions were measured in the presence of Y27632. Incubation of arteries with Y27632 (1 μM) reduced the pressure-induced myogenic tone in both ZDF (to $28 \pm 4\%$) and +/Fa rats (to $16 \pm 5\%$), but these reduced levels of myogenic tone remained significantly different between the two groups.

In arteries of control, +/Fa rats, incubation with Y27632 did not affect angiotensin II-induced constrictions either to the first or second applications (Figure 4). In arteries from ZDF rats, angiotensin II-induced constrictions were, however, reduced in the presence of Y27632 (1 μM) on the first application and were almost completely lost to the second application of angiotensin II (Figure 4). Exposure to Y27632 did not affect constrictions to noradrenaline in arteries from ZDF rats (maximum constrictions: $57 \pm 13\%$) or from +/Fa rats ($65 \pm 10\%$) (Table 2) and the lack of tachyphylaxis was similarly unaffected by Y27632 (Table 2).

In arteries of control, +/Fa rats exposed to high glucose concentration (25 mM, for 1 h), incubation with Y27632 also prevented the augmentation in angiotensin II-induced constrictions to the first application (Figure 4). Importantly, in the presence of Y27632, angiotensin II-induced constrictions to the second application were markedly reduced in the presence of high glucose (Figure 4).

Sustained surface availability of AT₁ receptors in VSMCs exposed to high glucose

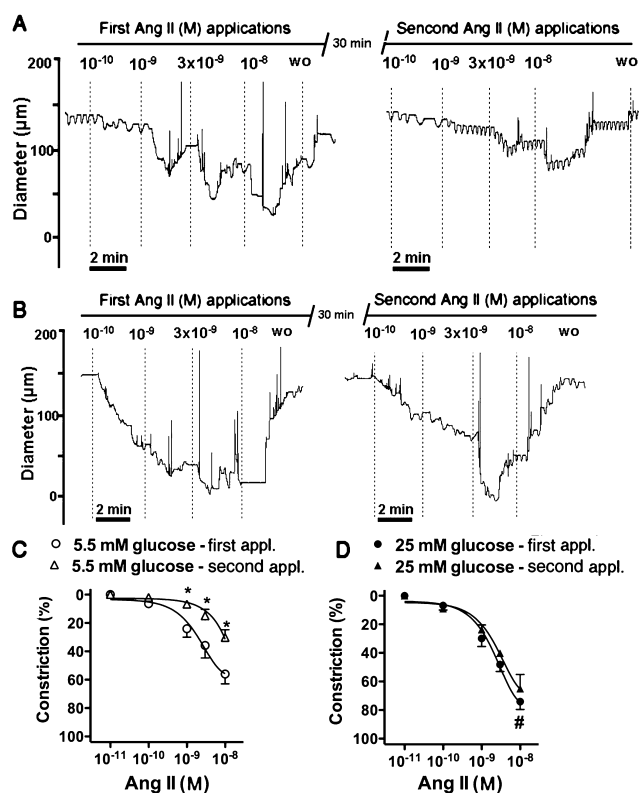
As we had found in this study that endothelium removal had no effect on angiotensin II-induced constrictions and on the magnitude of response upon repeated application, we inves-

Table 1

Constrictions (%) to repeated applications of NA (1–100 nM) in arteries of +/-Fa and ZDF rats and in arteries of +/-Fa rats exposed HG (25 mM)

	+/-Fa (n = 7)		ZDF (n = 7)		+/-Fa + HG (n = 7)	
	First appl.	Second appl.	First appl.	Second appl.	First appl.	Second appl.
NA (1 nM)	3 ± 2	3 ± 2	8 ± 4	7 ± 4	7 ± 2	4 ± 1
NA (10 nM)	25 ± 7	30 ± 6	38 ± 9	26 ± 8	32 ± 4	30 ± 3
NA (100 nM)	76 ± 7	81 ± 8	86 ± 10	74 ± 10	87 ± 2	76 ± 5

Noradrenaline-induced constrictions are expressed as percent changes of the initial diameter. Values are means ± SEM. HG, high glucose; NA, noradrenaline; ZDF, Zucker diabetic fatty.

**Figure 2**

Original records (A,B) and summary data (C,D) of constrictions (%) to repeated applications of angiotensin II (Ang II; 10 pM–10 nM, $n = 9$) in skeletal muscle arteries from control heterozygous (+/-Fa) rats in the presence of normal (5.5 mM, $n = 5$) or high glucose (25 mM, $n = 5$) concentration. Data are means ± SEM. * $P < 0.05$, significantly different from first application. # indicates difference from control (+/-Fa).

tigated the effect of high glucose concentrations on the AT₁ receptors on the cell surface of VSMCs, in culture. AT₁ receptors were assayed with a specific antibody recognizing one of the extracellular loops of these receptors (BML-SA608, Biomol), before and after application of angiotensin II (100 nM) and also in the absence or presence of the Rho-kinase inhibitor, Y27632 (10 µM). Under normal glucose conditions, AT₁ receptor immunofluorescence was significantly reduced by angiotensin II and this reduction was not affected

by Y27632 (Figure 5). Compared with controls, high glucose-treated VSMCs, however, exhibited a sustained AT₁ receptor immunofluorescence, which did not significantly decrease upon angiotensin II, but was reduced after pretreatment with Y27632 (Figure 5).

Discussion

The novel findings of the present study are that hyperglycaemia in diabetes or high glucose concentration *in vitro* leads not only to an enhanced but also a sustained arterial constriction to angiotensin II. These vasomotor changes are likely to be due to increased activation of vascular Rho-kinase elicited by high glucose, which results in a sustained vascular availability of AT₁ angiotensin II receptors. These conclusions are supported by our finding that constriction to repeated angiotensin II administration was decreased in isolated arteries of normoglycaemic control (+/-Fa) rats, but remained sustained in vessels of hyperglycaemic diabetic (ZDF) rats, and also in normal rat arteries exposed acutely to high glucose concentrations. Also the levels of AT₁ receptors on the cell surface of VSMCs assessed by immunofluorescence were decreased after application of angiotensin II to VSMC cultures, but these levels were maintained if cells were also exposed to high glucose concentration. Further, these vasoconstrictions to repeated angiotensin II applications in arteries from diabetic rats and normal arteries exposed to high glucose were no longer maintained after treatment with the Rho-kinase inhibitor, Y27632. Finally, treatment with Y27632 decreased the surface level of AT₁ receptors after angiotensin II administration to VSMCs exposed to high glucose concentrations.

Augmented vasoconstrictor action of angiotensin II may contribute to enhanced peripheral vascular resistance in various forms of hypertension (Cai and Harrison, 2000; Ungvari *et al.*, 2004; Mehta and Griendling, 2007). In addition, several studies have demonstrated that angiotensin II, via activation of AT₁ receptors elicits enhanced constriction of both conduit and resistance-sized arteries obtained from animals with experimental diabetes (Zhang *et al.*, 2005; Viswanad *et al.*, 2006; Siddiqui and Hussain, 2007). In this study, we have tested the hypothesis that the augmented angiotensin II-induced arterial constriction is primarily due to the increased and sustained functional availability of AT₁ receptors in arteries elicited by a high glucose environment. It

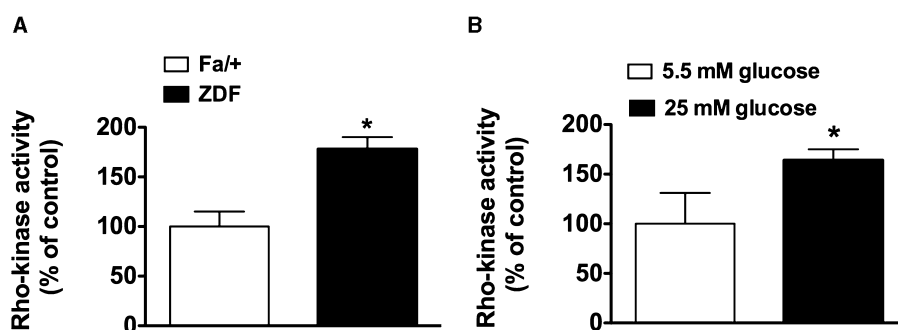


Figure 3

Rho-kinase activity in skeletal muscle arteries obtained from control heterozygous (+/Fa, $n = 4$) or Zucker diabetic fatty (ZDF, $n = 4$) rats, or in arteries obtained from +/Fa rats in the presence of normal (5.5 mM, $n = 4$) or high glucose (25 mM, $n = 4$) concentration. Data are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, significantly different from (A) Fa/+ or from (B) 5.5 mM glucose.

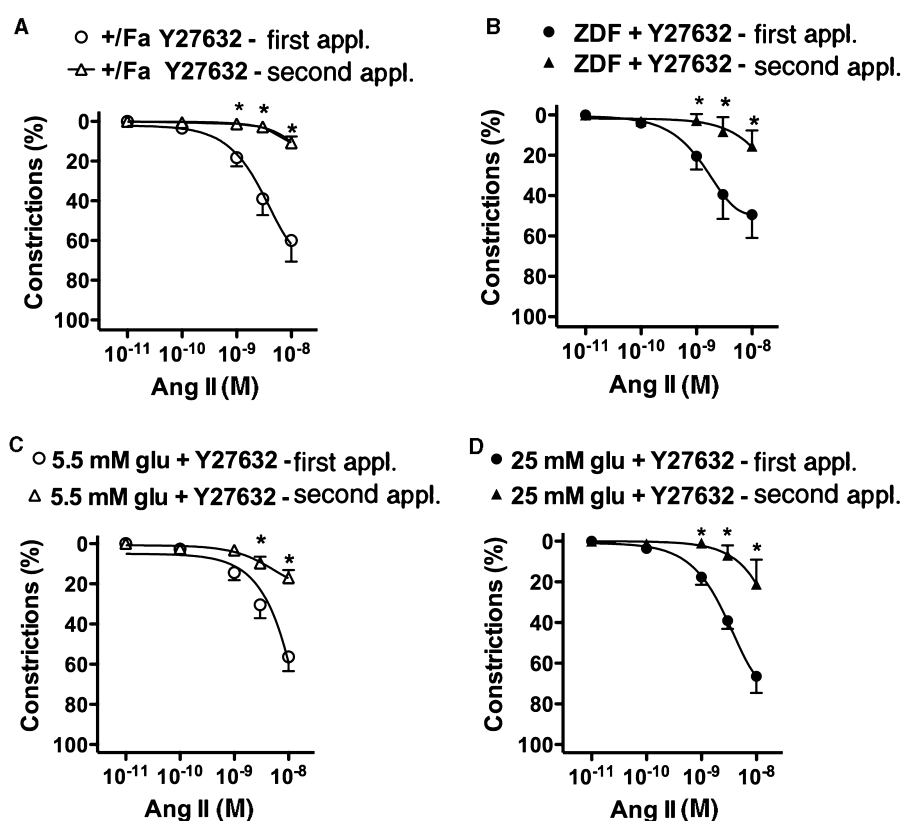


Figure 4

Summary data of constrictions (%) to repeated applications of angiotensin II (Ang II; 10 pM–10 nM, $n = 9$) in skeletal muscle arteries from +/Fa ($n = 5$) or Zucker diabetic fatty (ZDF, $n = 5$) rats (A,B) or arteries from +/Fa rats ($n = 5$) exposed to normal (5.5 mM glu) and high glucose (25 mM glu) concentration (C,D) in the presence of the Rho-kinase inhibitor, Y27632 (1 μ M). Data are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, significantly different from first application. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

is known that AT₁ receptors continuously cycle between the cell surface membrane and endoplasmic reticulum (Hunyady *et al.*, 2000). This process sets the number of active AT₁ receptors available for further stimulation and provides a (negative feedback) regulation of the availability of AT₁ receptors (Hunyady *et al.*, 2000). We hypothesized that the normal

regulation of AT₁ receptor trafficking is altered in diabetes leading to sustained availability of AT₁ receptors and thus sustained vasoconstrictions.

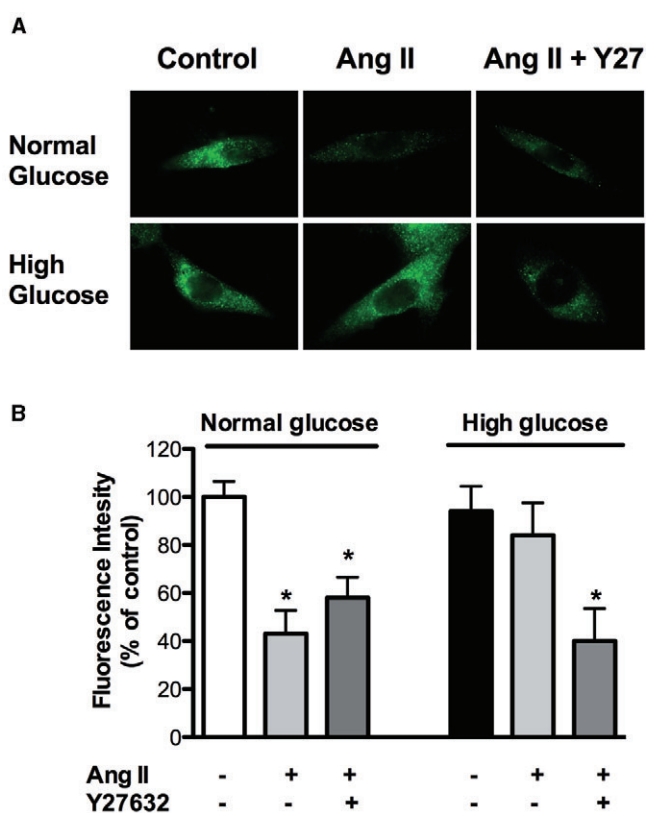
To assess the functionally available, 'active' AT₁ receptors in intact arteries we administered successive doses of angiotensin II. Under normal condition, repeated administration

Table 2

Constrictions (%) to repeated applications of NA (1–100 nM) in arteries of +/Fa and ZDF rats and in arteries of rats +/Fa exposed HG (25 mM) in the presence of Rho-kinase inhibitor, Y27632

	+/Fa (n = 7)		ZDF (n = 7)		+/Fa + HG (n = 7)	
	First appl.	Second appl.	First appl.	Second appl.	First appl.	Second appl.
NA (1 nM)	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 4	2 ± 3	3 ± 1	4 ± 1
NA (10 nM)	25 ± 3	41 ± 11	18 ± 3	24 ± 8	17 ± 1	20 ± 5
NA (100 nM)	65 ± 10	78 ± 8	57 ± 13	64 ± 7	62 ± 8	56 ± 10

Noradrenaline-induced constrictions are expressed as percent changes of the initial diameter. Values are means ± SEM. HG, high glucose; NA, noradrenaline; ZDF, Zucker diabetic fatty.

**Figure 5**

Detection of surface AT₁ receptors in vascular smooth muscle cells (VSMCs). Representative images (A) and summary data (B) show changes in extracellular AT₁ receptor immunofluorescence of VSMCs exposed to normal (5 mM) or high glucose (25 mM) concentrations, before and after stimulation with angiotensin II (Ang II; 100 nM, for 10 min) and in the absence and presence of Rho-kinase inhibitor, Y27632 (Y27; 10 µM). Images and data represent three separate experiments. Data are means ± SEM. **P* < 0.05, significantly different from control (100%).

of angiotensin II induces tachyphylaxis (Juul *et al.*, 1987; Vicaut *et al.*, 1989). This is due to the angiotensin II-induced desensitization and consequent internalization of AT₁ receptors (Thomas *et al.*, 1996; Hunyady *et al.*, 2000). Interestingly, our present study revealed that, in arteries of diabetic rats or

in normal arteries exposed to high glucose concentration (25 mM, a concentration similar to those seen in ZDF rats *in vivo*) angiotensin II-induced constrictions remained sustained upon repeated applications, that is, there was no tachyphylaxis. We have also found that the effect of chronic hyperglycaemia (in the ZDF rat) or acute high glucose exposure on sustained angiotensin II-induced arterial constriction were not reversible by normalizing the glucose concentrations *in vitro*, suggesting a long-lasting effect on angiotensin II tachyphylaxis. As there was no tachyphylaxis to noradrenaline in arteries of diabetic rats or in high glucose-exposed normal vessels, alterations in the downstream contractile function of VSMCs, such as increased calcium sensitivity, seem unlikely to play a role in the sustained response to angiotensin II. Even a short-term (1 h) exposure to high glucose concentration elicited greater and maintained angiotensin II-induced constrictions in normal arteries implying that changes in the expression of AT₁ receptors were also unlikely to be responsible for this phenomenon. We then hypothesized that, under normal glucose conditions, the tachyphylaxis to angiotensin II was due to the reduced number of functionally available AT₁ receptors on the surface of smooth muscle cells. On the other hand, the augmented and maintained constriction to angiotensin II in high glucose exposed arteries (*in vivo* or *in vitro*) would be probably due to the sustained surface availability of active AT₁ receptors on the smooth muscle cells. To test this hypothesis we have used a model system to detect the level of surface AT₁ receptors in VSMCs, in the presence of normal and high glucose conditions. Under normal glucose condition, surface AT₁ receptor immunofluorescence was significantly reduced by angiotensin II application, suggesting rapid internalization of AT₁ receptors. In contrast, high glucose-treated VSMCs exhibited a sustained AT₁ receptor immunofluorescence after angiotensin II stimulation, suggesting sustained surface presence of AT₁ receptors in high glucose environment. These experiments provided evidence of the effect of glucose concentrations on surface level of AT₁ receptors, although the mechanism(s) involved in the increased surface availability of vascular AT₁ receptors in diabetes has not been established.

It has been already demonstrated that activation of Rho-kinase is involved in the augmented α₁-adrenoceptor agonist-induced vasoconstriction in obese Zucker rats (Naik *et al.*, 2006). In addition, in a recent study Kizub *et al.* (2010) have found that Rho-kinase and protein kinase C (PKC) activation

play an important role in the augmented phenylephrine-induced arterial contraction in streptozotocin diabetic rats a model for type 1 diabetes. In the present study, the arterial constrictions to noradrenaline were not significantly increased in vessels from ZDF rats. However, comparable with the observations of Naik *et al.* and also Kizub *et al.* we have found that the contribution of Rho-kinase to the vasomotor response to a α_1 -adrenoceptor agonist was greater in the ZDF rat. In this study, we have also demonstrated that the pressure-induced myogenic tone is enhanced in arteries of ZDF rats. We found that the Rho-kinase inhibitor, Y27632 reduced myogenic tone in both in ZDF and Fa/+ rats; however, the difference in the magnitude of myogenic tone remained significant between the two groups. These findings suggested that Rho-kinase contributes to the development of myogenic tone of skeletal muscle resistance arteries, as previously shown in mesenteric arteries (Dubroca *et al.*, 2007). However, based on the present observations, it is likely that the enhanced myogenic tone in arteries of diabetic animals can be attributed to other mechanisms, such as increased production of constrictor prostanoids (Bagi *et al.*, 2005) and/or activation of PKC (Ungvari *et al.*, 1999).

Collectively, these data suggested that diabetes is associated with an increased activation of Rho-kinase pathway, although the potential impact of this pathway on AT₁ receptor function is entirely unknown. Small GTPases mediate the assembly of actin stress fibres (contractile actomyosin filaments) and regulate a wide range of fundamental biological functions, such as cell contraction and motility (Noma *et al.*, 2006). Various Rho family members are also involved in the regulation of intracellular vesicle trafficking in eukaryotic cells (Symons and Rusk, 2003). In particular, RhoA is reported to be an essential component of a constitutive, PKC-dependent, endocytotic pathway in *Xenopus* oocytes (Schmalzing *et al.*, 1995). These and our present functional findings suggest that the RhoA/Rho-kinase pathway was involved in the regulation of AT₁ receptor function. Because Rho-kinase has found to be directly activated by high glucose concentration (Naik *et al.*, 2006), a finding, which was confirmed in this study, we have formulated the novel hypothesis that Rho-kinase signalling is involved in the regulation of AT₁ receptor trafficking, thereby contributing to the sustained arteriolar constriction to angiotensin II in diabetes. To demonstrate the functional consequence of Rho-kinase activation in this process, angiotensin II-induced responses were measured after Rho-kinase inhibition. Under normal glucose conditions and in the presence of the Rho-kinase inhibitor, Y27632, angiotensin II elicited substantial constrictions to the first application, which became reduced only to the second application. This suggests only a minor contribution of Rho-kinase in mediating angiotensin II constrictions of skeletal muscle resistance arteries of the rat under normal conditions. Importantly, in arteries from diabetic rats and also in those exposed to high glucose concentration the Rho-kinase inhibitor diminished the sustained angiotensin II-induced constriction upon repeated applications. Correspondingly, the surface level of AT₁ receptors, as detected by immunofluorescence labelling, was reduced by Rho-kinase inhibition in VSMCs exposed to high glucose, after angiotensin II application, to level similar to those found in normal glucose conditions. These findings suggest that in arteries,

activation of Rho-kinase leads to sustained surface availability of AT₁ receptors and consequently augmented arterial constriction to angiotensin II in diabetes mellitus and also in acute hyperglycaemia.

Several mechanisms could be involved in the enhanced surface availability of vascular AT₁ receptors. It is known that the surface level of AT₁ receptors is regulated primarily by internalization and recycling, which are governed by complex subcellular mechanisms (Hein *et al.*, 1997; Hunyady *et al.*, 2000). AT₁ receptor internalization has been shown to involve both clathrin-dependent and -independent pathways (Hunyady *et al.*, 2000) and it requires initial phosphorylation of the AT₁ receptors by G-protein-coupled receptor kinases (Lefkowitz, 1998; Anborgh *et al.*, 2000). It is also known that receptor internalization directs the AT₁ receptors into the endosomes, where they are de-phosphorylated by protein phosphatases and recycled to the cell surface (Lefkowitz, 1998; Anborgh *et al.*, 2000). It is possible that high glucose environment may interfere with various mechanisms involved in either the internalization or the recycling of AT₁ receptors, including those mediated by Rho-kinase activation. Molecular evidence supporting the key role of Rho-kinase pathway affecting AT₁ receptor internalization and recycling needs to be obtained in future studies.

It seems well established that in human diabetes AT₁ receptor antagonists not only reduce systemic blood pressure, but also prevent the development of the functional and morphological alterations of arteries (Pahor *et al.*, 2000; Cooper, 2004). Our present findings provide experimental evidence and rationale for these clinical observations. Moreover, in recent studies, a possible role for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, statins, has been proposed to exert their vasculoprotective effects via interfering with the RhoA pathway in several cardiovascular diseases (Rikitake and Liao, 2005). Clinical studies claim that in diabetes, vascular complications can be effectively treated with statins, although the underlying mechanisms are incompletely understood (Garcia and Spellman, 2006). Thus, it seems plausible that in diabetes, statins interfere with the regulation of functional availability of AT₁ receptors, via inhibiting the RhoA/Rho-kinase pathway, a potential mechanism, which has not yet been addressed.

In conclusion, we propose that hyperglycaemia or high glucose environments lead to enhanced and sustained arterial constrictions to angiotensin II. These vasomotor changes are likely to be due to increased activation of vascular Rho-kinase elicited by high glucose, resulting in sustained functional availability of AT₁ receptors in the smooth muscle cells of arteries. These findings suggest a novel role for Rho-kinase, in augmenting the surface availability of vascular AT₁ receptors in diabetes. Thus, in diabetes, interfering with the vascular Rho-kinase signalling may prevent or delay the development of vasomotor dysfunction of resistance arteries, which is associated with augmented AT₁ receptor-mediated signalling.

Acknowledgements

The technical assistance of Marta Balogh in performing immunohistochemical experiments is gratefully acknowl-

edged. This study was supported by grants of K71591 from the Hungarian National Science Research Fund (OTKA), American Heart Association Founders Affiliate 0855910D and 0735540T, National Heart, Lung, and Blood Institute NHLB-43023 and R01HL104126, and British Heart Foundation Grant RE/08/004.

Conflict of interest

For all authors, no conflict of interest is declared.

References

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th edn. Br J Pharmacol 158 (Suppl. 1): S1–S254.
- Anborgh, PH, Seachrist, JL, Dale, LB, Ferguson, SS (2000). Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. Mol Endocrinol 14: 2040–2053.
- Arun, KH, Kaul, CL, Ramarao, P (2005). AT1 receptors and L-type calcium channels: functional coupling in supersensitivity to angiotensin II in diabetic rats. Cardiovasc Res 65: 374–386.
- Bagi, Z, Koller, A (2003). Lack of NO-mediation of flow-dependent arteriolar dilation in diabetes is restored by sepiapterin. J Vasc Res 40: 47–57.
- Bagi, Z, Koller, A, Kaley, G (2003). Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: H1404–H1410.
- Bagi, Z, Koller, A, Kaley, G (2004a). PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H742–H748.
- Bagi, Z, Toth, E, Koller, A, Kaley, G (2004b). 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: H626–H633.
- Bagi, Z, Erdei, N, Toth, A, Li, W, Hintze, TH, Koller, A *et al.* (2005). Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-derived constrictor prostaglandins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1610–1616.
- Bagi, Z, Erdei, N, Koller, A (2008). High intraluminal pressure via H2O2 upregulates arteriolar constrictions to angiotensin II by increasing the functional availability of AT1 receptors. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295: H835–H841.
- Cai, H, Harrison, DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res 87: 840–844.
- Cooper ME (2004). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. Am J Hypertens 17: 16S–20S; quiz A12–14.
- Dubroca C, Loyer X, Retailleau K, Loirand G, Pacaud P, Feron O *et al.* (2007). RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. Cardiovasc Res 73: 190–197.
- Galaria II, Fegley AJ, Nicholl SM, Roztocil E, Davies MG (2004). Differential regulation of ERK1/2 and p38(MAPK) by components of the Rho signaling pathway during sphingosine-1-phosphate-induced smooth muscle cell migration. J Surg Res 122: 173–179.
- Garcia PJ, Spellman CW (2006). Should all diabetic patients receive statins? Curr Atheroscler Rep 8: 13–18.
- Guo Z, Su W, Allen S, Pang H, Daugherty A, Smart E *et al.* (2005). COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice. Cardiovasc Res 67: 723–735.
- Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK (1997). Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. Mol Endocrinol 11: 1266–1277.
- Huang A, Koller A (1997). Endothelin and prostaglandin H2 enhance arteriolar myogenic tone in hypertension. Hypertension 30: 1210–1215.
- Huang A, Sun D, Koller A (1993). Endothelial dysfunction augments myogenic arteriolar constriction in hypertension. Hypertension 22: 913–921.
- Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gaborik Z (2000). Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. Regul Pept 91: 29–44.
- Juul B, Aalkjaer C, Mulvany MJ (1987). Responses of femoral resistance vessels to angiotensin in vitro. Eur J Pharmacol 135: 61–68.
- Kizub IV, Pavlova OO, Johnson CD, Soloviev AI, Zholos AV (2010). Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. Br J Pharmacol 159: 1724–1731.
- Koller A, Huang A (1994). Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. Circ Res 74: 416–421.
- Koller A, Huang A (1999). Development of nitric oxide and prostaglandin mediation of shear stress-induced arteriolar dilation with aging and hypertension. Hypertension 34: 1073–1079.
- Lee JH, Ragolia L (2006). AKT phosphorylation is essential for insulin-induced relaxation of rat vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 291: C1355–C1365.
- Lefkowitz RJ (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. J Biol Chem 273: 18677–18680.
- Mathur G, Noronha B, Rodrigues E, Davis G (2007). The role of angiotensin II type 1 receptor blockers in the prevention and management of diabetes mellitus. Diabetes Obes Metab 9: 617–629.
- Mehta PK, Griendling KK (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol 292: C82–C97.
- Naik JS, Xiang L, Hester RL (2006). Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290: R154–R161.
- Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Takeda R, Omata M, Fujita T *et al.* (2005). Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H1770–H1776.

- Noma K, Oyama N, Liao JK (2006). Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C661–C668.
- Pahor M, Psaty BM, Alderman MH, Applegate WB, Williamson JD, Furberg CD (2000). Therapeutic benefits of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23: 888–892.
- Rikitake Y, Liao JK (2005). Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 97: 1232–1235.
- Schmalzing G, Richter HP, Hansen A, Schwarz W, Just I, Aktories K (1995). Involvement of the GTP binding protein Rho in constitutive endocytosis in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol* 130: 1319–1332.
- Siddiqui AH, Hussain T (2007). Enhanced AT1 receptor-mediated vasocontractile response to angiotensin II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1722–H1727.
- Symons M, Rusk N (2003). Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol* 13: R409–R418.
- Thomas WG, Thekkumkara TJ, Baker KM (1996). Molecular mechanisms of angiotensin II (AT1A) receptor endocytosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 3: S74–S80.
- Ungvari Z, Pacher P, Kecskemeti V, Papp G, Szollar L, Koller A (1999). Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca²⁺ channels and protein kinase C. *Cardiovasc Res* 43: 1018–1028.
- Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A (2004). Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol* 165: 219–226.
- Vicaut E, Montalescot G, Hou X, Stucker O, Teisseire B (1989). Arteriolar vasoconstriction and tachyphylaxis with intraarterial angiotensin II. *Microvasc Res* 37: 28–41.
- Viswanad B, Srinivasan K, Kaul CL, Ramarao P (2006). Effect of tempol on altered angiotensin II and acetylcholine-mediated vascular responses in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance. *Pharmacol Res* 53: 209–215.
- Zhang C, Knudson JD, Setty S, Araiza A, Dincer UD, Kuo L *et al.* (2005). Coronary arteriolar vasoconstriction to angiotensin II is augmented in prediabetic metabolic syndrome via activation of AT1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2154–H2162.