

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A 2-es típusú diabetes és oxidatív stressz vaszkuláris
hatásai**

Rutkai Ibolya



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. Szívérrendszeri megbetegedések 2-es típusú diabetes mellitusban.....	7
2.3. A miogén tónus és a diabetes mellitus kapcsolata	12
2.4. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és a diabetes kapcsolata.....	13
2.5. Prostaglandin szintézis eltérései 2-es típusú diabetes mellitusban	14
2.6. Oxidatív stressz	18
2.7. Doxorubicin és PARP-2	20
3. METODIKÁK	23
3.1. Állatkísérletes modellek.....	23
3.1.1. A 2- DM genetikai állatmodellje.....	23
3.1.2. PARP-2 knock out egerek	23
3.2. Az artériás vérnyomás mérése.....	23
3.3. Izolált mikroértechnika	24
3.4. Izometrikus kontrakciómérés.....	25
3.5. A miogén tónus vizsgálata	26
3.6. Farmakológiai ágensek hatása a vázizom arteriolák átmérőjére	26
3.7. Kísérleti protokollok aortán	27
3.8. Western immunoblot	27
3.9. Statisztikai módszerek.....	28
3.9.1. Kanülált erek válaszainak értékelése.....	28
3.9.2. Izometriás rendszeren (ring) mért válaszok értékelése	28
4. EREDMÉNYEK.....	29
4.1. db/db egerek jellemzése	29
4.2. PARP-2 vaszkuláris biológiai szerepének jellemzése doxorubicin kezelt egerekben.....	33
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	40
7. IRODALOMJEGYZÉK	41
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	55
9. FÜGGELÉK.....	56

Rövidítések jegyzéke

2-DM - 2-es típusú diabetes mellitus

5-HT – szerotonin

ACE – angiotenzin-konvertáz enzim

Ach – acetilkolin

Ang I – angiotenzin I

Ang II – angiotenzin II

AT1R – angiotenzin II 1-es típusú receptora

AT2R – angiotenzin I 1-es típusú receptora

ATP – adenzin-trifoszfát

BH4 – tetrahidrobiopterin

cAMP – ciklikus-adenozin-monofoszfát

cGMP – ciklikus guanozin-monofoszfát

COX – ciklooxygenáz

DOX – doxorubicin

EDRF – endothelhez köthető relaxáló faktor

eNOS – endotheliális nitrogén-monoxid szintáz

EP receptor – prosztaglandin E2 receptor

FAD - flavin-adenin-dinukleotid

FMN - flavin-mononukleotid

H₂O₂ – hidrogén-peroxid

HDL – magas denzitású lipoprotein

iNOS – indukálható nitrogén-oxid-szintáz

IP receptor – prosztaglandin I2 receptor

KCl – kálium-klorid

L-NAME – L(G)-nitro-L-arginin-metil-észter

MAPK - mitogén aktiválta protein kináz

NAD⁺ - oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADPH – redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NASID – nem szteroid gyulladáscsökkentő

NE – norepinefrin

nNOS – neuronális nitrogén-oxid
NO – nitrogén-monoxid
NOS – nitrogén-monoxid szintáz
 O_2^- - szuperoxid-anion
pADP-ribóz – poli-adenin-dinukleotid-ribóz
PAR – poli-ADP-ribóz
PARP – poli-ADP-ribóz polimeráz
pCO₂ – szén-dioxid parciális nyomása
PGE₂ PGE₂ - prosztaglandin E₂
PGF_{2α} – prosztaglandin F_{2α}
PGG₂ – prosztaglandin-G₂
PGH₂ – prosztaglandin H₂
PGH₂ – prosztaglandin-H₂
PGI₂ – prosztaglandin-I₂
PKC – protein-kináz C
PLA₂ – foszfolipáz-A₂
pO₂ – oxigén parciális nyomása
ROS – reaktív oxigéngyökök
sGC - szolubilis guanilat-cikláz
SHR – spontán hipertenzív patkány
SNP – sodium-nitroprusside
TGFβ – transzformáló növekedési faktor β
TXA₂ – tromboxán A₂
TXB₂ – tromboxán B₂
XO – xantin-oxidáz

Tárgyszavak

Arteriola

Diabetes

Doxorubicin

EP receptor

Magas vérnyomás

PARP-2

PGE₂

Prosztanoidok

Vaszkuláris simaizom funkció

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Napjainkban a kardiovaszkuláris betegségek (magas vérnyomás, perifériás érbetegségek, iszkémiás szívbetegség) a leggyakrabban előforduló egészségügyi problémák és a halálokok között is vezető szerepet játszanak. Kialakulásuk hátterében a megváltozott szénhidrátanyagcserének (metabolikus szindróma, cukorbetegség) és az oxidatív stressznek is szerepe lehet.

Az érrendszeri betegségek kialakulásában a nagy erek szintjén létrejövő elváltozásoknak (pl. atherosclerosis) és a kórosan megváltozott mikrocirkulációnak (arteriola, venula, nyirokér) egyaránt fontos szerepe van. Cukorbetegségben a kis erek szintjén fellépő mikrokeringési zavarok (agyi, kardiális, alsó végtagi) hozzájárulnak az ezen betegségben szenvedők fokozott morbiditásához és mortalitásához. A 2-es típusú diabetes mellitusban (2-DM) nem kellően ismert a megváltozott mikroér működés patomechanizmusa, ezért nagyon fontos kutatási terület a szöveti keringést fenntartó/javító terápiás lehetőségek, valamint a 2-DM-hoz társult magas vérnyomás gyógyszeres kezelési elveinek kidolgozása.

Az utóbbi években derült fény a reaktív oxigén gyökök (ROS) *in vivo* jelentőségére. A sejtek egészséges működése során kis mennyiségben termelődnek reaktív oxigén gyökök, melyeknek fontos szerepe van a jelátviteli folyamatok szabályozásában. Kóros körülmények között, illetve citosztatikus terápia mellékhatásaként (pl. doxorubicin kezelés) a ROS fokozott mértékben termelődhetnek.

Míndezek alapján tudományos kutatásaimban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. A 2-es típusú diabetes mellitus állatkísérletes modelljében vizsgáljam a vázizomzatban található rezisztenciaerek működésében létrejövő elváltozásokat, különös tekintettel a megváltozott prosztaglandin szintézis mikrovaszkuláris és szisztémás hatásaira.
2. Feltárjam a poli-ADP-ribóz polimeráz-2 szerepét a reaktív oxigén szabadgyök termelést kiváltó doxorubicin kezelés vaszkuláris hatásaiban.

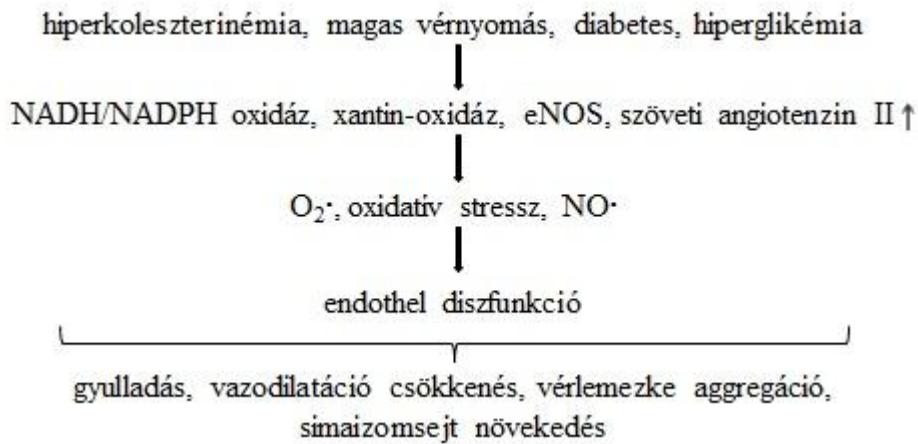
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Szívérrendszeri megbetegedések 2-es típusú diabetes mellitusban

A szöveti vérellátottságot számos lokális faktor, valamint a szöveti anyagcsere során keletkező melléktermék szabályozza, létrehozva ezzel az igényeknek megfelelő szöveti keringést, vérátáramlást.

A 2-es típusú diabetes mellitus különböző anyagcserezavarok összefoglaló neve, amit a megváltozott szénhidrát- és lipidanyagcserefolyamatok következtében kialakuló krónikus hiperglikémia jellemez. Az iszkémiás érbetegségek kialakulásának egyik fő rizikófaktorát képezik a lipidanyagcserében bekövetkező elváltozások, így például a hiperkoleszterinémia, a hipertrigliceridémia és a diszlipidémia, melyek atherosclerozishoz vezethetnek. Az atherosclerosis következtében kialakuló elváltozások megjelennek mind a nagy-, mind a kis erek szintjén (Yamamoto és mtsai. 1988; Sellke és mtsai. 1990), melynek hátterében az endothelium működés kóros megváltozását feltételezik (Freiman és mtsai. 1986; Cox és mtsai. 1989; Mugge és mtsai. 1991).

A kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában szerepet játszó diabetes egy olyan kórállapot, amelyet az emelkedett vércukorszint, károsodott glükóztolerancia, emelkedett triglicerid, valamint csökkent magas denzitású lipoprotein (HDL) szint és a társult magas vérnyomás jellemez (Alberti és mtsai. 2005). Számos klinikai tanulmányban igazolták, hogy a kardiovaszkuláris rizikó fokozódásában szerepe van a diabetes mellitusnak (Sowers és mtsai. 2001). Ezek szerint a DM önmagában is olyan mértékű kardiovaszkuláris rizikófokozódást jelent, mint a miokardiális infarktuson már korábban átesett betegek rizikófokozódása (Beckman és mtsai. 2002). 2-DM-ban a betegek nagy morbiditási és mortalitási rátája igen gyakran a kóros anyagcserefolyamatok miatt kialakuló kardiovaszkuláris szövődmények következménye (Kannel és McGee 1979; Fuller és mtsai. 1980; Stehouwer és mtsai. 1997; Alberti és Zimmet 1998). A DM-ban megfigyelhető vaszkuláris funkciózavar kialakulásában az endothelium funkcionális károsodásának jelentős szerepet tulajdonítanak (Fuller és mtsai. 1980) (1. ábra).



1. ábra Az endothel diszfunkció kialakulása és következményei

2.2. Endothel diszfunkció

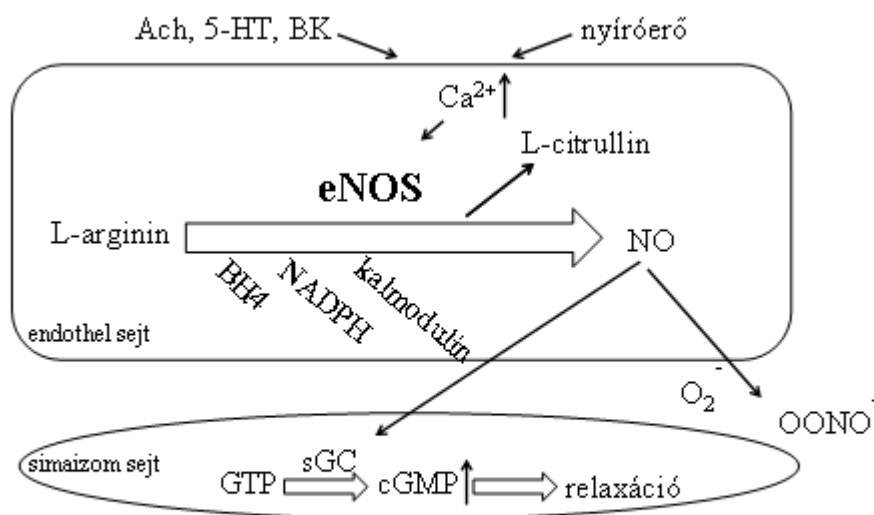
Az endothelium (a vér- és nyirokereket bélelő sejtréteg, egy endokrin-parakrin-autokrin szerv) központi szerepet játszik az érfalban, a vaszkuláris homeosztázis fenntartásában és kialakításában. Véralvadási folyamatokban sima felszíne miatt csökkenti a vérlemezke és leukocita adhéziót, így antitrombotikus hatású. Szerepe van az ion- és folyadékcsereben, hozzájárul az érfalban zajló lokális gyulladásos folyamatokhoz.

Mindemellett az endothel különböző ingerekre vazoaktív anyagokat szintetizál és szabadít fel, melyek az ér simaizom kontrakcióját és relaxációját szabályozzák, ezáltal befolyásolva az adott érterület vérellátását és a szöveti perfúziót. Elhelyezkedésének köszönhetően az endothelium van leginkább kitéve a keringés mechanikai ingereinek (például a transzmurális nyomás miatt kialakuló falfeszülés, illetve az áramlás okozta nyíróerő), melyekre az endothelium receptor-függő és független mechanizmusok révén válaszol (Hartge és mtsai. 2007). Ezen válaszok központi szerepet játszanak a rezisztenciaerek érátmérőjének szabályozásában, ezáltal a megfelelő szöveti keringés biztosításában. A lokális keingés szabályozásában fontos szerepe van a miogén tónusnak, különböző anyagcseretermékeknek (pCO₂, tejsav, pO₂, pH), érsérüléseknek, hőmérsékletváltozásnak, hormonoknak, a szimpatikus aktivitásnak és nem utolsó sorban az endothelsejtekben termelődő faktoroknak (NO, endotelinek, prosztaciklinek).

Az endotheliumról sokáig azt hitték, hogy egy passzív diffúziós barrier a vér és szövetek között, azonban az 1980-as években megállapították, hogy az egészséges endothelből acetilkolin hatására vazodilatátor anyag szabadul fel, melyet EDRF-nek (endothelium derived relaxing factor-nak) neveztek el (Furchgott és Zawadzki 1980). Endothelium hiányában az ér acetilkolin hatására vazodilatáció helyett vazokonstriktióval válaszolt. Később kiderült, hogy az endotheliumból felszabaduló vazodilatátor anyag a nitrogén-monoxid (Palmer és mtsai. 1987). Az endothelium által termelt vazodilatátorok közül a nitrogén-monoxid (NO) az egyik legfontosabb vegyület, melynek élettanát és biokémiáját az eltelt években részletesen feltárták. A NO egy szabadgyök, mely a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) által katalizált reakcióban L-argininből és oxigénből citrullin keletkezésén keresztül képződik és gyorsan lebomlik. Ép endothelium funkció esetén különböző humorális és mechanikai ingerek hatására (acetilkolin, hisztamin, trombin, fokozott áramlás miatt keletkező nyíróerő) fenntartott a NO termelés. A NO az artériák, a kapillárisok és a vénák területén is fontos szerepet játszik az érátmérő szabályozásában. Az NO-t termelő NOS-nak több izoformája található meg az emlős szervezetben (endotheliális (eNOS), neuronális (nNOS) és indukálható (iNOS)), melyek eltérő élettani szereppel rendelkeznek (Michel és Feron 1997). A NO bioszintézisének kofaktorai a redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) és a tetrahidrobiopterin (BH4) (Vasquez-Vivar és mtsai. 1998), továbbá a folyamatot katalizáló enzim nélkülözhetetlen alkotórésze a hem vas, a flavin-mononukleotid (FMN) (Cosentino és Luscher 1998) és a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) (Klatt és mtsai. 1992).

Az endotheliumból felszabaduló NO aktiválja az ér simaizomrétegében található szolubilis guanilat-cikláz (sGC), ami az intracelluláris ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) koncentráció növekedéséhez vezet, melyet az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és/vagy simaizom Ca^{2+} érzékenység csökkenés és végső soron simaizom relaxáció követ (Sausbier és mtsai. 2000; Perkins 2006) (2. ábra). A venulákban az acetilkolin alacsony dózisaira dilatáció, míg nagyobb koncentrációira kisebb mértékű dilatáció vagy kontrakció alakul ki. Munkacsoportunk korábbi adatai szerint 2-DM-ben a ciklooxygenáz (COX) enzim gátló indometacin vagy a TXA₂/PGH₂ receptor antagonistá SQ29548 jelenlétében a nagyobb acetilkolin koncentrációk hatására dilatáció helyett kontrakció alakul ki (Bagi és mtsai. 2005).

A lokális vérátáramlás szabályozásában szerepe van mind a miogén, mind a metabolikus mechanizmusoknak a neurális és humorális faktorokkal együtt (Koller 2002). *In vivo* körülmények között fontos szerepet játszik a vérnyomás mellett a vér áramlása is, melynek szerepét mikoerekben számos kutatócsoport tanulmányozta (Koller és Kaley 1989; Kuo és mtsai. 1991; Koller és mtsai. 1994; Koller és Kaley 1998). Az L-arginin analógok, melyek akadályozzák az L-arginin – NO átalakulást növelik a szisztémás vérnyomást. Az endothelsejtek fokozott vérátáramlás hatására bekövetkező nyíróerő fokozódásra ATP és bradikinin felszabadulással válaszolnak (2. ábra).

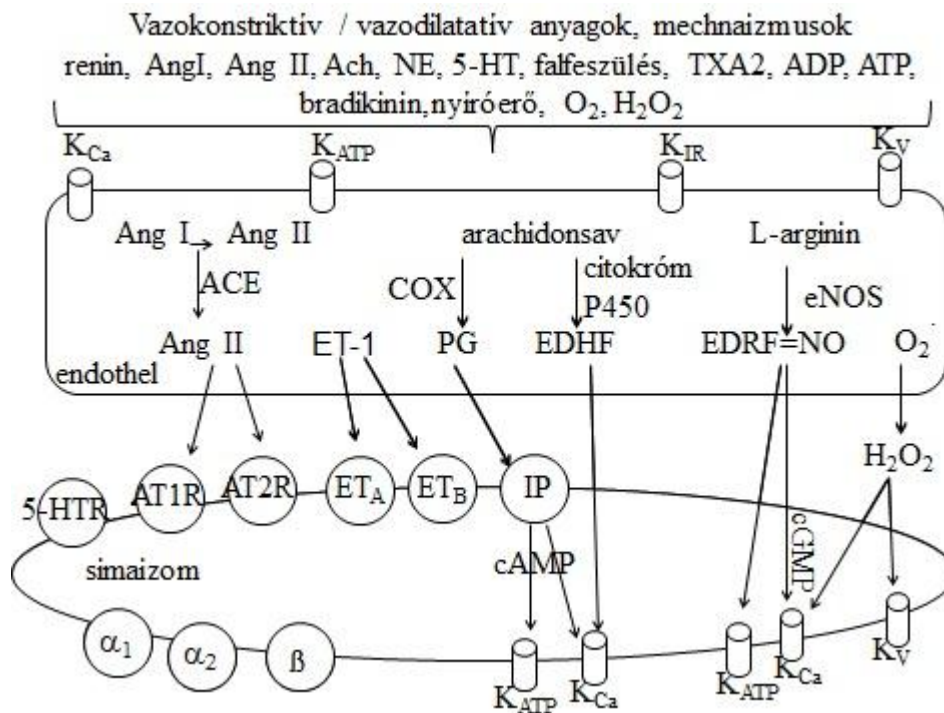


2. ábra Endotheliális NO képződés és simaizomra gyakorolt relaxáló hatás

Az ATP és bradikinin megjelenése az extracelluláris térben képes a NO szintézisét fokozni és így dilatációt kiváltani (Cosentino és Luscher 1998). A nyírófeszültség indukálta arteriola dilatáció mértéke csökken magas vérnyomásban, mint ahogyan a NO mediált dilatációs mechanizmus hatékonysága is, hozzájárulva ezzel a fokozott tónus és a megnövekedett nyírófeszültség kialakulásához. Feltehetőleg a NO termelés szükséges a fenntartott prosztaglandin szintézishez. Bizonyos körülmények között a konstriktor faktorok (PGH_2 , endotelin) keletkezésekor felszabaduló reaktív oxigén metabolitok,

mint például a szuperoxid anion befolyásolja az endothelfunkciót, ami összefüggésben van a dilatatív faktorok csökkent felszabadulásával (Vasquez-Vivar és mtsai. 1998). Ezzel összhangban a szuperoxid dizmutáz gyengíti a vázizomban a venulák acetilkolin kiváltott, PGH₂ közvetített konstriktiót (3. ábra).

A vaszkuláris endothelium a vazodilatátor természetű anyagok mellett vazokonstriktor anyagokat is termel, melyek közül az endotelin szerepe a legismertebb. Az endotelin egy 21 aminosavat tartalmazó peptid, három izoformája létezik (endotelin-1, 2 és 3), melyek különböző endotelin receptorokon fejtik ki hatásukat (D'Orleans-Juste és mtsai. 2002). Az angiotenzin II szintén endothel által termelt fontos vazokonstriktor anyag, mely angiotenzin I-ből főként az endothel felszínén lévő angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) hatására képződik (Re 2004). Az endotelin az angiotenzin II-höz hasonlóan simaizomsejteken található G-protein kapcsolt receptorok stimulálásával fejtik ki hatásukat: növeli az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt, a protein kináz C aktivációt, a simaizomsejt migrációt és a proliferációt vált ki (3. ábra) (Iglarz és Schiffrin 2003).



3. ábra Simaizom működést befolyásoló endotheliális útvonalak

A trombocitákban és az endotheliumban termelődő tromboxán A₂ (TXA₂) és prosztaglandin H₂ (PGH₂) az arachidonsav anyagcsere termékei, melyek a

simaizomsejteken megtalálható receptorok aktivációjával vazokonstriktiót váltanak ki (Bos és mtsai. 2004). Az endothelium által termelt vazoaktív faktorok kölcsönhatásaik miatt egy igen bonyolult, egymással párhuzamosan működő rendszert képeznek (3. ábra). Ezen összetett rendszer bármely elemének megváltozása esetén megbomlik az egyensúly, ami ez endothelium kóros működéséhez, endothel diszfunkcióhoz vezethet. Az érátmérőre gyakorolt hatások mellett az endotheliumból kiszabaduló faktorok a vér alakos elemeinek (vérelemezkek, monociták) működését is érintik és ennek következtében fokozott tromboziskészség, az érfali simaizomsejtek proliferációja és lokális gyulladás alakulhat ki (Hartge és mtsai. 2007; Jansson 2007). Ezen patológias elváltozások következményeként pedig gyakran tovább károsodik az endothelium működése.

2.3. A miogén tónus és a diabetes mellitus kapcsolata

A rezisztenciaerek állandó nyugalmi tónussal, vagy más néven miogén tónussal bírnak, ami lehetővé teszi az erek különböző stimulusokra (vazokonstriktív illetve vazodilatatív faktorokra, a transzmurális nyomás emelkedésére illetve csökkenésére) bekövetkező konstriktióját vagy dilatációját, ezáltal létrehozva az anyagcsereigényeknek megfelelő szöveti perfúziót. A mikroerek tónusának kialakításában egyidejűleg több tényező játszik szerepet: a szövetek metabolikus igénye, az idegrendszer, a keringő és lokálisan felszabaduló vazoaktív anyagok és a mechanikai stimulusok. A mikroerek szintjén kialakuló vaszkuláris ellenállás kialakításában a miogén válasz az egyik legfontosabb tényező (Sun és mtsai. 1994). DM-ban a miogén tónusban bekövetkező változásokról illetően viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Patkány cremaster arteriolák nyomás indukálta passzív és aktív érválaszainak károsodását mutatták ki DM-ban (Hill és Meininger 1993; Hill és Ege 1994). A simaizom Ca^{2+} érzékenységének változása hozzájárulhat a diabetes mellitusban tapasztalható fokozott miogén tónushoz illetve a fokozott agonista indukált vazokonstriktióhoz (White és Carrier 1988; Inazu és mtsai. 1991; Tam és mtsai. 1997).

2-DM-ban az endothelium és simaizom funkcionális károsodásának szerepet tulajdonítanak mind a makrovaszkuláris, mind a mikrovaszkuláris funkciózavar és érszövődmények kialakulásában (Stehouwer és mtsai. 1997; De Vriese és mtsai. 2000).

Diabetesez patkányok mesenterialis arterioláiban az acetilkolin hatására létrejövő dilatációs mechanizmusok beszűkülését (Palmer és mtsai. 1998) és a bradikin és az acetilkolin indukálta dilatáció csökkenését mutatták ki (Heygate és mtsai. 1995). Hasonló megfigyelést tettek inzulin rezisztens db/db egerek mesenterialis arterioláiban (Lagaud és mtsai. 2001).

Hasonlóan az állatkísérletes modellekhez humán vizsgálatokban is kimutatták 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegeken az arteria brachialis csökkent mértékű áramlásfüggő dilatációját (Clarkson és mtsai. 1996). Ugyanezen érterület csökkent endotheliumfüggő dilatációját írták le 2-DM-ban szenvedő betegeken (Makimattila és mtsai. 1999; Vehkavaara és mtsai. 1999).

2.4. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és a diabetes kapcsolata

A renin angiotenzin rendszer (RAS) koordinálja azt a hormonális kaskád út vonalat, mely fontos szerepet játszik mind a veseműködés, mind az érátmérő szabályozásában (Giacchetti és mtsai. 2005). A rendszer első eleme a renin, amely a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből szabadul fel. A kaskád következő lépésében a renin elhasítja a májban termelődő angiotenzinogént, amelynek során egy inaktív dekaeptid, az angiotenzin I (Ang I) képződik. Az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) által katalizált reakcióban jön létre AngI-ből az aktív angiotenzin II (Ang II) oktapeptid. Az Ang II-nek két receptorát jellemezték behatóan (AT1R és AT2R). Az AT1R közvetített folyamatok AngII általi szabályozása számos élettani folyamatban szerepet játszik, úgymint a vazokonstrikció, sejt differenciálódás, aldoszteronszekréció és a reninfelszabadulás (Giacchetti és mtsai. 2005). Az AT2R funkciója kevésbé feltárt, habár az általánosan elfogadott, hogy AngII stimulációjának következtében az AT1R-ral ellentétes hatást fejt ki (Siragy és Carey 1997; Tsutsumi és mtsai. 1999). Ilyen hatás az AT2R mediálta vazodilatáció coronária és mesenterialis ereken (Widdop és mtsai. 2002; Batenburg és mtsai. 2004), mely bradikinin és NO felszabadulással jár. Az Ang II metabolikus termékei közül az angiotenzin 1-7 (Ang1-7) NO és prosztaglandin felszabadulást, vazodilatációt, nátriuresit és a celluláris proliferáció gátlását okozza, azonban az angiotenzin III (Ang III vagy des-aspartyl-Ang II) hatásai megegyeznek az Ang II AT1R mediálta válaszokkal (Chappell és mtsai. 1998; Santos és mtsai. 2003).

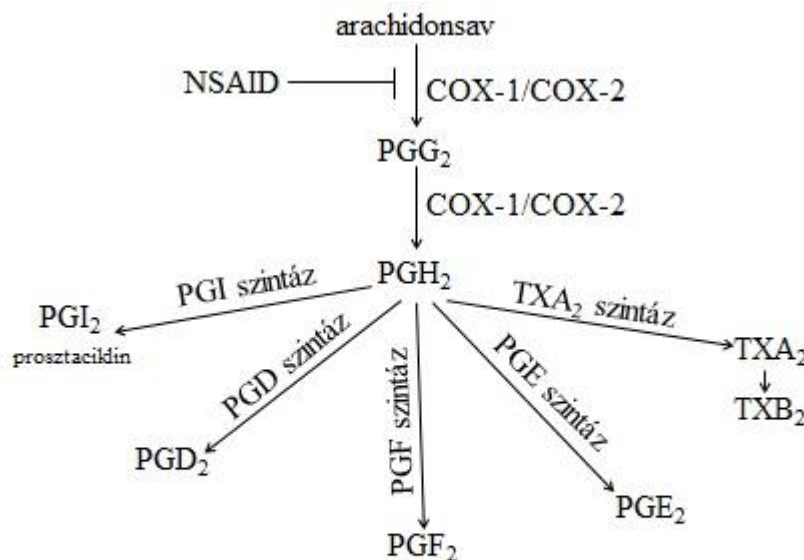
Az Ang II receptorokat számos kutatócsoport tanulmányozta a diabetes állatmodelljeiben. Streptozotocin indukálta DM-ban a vese intersticiális AngII koncentrációja megnőtt, míg a NO metabolitok szintje lecsökkent (Awad és mtsai. 2004). Ezt az emelkedett Ang II szintet az AT1R blokkoló tovább fokozta, miközben a NO és termékeinek szintje normalizálódott. Megállapították, hogy glükóz hatására fokozódik a mesangiális sejtek Ang II szintézise, továbbá a glükóz indukálta TGF β produkció fokozódás gátolható volt AT1R blokkolókkal (Singh és mtsai. 1999). Kimutatták, hogy az Ang II infúzió hatására kialakuló inzulinrezisztencia mértéke AT2R blokkolókkal és ACE inhibitorokkal csökkentő. Ezen kísérleti megfigyelések igen fontosak, mivel inzulinrezisztenciában az erek több oxigényököket bocsátanak ki (amelyek a NO eliminálásával elősegítik a H₂O₂ és szabad hidroxilgyökök képződését, ezáltal lipidperoxidációt és sejtmembránkárosodást okozva), továbbá az AT1R Ang II általi aktiválódását NAD(P)H oxidáz stimuláció követi, ezzel is fokozva az endotheliális ROS termelést. Inzulin rezisztens patkányokban az AT1R blokkolók normalizálják a szabadgyökképződést, ezáltal javítják az endothelfunkciót és kivédik az Ang II indukálta vazokonstriktációt (Henriksen és mtsai. 2001; Shinozaki és mtsai. 2004).

2.5. Prostaglandin szintézis eltérései 2-es típusú diabetes mellitusban

A gyulladás a szervezet komplex válaszreakciója, feladata a károsító hatás megszüntetése, a normál struktúra és funkció helyreállítása. A védelemben fontos szerepet játszanak a különböző proteolitikus kaszkádrendszerek és gyulladásos mediátorok, például a leukotriének és a prosztaglandinok. A kardiovaszkuláris megbetegedések egy része krónikus, alacsony szintű szöveti gyulladással társul. A gyulladásos folyamatok jelentős része a kis artériák (rezisztenciaerek) szintjén játszódik le. Az érfalban létrejövő gyulladásos válasz ugyanakkor fontos szerepet tölt be élettani körülmények között is azáltal, hogy az érfal felépítésében és működésében változásokat vált ki, így biztosítva a megváltozott körülményekhez való alkalmazkodást (Libby és mtsai. 2002). Az utóbbi évek kutatásai szerint az alacsony szintű szöveti gyulladásos folyamatok központi szerepet játszhatnak a diabeteses vaszkuláris szövődmények kialakításában (Helmersson és mtsai. 2004). A gyulladásos folyamatok mediátorai közül

a prosztaglandinok fontos szerepet töltenek be az arteriolák átmérőjének szabályozásában (Koller és Kaley 1991). A prosztaglandinok arachidonsavból származó biokatív anyagok, melyeket elsőként ondóból izoláltak (Goldblatt 1935). Az arachidonsavból a ciklooxygenáz (COX) hatására a prosztaglandin G₂, majd abból H₂ (PGH₂) képződik, melyből további származékok is létrejönnek (4. ábra) (McAdam és mtsai. 1999).

A COX egy membránkötött kettős funkciójú enzim, ami katalizálja az arachidonsav prosztaglandin G₂-vé történő konverzióját ciklooxygenáz aktivitásának köszönhetően és a PGG₂ PGH₂ törénő átalakulását peroxidáz aktivitása révén (Wu 1996) (4. ábra). A COX enzimek két izoformáját azonosították, a COX1-et és COX2-t (Sirois és Richards 1992). A COX1 konstitutívan expresszálódik a legtöbb szövetben és felelős a prosztaglandin termeléséért élettani körülmények között. Ezzel szemben a COX-2 egy indukálható enzim, szintje alacsony a legtöbb szövetben, azonban gyulladásos stimulusokra, mint például citokinek, mitogén faktorok, expressziója jelentős mértékben megnő (Harris és mtsai. 1994; Tetsuka és mtsai. 1996). A COX-2 aktiválódása kulcsszerepet játszhat a gyulladásos betegségek, a szívelégtelenség és az atherosclerosis patofiziológiájában egyaránt (Ditzel és Schwartz 1967; Hostetter és mtsai. 1981; Baynes 1991; Nishikawa és mtsai. 2000).



4. ábra Vazoaktív arachidonsav származékok ciklooxygenáz mediált képződése

DM-ban a prosztaglandin szintézis növekedése vaszkuláris működési zavarokhoz vezet (Arima és mtsai. 1994). Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a magas glükózkoncentráció következtében nemcsak a prosztanoid profilban jönnek létre változások, hanem fokozódik az eikozanoidok termelődése is a vaszkuláris sejtekben. (Schambelan és mtsai. 1985; Craven és mtsai. 1987). Ennek magyarázatát adhatja, hogy a PG szint emelkedésére hiperglikémiás környezetben fokozott arachidonsav termelés jön létre (Williams és Schrier 1993; Haneda és mtsai. 1997), azonban a megváltozott PG termelés mechanizmusa nem kellően ismert DM-ban. A glükóz és metabolitjai valószínűleg azáltal fejtik ki hatásukat, hogy megváltoztatják a különböző biokatív mediátorokat, melyek szerepet játszanak a vaszkuláris sejtek funkciójában és főként a celluláris integritásban. Mindemellet a magas glükózkoncentráció következtében nemcsak a prosztanoid szintézisben jönnek létre változások, hanem fokozódik az eikozanoidok termelődése is a vaszkuláris sejtekben.

A vaszkuláris simaizom sejtek glükóz általi indukciója következtében nő a növekedési faktor β (McClain és mtsai. 1992), oszteopontin (Takemoto és mtsai. 1999), extracelluláris mátrixproteinek szintje, fokozódik a citoszólikus foszfolipáz A2 aktivitása (Xia és mtsai. 1995). A glükóz metabolizmus a szorbitol útvonalon keresztül emeli a NADH/NAD⁺ arányt a citoszólban, ez kedvez a diacil glicerolok *de novo* szintézisének, ami PKC-t aktivál (Lee és mtsai. 1989; Craven és mtsai. 1990; Williams és Schrier 1992; Williams és Schrier 1993). A glükóz patofiziológiai hatásában is leírták a fokozott PKC aktivitás kulcsszerepét, amit az aldóz reduktáz inhibitorok kivédnek (Koya és King 1998). A glükóz által kiváltott vaszkuláris diszfunkciók ellen az emelkedett piruvátszint a NADH/NAD⁺ arány normalizálása révén véd (Williamson és mtsai. 1993). A PLA2 aktivitás fokozódásának alternatív útvonalát jelentheti a magas glükóz koncentráció hatására fokozódó mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) aktivitás (Haneda és mtsai. 1997; Hayama és mtsai. 1997), amely szintén képes növelni a PLA2 aktivitást és a PG produkciót.

Fiziológiás körülmények között az endothelsejtek és vaszkuláris simaizomsejtek COX-1 fehérjét expresszálnak (Wu 1996), azonban a COX-2 szerepét is azonosították endothel sejt kultúrán (Topper és mtsai. 1996), mi több, az összprosztaglandin termeléshez nagymértékben hozzájárulhat a COX-2 fiziológiás körülmények között (McAdam és mtsai. 1999).

Immunhisztokémiai tanulmányokban (Crofford és mtsai. 1994; Schonbeck és mtsai. 1999) azt találták, hogy a COX-2 expresszió mind a kis, mind a nagy erek esetében jelentéktelen, míg a COX-1 könnyen detektálható. Ezen megfigyelés azt támasztja alá, hogy a COX1 nagymértékben expresszálódik a vaszkuláris szövetekben, míg a COX-2-t aktivált, proliferáló vaszkuláris szövetekben például az angiogenezis folyamatában lévő mikroerekben, atherosclerotikus léziókban, gyulladt szövetekben jelenik meg (Sano és mtsai. 1992). Az atherosclerotikus léziók, melyek megtalálhatók nagy erekben így a carotisban, koronária artériákban, fokozott COX-2 expressziót mutattak humán erek esetében (Sano és mtsai. 1992).

A normális prosztaciklin termelés fontos az erek tónusának szabályozásában és a trombózis gátlásában (FitzGerald és mtsai. 1983). A vaszkuláris sejtekben számos különböző prosztanoid szekretálódik mint a PGI₂, PGE₂, PGF₂α, továbbá az érfal számos sejtje is reagál prosztanoidokra (FitzGerald és mtsai. 1983). A prosztaglandinok hatásukat saját receptoraikhoz kötődve fejtik ki. A prosztaglandin receptorok nevüket a preferált szubsztrátjaikról kapták. A klasszikus prosztanoid receptorok plazmamembránhoz kötöttek és G protein kapcsoltak.

A legtöbb prosztanoidot az endothel sejtek szekretálják, többek között a COX útvonalon keresztül szintetizálódó PGI₂-t, ami fontos a vaszkuláris homeosztázis és trombózis szabályozásában. A vaszkuláris simaizomban található IP receptorokhoz kötődve növeli az intracelluláris cAMP koncentrációját antagonizálva ezáltal a konstruktív hatásokat és gátolva a MAPK útvonalat (1. táblázat) (FitzGerald és mtsai. 1983). Ez a jelátviteli útvonal a trombocitákban gátolja az aggregációt, így megakadályozva a trombózist (FitzGerald és Patrono 2001).

A PGE₂ és PGF₂α a PGI₂-vel ellentétben képes mind vazokonstriktiót, mind vazodilatációt kiváltani, attól függően, hogy mely receptorához kötődik. A PGE₂ például EP2 receptoron keresztül hatva a simaizomsejtek relaxációját váltja ki, míg EP2 receptoron hatva konstruktiót okoz (1. táblázat).

Receptor	Receptor altípus	G-féherje	Receptor aktiválódás hatása
PGE2	EP1	G _s	↑Ca ²⁺
	EP2	G _s	↑cAMP
	EP3	G _i , G _q , G _i	↓cAMP, ↑IP3/DAG, ↑cAMP
	EP4	G _s	↑cAMP
PGD2	DP	G _s	↑cAMP, ↑Ca ²⁺
PGI2	IP	G _s , G _q , G _i	↑cAMP, ↑IP3/DAG, ↓cAMP
PGF2 α	FP	G _q	↑IP3/DAG, Rho
TXA2	TP	G _q , G _s (α), G _i (β)	↑IP3/DAG/Ca ²⁺ , ↑cAMP

1. táblázat Prosztanoid ligandok és receptorok intracelluláris hatásai

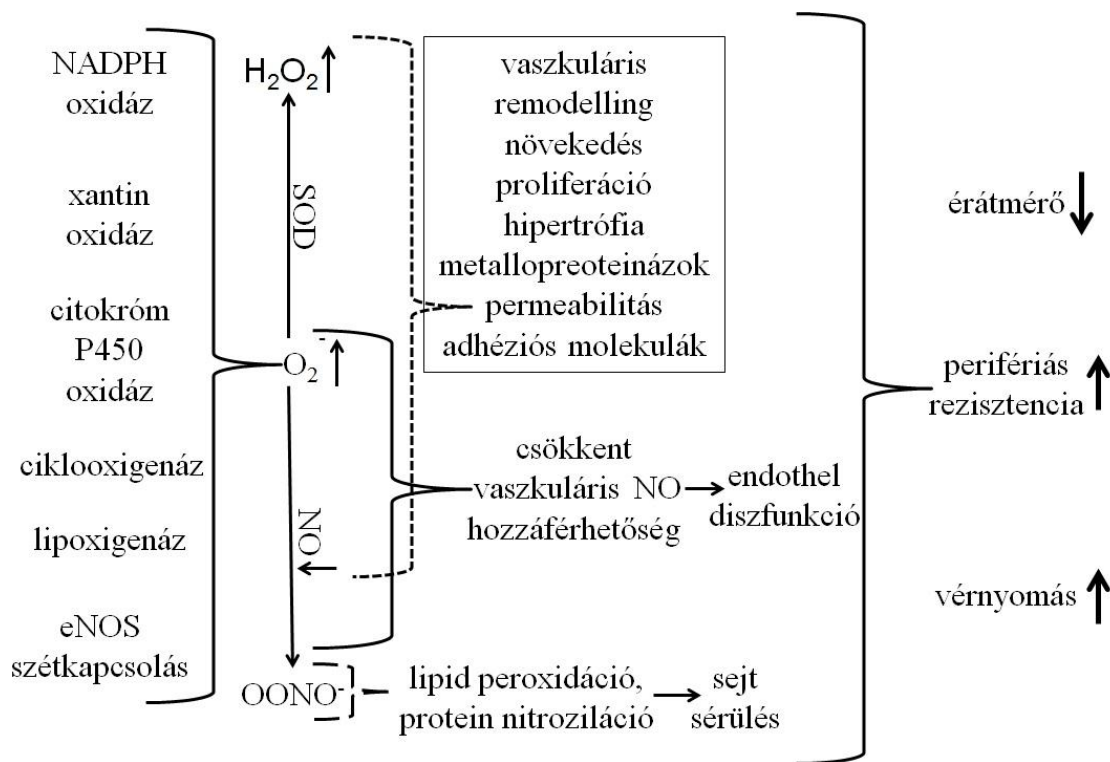
2.6. Oxidatív stressz

Szabadgyököknek nevezzük azokat a vegyületeket, amelyeknek külső elektronhéján egy vagy több párosítatlan elektron található. Oxigén szabadgyökökről (ROS) beszélünk, amennyiben a pár nélküli elektron vagy elektronok egy oxigén atom külső elektronhéján helyezkednek el. A szervezetben a szabadgyökök hatása kétirányú, egyrészt nélkülözhetetlenek bizonyos biokémiai, immunológiai és enzimikus folyamatoknál, másrészt a képződő szabadgyökök károsíthatják a sejtek, szövetek működését. A sejtek működése során általában kis mennyiségben termelődnek reaktív oxigéngyökök (ROS) (Kunsch és Medford 1999), azonban a ROS mennyisége patológiás körülmények között meghaladhatja az antioxidáns rendszer kapacitását, minek következtében különböző makromolekulák (proteinek, lipidek, szénhidrátok, DNS) oxidációja jöhet létre, ami funkcionális és morfológiai károsodáshoz vezethet (Valko és mtsai. 2007). Ezt a jelenséget oxidatív stressznek nevezzük, melynek a kardiovaszkuláris megbetegedéseken túl igen fontos szerepet tulajdonítanak a daganatos betegségek patomechanizmusában is. A diabeteses komplikációk és az oxidatív stressz

között is szoros összefüggés áll fent (Valko és mtsai. 2007).

A ROS csoportjába tartozó elsődleges szabadgyök a szuperoxid anion (O_2^-), melyből más molekulákkal történő interakció során további ROS képződhetnek: hidroxil gyök (OH^\cdot) proxilok, alkoxilok (RO_2^- , RO^\cdot), nitrogén oxidok (NO^\cdot , NO_2^\cdot). A ROS forrásai lehetnek: a mitokondriális elektrontranszport lánc, a fagocitózis folyamata, továbbá az enzimrendszerek működése során is számos ROS keletkezhet (például NADPH oxidáz, xantin oxidáz, monoaminoxidáz, citokrom P450-oxidáz, NOS, COX izoenzimek, lipoxigenázok által katalizált folyamatokban). Hidroxil gyök keletkezhet a Fenton és a Haber-Weiss reakciók révén is. A ROS termelő és elimináló rendszerek a vaszkuláris sejtekben is megtalálhatóak és számos esetben kimutatták, hogy az oxidatív stressznek fontos szerepe van a kardiovaszkuláris megbetegedések patogenezisében (Harrison 1997; Kojda és mtsai. 1999; Cai és Harrison 2000; Hazen 2000; Lum és Roebuck 2001), továbbá az oxidatív stressz során keletkező ROS károsítja az érfal fiziológiai funkcióját (Wolin 2000; Matsuoka 2001).

A vaszkuláris ROS termelésében három fő enzim vesz részt (5. ábra): a NADPH-oxidáz (Mohazzab és Wolin 1994; Patterson és mtsai. 1999), a xantin-oxidáz és a nitrogén oxid szintáz (NOS) (Cai és Harrison 2000). A NADPH-oxidáz az oxigént a NADH illetve a NADPH egy elektronját felhasználva szuperoxid anionná redukálja. Ezen enzim vaszkuláris formáját citokinek, hormonok és az érfalra ható mechanikai erők is aktiválhatják (Aviram és mtsai. 1996). A mikroerekben nagy mennyiségben megtalálható xantin-oxidáz (XO) (Suzuki és mtsai. 1998) a purin metabolizmus során a xantin és hipoxantin oxidációját katalizálja. A XO a molekuláris oxigént redukálja, miközben szuperoxid anion és hidrogén peroxid képződik. Gátlószere az oxipurinol, ami csökkenti a spontán hipertenzív (SHR) állatok vérnyomását (Nakazono és mtsai. 1991) utalva ezzel a XO magas vérnyomás kialakításában betöltött szerepére. Kísérletesen előidézett atheroscleorosisban a megnövekedett szuperoxid szintet a XO gátlása csökkentette (Ohara és mtsai. 1993) és hiperkoleszterinémiás betegekben javította a vazodilatációt (Cardillo és mtsai. 1997). A vaszkuláris szuperoxid anion harmadik forrása az eNOS, ami L-arginin guanidino csoportjának nitrogénjére juttat elektront, miközben NO képződik.



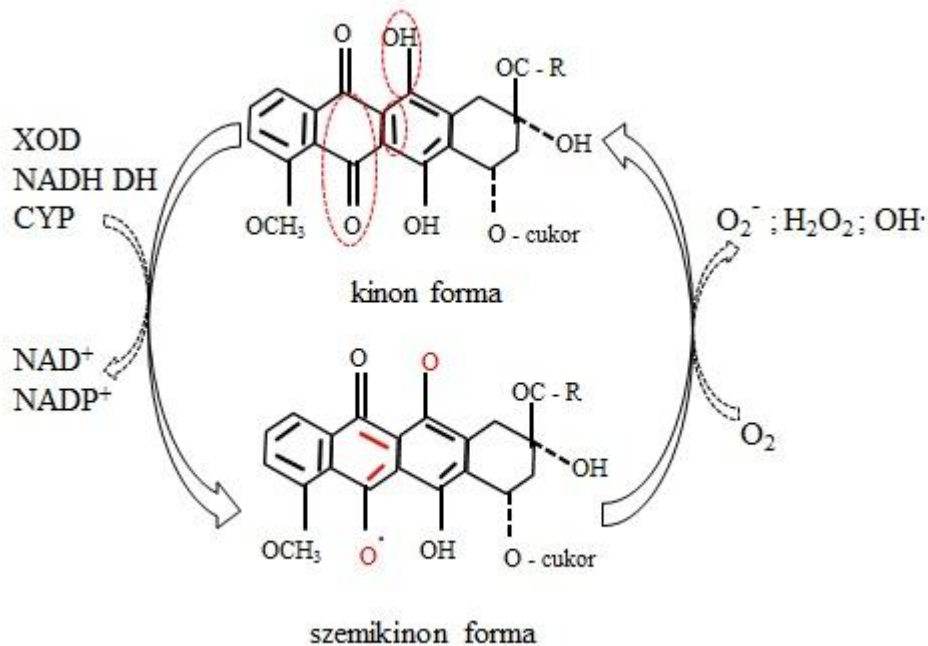
5. ábra Reaktív oxigén gyököket termelő élettani rendszerek és azok hatásai

A mitokondriumok is jelentős forrásai a reaktív oxigén gyököknek, ugyanis a megnövekedett intracelluláris glükóz a trikarbonsav ciklus elektrondonorainak túltöltődését váltja ki, minek következtében megnő a mitokondriális protongradiens, ami hozzájárul a szuperoxidok mitokondriumból történő kiszivárgásához. Ezzel összhangban a mitokondriális ROS gátlása normalizálja a diabetes komplikációk kialakulását (Da Ros és mtsai. 2004).

2.7. Doxorubicin és PARP-2

A doxorubicin (DOX) egy széles körben alkalmazott, antraciklin alapú citosztatikum (6. ábra), melyet elsődlegesen szolid tumorok, limfómák és leukémiák kezelésére használnak. Hatásának alapját az jelenti, hogy képes interkalálódni a DNS-be, megváltoztatni a szerkezetét, DNS töréseket okozni és ezen keresztül apoptózist indukálni tumorsejtekben (Chuang és Chuang 1979; Muller és mtsai. 1997). Emellett a mitokondriumok egyes enzimei képesek a DOX-ból szemikinon gyökök képzésére (6. ábra) (Davies és Doroshow 1986). A képződött szemikinon instabil és elektronját

könnyen továbbadja, elősegítve ezzel különböző reaktív intermedierek képződését. Számos tanulmány azt sugallja, hogy az előbb említett szabadgyökök károsítják a vaszkulaturát és a szívmot, ami károsíthatja mind a vazokonstriktiót (Kanmura és mtsai. 1989), mind pedig a vazodilatációt (Ferrans és mtsai. 1997). Mindezen megfigyelésekkel összhangban a DOX kezelés legjelentősebb mellékhatása súlyos kardiotoxicitása.



6. ábra A doxiciklin szerkezete és mitokondriális átalakulása

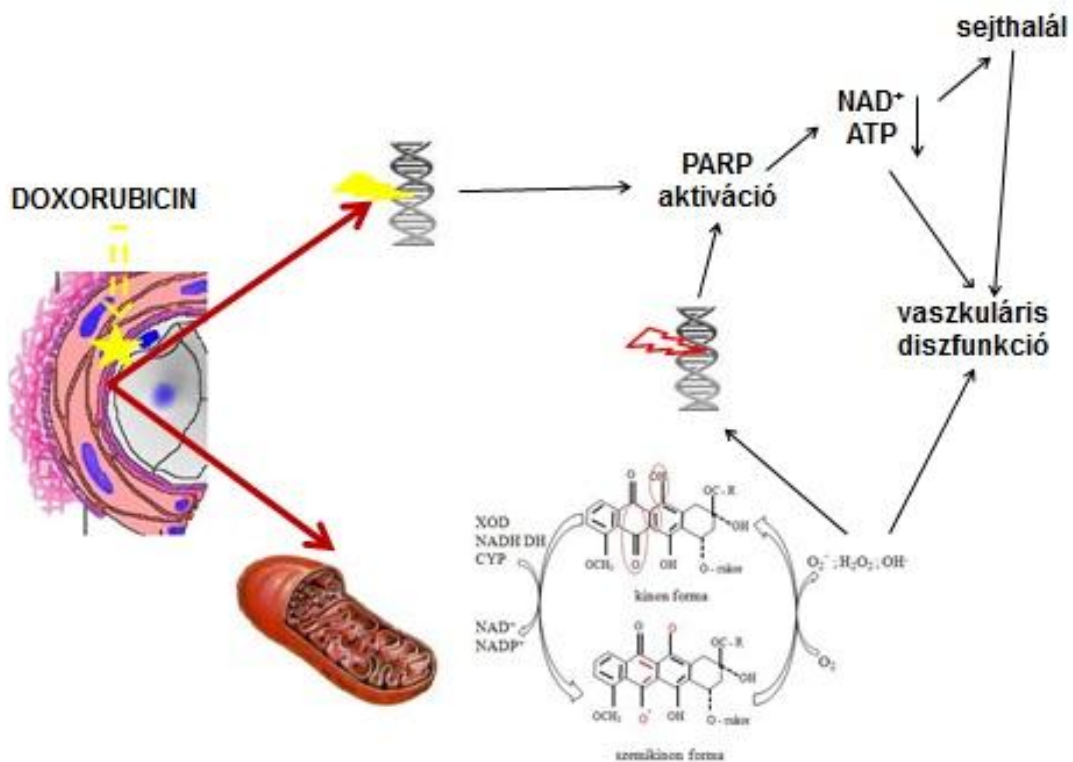
A DOX okozta kardiotoxicitáshoz hozzájárulhat endothelium károsodást okozó tulajdonsága is (Murata és mtsai. 2001; Wolf és Baynes 2006). Az endothel diszfunkció létrejöttének hátterében a ROS képződés, valamint a megváltozott NO szintézis állhatnak (Vasquez-Vivar és mtsai. 1997; Kalivendi és mtsai. 2001). Ennek magyarázatát adhatja, hogy a DOX-ból képződő szemikinon (6. ábra) képes kötődni az eNOS reduktáz doménjéhez, ezzel az elektron transzport megváltozását eredményezve az enzim oxigenáz doménjéről, így megnő a szuperoxid termelés és lecsökken a NO produkció (Vasquez-Vivar és mtsai. 1997).

A DOX kezelés ROS termelést fokozó hatása a DNS törések kiváltásával aktiválhatja a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) enzimeket (7. ábra), mely folyamat hozzájárulhat a kezelést követő vaszkuláris funkciózavar kialakulásához. Ezen

funkciózavar kialakulásának oka lehet a PARP aktiváció következtében lecsökkenő NAD^+ szint (Schraufstatter és mtsai. 1986), amely a sejtek elhalásához vezethet (Pacher és mtsai. 2002).

A PARP-2 a poli-ADP-ribóz polimeráz enzimes család tagja (Ame és mtsai. 1999). A poli(ADP-riboszil)áció a fehérjék poszttranszlációs módosítása a PARP enzimek által, minek során a NAD^+ bontásából származó ADP-ribóz polimereket (PAR) kapcsolnak intracelluláris fehérjékhez. A PAR lebontását a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz végzi (Schreiber és mtsai. 2006).

Számos tanulmányban kutatják a PARP-2 szerepét a krónikus és akut gyulladásos folyamatokban (Szabo és Dawson 1998; Kofler és mtsai. 2006). A PARP-2 génhányos egerek bizonyos fokig védettek fokális cerebrális iszkémiában (Kofler és mtsai. 2006).



7. ábra A reaktív oxigén gyökök és a poli-ADP-ribóz polimeráz aktiváció kapcsolata

3. METODIKÁK

3.1. Állatkísérletes modellek

3.1.1. A 2- DM genetikai állatmodellje

Kísérleteinkben 12-14 hetes hím db/db (C57BL/KsJ-db⁻/db⁻), valamint kontroll heterozigóta (C57BL/KsJ-db⁺/db⁻) egereket használtunk (Jackson Laboratories, Ann Arbor, USA). A db/db egerekben a 4-es kromoszómán található mutáció következtében gátolt a leptin receptor expressziója. A működőképes leptin receptor hiányában a táplálkozási idő megnyúlik a homozigóta (db/db) egerekben, melynek következtében súlyos mértékben elhíznak és hiperglikémiások lesznek. A 2-es típusú diabetes mellitus genetikai állatmodelljében kialakuló metabolikus eltérések hasonlóak a humán 2-es típusú diabetes mellitusra jellemzőkhöz (Hummel és mtsai. 1966; Bagi és mtsai. 2003). A kontrollként használt heterozigóta egerek sem morfológiailag, sem élettani működésük tekintetében nem különböznek a normál egerektől. A kísérleti protokollok után valamennyi állaton 150 mg/tskg nembutal *intraperitoneális* injekció adásával eutanáziát végeztünk.

3.1.2. PARP-2 knock out egerek

12-14 hetes PARP-2^{-/-} és vad típusú egereket (C57BL/6-Parp2^{tm1Jmdm}, Jackson Laboratories, Ann Arbor, USA) használtunk. Az egereket négy csoportra osztottuk: PARP-2 ^{+/+} kontroll; PARP-2 ^{-/-} kontroll; PARP-2 ^{+/+} DOX kezelt; PARP-2 ^{-/-} DOX kezelt. Kísérleteink során a kezelt csoport egyedeit *intraperitoneálisan* 25 mg/kg DOX-nal illetve a kontroll csoport állatait sóoldattal oltottuk be. Funkcionális kísérleteinkhez az egereket két nappal a DOX kezeléseket követően 50 mg/kg thiopentallal altattuk el.

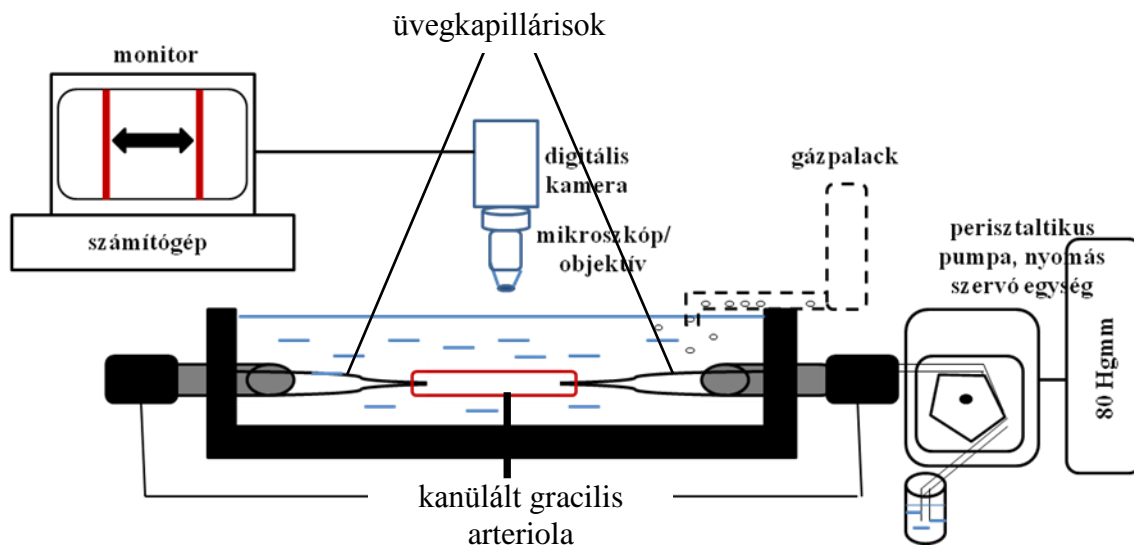
3.2. Az artériás vérnyomás mérése

Az egerek vérnyomását éber állatokban az ún. „tail cuff” módszer segítségével mértük. Az egerek farkára pneumatikus pulzusérzékelővel felszerelt mandzsetta került, melynek segítségével meghatároztuk az állatok vérnyomását és szívfrekvenciáját. Három nappal a méréseket követően 8 kontroll és 8 db/db egeret két csoportra

osztottunk. 4-4 egeret mindkét csoportból (kontroll és db/db) egy szelektív EP1 receptor antagonistá (AH6809) kezelésnek vetettünk alá (*per os*, 10mg/kg/nap). A fennmaradó 4-4 egeret mindkét csoportban a hordozóanyaggal kezeltük. A kezelések négy napig tartottak, melynek során a kezelést követő második napig mértük az állatok vérnyomását.

3.3. Izolált mikroértechnika

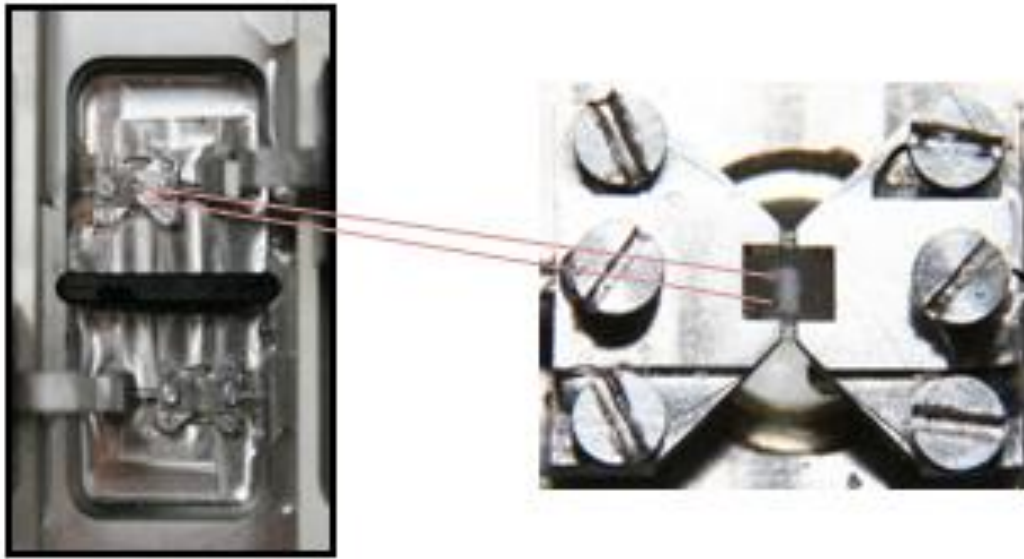
Izolált mikroér kísérleteinket egér *musculus gracilis*-ból izolált arteriolákon (érátmérő 80 Hgmm intraluminális nyomás mellett ~90 μm) végeztük. Nembutállal altatott állatokból steril körülmények között metszettük ki a megfelelő arteriolát tartalmazó szövetdarabot és jégbe hűtött Ca^{2+} mentes Krebs oldatot (10 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 5 mM glükóz, és 24 mM NaHCO_3 , pH 7,4, oxigenizálva 10% O_2 -t, 5% CO_2 -ot és 85 % N_2 tartalmazó gázkeverékkel) tartalmazó Petri-csészében izoláltuk. Az arteriola 1-2 mm-es szakaszát majd hideg oxigenizált Ca^{2+} mentes Krebs oldatot tartalmazó szervkádba helyeztük. Az arteriolákat sztereomikroszkóp (Nikon SMZ 1000) segítségével, mikrosebészeti eszközöket használva üvegapillárisok (VWR, Magyarország) segítségével kanuláltuk és egy nyomás-szervó rendszerre csatlakoztattuk (8. ábra) (Living Systems Instrumentation, VT, USA). Ezután beállítottuk az eredeti ér hosszát, a hőmérsékletet 37 °C-ra emeltük és a szervkádba 2,5 mM CaCl_2 -ot tartalmazó Krebs oldatot tettünk, melyben a kísérleteket végeztük. Az intraluminális nyomást egy pressure-servo rendszer segítségével lassan 80 Hgmm-re emeltük és 60 percig azon tartottuk, amíg az ér állapota stabilizálódott. A belső érátmérő változását videómikroszkópos rendszer segítségével detektáltuk (Nikon, Eclipse 80i, CCD camera, frame grabber, National Instruments, PCI 1405).



8. ábra A kanülált arteriola vizsgálatára használt videomikroszkópos rendszer vázlatos rajza

3.4. Izometrikus kontrakciómérés

Az egerek exterminalását követően eltávolítottuk az aortát, amit 4 °C-os, oxigenált Ca^{2+} mentes Krebs-et tartalmazó Petri-csészében rögzítettünk és mikrosebészeti eszközök segítségével megtisztítottunk a környező szövetektől. Preparálást követően az aortát ~4 mm hosszú gyűrűkre vágtuk, majd izometriás kontrakció mérő rendszeren (DMT 510A, Aarhus, Dánia) két egyenként 40 μm átmérőjű fém drótot vezettünk az ér lumenébe, majd az egyik oldalt a mozgatható, a másik oldalt az erőmérő karhoz rögzítettük csavarok segítségével (9. ábra). A rögzítést követően a Ca^{2+} -mentes Krebs oldatot Ca^{2+} tartalmúra cseréltük, melyet a kísérlet végéig oxigenáltuk és 37 °C on tartottunk.



9. ábra Auto Dual Wire Myograph System 510 A szervkád és a rögzített aorta

3.5. A miogén tónus vizsgálata

Kísérleteinkben vizsgáltuk a db/db egerekből izolált gracilis arteriolák izobarikus körülmények között spontán kifejlődő miogén tónusának mértékét. Az arteriolákban 20 Hgmm-es kezdőnyomásról kiindulva az intraluminális nyomást 20 Hgmm-enként emeltük egészen 120 Hgmm-ig. Minden egyes nyomásérték beállítását követően megvártuk a spontán miogén tónus kifejlődését (4 perc), az adott nyomás mellett kialakuló érátmérő meghatározása során. Az arteriolák átmérőjét egyaránt vizsgáltuk Ca^{2+} tartalmú (aktív átmérő) és Ca^{2+} -mentes (passzív átmérő) Krebs oldatban.

3.6. Farmakológiai ágensek hatása a vázizom arteriolák átmérőjére

A normalizált arterioláris átmérőt az 1-es típusú prostaglandin E_2 (EP1) receptor antagonistá AH6809 (10 μM , 30 perc előinkubálás) jelenlétében is meghatároztuk. Vizsgáltuk az arteriolákhoz külsőleg, kumulatív koncentrációkban adott PGE_2 (10 pM-100 nM), a szelektív EP1 receptor agonista fenil-trinor PGE_2 (10 pM-100 nM) és az Ang II (0,1 nM- 10 nM) hatására kialakuló érátmérőváltozásokat AH6809 jelenlétében

és hiányában. Vizsgáltuk a PGE₂ indukálta válaszokat az AH6809 és egy TP receptor antagonistá, az SQ29548 (1 μM, 30 perc előkezelés) együttes jelenlétében, valamint egy szelektív EP4 receptor antagonistá, az L161982 (1 μM, 30 perc előkezelés) illetve a NOS-t gátló L-NAME (200 μM, 20 perc előkezelés) jelenlétében is.

3.7. Kísérleti protollok aortán

Minden kísérletünk előtt az izometriás kontrakciót mérő rendszerhez rögzített aorta gyűrűkön normalizációs protollot végeztünk el, mely addig tartott, amíg az erek 15 másodpercenkénti 1,5 mN-os erővel történő meghúzása által elértünk egy 120 Hgmm-es intraluminális nyomásértéket (13,3 kPa), ahonnan a rendszer 50 Hgmm-es értékre állította be az erek előfeszítését. A normalizációt 60 perces inkubáció követte. Az erek életképességének vizsgálatára KCl dózis-hatás vizsgálatát (10 – 60 mM) alkalmaztuk, a kontraktilis funkciót noradrenalin (NE, 0,1 μM – 30 μM) és szerotonin (5-HT, 1 nM – 30 μM) kumulatív dózisaival vizsgáltuk. A relaxációs válaszokat a félmaximális kontrakciót kiváltó noradrenalinnal (3 μM) prekontrahált ereken vizsgáltuk. Az endothelium függő relaxáció tanulmányozására acetilkolint (Ach, 1 nM – 30 μM), míg az endothelium független relaxáció meghatározására nitropussid-nátriumot (SNP, 10 nM – 300 μM) használtunk. Az egyes vazoaktív szerek között a rendszert háromszor mostuk át Krebs oldattal és minden esetben megvártuk, amíg az oldat 37 °C-ra felmelegedett.

3.8. Western immunoblot

Az EP1 és EP4 receptorok expresszióját a kontroll és db/db egerekből származó izolált aortákon vizsgáltuk. Az aortákat eltávolítottuk, a környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd az aortadarabokat 200 μl SDS mintapufferben (Sigma-Aldrich, Magyarország) homogenizáltuk és főztük (10 perc). A fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen 150 V feszültségen 1 óra alatt választottuk el, majd polyvinil membránra transzferáltuk. Az EP1 és EP4 receptorok kimutatására poliklonális antitestet (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA), míg fehérje mennyiség kontrollként anti-β-

aktin ellenes antitestet (Sigma-Aldrich, Magyarország) használtunk. A kemilumineszcens jeleket autoradiográfiával vizualizáltuk és az optikai denzitást a NIH Image szoftver segítségével számszerűsítettük és a β aktinra kapott jel mértékére normalizáltuk.

3.9. Statisztikai módszerek

3.9.1. Kanulált erek válaszainak értékelése

A vazóaktív szerek hatására kialakuló átmérőváltozásokat abszolút értékben, illetve a Ca^{2+} mentes oldatban megfigyelt passzív átmérő százalékában fejeztük ki. A normalizált érátmérőt az adott nyomásértéken mért aktív és passzív érátmérő arányokból határoztuk meg. Az arteriolák miogén tónusát az ugyanazon a nyomásértéken mért aktív (Ca^{2+} tartalmú Krebs-ben mért) átmérő Ca^{2+} mentes Krebs oldatban mért (passzív) átmérőjének százalékában adtuk meg. Az ábrákon a nyert adatok átlagértékei és a S.E.M. szerepelnek. A statisztikai analízishez két utas ANOVA-t használtunk. Az értékeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $P < 0,05$ volt.

3.9.2. Izometriás rendszeren (ring) mért válaszok értékelése

Eredményeink kiértékelésére Student-féle t-próbát használtunk, ahol a $P < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Eredményeinket a vazokonstriktív anyagok esetében abszolút egységekben, mN-ban ábrázoltuk, míg a vazodilatatív anyagok hatására bekövetkező kontraktilis erőcsökkenést a prekonstriktóra használt noradrenalin válasz százalékában ábrázoltuk. Az ábrákon a kapott adatok átlagértékei és a S.E.M. láthatók.

4. EREDMÉNYEK

4.1. db/db egerek jellemzése

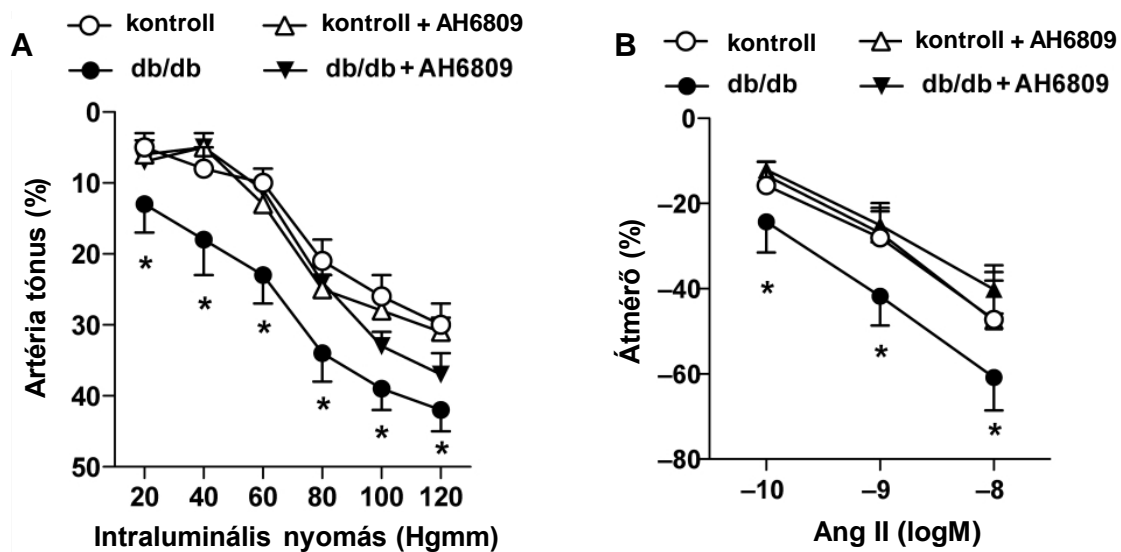
Kísérleteinkben a 2-es típusú diabetes mellitus genetikai állatmodelljében vizsgáltuk a mikroerek vazomotor működését és annak a szisztémás vérnyomásra gyakorolt hatásait, továbbá tanulmányoztuk a prosztanoidok vazomotor diszfunkció és a következményes magas vérnyomás kialakulásában betöltött lehetséges szerepét. Eredményink szerint a db/db egerekben éber állapotban mért szisztolés vérnyomás értékek szignifikánsan magasabbak a kontroll állatokban mért értékekhez viszonyítva, míg a szívfrekvencia hasonló a két csoportban (2. táblázat).

	Kontroll	db/db
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	136±4	155±5*
Szívfrekvencia (1/perc)	612±8	579±24

2. táblázat A db/db genotípus hatása a vérnyomására és szívfrekvenciára.

A vérnyomást és a szívfrekvenciát tail-cuff módszerrel határoztuk meg. A kontroll egértörzstől való szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

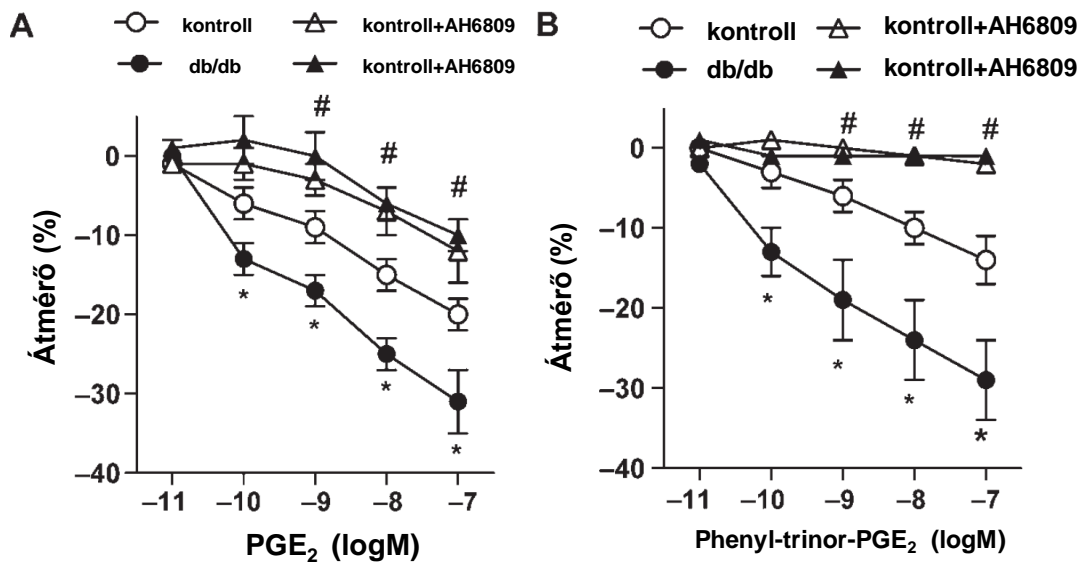
Funkcionális kísérleteinkben elsőként az EP1 receptor aktivációjának szerepét vizsgáltuk az intraluminális nyomás és az agonista Ang II indukálta tónus kialakításában (10. ábra). A db/db egerek izolált arterioláiban minden nyomásértékre szignifikánsan nagyobb mértékű miogén tónus alakult ki a kontroll erekkel összehasonlítva (10.A ábra), ami összhangban volt korábbi megfigyelésünkkel (Bagi és mtsai. 2005). Az Ang II indukálta kontrakció szintén szignifikánsan nagyobb mértékű volt a db/db egerek arterioláiban (10.B ábra).



10. ábra Az arteriolák miogén tónusa db/db genotípus esetén. Az EP1 receptor gátló AH6809 (10 μ M, 30 perc előkezelés) hatása az emelkedő intraluminális nyomás fokozás (20 - 120 Hgmm, A panel) és az angiotenzin II (Ang II, 0,1 – 10 nM, B panel) kiváltotta kontrakcióra kontroll (n=11) és db/db (n=11) egerek izolált arterioláin. A szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillaggal jelöltük.

Kísérleteinket elvégeztük a szelektív EP1 receptor antagonistá, AH6809 jelenlétében, aminek a kontroll csoportban nem volt hatása a nyomás és Ang II indukálta válaszokra, azonban a db/db egerek arterioláinak mind nyomás, mind az Ang II indukálta tónusát a kontroll erek szintjére csökkentette (10. ábra).

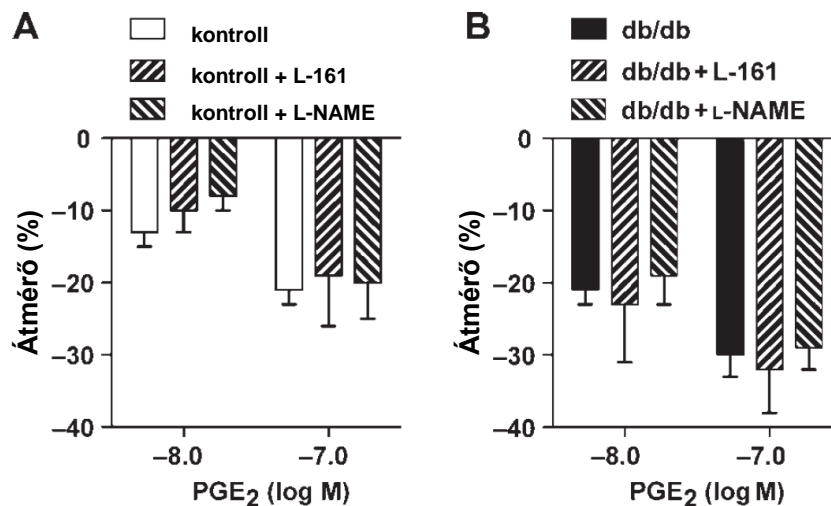
Irodalmi adatok szerint a PGE₂ receptorai közül az egyes típusú PGE₂ receptor (EP1) aktivációja vezet elsősorban vazokonstrikciónak (Tang és mtsai. 2008). PGE₂ hatására jelentős mértékű vazokonstrikciónak alakult ki mind kontroll, mind db/db egerekben (11. ábra), ami azonban szignifikánsan nagyobb volt a db/db egerek izolált vázizom arteriolái esetében mindkét konstruktív anyagra (11. ábra). A szelektív EP1 receptor gátló AH6809 jelenléte jelentősen csökkentette a PGE₂ és a 17-phenyl-trinor-PGE₂ kiváltotta konstruktív mind kontroll, mind db/db egerekben (11. ábra).



11. ábra Az EP1 receptor stimuláció hatásai

Az exogén PGE₂ (10 pM–100 nM, A panel) és 17-phenyl-trinor-PGE₂ (10 pM–100 nM, B panel) hatása kontroll (n = 7) és db/db (n=7) egerek izolált vázizom arteioláin az EP1 receptor gátló, AH6809 jelenlétében és hiányában. Csillaggal a kontroll és db/db csoport közötti szignifikáns eltérést, míg a kettős kereszttel az AH6809 kezelés előtti és utáni szignifikáns eltéréseket (P<0,05) jeleztük a csoportok között.

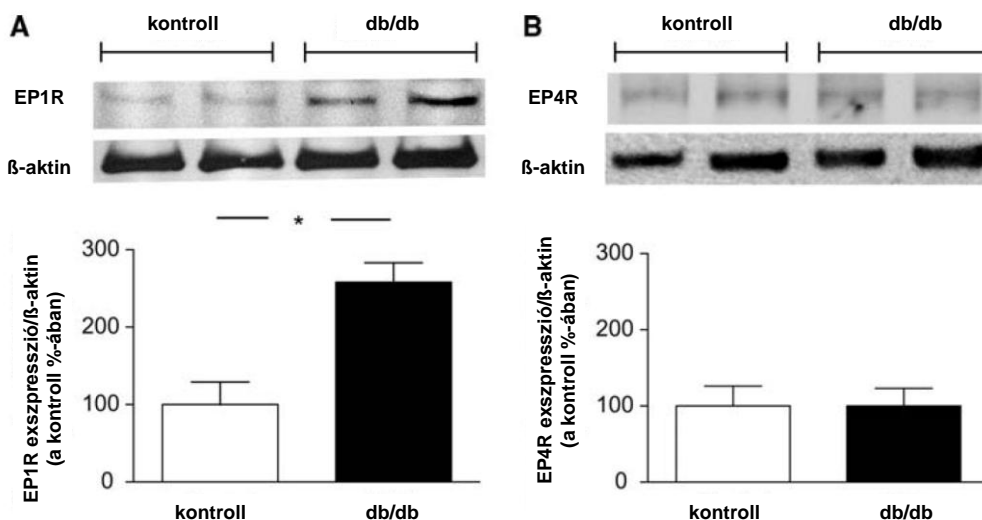
A PGE₂ hatására kialakult tónust a szelektív EP4 receptor antagonistá L161982 (1 μM) és a NOS inhibitor L-NAME (200 μM) nem befolyásolta egyik csoportban sem (12. ábra).



12. ábra PGE₂ arteriális hatásai

Az exogén alkalmazott PGE₂ (10 pM–100 nM) hatására létrejövő érátmérő változásokat százalékosan fejeztük ki kontroll (n = 6, A panel) és db/db (n=6, B panel) egerek izolált vázizom EP4 receptor antagonistá (L161) és NOS gátló (L-NAME) jelenlétében és hiányában.

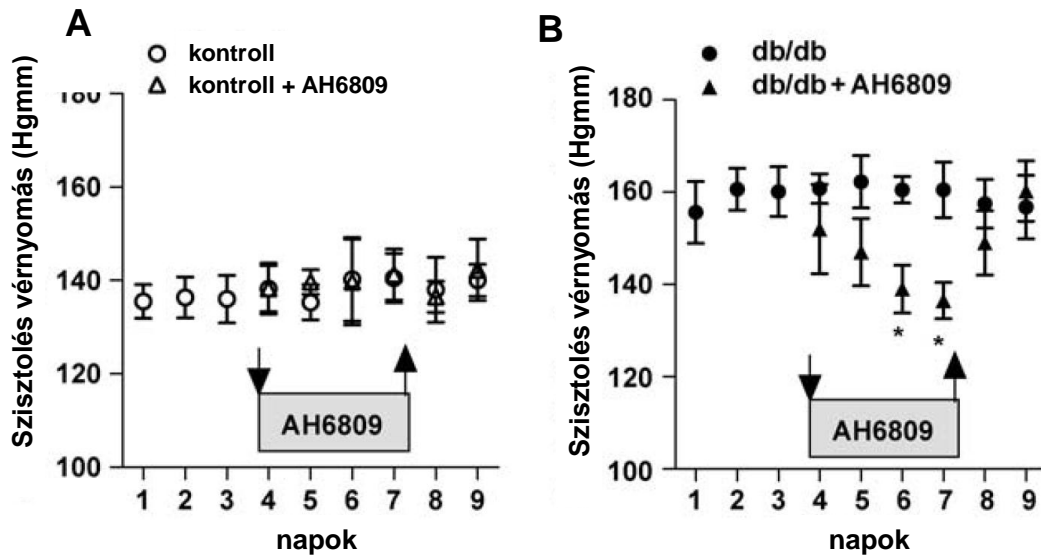
A következőkben arra kerestük a válszt, hogy mi állhat a fokozott EP1 receptor közvetített, PGE₂ mediált vazokonstriktió hátterében. Kísérleteinkben az EP1 receptor fehérje expresszióját Western blot segítségével vizsgáltuk a kontroll és db/db egerek aortáiban. Azt találtuk, hogy a db/db egerek aortájában fokozódik az EP1 receptor expressziója a kontrollhoz viszonyítva (13.A ábra), míg az EP4 receptor expressziója hasonló a két csoportban (13.B ábra).



13. ábra PGE₂ receptorok expressziójának vizsgálata

Az 1-es típusú (EP1R, A panel) és a 4-es típusú PGE₂ receptorok (EP4R, B panel) fehérje expressziójának vizsgálata kontroll (n = 4) és db/db (n = 4) egerek aortáiban. Fehérje mennyiség kontrollként β -aktint használtunk és a receptorok expresszióját β -aktinra normalizáltuk (n=4, minden csoportban). Csillaggal a szignifikáns különbséget (P<0,05) jelöltük.

A db/db egerek izolált ereiben, *in vitro* körülmények között megfigyelt fokozott EP1 receptor aktiváció *in vivo* szerepének tisztázása érdekében mind kontroll (14.A ábra), mind db/db (14.B ábra) egerekben vizsgáltuk a szisztémásan adott EP1 receptor gátló vérnyomásra gyakorolt hatását. Az állatokat 9 napon keresztül tartottuk megfigyelés alatt. A 4. naptól számítva 4 napon keresztül részesültek az EP1 receptor gátló AH6809 kezelésben (10 mg/kg/nap, *per os*). Az éber állatok vérnyomását tail-cuff módszerrel mértük és azt találtuk, hogy a db/db egerek szisztolés vérnyomása magasabb a kontrollokéhoz viszonyítva (14. ábra). Az EP1 receptor gátló szignifikánsan csökkentette a db/db egerek vérnyomását, míg a kontroll egerek vérnyomására nem volt hatással (14. ábra). Mi több, a db/db egerekben az EP1 receptor antagonistá elhagyása után az állatok vérnyomása a kiindulási, magasabb értékre emelkedett (14. ábra).



14. ábra EP1 receptor gátlás hatása az egerek vérnyomására

Az EP1R antagonistá AH6809 (10 mg/kg/nap) és az oldószer hatása a kontroll (n=8, A panel) és db/db (n=8, B panel) egerek szisztolés vérnyomására. A lefelé mutató nyilak a kezelés kezdetét, a felfelé mutató nyilak a kezelés végét jelzik. Csillagokkal a szignifikáns különbséget (P<0,05) jelöltük.

4.2. PARP-2 vaszkuláris biológiai szerepének jellemzése doxorubicin kezelt egerekben

Doxorubicin kezelt és kezeletlen kontroll (PARP-2 +/+) és PARP-2 knock out (PARP-2 -/-) egerekből származó aortákon izometriás kontrakció mérést végeztük. A kontrakciós erőt mN-ban rögzítettük. A konstrikatív hatású anyagokat (KCl, 10 – 60 mM; 5-HT, 1 nM – 30 μ M; NE, 0,1 μ M – 30 μ M) kummulativ dózisban alkalmaztuk. A relaxáció vizsgálatát prekontrahált (NE, 3 μ M) ereken végeztük Ach-nal (1 μ M – 30 μ M) és SNP-vel (10 nM – 300 μ M).

Kísérleteink során nem találtunk különbséget a kezeletlen PARP-2+/+ és PARP-2-/- egerek aortáinak KCl (10 – 60 mM), 5-HT (1 nM – 30 μ M), NE (0,1 μ M – 30 μ M) válaszkészségében (2. táblázat, 15. ábra). Ugyanakkor DOX kezelés szignifikánsan csökkentette a NE, 5-HT és KCl indukálta kontrakciók mértékét PARP-2+/+ egerekben, míg a PARP-2-/- egerek részlegesen védettek voltak (15. ábra).

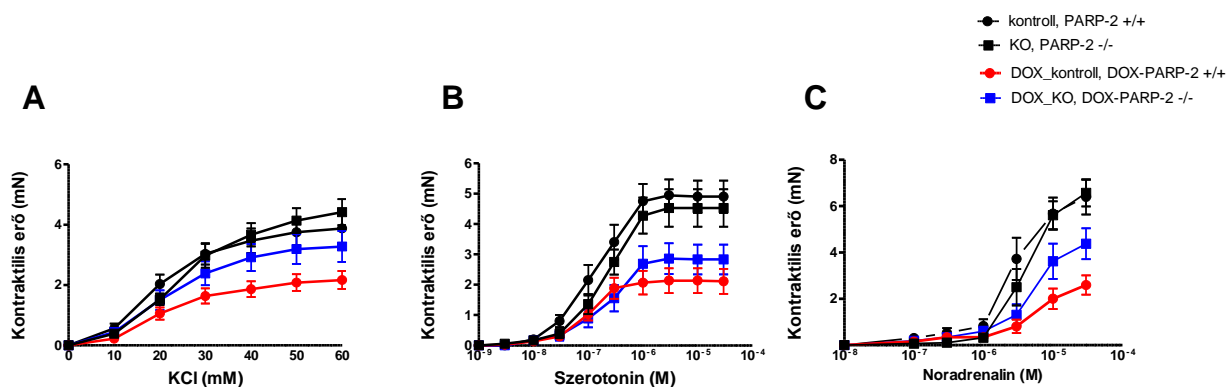
Az endothelium funkciójának vizsgálatára acetilkolint használtunk (15. ábra). A DOX kezelés hatására bekövetkező válaszkészség csökkenés egyik csoportban sem mutatott szignifikáns különbséget.

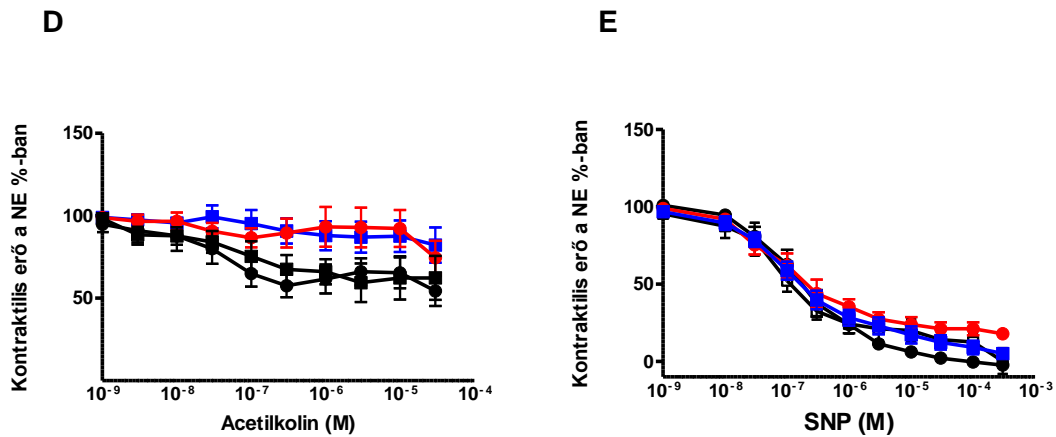
Kísérleteink során az erek dilatatív kapacitását SNP-vel vizsgáltuk (15. ábra). Az SNP kiváltotta vazorelaxációt nem befolyásolta sem a DOX kezelés, sem a PARP-2 genotípus.

	PARP-2 +/+	PARP-2 -/-	DOX PARP-2 +/+	DOX PARP-2 -/-
Noradrenalin	6,4±0,7 mN	6,6±0,6 mN	2,6±0,4 mN	4,4±0,7 mN
Szerotonin	4,9±0,5 mN	4,5±0,6 mN	2,1±0,4 mN	2,8±0,5 mN
KCl	3,9±0,5 mN	4,4±0,4 mN	2,2±0,3 mN	3,3±0,5 mN
Acetilkolin	54,4±9,0 %	62,3±13,3 %	74,6±10,2 %	82,6±10,6 %
SNP	2,2±2,7 %	5,1±3,06 %	17,0±3,5 %	0,3±8,4 %

2. táblázat A PARP-2 genetikai háttér hatása a vaszkuláris kontraktilitásra

A különböző kontraktilis (Noradrenalin, szerotonin, KCl) és dilatatív (acetilkolin, SNP) faktorkok által kiváltott maximális hatások a különböző genotípusú (PARP2^{+/+} és PARP2^{-/-}) egerek aortáiban. Az egerek kezelése oldószerrel (kontroll), illetve doxorubicinnel (DOX) történt. Az adatok átlag ± S.E.M. egységben szerepelnek, a kontraktilis válaszok esetén abszolút egységben, a dilatatív válaszok esetében a prekontrakció százalékában.





15. ábra A PARP-2 lehetséges szerepe a doxorubicin kiváltott vaszkuláris funkciózavarban

PARP-2 és vad genotípusú, PARP-2^{+/+} és PARP-2^{-/-} egereket sóoldattal (n=10 és 7, kontroll), vagy 25 mg/kg doxorubicinnal oltottuk be (n=8 mindkét esetben, DOX). Az izolált aorták kontraktilis válaszait izometriás kontraktilitás mérő rendszeren noradrenalin (NE, 0,1 – 30 μ M, A panel), szerotonin (5-HT, 1 nM – 30 μ M, B panel) és KCl (10 – 60 mM, C panel) hozzáadásával vizsgáltuk. Az endothelium funkció vizsgálata acetilkolinnal (Ach, 1 nM – 30 μ M, D panel), míg az NO válaszkészség meghatározása sodium nitroprussiddal (SNP, 10 nM – 300 μ M, E panel) történt.

5. MEGBESZÉLÉS

A 2-DM napjainkban igen jelentős népegészségügyi problémát jelent, továbbá egy megnövekedett kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással járó kór állapot (Turner és mtsai. 1998). Korábbi tanulmányunkban megállapítottuk, hogy a db/db egerekben kialakult magasvérnyomás a perifériás ellenállás fokozódásával jár, ezen hemodinamikai változások az arteriolák fokozott tónusában öltenek testet (Bagi és mtsai. 2005). Az alacsony szintű vaszkuláris gyulladás szerepét 2-DM-ben már korábban felvetették (Hsueh és Quinones 2003; Hartge és mtsai. 2007). Korábbi kutatásaink során ezzel összhangban igazoltuk, hogy a COX-2 eredetű konstriktor prosztaglandinok hozzájárulnak a fokozott vaszkuláris rezisztencia kialakításához (Bagi és mtsai. 2005). Ugyanakkor vannak olyan kutatócsoportok is, akik szerint a prosztanoidok elsődleges hatása a vérnyomás csökkentése és ezen feltevéssel összhangban van az a humán megfigyelés, mely szerint a prosztaglandin szintézis csökkentése nemszteroid gyulladáscsökkentőkkel vagy a szelektív COX-2 inhibitorokkal növeli a vérnyomást (Sowers és mtsai. 2005), míg más tanulmányok szerint a COX-2 gátlás nem emeli a vérnyomást (White és mtsai. 2002), sőt arra is vannak adatok, hogy a szelektív COX-1 gátlás csökkenti a vérnyomást (Qi és mtsai. 2002). A fennálló ellentmondások és a prosztanoid szintézis gátlásából adódó nem kívánt hatások tükrében a figyelem a prosztanoid receptorokra irányult, melyek a vaszkuláris rezisztencia és a szisztolés vérnyomás csökkentés célpontjai. Ezt alátámasztani látszik, hogy az 1-es típusú PGE₂ receptor szerepet játszhat a magas vérnyomás kialakulásában (Suganami és mtsai. 2003; Guan és mtsai. 2007).

Hipotézisünk az volt, hogy a 2-DM állatmodelljeként szolgáló db/db egerekben az 1-es típusú PGE₂ (EP1) receptor aktiváció felelős az arteriolák fokozott tónusáért, minek eredménye a magas a szisztolés vérnyomás. Ezt alátámasztotta hogy db/db egerek arterioláin mind a nyomás, mind az agonista AngII által kiváltott kontrakció nagyobb mértékű volt a kontrollhoz viszonyítva, mely fokozott tónust a szelektív EP1 receptor antagonistája AH6809 jelentősen csökkentette. Ezen eredmények felvetették annak a lehetőségét, hogy db/db egerekben az endogén PGE₂ aktiválta EP1 receptoroknak van szerepe a nyomás és agonista indukálta tónus kialakításában. Ismert, hogy a PGE₂ négy különböző G-fehérje kapcsolt receptort aktiválhat, melynek

eredményeként mind vazodilatáció (EP2 és EP4), mind vazokonstriktió (EP1 és EP3) kialakulhat (Narumiya és mtsai. 1999; Breyer és mtsai. 2001). Az exogénean adott PGE₂ hatásáról is ellentmondásos eredmények lelhetők fel az irodalomban: egyaránt leírták a rezisztencia erek tónusának csökkenését (Messina és Kaley 1980) és fokozódását (Bolla és mtsai. 2004). Saját kísérleteink során azt találtuk, hogy az exogénean alkalmazott PGE₂ és a szelektív EP1 receptor agonista 17-fenil-trinor-PGE₂ által kiváltott kontrakció szignifikánsan nagyobb volt db/db egerek izolált arterioláiban, mely kontrakció kifejlődését az EP1 receptor antagonistá AH6809 mindkét csoportban gátolta. Megfigyeléseink tehát arra utalnak, hogy az exogén PGE₂ izolált egér arteriolákon kontrakciót vált ki, továbbá hogy az emelkedő nyomás és Ang II indukálta kontrakcióban központi szerepe van az EP1 receptor fokozott érzékenységének. Az EP4 receptor mediálta válaszok lehetőségének kizárására (Breyer és mtsai. 2001) kísérleteinket elvégeztük a szelektív EP4 receptor gátló L161982 jelenlétében is mind kontroll, mind db/db egerek arterioláin. Kísérleteink eredményei arra engedtek következtetni, hogy az EP4 receptornak a PGE₂ kiváltotta válaszokban nincs vagy nagyon minimális a szerepe. 2-DM-ben a NO biológiai hozzáférhetősége csökkent, így a prosztanoidok indukálta válaszok fokozottak lehetnek (Sametz és mtsai. 1999). Ennek a hipotézisnek a vizsgálatára az NO szintézis gátló L-NAME-et használtuk és megállapítottuk, hogy a NOS gátlás sem az arteriolák tónusát, sem a PGE₂ kiváltotta kontrakciót a NOS gátlás nem befolyásolja számottevően egyik csoportban sem. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a PGE₂ indukálta válaszokhoz a NO korlátozott mértékben járul hozzá. Adataink az EP1 receptor központi szerepét támogatják, melyet western immunoblottal is igazoltunk: db/db ergerekből fokozott EP1 receptor expressziót detektáltunk. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a fokozott expresszió jelenlétének nem egyértelmű következménye a fokozott kontrakció, ugyanis az EP1 receptor jelátviteli útvonalai szintén szerepet játszhatnak a fokozott tónus kialakításában.

Az EP1 receptor aktivitása igen összetett és még nyitott kérdés a szív-érrendszeri szabályozásban. A PGE₂ aktiválta receptorok hatással lehetnek más vérnyomásszabályozó mechanizmusokra, melyek az extracelluláris folyadék térfogatát szabályozzák a vesében és fontos szerepük lehet a központi idegrendszerben is (Breyer és Breyer 2001). Bebizonyították, hogy spontán hipertenzív patkányokban és krónikus Ang II infúzió adásakor az EP1 receptor aktiválása hozzájárul a vérnyomás

emlekedéséhez (Guan és mtsai. 2007). Ehhez hasonló kísérleti elrendezésben tanulmányoztuk EP1 receptor gátlás hatását az egerek szisztémás vérnyomásra. Azt találtuk, hogy az EP1 receptor gátló kezelés jelentős csökkentést váltott ki a db/db egerek vérnyomásában, azonban a kontroll egerek vérnyomására nem volt hatással. Ezen adatok arra utalnak, hogy az EP1 receptor *in vivo* gátlása a szisztémás vérnyomás csökkenését eredményezi db/db egerekben. A PGE₂ akut, *in vivo* alkalmazásának hatására csökken a szisztémás vérnyomás (Audoly és mtsai. 1999; Zhang és mtsai. 2000), azonban ezen akut hatások nagyban függhetnek a kísérleti elrendezéstől (Armstrong és mtsai. 1976; Gerber és Nies 1979; Audoly és mtsai. 1999). Hím egerekben megfigyelték, hogy az EP1 receptor hiánya is vérnyomáscsökkenést okoz, ami arra utal, hogy az EP1 receptornak hosszú távon döntő szerepe lehet a szisztolés vérnyomás emelkedésben (Stock és mtsai. 2001). Ezzel összhangban van saját kísérletünk eredménye is, melyben az EP1 receptor gátló kezelés hatására csak a második nap után csökkent jelentősen a db/db egerek vérnyomása. Fontos megjegyezni, hogy a vérnyomásmérés adatainak további, alapos értelmezésére is szükség van a technikai korlátok (farok mandzsetta) miatt. Az EP1 receptor gátló 2-DM-ben betöltött hosszútávú, hemodinamikai hatásainak feltárása további vizsgálatokat igényel.

A DOX kezelés mind a szívet, mind az ereket károsítja (Singal és Iliskovic 1998). Az érrendszer esetében a DOX kezelés hatással van az endothelium funkciójára (Murata és mtsai. 2001), azonban nincsenek pontos adatok arra, hogy a hatás a vaszkuláris simaizmon vagy az extracelluláris mátrixban bekövetkező változások miatt alakul ki (Taga és mtsai. 1987; Dawer és mtsai. 1988; Bai és mtsai. 2004). Kísérleteink során megerősítettük a DOX kezelés hatására bekövetkező endothelium funkció romlását, de ez független volt a PARP-2-től az általunk használt kísérleti elrendezésben 2 nappal a kezelés után. Fontos megemlíteni, hogy a korai DOX kezelésnek vaszkuláris simaizom károsító hatása is lehet: az alacsony dózisú doxorubicin kezelés szignifikánsan csökkentette a patkány aorta kontraktilis válaszait (Dalske és Hardy 1988). Az SNP kiváltotta endothelium független vazorelaxációt nem befolyásolta sem a DOX kezelés, sem a PARP-2 genotípus. Eredményeink arra utalnak, hogy nincs összefüggés a csökkent acetilkolin válszok és a simaizomsejtek csökkent NO reaktivitása között. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a DOX kezelés jelentős mértékben csökkentette a KCl, a NE és 5-HT indukálta kontrakciók nagyságát PARP-2+/+

egerekben, míg a PARP-2^{-/-} egerek részlegesen védettek voltak a DOX okozta vaszkuláris hatásokkal szemben. Eredményeink azt sugallják, hogy DOX kezelés hatására létrejövő simaizom funkció romlása PARP-2 függő folyamat.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban kimutattuk, hogy az 1-es típusú prosztaglandin E2 receptor (EP1R) upregulációja hozzájárul a fokozott tónus kialakulásához nyomás emelkedés és Ang II hatására db/db egerekben. Ezen megállapításaink felvetik az EP1R gátlás terápiáját a 2-es típusú diabeteshez kapcsolódó mikorvaszkuláris vazomotor diszfunkció és a magas vérnyomás kezelésében.

Kimutattuk, hogy a PARP-2 deléció véd a DOX okozta vaszkuláris károsodás ellen, így eredményeink felvetik a PARP-2 farmakológiai gátlásának hatásosságát a doxorubicin által kiváltott kardiovaszkuláris mellékhatások megelőzésében.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Alberti, K. G., P. Zimmet and J. Shaw (2005). "The metabolic syndrome--a new worldwide definition." Lancet **366**(9491): 1059-62.
- Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." Diabet Med **15**(7): 539-53.
- Ame, J. C., V. Rolli, V. Schreiber, C. Niedergang, F. Apiou, P. Decker, S. Muller, T. Hoger, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia (1999). "PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase." J Biol Chem **274**(25): 17860-8.
- Arima, S., Y. Ren, L. A. Juncos, O. A. Carretero and S. Ito (1994). "Glomerular prostaglandins modulate vascular reactivity of the downstream efferent arterioles." Kidney Int **45**(3): 650-8.
- Armstrong, J. M., A. L. Boura, M. Hamberg and B. Samuelsson (1976). "A comparison of the vasodepressor effects of the cyclic effects of the cyclic endoperoxides PGG₂ and PGH₂ with those of PGD₂ and PGE₂ in hypertensive and normotensive rats." Eur J Pharmacol **39**(2): 251-8.
- Audoly, L. P., S. L. Tilley, J. Goulet, M. Key, M. Nguyen, J. L. Stock, J. D. McNeish, B. H. Koller and T. M. Coffman (1999). "Identification of specific EP receptors responsible for the hemodynamic effects of PGE₂." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): H924-30.
- Aviram, M., M. Rosenblat, A. Etzioni and R. Levy (1996). "Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein." Metabolism **45**(9): 1069-79.
- Awad, A. S., R. L. Webb, R. M. Carey and H. M. Siragy (2004). "Renal nitric oxide production is decreased in diabetic rats and improved by AT1 receptor blockade." J Hypertens **22**(8): 1571-7.
- Bagi, Z., N. Erdei, A. Toth, W. Li, T. H. Hintze, A. Koller and G. Kaley (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**(8): 1610-6.

- Bagi, Z., A. Koller and G. Kaley (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): H1404-10.
- Bai, P., J. G. Mabley, L. Liaudet, L. Virag, C. Szabo and P. Pacher (2004). "Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity." Oncol Rep **11**(2): 505-8.
- Batenburg, W. W., I. M. Garrelds, C. C. Bernasconi, L. Juillerat-Jeanneret, J. P. van Kats, P. R. Saxena and A. H. Danser (2004). "Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries." Circulation **109**(19): 2296-301.
- Baynes, J. W. (1991). "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes." Diabetes **40**(4): 405-12.
- Beckman, J. A., M. A. Creager and P. Libby (2002). "Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management." JAMA **287**(19): 2570-81.
- Bolla, M., D. You, L. Loufrani, B. I. Levy, S. Levy-Toledano, A. Habib and D. Henrion (2004). "Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries." Hypertension **43**(6): 1264-9.
- Bos, C. L., D. J. Richel, T. Ritsema, M. P. Peppelenbosch and H. H. Versteeg (2004). "Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction." Int J Biochem Cell Biol **36**(7): 1187-205.
- Breyer, M. D. and R. M. Breyer (2001). "G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney." Annu Rev Physiol **63**: 579-605.
- Breyer, R. M., C. K. Bagdassarian, S. A. Myers and M. D. Breyer (2001). "Prostanoid receptors: subtypes and signaling." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 661-90.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-4.
- Cardillo, C., C. M. Kilcoyne, R. O. Cannon, 3rd, A. A. Quyyumi and J. A. Panza (1997). "Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients." Hypertension **30**(1 Pt 1): 57-63.
- Chappell, M. C., N. T. Pirro, A. Sykes and C. M. Ferrario (1998). "Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme." Hypertension **31**(1 Pt 2):

362-7.

- Chuang, R. Y. and L. F. Chuang (1979). "Inhibition of chicken myeloblastosis RNA polymerase II activity by adriamycin." Biochemistry **18**(10): 2069-73.
- Clarkson, P., D. S. Celermajer, A. E. Donald, M. Sampson, K. E. Sorensen, M. Adams, D. K. Yue, D. J. Betteridge and J. E. Deanfield (1996). "Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels." J Am Coll Cardiol **28**(3): 573-9.
- Cosentino, F. and T. F. Luscher (1998). "Tetrahydrobiopterin and endothelial function." Eur Heart J **19 Suppl G**: G3-8.
- Cox, D. A., J. A. Vita, C. B. Treasure, R. D. Fish, R. W. Alexander, P. Ganz and A. P. Selwyn (1989). "Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans." Circulation **80**(3): 458-65.
- Craven, P. A., M. A. Caines and F. R. DeRubertis (1987). "Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: relationship to the hyperfiltration of early diabetes." Metabolism **36**(1): 95-103.
- Craven, P. A., C. M. Davidson and F. R. DeRubertis (1990). "Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids." Diabetes **39**(6): 667-74.
- Crofford, L. J., R. L. Wilder, A. P. Ristimaki, H. Sano, E. F. Remmers, H. R. Epps and T. Hla (1994). "Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids." J Clin Invest **93**(3): 1095-101.
- D'Orleans-Juste, P., J. Labonte, G. Bkaily, S. Choufani, M. Plante and J. C. Honore (2002). "Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology." Pharmacol Ther **95**(3): 221-38.
- Da Ros, R., R. Assaloni and A. Ceriello (2004). "Antioxidant therapy in diabetic complications: what is new?" Curr Vasc Pharmacol **2**(4): 335-41.
- Dalske, H. F. and K. Hardy (1988). "Effect of low-dose doxorubicin on calcium content and norepinephrine response in rat aorta." Eur J Cancer Clin Oncol **24**(6): 979-83.
- Davies, K. J. and J. H. Doroshov (1986). "Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase." J

Biol Chem **261**(7): 3060-7.

- Dawer, S. P., T. Featherstone, M. A. Ratcliffe, J. Weir, A. A. Dawson, B. Bennett and J. M. Rawles (1988). "Accelerated increase in aortic diameter in patients treated for lymphoma." Heart Vessels **4**(4): 237-40.
- De Vriese, A. S., T. J. Verbeuren, J. Van de Voorde, N. H. Lameire and P. M. Vanhoutte (2000). "Endothelial dysfunction in diabetes." Br J Pharmacol **130**(5): 963-74.
- Ditzel, J. and M. Schwartz (1967). "Abnormally increased glomerular filtration rate in short-term insulin-treated diabetic subjects." Diabetes **16**(4): 264-7.
- Ferrans, V. J., J. R. Clark, J. Zhang, Z. X. Yu and E. H. Herman (1997). "Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy." Tsitologiya **39**(10): 928-37.
- FitzGerald, G. A. and C. Patrono (2001). "The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2." N Engl J Med **345**(6): 433-42.
- FitzGerald, G. A., A. K. Pedersen and C. Patrono (1983). "Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease." Circulation **67**(6): 1174-7.
- Freiman, P. C., G. G. Mitchell, D. D. Heistad, M. L. Armstrong and D. G. Harrison (1986). "Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates." Circ Res **58**(6): 783-9.
- Fuller, J. H., M. J. Shipley, G. Rose, R. J. Jarrett and H. Keen (1980). "Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study." Lancet **1**(8183): 1373-6.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Gerber, J. G. and A. S. Nies (1979). "The hemodynamic effects of prostaglandins in the rat. Evidence for important species variation in renovascular responses." Circ Res **44**(3): 406-10.
- Giacchetti, G., L. A. Sechi, S. Rilli and R. M. Carey (2005). "The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes." Trends Endocrinol Metab **16**(3): 120-6.
- Goldblatt, M. W. (1935). "Properties of human seminal plasma." J Physiol **84**(2): 208-18.

- Guan, Y., Y. Zhang, J. Wu, Z. Qi, G. Yang, D. Dou, Y. Gao, L. Chen, X. Zhang, L. S. Davis, M. Wei, X. Fan, M. Carmosino, C. Hao, J. D. Imig, R. M. Breyer and M. D. Breyer (2007). "Antihypertensive effects of selective prostaglandin E2 receptor subtype 1 targeting." J Clin Invest **117**(9): 2496-505.
- Haneda, M., S. Araki, M. Togawa, T. Sugimoto, M. Isono and R. Kikkawa (1997). "Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions." Diabetes **46**(5): 847-53.
- Harris, R. C., J. A. McKanna, Y. Akai, H. R. Jacobson, R. N. Dubois and M. D. Breyer (1994). "Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction." J Clin Invest **94**(6): 2504-10.
- Harrison, D. G. (1997). "Endothelial function and oxidant stress." Clin Cardiol **20**(11 Suppl 2): II-11-7.
- Hartge, M. M., T. Unger and U. Kintscher (2007). "The endothelium and vascular inflammation in diabetes." Diab Vasc Dis Res **4**(2): 84-8.
- Hayama, M., S. Akiba, M. Fukuzumi and T. Sato (1997). "High glucose-induced cytosolic phospholipase A2 activation responsible for eicosanoid production in rat mesangial cells." J Biochem **122**(6): 1196-201.
- Hazen, S. L. (2000). "Oxidation and atherosclerosis." Free Radic Biol Med **28**(12): 1683-4.
- Helmersson, J., B. Vessby, A. Larsson and S. Basu (2004). "Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population." Circulation **109**(14): 1729-34.
- Henriksen, E. J., S. Jacob, T. R. Kinnick, M. K. Teachey and M. Krekler (2001). "Selective angiotensin II receptor antagonist reduces insulin resistance in obese Zucker rats." Hypertension **38**(4): 884-90.
- Heygate, K. M., I. G. Lawrence, M. A. Bennett and H. Thurston (1995). "Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats." Br J Pharmacol **116**(8): 3251-9.
- Hill, M. A. and E. A. Ege (1994). "Active and passive mechanical properties of isolated arterioles from STZ-induced diabetic rats. Effect of aminoguanidine treatment." Diabetes **43**(12): 1450-6.

- Hill, M. A. and G. A. Meininger (1993). "Impaired arteriolar myogenic reactivity in early experimental diabetes." Diabetes **42**(9): 1226-32.
- Hostetter, T. H., J. L. Troy and B. M. Brenner (1981). "Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus." Kidney Int **19**(3): 410-5.
- Hsueh, W. A. and M. J. Quinones (2003). "Role of endothelial dysfunction in insulin resistance." Am J Cardiol **92**(4A): 10J-17J.
- Hummel, K. P., M. M. Dickie and D. L. Coleman (1966). "Diabetes, a new mutation in the mouse." Science **153**(740): 1127-8.
- Iglarz, M. and E. L. Schiffrin (2003). "Role of endothelin-1 in hypertension." Curr Hypertens Rep **5**(2): 144-8.
- Inazu, M., Y. Sakai and I. Homma (1991). "Contractile responses and calcium mobilization in renal arteries of diabetic rats." Eur J Pharmacol **203**(1): 79-84.
- Jansson, P. A. (2007). "Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes." J Intern Med **262**(2): 173-83.
- Kalivendi, S. V., S. Kotamraju, H. Zhao, J. Joseph and B. Kalyanaraman (2001). "Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium." J Biol Chem **276**(50): 47266-76.
- Kanmura, Y., L. Raeymaekers and R. Casteels (1989). "Effects of doxorubicin and ruthenium red on intracellular Ca²⁺ stores in skinned rabbit mesenteric smooth-muscle fibres." Cell Calcium **10**(6): 433-9.
- Kannel, W. B. and D. L. McGee (1979). "Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study." JAMA **241**(19): 2035-8.
- Klatt, P., B. Heinzl, B. Mayer, E. Ambach, G. Werner-Felmayer, H. Wachter and E. R. Werner (1992). "Stimulation of human nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and selective binding of the cofactor." FEBS Lett **305**(2): 160-2.
- Kofler, J., T. Otsuka, Z. Zhang, R. Noppens, M. R. Grafe, D. W. Koh, V. L. Dawson, J. M. de Murcia, P. D. Hurn and R. J. Traystman (2006). "Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **26**(1): 135-41.
- Kojda, G., J. B. Laursen, S. Ramasamy, J. D. Kent, S. Kurz, J. Burchfield, E. G. Shesely

- and D. G. Harrison (1999). "Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control." Cardiovasc Res **42**(1): 206-13.
- Koller, A. (2002). "Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension." Microcirculation **9**(4): 277-94.
- Koller, A. and G. Kaley (1989). "Flow velocity-dependent regulation of microvascular resistance in vivo." Microcirc Endothelium Lymphatics **5**(6): 519-29.
- Koller, A. and G. Kaley (1991). "A new role for prostaglandins in the regulation of peripheral resistance." Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res **21B**: 595-8.
- Koller, A. and G. Kaley (1998). "Shear stress-induced dilation of arterioles." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): H382-3.
- Koller, A., D. Sun, A. Huang and G. Kaley (1994). "Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles." Am J Physiol **267**(1 Pt 2): H326-32.
- Koya, D. and G. L. King (1998). "Protein kinase C activation and the development of diabetic complications." Diabetes **47**(6): 859-66.
- Kunsch, C. and R. M. Medford (1999). "Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature." Circ Res **85**(8): 753-66.
- Kuo, L., W. M. Chilian and M. J. Davis (1991). "Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels." Am J Physiol **261**(6 Pt 2): H1706-15.
- Lagaud, G. J., E. Masih-Khan, S. Kai, C. van Breemen and G. P. Dube (2001). "Influence of type II diabetes on arterial tone and endothelial function in murine mesenteric resistance arteries." J Vasc Res **38**(6): 578-89.
- Lee, T. S., K. A. Saltsman, H. Ohashi and G. L. King (1989). "Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5141-5.
- Libby, P., P. M. Ridker and A. Maseri (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105**(9): 1135-43.

- Lum, H. and K. A. Roebuck (2001). "Oxidant stress and endothelial cell dysfunction." Am J Physiol Cell Physiol **280**(4): C719-41.
- Makimattila, S., M. L. Liu, J. Vakkilainen, A. Schlenzka, S. Lahdenpera, M. Syvanne, M. Mantysaari, P. Summanen, R. Bergholm, M. R. Taskinen and H. Yki-Jarvinen (1999). "Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants." Diabetes Care **22**(6): 973-81.
- Matsuoka, H. (2001). "Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human." Diabetes Res Clin Pract **54 Suppl 2**: S65-72.
- McAdam, B. F., F. Catella-Lawson, I. A. Mardini, S. Kapoor, J. A. Lawson and G. A. FitzGerald (1999). "Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 272-7.
- McClain, D. A., A. J. Paterson, M. D. Roos, X. Wei and J. E. Kudlow (1992). "Glucose and glucosamine regulate growth factor gene expression in vascular smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8150-4.
- Messina, E. J. and G. Kaley (1980). "Microcirculatory responses to prostacyclin and PGE2 in the rat cremaster muscle." Adv Prostaglandin Thromboxane Res **7**: 719-22.
- Michel, T. and O. Feron (1997). "Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?" J Clin Invest **100**(9): 2146-52.
- Mohazzab, K. M. and M. S. Wolin (1994). "Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle." Am J Physiol **267**(6 Pt 1): L815-22.
- Mugge, A., J. H. Elwell, T. E. Peterson, T. G. Hofmeyer, D. D. Heistad and D. G. Harrison (1991). "Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits." Circ Res **69**(5): 1293-300.
- Muller, I., A. Jenner, G. Bruchelt, D. Niethammer and B. Halliwell (1997). "Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage." Biochem Biophys Res Commun **230**(2): 254-7.
- Murata, T., H. Yamawaki, M. Hori, K. Sato, H. Ozaki and H. Karaki (2001). "Chronic

- vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery." Br J Pharmacol **132**(7): 1365-73.
- Nakazono, K., N. Watanabe, K. Matsuno, J. Sasaki, T. Sato and M. Inoue (1991). "Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?" Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10045-8.
- Narumiya, S., Y. Sugimoto and F. Ushikubi (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." Physiol Rev **79**(4): 1193-226.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, X. L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M. A. Yorek, D. Beebe, P. J. Oates, H. P. Hammes, I. Giardino and M. Brownlee (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." Nature **404**(6779): 787-90.
- Ohara, Y., T. E. Peterson and D. G. Harrison (1993). "Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production." J Clin Invest **91**(6): 2546-51.
- Pacher, P., L. Liaudet, P. Bai, L. Virag, J. G. Mabley, G. Hasko and C. Szabo (2002). "Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 862-7.
- Palmer, A. M., N. Gopaul, S. Dhir, C. R. Thomas, L. Poston and R. M. Tribe (1998). "Endothelial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats is not reversed by dietary probucol or simvastatin supplementation." Diabetologia **41**(2): 157-64.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-6.
- Patterson, C., J. Ruef, N. R. Madamanchi, P. Barry-Lane, Z. Hu, C. Horaist, C. A. Ballinger, A. R. Brasier, C. Bode and M. S. Runge (1999). "Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo." J Biol Chem **274**(28): 19814-22.
- Perkins, W. J. (2006). "Regulation of soluble guanylyl cyclase: looking beyond NO." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(3): L334-6.
- Qi, Z., C. M. Hao, R. I. Langenbach, R. M. Breyer, R. Redha, J. D. Morrow and M. D. Breyer (2002). "Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II." J Clin Invest **110**(1): 61-9.

- Re, R. N. (2004). "Tissue renin angiotensin systems." Med Clin North Am **88**(1): 19-38.
- Sametz, W., S. Prasthofer, R. Wintersteiger and H. Juan (1999). "Vascular effects of isoprostanes after endothelial damage." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **61**(6): 369-72.
- Sano, H., T. Hla, J. A. Maier, L. J. Crofford, J. P. Case, T. Maciag and R. L. Wilder (1992). "In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis." J Clin Invest **89**(1): 97-108.
- Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, C. Maric, D. M. Silva, R. P. Machado, I. de Buhr, S. Heringer-Walther, S. V. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, E. P. Mendes, V. S. Lemos, M. J. Campagnole-Santos, H. P. Schultheiss, R. Speth and T. Walther (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8258-63.
- Sausbier, M., R. Schubert, V. Voigt, C. Hirneiss, A. Pfeifer, M. Korth, T. Kleppisch, P. Ruth and F. Hofmann (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." Circ Res **87**(9): 825-30.
- Schambelan, M., S. Blake, J. Sraer, M. Bens, M. P. Nivez and F. Wahbe (1985). "Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus." J Clin Invest **75**(2): 404-12.
- Schonbeck, U., G. K. Sukhova, P. Graber, S. Coulter and P. Libby (1999). "Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions." Am J Pathol **155**(4): 1281-91.
- Schraufstatter, I. U., D. B. Hinshaw, P. A. Hyslop, R. G. Spragg and C. G. Cochrane (1986). "Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide." J Clin Invest **77**(4): 1312-20.
- Schreiber, V., F. Dantzer, J. C. Ame and G. de Murcia (2006). "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 517-28.
- Sellke, F. W., M. L. Armstrong and D. G. Harrison (1990). "Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates." Circulation **81**(5): 1586-93.
- Shinozaki, K., K. Ayajiki, Y. Nishio, T. Sugaya, A. Kashiwagi and T. Okamura (2004).

- "Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance." Hypertension **43**(2): 255-62.
- Singal, P. K. and N. Iliskovic (1998). "Doxorubicin-induced cardiomyopathy." N Engl J Med **339**(13): 900-5.
- Singh, R., N. Alavi, A. K. Singh and D. J. Leehey (1999). "Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation." Diabetes **48**(10): 2066-73.
- Siragy, H. M. and R. M. Carey (1997). "The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats." J Clin Invest **100**(2): 264-9.
- Sirois, J. and J. S. Richards (1992). "Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles." J Biol Chem **267**(9): 6382-8.
- Sowers, J. R., M. Epstein and E. D. Frohlich (2001). "Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update." Hypertension **37**(4): 1053-9.
- Sowers, J. R., W. B. White, B. Pitt, A. Whelton, L. S. Simon, N. Winer, A. Kivitz, H. van Ingen, T. Brabant and J. G. Fort (2005). "The Effects of cyclooxygenase-2 inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory therapy on 24-hour blood pressure in patients with hypertension, osteoarthritis, and type 2 diabetes mellitus." Arch Intern Med **165**(2): 161-8.
- Stehouwer, C. D., J. Lambert, A. J. Donker and V. W. van Hinsbergh (1997). "Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy." Cardiovasc Res **34**(1): 55-68.
- Stock, J. L., K. Shinjo, J. Burkhardt, M. Roach, K. Taniguchi, T. Ishikawa, H. S. Kim, P. J. Flannery, T. M. Coffman, J. D. McNeish and L. P. Audoly (2001). "The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure." J Clin Invest **107**(3): 325-31.
- Suganami, T., K. Mori, I. Tanaka, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Makino, S. Muro, K. Yahata, S. Ohuchida, T. Maruyama, S. Narumiya and K. Nakao (2003). "Role of prostaglandin E receptor EP1 subtype in the development of renal injury in genetically hypertensive rats." Hypertension **42**(6): 1183-90.

- Sun, D., G. Kaley and A. Koller (1994). "Characteristics and origin of myogenic response in isolated gracilis muscle arterioles." Am J Physiol **266**(3 Pt 2): H1177-83.
- Suzuki, H., F. A. DeLano, D. A. Parks, N. Jamshidi, D. N. Granger, H. Ishii, M. Suematsu, B. W. Zweifach and G. W. Schmid-Schonbein (1998). "Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4754-9.
- Szabo, C. and V. L. Dawson (1998). "Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion." Trends Pharmacol Sci **19**(7): 287-98.
- Taga, I., K. Yamamoto, H. Kawai, H. Kawabata, K. Masada and Y. Tsuyuguchi (1987). "The effects of intra-arterially injected adriamycin on microvascular anastomosis." J Reconstr Microsurg **3**(2): 153-8.
- Takemoto, M., K. Yokote, M. Yamazaki, A. L. Ridall, W. T. Butler, T. Matsumoto, K. Tamura, Y. Saito and S. Mori (1999). "Enhanced expression of osteopontin by high glucose in cultured rat aortic smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **258**(3): 722-6.
- Tam, E. S., D. G. Ferguson, D. R. Bielefeld, J. N. Lorenz, R. M. Cohen and R. Y. Pun (1997). "Norepinephrine-mediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat." Cell Calcium **21**(2): 143-50.
- Tang, E. H., B. L. Jensen, O. Skott, G. P. Leung, M. Feletou, R. Y. Man and P. M. Vanhoutte (2008). "The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E2 in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats." Cardiovasc Res **78**(1): 130-8.
- Tetsuka, T., D. Daphna-Iken, B. W. Miller, Z. Guan, L. D. Baier and A. R. Morrison (1996). "Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells." J Clin Invest **97**(9): 2051-6.
- Topper, J. N., J. Cai, D. Falb and M. A. Gimbrone, Jr. (1996). "Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10417-22.
- Tsutsumi, Y., H. Matsubara, H. Masaki, H. Kurihara, S. Murasawa, S. Takai, M.

- Miyazaki, Y. Nozawa, R. Ozono, K. Nakagawa, T. Miwa, N. Kawada, Y. Mori, Y. Shibasaki, Y. Tanaka, S. Fujiyama, Y. Koyama, A. Fujiyama, H. Takahashi and T. Iwasaka (1999). "Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation." J Clin Invest **104**(7): 925-35.
- Turner, R. C., H. Millns, H. A. Neil, I. M. Stratton, S. E. Manley, D. R. Matthews and R. R. Holman (1998). "Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23)." BMJ **316**(7134): 823-8.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo and K. A. Pritchard, Jr. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9220-5.
- Vasquez-Vivar, J., P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, K. A. Pritchard, Jr. and B. Kalyanaraman (1997). "Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin." Biochemistry **36**(38): 11293-7.
- Vehkavaara, S., A. Seppala-Lindroos, J. Westerbacka, P. H. Groop and H. Yki-Jarvinen (1999). "In vivo endothelial dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose." Diabetes Care **22**(12): 2055-60.
- White, R. E. and G. O. Carrier (1988). "Enhanced vascular alpha-adrenergic neuroeffector system in diabetes: importance of calcium." Am J Physiol **255**(5 Pt 2): H1036-42.
- White, W. B., J. Kent, A. Taylor, K. M. Verburg, J. B. Lefkowitz and A. Whelton (2002). "Effects of celecoxib on ambulatory blood pressure in hypertensive patients on ACE inhibitors." Hypertension **39**(4): 929-34.
- Widdop, R. E., K. Matrougui, B. I. Levy and D. Henrion (2002). "AT2 receptor-mediated relaxation is preserved after long-term AT1 receptor blockade." Hypertension **40**(4): 516-20.
- Williams, B. and R. W. Schrier (1992). "Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells." Diabetes

41(11): 1464-72.

- Williams, B. and R. W. Schrier (1993). "Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells." J Clin Invest **92**(6): 2889-96.
- Williamson, J. R., K. Chang, M. Frangos, K. S. Hasan, Y. Ido, T. Kawamura, J. R. Nyengaard, M. van den Enden, C. Kilo and R. G. Tilton (1993). "Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications." Diabetes **42**(6): 801-13.
- Wolf, M. B. and J. W. Baynes (2006). "The anti-cancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction." Biochim Biophys Acta **1760**(2): 267-71.
- Wolin, M. S. (2000). "Interactions of oxidants with vascular signaling systems." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(6): 1430-42.
- Wu, K. K. (1996). "Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiologic roles." J Lab Clin Med **128**(3): 242-5.
- Xia, P., R. M. Kramer and G. L. King (1995). "Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2." J Clin Invest **96**(2): 733-40.
- Yamamoto, H., C. Bossaller, J. Cartwright, Jr. and P. D. Henry (1988). "Videomicroscopic demonstration of defective cholinergic arteriolar vasodilation in atherosclerotic rabbit." J Clin Invest **81**(6): 1752-8.
- Zhang, Y., Y. Guan, A. Schneider, S. Brandon, R. M. Breyer and M. D. Breyer (2000). "Characterization of murine vasopressor and vasodepressor prostaglandin E(2) receptors." Hypertension **35**(5): 1129-34.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Kardiológiai Intézet és Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak, kiemelten Prof. Dr. Édes István Intézet Igazgató Úrnak és Prof. Dr. Papp Zoltánnak, hogy a Debreceni Egyetem keretén belül végzett munkámat mindenkoron támogatták és segítették tudományos kutatásaimat.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Bagi Zsoltnak és az Orvosi Vegytani Intézet munkatársainak, kiemelten Dr. Bay Péternek és Dr. Szántó Magdolnának, a tudományos munkámban nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Czikora Ágnesnek és Fülöp Gábor Áronnak a mindenkori támogatásukért és segítségükért.

Külön köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Tóth Attilának a munkámhoz nyújtott pótolhatatlan segítségéért, támogatásáért és építő jellegű kritikáiért, melyek hozzájárultak a fejlődésemhez.

9. FÜGGELÉK

A függelék az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények különlenyomatait tartalmazza. Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

Iktatószám: DEENKÉTK /285/2011.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Rutkai Ibolya

Neptun kód: HDBA73

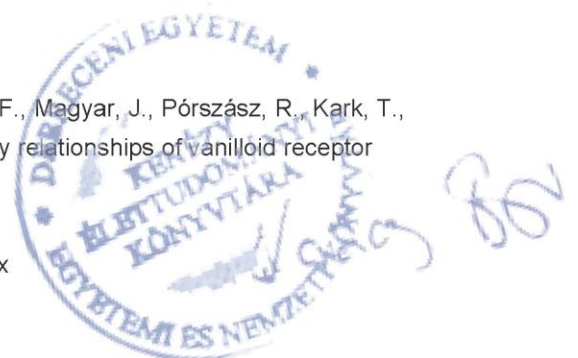
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szántó, M., **Rutkai, I.**, Hegedűs, C., Czikora, Á., Rózsahegyi, M., Kiss, B., Virág, L., Gergely, P., Tóth, A., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction.
Cardiovasc. Res. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr246>
IF:6.051 (2010)
2. **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

További Közlemények

3. Czikora, Á., Lizanecz, E., Bakó, P., **Rutkai, I.**, Ruzsnavszky, F., Magyar, J., Pórszász, R., Kark, T., Facskó, A., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1.
Br. J. Pharmacol. Epub ahead of Print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01645.x>
IF:4.925 (2010)



4. Fehér, A., **Rutkai, I.**, Beleznai, T., Ungvári, Z., Csiszár, A., Édes, I., Bagi, Z.: Caveolin-1 limits the contribution of BK(Ca) channel to EDHF-mediated arteriolar dilation: implications in diet-induced obesity.
Cardiovasc. Res. 87 (4), 732-739, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvq088>
IF:6.051
5. Jebelovszki, É., Király, C., Erdei, N., Fehér, A., Páztorné Tóth, E., **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

Összesített impakt faktor: 26,471

Összesített impakt faktor (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 11,852

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

Debrecen, 2011.11.16





Activation of prostaglandin E₂ EP1 receptor increases arteriolar tone and blood pressure in mice with type 2 diabetes

Ibolya Rutkai¹, Attila Feher¹, Nora Erdei¹, Daniel Henrion², Zoltan Papp¹, Istvan Edes¹, Akos Koller^{3,4}, Gabor Kaley³, and Zsolt Bagi^{1,3*}

¹Division of Clinical Physiology, Institute of Cardiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; ²University of Angers, CNRS UMR 6214, INSERM U771, Angers 49045, France; ³Department of Physiology, New York Medical College, Valhalla, NY 10595, USA; and ⁴Department of Pathophysiology and Gerontology, University of Pecs, Pecs, Hungary

Received 11 June 2008; revised 25 February 2009; accepted 17 March 2009; online publish-ahead-of-print 19 March 2009

Time for primary review: 31 days

KEYWORDS

Diabetes;
Hypertension;
Arteriole;
Prostanoid;
EP receptor

Aims Type 2 diabetes mellitus is frequently associated with hypertension, but the underlying mechanisms are not completely understood. We tested the hypothesis that activation of type 1 prostaglandin E₂ (PGE₂) receptor (EP1) increases skeletal muscle arteriolar tone and blood pressure in mice with type 2 diabetes.

Methods and results In 12-week-old, male db/db mice (with homozygote mutation in leptin receptor), systolic blood pressure was significantly elevated, compared with control heterozygotes. Isolated, pressurized gracilis muscle arterioles (~90 µm) of db/db mice exhibited an enhanced pressure- and angiotensin II (0.1–10 nM)-induced tone, which was reduced by the selective EP1 receptor antagonist, AH6809 (10 µM), to the level observed in arterioles of control mice. Exogenous application of PGE₂ (10 pM–100 nM) or the selective agonist of the EP1 receptor, 17-phenyl-trinor-PGE₂ (10 pM–100 nM), elicited arteriolar constrictions that were significantly enhanced in db/db mice (max: 31 ± 4 and 29 ± 5%), compared with controls (max: 20 ± 2 and 14 ± 3%, respectively). In the aorta of db/db mice, an increased protein expression of EP1, but not EP4, receptor was also detected by western immunoblotting. Moreover, we found that oral administration of the EP1 receptor antagonist, AH6809 (10 mg/kg/day, for 4 days), significantly reduced the systolic blood pressure in db/db, but not in control mice.

Conclusion Activation of EP1 receptors increases arteriolar tone, which could contribute to the development of hypertension in the db/db mice.

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus is frequently associated with hypertension, but the inter-relationship and the underlying mechanisms are not completely understood, so that effective preventive therapeutic strategies cannot be adopted.^{1,2} It is known that many forms of hypertension are characterized by an augmented functional constriction of resistance arteries, which may contribute to the increased peripheral resistance and elevation in systemic blood pressure.^{3–7} Similarly, in type 2 diabetes mellitus, an enhanced myogenic tone and agonist-induced constriction of resistance arteries have been described in humans⁸ and in animal models of type 2 diabetes.^{9,10} In this context, we have shown previously that mice with type 2 diabetes (db/db mice with homozygous mutation of leptin receptor) exhibit an

enhanced arteriolar tone of skeletal muscle resistance arteries, an alteration, which was found to be associated with elevated blood pressure of these animals.¹¹ A previous study by Lagaud *et al.* indicated that in db/db mice, basal- and agonist-stimulated NO release is reduced in mesenteric arterioles, similar to our findings showing a diminished contribution of NO to flow-mediated dilations of coronary arterioles of db/db mice.^{12,13} Interestingly, Lagaud *et al.*⁹ also found that arteriolar relaxation was countered by an endogenous production of vasoconstrictor prostanoids. Motivated by this observation, we have recently demonstrated that the enhanced release of constrictor prostaglandins can be specifically attributed to the increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the vascular wall of db/db mice.¹¹ These and other observations¹⁴ indicated that COX-2-derived constrictor prostanoids have a pivotal role in increasing arteriolar tone in type 2 diabetic mice. However, little is yet known about the nature of COX-2-derived constrictor prostanoids and how

* Corresponding author. Tel: +1 914 594 4085; Fax: +1 914 594 4018.
E-mail address: zsolt_bagi@nyc.edu

they increase the arteriolar tone and agonist-induced constriction in type 2 diabetes.

Previous studies have found that the induction of COX-2 in vascular smooth muscle cells is associated primarily with an enhanced production of prostaglandin E₂ (PGE₂).^{15,16} These findings were further supported by the observations showing that COX-2 is coupled to and compartmentalized with PGE₂ synthase.^{17,18} It is known that PGE₂ can cause either vasodilatation, via activating EP2/EP4 receptors, or vasoconstriction, via activating EP1/EP3 receptors.¹⁹ Thus, either a diminished EP2/EP4 receptor-mediated vasodilatation or an augmented EP1/EP3 receptor signalling may be responsible for an enhanced vascular tone. This latter scenario seems to be supported by a recent study, in which a crucial role for vasoconstrictor EP1 receptor activation has been demonstrated, contributing to the increased angiotensin II (Ang II)-induced vasoconstriction and elevation of systemic blood pressure in spontaneously hypertensive rats.²⁰ In addition, PGE₂, via primarily activating EP1 receptors, has been shown to play a key role in the development of hypertensive renal disease.²¹

These aforementioned studies prompted us to test the specific hypothesis that EP1 receptor activation plays a pivotal role in the augmentation of arteriolar tone and consequently, elevation of systemic blood pressure in type 2 diabetes mellitus. This idea has not yet been tested in subjects with type 2 diabetes. Thus, in the present study, we set out to characterize the contribution of EP1 receptors to the augmented pressure- and agonist (Ang II)-induced constriction of resistance arteries, as well as its impact on systemic blood pressure in a mouse model of type 2 diabetes, db/db mice.

2. Methods

2.1 Animals and experimental procedures

In the experiments, a well-characterized mouse model of the human type 2 diabetes was used (db/db mouse with homozygote mutation in leptin receptor).^{11–13} A 12-week-old, male db/db (C57BL/KsJ-db⁻/db⁻) and heterozygous (C57BL/KsJ-db⁺/db⁻) mice were fed standard chow and had free access to water. All protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. 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). Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg). Under anaesthesia, the gracilis muscle was excised and placed in ice-cold and oxygenated Krebs solution. Euthanasia was then performed by additional intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (150 mg/kg), and the aorta of mice was excised.

2.2 Isolation of skeletal (gracilis) muscle arteriole

Microsurgery instruments and an operating microscope were used for the isolation of a gracilis muscle arteriole (~0.5 μm in length) running intramuscularly. The arteriole was isolated and transferred into an organ chamber containing two glass micropipettes filled with Krebs solution composed of (in mmol/L): 110 NaCl, 5.0 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.0 MgSO₄, 1.0 KH₂PO₄, 5.0 glucose, and 24.0 NaHCO₃ equilibrated with a

gas mixture of 10% O₂ and 5% CO₂, balanced with nitrogen, at pH 7.4. Vessels were cannulated on both ends, and micropipettes were connected with silicone tubing to a pressure servo control system (Living Systems Instrumentation, VT, USA). Temperature was set at 37°C by a temperature controller. Changes in arteriolar diameter were continuously measured with a videomicroscope system (Nikon Eclipse 80i, CCD camera, frame grabber, National Instruments, PCI 1405).

2.3 Experimental protocols

After a 1 h incubation period, spontaneous basal arteriolar tone developed in response to 80 mmHg intraluminal pressure, without the use of any constrictor agent. Then, changes in the diameter of arterioles were measured in response to step increases in intraluminal pressure from 20 to 120 mmHg. Arterioles were incubated with the EP1 receptor antagonist, AH6809 (10 μM for 30 min), and pressure-induced diameter changes were reassessed. To obtain the passive arteriolar characteristics, pressure-induced arteriolar responses were measured in the presence of Ca²⁺-free Krebs solution. Normalized arteriolar diameter (in Ca²⁺-containing Krebs solution) was expressed as a percentage of corresponding passive diameters (in Ca²⁺-free Krebs solution).

In separate experiments, at an intraluminal pressure of 80 mmHg, cumulative concentrations of PGE₂ (10 pM–100 nM), the selective EP1 receptor agonist, 17-phenyltrior-PGE₂ (10 pM–100 nM), or Ang II (0.1 nM–10 nM) were applied to the organ chamber, and diameter changes of arterioles were continuously recorded. These agonist-induced responses were observed after incubation with AH6809 (10 μM for 30 min).

In one set of experiments, PGE₂-induced arteriolar responses were investigated in the simultaneous presence of AH6809 and the TP receptor antagonist, SQ29548 (1 μM for 30 min), in both groups of vessels. In addition, PGE₂-induced arteriolar responses were investigated in the presence of L-161,982 (1 μM for 30 min), the selective antagonist of EP4 receptors, or in the presence of the NO synthesis inhibitor, L-NAME (200 μM for 20 min), in both groups of vessels.

2.4 Measurement of blood pressure and administration of AH6809

Blood pressure was measured in 12-week-old conscious mice using an automated tail cuff manometer system.¹¹ After 3 days of measurements, eight control and eight db/db mice were randomized to two groups. Groups of control (*n* = 4) and db/db (*n* = 4) mice were given a selective EP1 receptor antagonist, AH6809 (10 mg/kg/day), by daily oral gavage. Administration and dosage of AH6809 was based on previous studies, in which *in vivo* administration of AH6809 was performed in mice²² and in which another EP1 receptor antagonist, SC51322, was used in a similar experimental design.²⁰ Other groups of control (*n* = 4) and db/db (*n* = 4) mice were given vehicle. AH6809 or vehicle administration was continued for 4 days, and blood pressure measurements were continued for two consecutive days after the treatments were terminated.

2.5 Western immunoblotting

Aorta was dissected from control and db/db mice, cleared of connective tissue, and briefly rinsed in ice-cold, oxygenated Krebs solution. After the addition of 200 μ L of Laemmli sample buffer (Sigma Inc.), tissues were homogenized. Immunoblot analysis was carried out as described earlier.¹¹ The polyclonal antibodies used for the detection of EP1 and EP4 receptors were obtained from Cayman Chemicals. Anti- β -actin IgG 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 Statistics

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by two-way analysis of variance for repeated measures (ANOVA) followed by the Tukey *post hoc* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Basic characteristics of db/db mice

Previously, we have found that at 12 weeks of age, body weight, serum glucose, and serum insulin of male, db/db mice were significantly elevated, compared with age-matched control heterozygous animals.¹¹ These alterations in the db/db mice resemble to characteristics of human type 2 diabetes. In this study, we have found that systolic blood pressure was significantly elevated in db/db compared with control mice (control: 136 ± 4 mmHg vs. db/db: 155 ± 5 mmHg, $P < 0.05$), whereas heart rates were similar in the two groups of animals (control: 612 ± 18 , db/db 579 ± 24 1/min, $P > 0.05$).

3.2 Role of EP1 receptor in enhanced arteriolar tone in db/db mice

First, the potential contribution of EP1 receptor activation to the intraluminal pressure- and agonist (Ang-II)-induced arteriolar tone was investigated. Stepwise increases in intraluminal pressure from 20 to 120 mmHg elicited significantly greater constrictions in arterioles from db/db mice compared with control vessels at each pressure step (Figure 1A), a finding that corresponds with our previous observations.¹¹ Ang II-induced constrictions were also augmented in skeletal muscle arterioles of db/db mice (Figure 1B), similar to the observation in the aorta of the obese Zucker rat.²³

Incubation with the selective EP1 receptor antagonist, AH6809, did not affect pressure- and Ang II-induced responses in arterioles of control mice, but it reduced pressure- and Ang II-induced tone in arterioles of db/db mice, back to the control level (Figure 1). Next, arteriolar responses were obtained to exogenously administered PGE₂ (10 pM–100 nM) or to the selective EP1 receptor agonist 17-phenyl-trinor-PGE₂ (10 pM–100 nM) in the absence and presence of the EP1 receptor antagonist, AH6809. PGE₂, in a dose-dependent manner, elicited constrictions in both group of vessels; however, the magnitude of constrictions was significantly enhanced in arterioles of db/db mice (Figure 2A). 17-phenyl-trinor-PGE₂ elicited

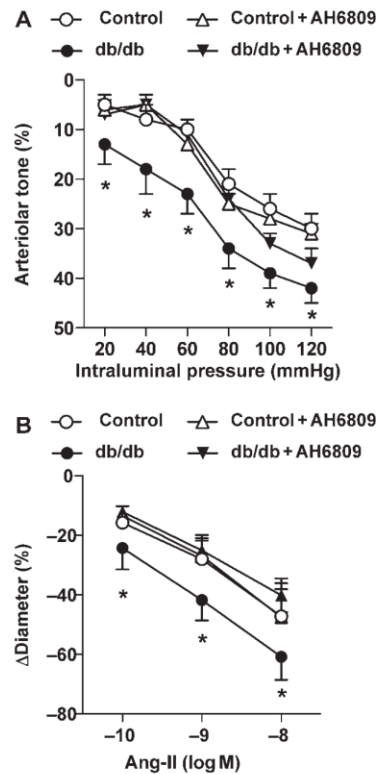


Figure 1 Effect of the EP1 receptor antagonist AH6809 on intraluminal pressure- [from 20 to 120 mmHg (A)] and angiotensin II [Ang II, 0.1–10 nM (B)]-induced constrictions of arterioles isolated from control ($n = 11$) and db/db mice ($n = 11$). Data are mean \pm SEM. Asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$).

constriction of arterioles, which was also significantly greater in arterioles of db/db mice (Figure 2B). The EP1 receptor antagonist, AH6809, significantly reduced constrictions to PGE₂ and diminished arteriolar responses to 17-phenyl-trinor-PGE₂ in both groups of mice (Figure 2). Of note, higher concentrations of PGE₂ (10 and 100 nM) elicited significant constrictions even in the presence of AH6809 (Figure 2A). We have found that the remaining constrictions in the presence of the EP1 receptor antagonist were completely abolished by additional administration of the TP receptor antagonist, SQ29548, in both groups of vessels (control: to $1 \pm 4\%$ and db/db: to $-3 \pm 2\%$).

We have also found that PGE₂-induced arteriolar tone was not significantly affected by the presence of the selective EP4 receptor antagonist, L-161,982, or by the presence of an NO synthesis inhibitor, L-NAME, either in control or db/db mice (Figure 3).

3.3 Increased protein expression of EP1 receptor in db/db mice

Functional experiments indicated a contribution of EP1 receptors in the augmented constriction of skeletal muscle arterioles of db/db mice. To reveal changes in vascular

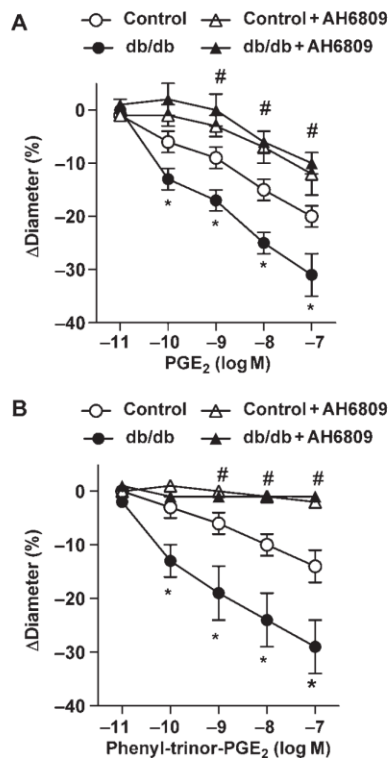


Figure 2 Effects of exogenously administered PGE₂ [10 pM–100 nM (A)] and 17-phenyl-trinor-PGE₂ [10 pM–100 nM (B)] in skeletal muscle arterioles isolated from control ($n = 7$) and db/db mice ($n = 7$), in the absence and presence of the EP1 receptor antagonist, AH6809. Data are mean \pm SEM. *Indicates significant difference between control and db/db mice; #Indicates significant difference before and after the treatment with AH6809 in both groups ($P < 0.05$).

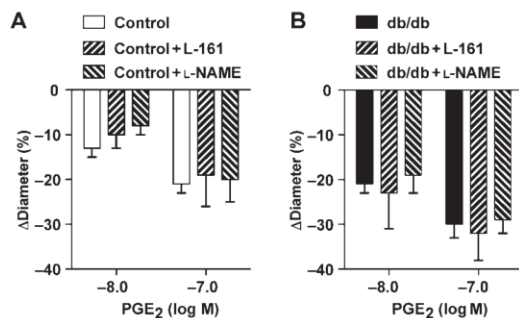


Figure 3 Effects of exogenously administered PGE₂ (10 pM–100 nM) in skeletal muscle arterioles isolated from control [$n = 6$ (A)] and db/db mice [$n = 6$ (B)], in the absence and presence of the EP4 receptor antagonist, L-161,982, or the NO synthesis inhibitor, L-NAME. Data are mean \pm SEM.

expression of EP1 receptors, western immunoblot analysis was performed in the aorta of mice. We have found that the protein expression of the EP1 receptor was significantly increased in the aorta of db/db mice (Figure 4A), when compared with control animals, whereas protein expression of the EP4 receptor was similar in the two groups (Figure 4B).

3.4 EP1 receptor activation and elevated blood pressure in db/db mice

To provide *in vivo* evidence for an enhanced EP1 receptor activation in db/db mice, the effects of an EP1-selective antagonist on systemic blood pressure were assessed. Systolic blood pressure was monitored in conscious animals by the tail cuff method. After 2 days of treatment with the EP1 receptor antagonist, AH6809 (10 mg/kg/day), significantly reduced the systolic blood pressure of db/db mice, but did not affect the blood pressure of control animals. Upon discontinuing AH6809 administration, systolic blood pressure returned back to the initial, elevated level in db/db mice (Figure 5A and B).

4. Discussion

This study demonstrates that, in addition to the pathological factors described earlier,²⁴ endogenous EP1 receptor activation in resistance arteries may also contribute to the development of high blood pressure in a well-established model of human type 2 diabetes (db/db mice). This conclusion is supported by the findings that the augmented pressure- and Ang II-induced arteriolar tone, as well as the elevated systolic blood pressure of db/db mice are normalized by the EP1-selective antagonist, AH6809.

Recently, we have reported that mice with type 2 diabetes (db/db mice) develop high blood pressure and increased peripheral vascular resistance.¹¹ We have found that these haemodynamic changes were associated with an enhanced basal tone of skeletal muscle resistance arteries.¹¹ Along with recent studies, proposing a pivotal role for low-grade vascular inflammation in type 2 diabetes mellitus,^{25,26} we have shown that COX-2-derived constrictor prostanoids contribute to this enhanced constriction in resistance-sized vessels.¹¹ It was thought that the predominant effects of endogenous prostanoids are posed to reduce blood pressure, consistent with observations showing that inhibition of prostaglandin synthesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs or selective COX-2 inhibitors may increase blood pressure in humans.²⁷ In contrast, clinical studies also demonstrated that COX-2 inhibition does not increase blood pressure,^{27,28} whereas selective inhibition of COX-1 has been implicated in the reduction of blood pressure.²⁹ In light of this existing controversy and due to the unwanted actions of the systemic inhibition of prostanoid synthesis, other studies focused on particular prostanoid receptors that can be targeted to reduce vascular resistance and systemic blood pressure. In this context, type 1 PGE₂ (EP1) receptors have been demonstrated to play a potential role in the development of hypertension.^{20,21}

Based on the aforementioned, we hypothesized that EP1 receptor activation may be responsible for the enhanced arteriolar tone and consequently elevated systemic blood pressure in db/db mice. Supporting our assumption, in the present study, we have found that both pressure- and Ang II-induced constrictions were augmented in skeletal muscle arterioles of db/db mice, responses that were normalized by the selective EP1 receptor antagonist, AH6809 (Figure 1). These findings raised the possibility that in arterioles of db/db mice, endogenous PGE₂, via primarily activating EP1 receptors, enhances pressure- and Ang II-induced arteriolar tone. It is known that PGE₂ can activate four

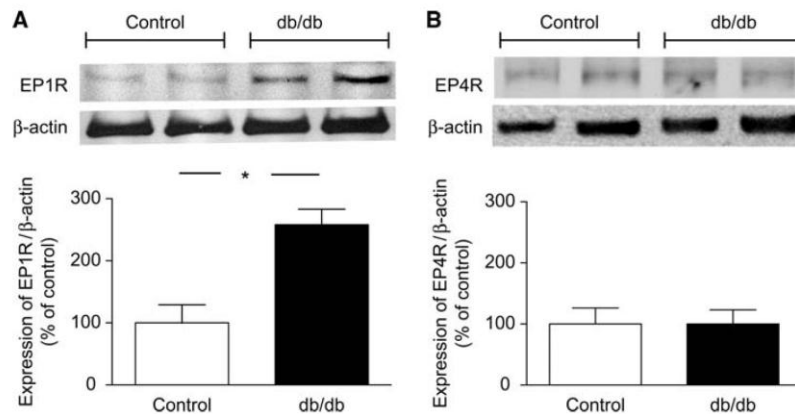


Figure 4 Western blot analysis of the expression of EP1 and EP4 receptors (EP1R and EP4R) in the aorta of control ($n = 4$) and db/db ($n = 4$) mice. Anti- β -actin was used to normalize for loading variations. Bar graphs represent the summary of normalized densitometric ratios ($n = 4$, for each group). Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$).

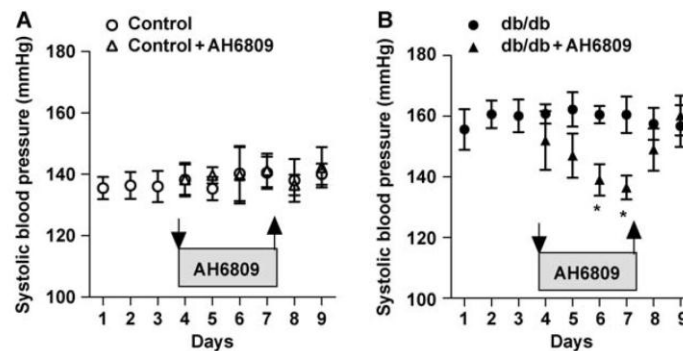


Figure 5 Effect of EP1 receptor antagonist AH6809 (10 mg/kg/day by daily gavage) or vehicle on systolic blood pressure in control ($n = 8$) and db/db ($n = 8$) mice. Downward arrows indicate the start and upward arrows indicate the end of the treatments. Data are mean \pm SEM. Asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$).

different types of G-protein-coupled receptors, which may result in either vasodilation (via activating EP2 and EP4 receptors) or vasoconstriction (via activating EP1 and EP3 receptors).^{19,30} Exogenously administered PGE₂ has been shown to reduce³¹ or enhance the basal tone of resistance-sized arteries.³² In this study, we have found that exogenous application of PGE₂ or the selective EP1 receptor agonist, 17-phenyl-trinor-PGE₂, elicited substantial constrictions in isolated arterioles, responses that were significantly greater in arterioles of db/db mice and were inhibited by EP1 receptor antagonist, AH6809, in vessels of both groups of animals (Figure 2). These findings indicated that exogenous PGE₂ causes primarily vasoconstriction in mouse skeletal muscle arterioles and that increased responsiveness of EP1 receptors is mainly responsible for the augmented pressure and Ang II-induced constriction in arterioles of db/db mice. To exclude the possible contribution of a diminished EP4 receptor-mediated dilator responses,¹⁹ PGE₂-induced arteriolar responses were also evaluated in the presence of selective antagonist of EP4 receptor, L-161,982, both in control and db/db mice. We have found that L-161,982 did not exaggerate PGE₂-induced arteriolar constrictions in either control or db/db mice (Figure 3), suggesting no or

only a minimal role for the involvement of EP4 receptors in this process. Furthermore, it is possible that a reduced NO bioavailability, often present in diabetes, may also exaggerate prostanoid-induced vascular tone.³³ However, we have found that NO synthesis inhibitor, L-NAME, did not significantly affect arteriolar tone and constrictions to PGE₂ in control and db/db mice (Figure 3), suggesting only a limited contribution of NO in mediating PGE₂-induced arteriolar responses. It should be noted that PGE₂-mediated vasoconstriction was not entirely inhibited by the EP1 receptor antagonist, but was completely diminished by additional application of the TP receptor blocker, SQ29548, both in control and diabetic mice. Thus, it is likely that PGE₂, especially at higher concentrations (10^{-8} and 10^{-7} M), may co-activate TP receptors in the arteriolar wall. This observation might explain why TP receptor blockade by SQ29548 reduced the enhanced arteriolar tone in db/db mice^{9,11,14} and also PGE₂-induced constriction in mesenteric arterioles,³² as reported previously. Thus, it is possible that the augmented constriction of arterioles of db/db mice can be attributed to both EP1 and TP receptors in the microvascular wall. Notwithstanding, our present data support a pivotal role for EP1 receptors, since we detected an increased

vascular expression of EP1 receptors in db/db mice, when compared with controls (Figure 4). However, it should be noted that an increased expression of EP1 receptors does not necessarily cause a greater response, as EP1 receptor signal transduction/second messenger pathways could be also enhanced, and receptors may not be present in the plasma membrane, but rather in an intracellular location. Thus, one cannot exclude the possibility that EP1 receptor-initiated signalling mechanisms are augmented in microvessels of type 2 diabetic mice, an idea yet to be elucidated.

The potential role of EP1 receptor activation on cardiovascular homeostasis is complex and is still open to debate. PGE₂, via activating EP receptors, may affect several blood pressure regulatory mechanisms, among which the regulation of extracellular fluid volume in the kidney and the central nervous system is important.³⁴ The aforementioned study by Guan *et al.*²⁰ has demonstrated that EP1 receptor activation *in vivo* contributes to blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats and also in rats given a chronic Ang II infusion. Therefore, in a similar experimental setting, in our study, we have investigated the effect of EP1 receptor inhibition on systemic blood pressure in control and db/db mice. We have found that, after 2 days of treatment, EP1 receptor inhibition elicited a significant reduction in systolic blood pressure of db/db mice, whereas it had no effect on control animals (Figure 5). These data suggested that interfering with EP1 receptor *in vivo* results in a reduction of systemic blood pressure in db/db mice, but not in control animals. Although evidence supports that acute, *in vivo* administration of PGE₂ causes a reduction in systemic blood pressure,^{35,36} chronic effects of PGE₂ on systemic blood pressure are inconsistent and variable and seem to depend on experimental conditions, such as mode of administration.^{35,37,38} For instance, Stock *et al.*³⁹ have found that in male mice, the absence of EP1 receptor is associated with significant reduction in blood pressure, suggesting a crucial role for EP1 receptors in elevating systemic blood pressure, in the long term. Correspondingly, our data showing that significant blood pressure fall in db/db mice developed only after 2 days of treatment with the EP1 receptor antagonist suggest that EP1 receptors are involved in the chronic regulation of systemic blood pressure, yet an indirect effect of EP1 receptor inhibition cannot be entirely excluded. Also, we should emphasize that due to the limitation of our blood pressure monitoring method (tail cuff), a careful interpretation of these results is still needed. Further studies have yet to be performed to demonstrate the long-term haemodynamic effects of EP1 receptor inhibition in type 2 diabetes mellitus.

In conclusion, the present study showed that up-regulation of EP1 receptors, in part, contributes to the augmented pressure- and Ang II-induced arteriolar tone in db/db mice. We propose that targeting of EP1 receptors may provide novel therapeutic modalities for the treatment of type 2 diabetes-associated microvascular vasomotor dysfunction and hypertension.

Funding

This study was supported by grants from the NIH PO1-HL-43023, HL-46813, American Heart Association,

0735540T, and by the Hungarian Ministry of Health: 449/2006, 454/2006 grants.

Conflict of interest: Z.P. holds a Bolyai Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences.

References

- Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001;**37**:1053–1059.
- Kirpichnikov D, Sowers JR. Diabetes mellitus and diabetes-associated vascular disease. *Trends Endocrinol Metab* 2001;**12**:225–230.
- Heistad DD, Lopez JA, Baumbach GL. Hemodynamic determinants of vascular changes in hypertension and atherosclerosis. *Hypertension* 1991;**17**:1117–111.
- Mulvany MJ. Structure and function of small arteries in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1990;**8**:S225–S232.
- Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, DeLano FA, Chen PC. Microvascular tone in a skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987;**9**:164–171.
- Bohlen HG. Arteriolar closure mediated by hyperresponsiveness to nor-epinephrine in hypertensive rats. *Am J Physiol* 1979;**236**:H157–H164.
- Koller A. Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension. *Microcirculation* 2002;**9**:277–294.
- Jaap AJ, Shore AC, Tooke JE. The influence of hypertension on microvascular blood flow and resistance to flow in the skin of patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabet Med* 1994;**11**:883–887.
- Lagaud GJ, Masih-Khan E, Kai S, van Breemen C, Dube GP. Influence of type II diabetes on arterial tone and endothelial function in murine mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res* 2001;**38**:578–589.
- Naik JS, Xiang L, Hester RL. Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;**290**:R154–R161.
- Bagi Z, Erdei N, Toth A, Li W, Hintze TH, Koller A *et al.* Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-derived constrictor prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1610–1616.
- 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* 2003;**285**:H1404–H1410.
- Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H742–H748.
- Guo Z, Su W, Allen S, Pang H, Daugherty A, Smart E *et al.* COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperactivity in spontaneous diabetic db/db mice. *Cardiovasc Res* 2005;**67**:723–735.
- Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA. Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:1655–1661.
- Bishop-Bailey D, Larkin SW, Warner TD, Chen G, Mitchell JA. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *Br J Pharmacol* 1997;**121**:125–133.
- Campean V, Thellig F, Paliege A, Breyer M, Bachmann S. Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;**285**:F19–F32.
- Schneider A, Zhang Y, Zhang M, Lu WJ, Rao R, Fan X *et al.* Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney Int* 2004;**65**:1205–1213.
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;**41**:661–690.
- Guan Y, Zhang Y, Wu J, Qi Z, Yang G, Dou D *et al.* Antihypertensive effects of selective prostaglandin E₂ receptor subtype 1 targeting. *J Clin Invest* 2007;**117**:2496–2505.
- Suganami T, Mori K, Tanaka I, Mukoyama M, Sugawara A, Makino H *et al.* Role of prostaglandin E receptor EP1 subtype in the development of renal injury in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 2003;**42**:1183–1190.
- Oliveira P, Berrino L, de Novellis V, Palazzo E, Marabese I, Siniscalco D *et al.* Role of periaqueductal grey prostaglandin receptors in formalin-induced hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 2006;**530**:40–47.

23. Siddiqui AH, Hussain T. Enhanced AT1 receptor-mediated vasocontractile response to ANG II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1722-H1727.
24. Stas SN, El-Atat FA, Sowers JR. Pathogenesis of hypertension in diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2004;5:221-225.
25. Hsueh WA, Quinones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol* 2003;92:10J-17J.
26. Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4:84-88.
27. Sowers JR, White WB, Pitt B, Whelton A, Simon LS, Winer N *et al.* The effects of cyclooxygenase-2 inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory therapy on 24 h blood pressure in patients with hypertension, osteoarthritis, and type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2005;165:161-168.
28. White WB, Kent J, Taylor A, Verburg KM, Lefkowitz JB, Whelton A. Effects of celecoxib on ambulatory blood pressure in hypertensive patients on ACE inhibitors. *Hypertension* 2002;39:929-934.
29. Qi Z, Hao CM, Langenbach RI, Breyer RM, Redha R, Morrow JD *et al.* Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest* 2002;110:61-69.
30. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-1226.
31. Messina EJ, Kaley G. Microcirculatory responses to prostacyclin and PGE₂ in the rat cremaster muscle. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1980;7:719-722.
32. Bolla M, You D, Loufrani L, Levy BI, Levy-Toledano S, Habib A *et al.* Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2004;43:1264-1269.
33. Sametz W, Prasthofer S, Wintersteiger R, Juan H. Vascular effects of isoprostanol after endothelial damage. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999;61:369-372.
34. Breyer MD, Breyer RM. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 2001;63:579-605.
35. Audoly LP, Tilley SL, Goulet J, Key M, Nguyen M, Stock JL *et al.* Identification of specific EP receptors responsible for the hemodynamic effects of PGE₂. *Am J Physiol* 1999;277:H924-H930.
36. Zhang Y, Guan Y, Schneider A, Brandon S, Breyer RM, Breyer MD. Characterization of murine vasopressor and vasodepressor prostaglandin E(2) receptors. *Hypertension* 2000;35:1129-1134.
37. Armstrong JM, Boura AL, Hamberg M, Samuelsson B. A comparison of the vasodepressor effects of the cyclic effects of the cyclic endoperoxides PGG₂ and PGH₂ with those of PGD₂ and PGE₂ in hypertensive and normotensive rats. *Eur J Pharmacol* 1976;39:251-258.
38. Gerber JG, Nies AS. The hemodynamic effects of prostaglandins in the rat. Evidence for important species variation in renovascular responses. *Circ Res* 1979;44:406-410.
39. Stock JL, Shinjo K, Burkhardt J, Roach M, Taniguchi K, Ishikawa T *et al.* The prostaglandin E₂ EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J Clin Invest* 2001;107:325-331.

Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction

Magdolna Szántó^{1†}, Ibolya Rutkai^{2†}, Csaba Hegedűs^{1,3}, Ágnes Czikora², Máté Rózsahegyi¹, Borbála Kiss⁴, László Virág^{1,3}, Pál Gergely^{1,3}, Attila Tóth², and Péter Bai^{1,3*}

¹Department of Medical Chemistry, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei krt 98. Pf. 7, H-4032 Debrecen, Hungary; ²Division of Clinical Physiology, Institute of Cardiology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; ³Cell Biology and Signaling Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Debrecen, Hungary; and ⁴Department of Dermatology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Received 2 June 2011; revised 27 August 2011; accepted 12 September 2011; online publish-ahead-of-print 15 September 2011

Time for primary review: 33 days

Aims	Doxorubicin (DOX) is widely used in cytostatic treatments, although it may cause cardiovascular dysfunction as a side effect. DOX treatment leads to enhanced free radical production that in turn causes DNA strand breakage culminating in poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation and mitochondrial and cellular dysfunction. DNA nicks can activate numerous enzymes, such as PARP-2. Depletion of PARP-2 has been shown to result in a protective phenotype against free radical-mediated diseases, suggesting similar properties in the case of DOX-induced vascular damage.
Methods and results	<i>PARP-2</i> ^{+/+} and <i>PARP-2</i> ^{-/-} mice and aortic smooth muscle (MOVAS) cells were treated with DOX (25 mg/kg or 3 μM, respectively). Aortas were harvested 2-day post-treatment while MOVAS cells were treated with DOX for 7 hours. Aortas from <i>PARP-2</i> ^{-/-} mice displayed partial protection against DOX toxicity, and the protection depended on the conservation of smooth muscle but not on the conservation of endothelial function. DOX treatment evoked free radical production, DNA breakage and PARP activation. Importantly, depletion of PARP-2 did not quench any of these phenomena, suggesting an alternative mechanism. Depletion of PARP-2 prevented DOX-induced mitochondrial dysfunction through SIRT1 activation. Genetic deletion of PARP-2 resulted in the induction of the SIRT1 promoter and consequently increased SIRT1 expression both in aortas and in MOVAS cells. SIRT1 activation enhanced mitochondrial biogenesis, which provided protection against DOX-induced mitochondrial damage.
Conclusion	Our data identify PARP-2 as a mediator of DOX toxicity by regulating vascular SIRT1 activity and mitochondrial biogenesis. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first report of SIRT1 as a protective factor in the vasculature upon oxidative stress.
Keywords	PARP-2 • Doxorubicin • SIRT1 • Mitochondria • Vascular smooth muscle

1. Introduction

Doxorubicin (adriamycin, DOX) is a widely used antitumor drug, exerting cardiovascular side effects that may culminate in irreversible degenerative cardiomyopathy and heart failure.¹ DOX-induced cardiovascular injury is linked to increased oxidative stress² as DOX can export electrons from the mitochondria via redox cycling, creating radical species.³ Although cardiac effects of DOX toxicity are well

characterized, vascular damage is scarcely mapped and the molecular background is largely unknown. Vascular damage upon DOX treatment affects the aorta^{4,5} and smaller arteries in the liver⁶ and kidney.^{7,8} Furthermore, DOX impairs endothelial function⁹ and promotes thrombosis.¹⁰

Free radical-evoked DNA damage activates poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1, which catabolizes NAD⁺ in order to create poly(ADP-ribose) (PAR) polymers. PARP-1 activation leads to

[†] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel: +36 52 412 345; fax: +36 52 412 566. Email: bai@med.unideb.hu

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2011. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

NAD⁺ and consequently ATP depletion, provoking cell dysfunction and cell death.¹¹ This PARP-1-mediated cell death pathway is active in DOX-induced toxicity and it is a major contributor to cardiac and vascular dysfunction.^{12,13} Therefore, pharmacological inhibition of PARP-1 proved to be advantageous under such circumstances.^{12,13} Upon DOX damage, PARP inhibition partially restored vascular contractility.¹³

PARP-2 is a nuclear enzyme that can bind to DNA nicks and thereby becomes active.¹⁴ Upon activation, it is capable of synthesizing PAR at the expense of NAD⁺.¹⁴ Moreover, PARP-2^{-/-} mice are resistant to numerous oxidative stress-related pathologies in the brain and intestines.^{15–17} These properties of PARP-2 prompted us to examine whether PARP-2 inactivation may also provide protection against DOX-induced vascular damage.

2. Methods

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

2.1 Animal experiments

All animal experiments were carried out according to the national and EU ethical guidelines and were authorized by the Institutional Ethics Committee (7/2010 DE MÁB). Homozygous female PARP-2^{-/-} and littermate PARP-2^{+/+} mice¹⁸ derived from heterozygous crossings were kept in a 12/12 h dark–light cycle with *ad libitum* access to water and food. Mice were randomly assigned to four groups: PARP-2^{+/+} and PARP-2^{-/-} control (CTL), and PARP-2^{+/+} and PARP-2^{-/-} DOX-treated. DOX treatment was performed by the injection of 25 mg/kg DOX or saline ip as described.¹² Aortas were harvested 2-day post-injection for further assessment.

2.2 Aorta ring studies

For aorta ring studies, mice were anaesthetized by thiopental (50 mg/kg, iv). Mice were dissected after they did not respond to pain. Thoracic aortas were cut into 4 mm rings in an organ chamber and were fixed on an isometric contractile force measurement system (DMT 510A, Aarhus, Denmark) by metal wires. Aortic rings were stretched according to the manufacturer's instructions. Fixed, stretched aortic rings were treated with the indicated agents for the indicated times and contractile force was recorded.

2.3 Histology and microscopy

Staining was performed on 7 μm tissue sections or cells using antibodies against PAR, PARP-2 (both from Alexis, Lausen, Switzerland), and smooth muscle actin (SMA; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) as in Bai *et al.*¹⁹

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay was performed following the instructions of the manufacturer (Millipore).

2.4 Cell culture

MOVAS murine aortic smooth muscle cells were obtained from ATCC and were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose, 10% FCS, and 0.2 mg/mL G418). PARP-2 silencing was performed as in Bai *et al.*¹⁹ employing shPARP-2 (small hairpin) and scPARP-2 (scrambled) shRNA by lentiviral delivery. Cellular measurements took place 7 h after addition of DOX.

2.5 Measurement of thiobarbituric acid reactive species

The extent of oxidative stress was assessed by determining lipid peroxidation. Aortas were homogenized in 1.15% KCl. Homogenates were cleared and supernatants were used. Supernatants were incubated at

90°C for 45 min with thiobarbituric acid. After cooling to room temperature, absorbance at 532 nm was measured and normalized to protein content. The level of lipid peroxides was expressed as a percentage of control.

2.6 PARP activity measurement

PARP activity in MOVAS cells was measured by the incorporation of ³H-NAD⁺. Cells stimulated with DOX (3 μM, 7 h) or H₂O₂ (1 mM, 10 min) and were incubated with ³H-NAD⁺ (10 min, 37°C). After incubation, cellular proteins were precipitated and subsequently washed with ice-cold TCA (50 and 5% w/v, respectively). Precipitates were solubilized in 250 μL 2% w/v SDS/0.1 N NaOH at 37°C overnight. Tritium incorporation was measured by liquid scintillation counting.

2.7 Measurement of superoxide production

Superoxide was measured using hydroethidine (HE) staining as described in Bai *et al.*²⁰ Cells were induced by DOX (7 h, 3 μM) and were stained by 2 μM HE for 30 min. Fluorescence was analysed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). Superoxide production was indicated as a mean of HE fluorescence in each sample.

2.8 Oxygen consumption

Oxygen consumption was measured using an XF96 oximeter (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA). scPARP-2 and shPARP-2 MOVAS cells were seeded in 96-well assay plates. After recording the baseline oxygen consumption, cells received a single bolus dose of DOX (0.3–30 μM final concentration). Then, oxygen consumption was recorded every 30 min to follow DOX toxicity. Final reading took place at 7 h post-treatment. The oxygen consumption rate was normalized to protein content and normalized readings were displayed.

2.9 NAD⁺ measurement

Cells were seeded in six-well plates and treated with 3 μM DOX for 7 h. Control and DOX-treated cells were homogenized in 500 μL 0.5 N HClO₄ solution and the homogenates were then neutralized with 150 μL 3 M KOH. The concentration of NAD⁺ was measured photometrically at 560 nm after enzymatic reaction, which is based on an alcohol dehydrogenase cycling reaction in which a tetrazolium dye is reduced by NADH in the presence of phenazine methosulfate. Samples were normalized to protein content and NAD⁺ concentration was determined using an NAD⁺ standard curve.

2.10 Luciferase activity measurement

Luciferase activity measurement took place as described in Bai *et al.*¹⁹ with modifications as follows. MOVAS cells carrying a stable transfection of a scrambled or specific PARP-2 shRNA were seeded in six-well plates. Transfection took place (8 μg SIRT1 -91 promoter construct²¹ and 4 μg β-galactosidase expression plasmid per 9 μL JetPEI transfection reagent (Polyplus Transfection, Illkirch, France) after cells reached ~60% confluence. Cells were scraped 48 h post-transfection and luciferase activity was determined by standard procedures. The activity was expressed as luciferase activity/β-galactosidase activity.

2.11 Measurement of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was determined by tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) staining.²² MOVAS cells carrying a stable transfection of a scrambled or specific PARP-2 shRNA were seeded in 96-well plate (25 000 cells/well) and induced by DOX (0.3–30 μM, 7 h). After DOX treatment, cells were stained with 25 nM TMRE for 30 min and then were washed with Hanks' balanced salt solution (0.138 M NaCl, 5.33 mM KCl, 0.338 mM Na₂HPO₄, 0.441 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂, 0.493 mM MgCl₂, 0.407 mM MgSO₄, and

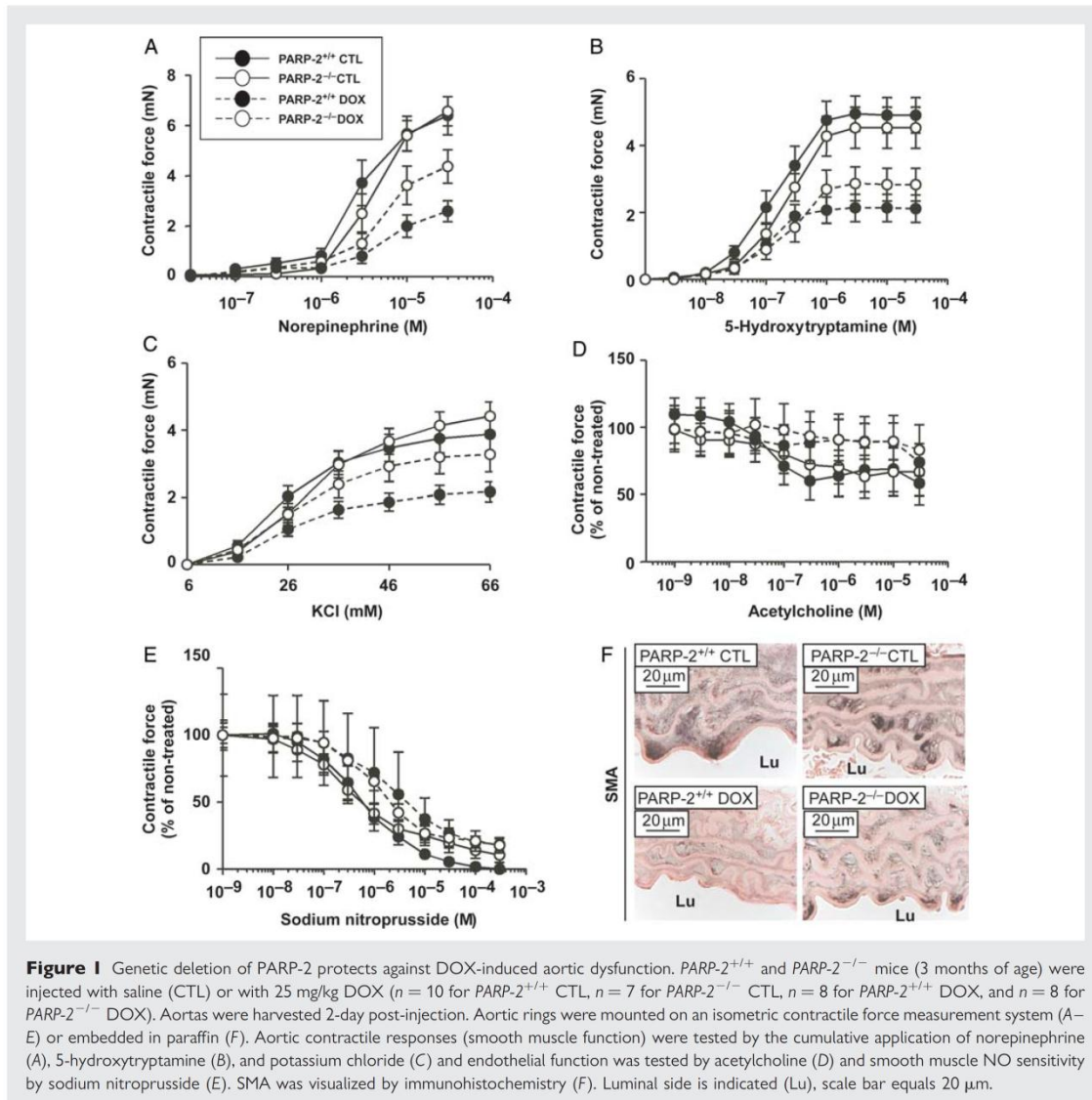


Figure 1 Genetic deletion of PARP-2 protects against DOX-induced aortic dysfunction. PARP-2^{+/+} and PARP-2^{-/-} mice (3 months of age) were injected with saline (CTL) or with 25 mg/kg DOX ($n = 10$ for PARP-2^{+/+} CTL, $n = 7$ for PARP-2^{-/-} CTL, $n = 8$ for PARP-2^{+/+} DOX, and $n = 8$ for PARP-2^{-/-} DOX). Aortas were harvested 2-day post-injection. Aortic rings were mounted on an isometric contractile force measurement system (A–E) or embedded in paraffin (F). Aortic contractile responses (smooth muscle function) were tested by the cumulative application of norepinephrine (A), 5-hydroxytryptamine (B), and potassium chloride (C) and endothelial function was tested by acetylcholine (D) and smooth muscle NO sensitivity by sodium nitroprusside (E). SMA was visualized by immunohistochemistry (F). Luminal side is indicated (Lu), scale bar equals 20 μm.

4.17 mM NaHCO₃). Fluorescence was measured on 530 nm as excitation and 590 nm as emission wavelength. TMRE fluorescence was normalized to protein content.

2.12 Protein extraction and western blotting

Cells were lysed with RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate, 2 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, and freshly added protease inhibitor cocktail (1:100, Sigma, St Louis, USA). Cells were left on ice for several minutes in the buffer and then were homogenized with a 22 G needle. Lysates were cleared by centrifugation. Extracts were separated by SDS-PAGE and were blotted as in Erdelyi et al.²³ Blots were probed with the

following antibodies: SIRT1 (1:1000, Millipore-Upstate, Billerica, MA, USA), actin (1:1000, Sigma), and PARP-2 (1:1000, PARP-2, Alexis).

2.13 Total RNA preparation, reverse transcription, and RT-qPCR

Total RNA preparation, reverse transcription, and RT-qPCR were performed similarly as in Brunyanszki et al.²⁴ Total RNA was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of RNA were used for reverse transcription (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Diluted cDNA was used for RT-qPCR. Expression was normalized to the geometric mean of murine 36B4, 18S, and cyclophilin.

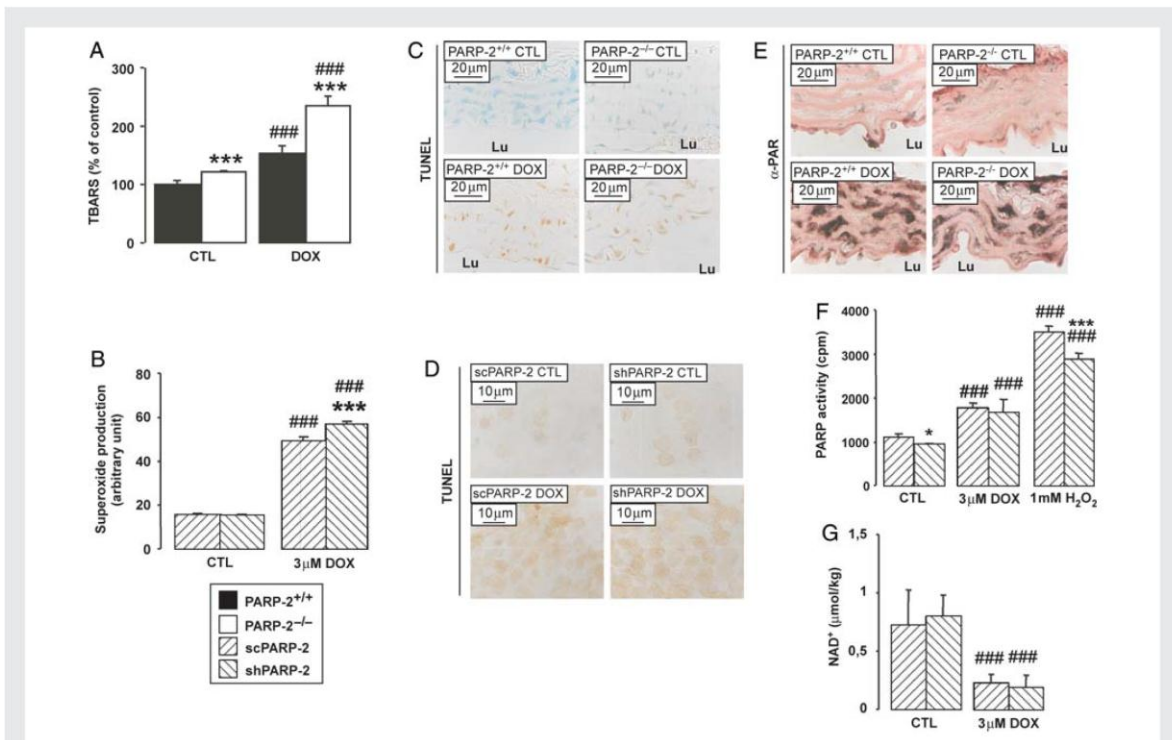


Figure 2 Deletion of PARP-2 does not affect free radical-induced PARP activation or NAD⁺ depletion. *PARP-2*^{+/+} and *PARP-2*^{-/-} mice were injected with saline (CTL) or with 25 mg/kg DOX at 3 months of age ($n = 5$ for *PARP-2*^{+/+} CTL, $n = 5$ for *PARP-2*^{-/-} CTL, $n = 5$ for *PARP-2*^{+/+} DOX, and $n = 4$ for *PARP-2*^{-/-} DOX; A, C, and E). An aortic smooth muscle cell line (MOVAS) was also tested (B, D, F, and G; $n = 3$ parallel measurements). MOVAS cells were transfected with a PARP-2-silencing (shPARP-2) or -scrambled (scPARP-2) shRNA and treated with solvent (CTL), 3 μ M DOX or with 1 mM H₂O₂. Measurements were performed 2-day post-DOX injection (aortas) or 7 h (MOVAS) after DOX treatment. Free radical formation was measured by determining thiobarbituric acid reactive species (TBARS) (A) and HE fluorescence (B). DNA breaks were detected using TUNEL assay; scale bar represents 20 or 10 μ m, respectively (C and D). PAR formation in paraffin-embedded aortas was assessed with an anti-PAR antibody; scale bar represents 20 μ m (E), or in MOVAS cells by the PARP enzyme activity assay (F). NAD⁺ concentrations were determined in MOVAS cells using an alcohol dehydrogenase-coupled colorimetric assay (G). Lu, lumen; ### indicate statistically significant difference between CTL and DOX/H₂O₂-treated samples, at $P < 0.001$, * or *** indicate statistically significant difference between *PARP-2*^{+/+} mice/scPARP-2 cells and *PARP-2*^{-/-} mice/shPARP-2 cells at $P < 0.05$ or < 0.001 , respectively. On (B), (F), and (G), error is represented as SD.

Mitochondrial DNA content was determined in qPCRs using total DNA extract of cells or tissues as described in Bai *et al.*¹⁹ Primers are summarized in Supplementary material online, Tables S1 and S2.

2.14 Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation was performed similarly as in Bai *et al.*²⁵ In MOVAS cells, chromatin-bound proteins were fixed on DNA by formaldehyde. Nuclei were prepared and chromatin was sonicated in order to split DNA into shorter, ~500 bp fragments. PARP-2-bound chromatin fragments were collected by immunoprecipitation using α -PARP-2 (Alexis) and α -matrix-metalloproteinase-9 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) antibodies. Formaldehyde crosslinking was reversed by heating and then DNA fragments were purified and amplified using SIRT1 promoter-specific primers by qPCR (primers are indicated in the respective section of Supplementary material online). The results were expressed as a percentage of input.

2.15 Statistical analysis

Statistical significance was determined using Student's *t*-test. Error bars represent SEM unless stated otherwise.

3. Results

3.1 PARP-2 depletion counteracts vascular dysfunction

We investigated vascular functions after DOX treatment in *PARP-2*^{+/+} and *PARP-2*^{-/-} mice first. We did not detect major differences in aortic reactivity between untreated (CTL) *PARP-2*^{+/+} and *PARP-2*^{-/-} mice. In contrast, DOX treatment significantly decreased norepinephrine and 5-hydroxytryptamine (serotonin)-induced contractility of the vessels in *PARP-2*^{+/+} mice, while *PARP-2*^{-/-} mice were partially protected (Figure 1A and B). KCl-induced contraction of aortas from *PARP-2*^{+/+} mice was reduced upon DOX treatment,

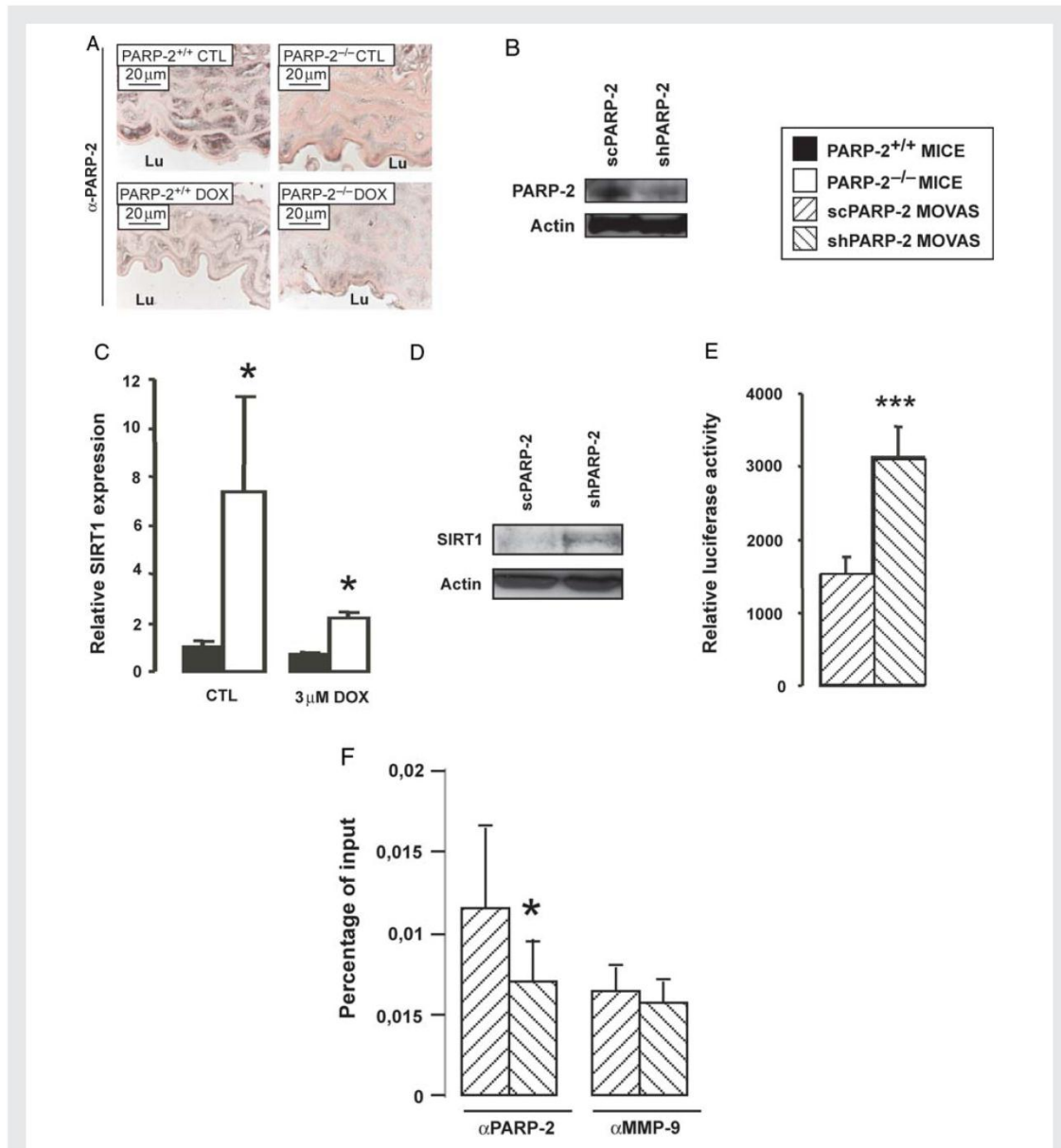
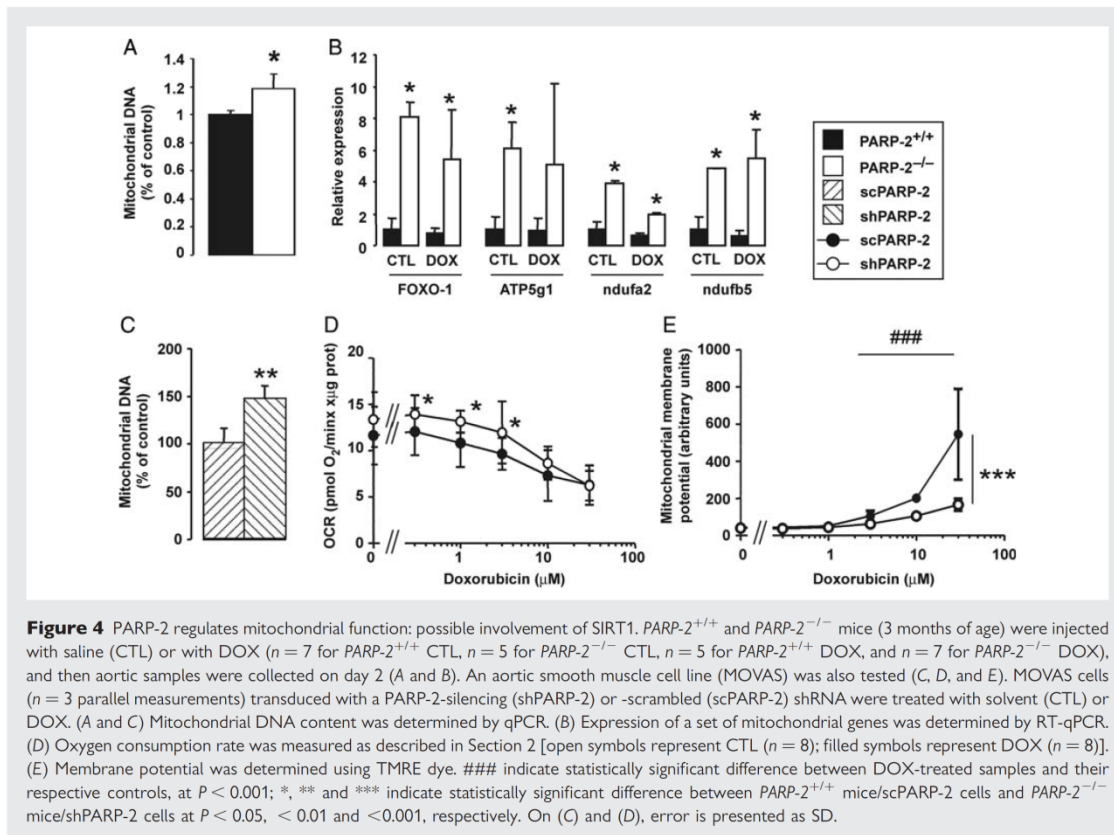


Figure 3 Depletion of PARP-2 induces SIRT1 levels in aortic smooth muscle cells. *PARP-2*^{+/+} and *PARP-2*^{-/-} mice were injected with saline (CTL) or with DOX at 3 months of age ($n = 7, 5, 5,$ and $5,$ respectively), and then aortic samples were collected on day 2 (A and C). An aortic smooth muscle cell line (MOVAS) was also tested (B, D, E, and F). MOVAS cells were transduced with a PARP-2-silencing (shPARP-2) or -scrambled (scPARP-2) shRNA and treated with solvent (CTL) or DOX. PARP-2 expression was determined in aortas by immunohistochemistry, scale bar represents 20 μ m (A), and in MOVAS cells by western blotting (B). SIRT1 expression was determined in aortas by RT-qPCR (C), while in MOVAS cells by western blotting (D). The activity of the -1 to -91 portion of the SIRT1 promoter was determined in luciferase assays (E, $n = 6$). PARP-2 binding to the SIRT1 promoter was determined using ChIP assays (F, $n = 3$). Lu, lumen, * and *** indicate statistically significant difference between scPARP-2 cells/*PARP-2*^{+/+} mice and shPARP-2 cells/*PARP-2*^{-/-} mice at $P < 0.05$ or < 0.001 , respectively. On (E) and (F), error is represented as SD.



whereas the contractile responses of aortas from *PARP-2*^{-/-} mice were unaffected (Figure 1C). These findings suggested a PARP-2-dependent deterioration of vascular smooth muscle function after DOX treatment in mice.

Endothelial function was assessed by the application of acetylcholine. Impaired reactivity of aortas to acetylcholine after DOX treatment in both *PARP-2*^{+/+} and *PARP-2*^{-/-} mice indicated that the DOX-induced deterioration of endothelial function was independent of PARP-2 (Figure 1D). Moreover, sodium nitroprusside-induced vasorelaxation was not affected by either DOX treatment or by the deletion of PARP-2 (Figure 1E), suggesting that blunted acetylcholine responses were not related to impaired NO reactivity of smooth muscle cells.

Taken together, our physiological data suggested a role for PARP-2 in DOX-evoked vascular dysfunction and implicated smooth muscle as a potential target. This notion was further supported by decreased smooth muscle actin (SMA) immunoreactivity in *PARP-2*^{+/+} mice after DOX treatment, suggesting a loss of smooth muscle cells, which was not the case in *PARP-2*^{-/-} mice (Figure 1F). Importantly, these data identify smooth muscle dysfunction as a novel mechanism of DOX-induced vascular damage. In our following experiments, we employed an aortic smooth muscle cell line (MOVAS) to reveal the potential mechanisms for PARP-2 involvement in DOX-evoked functional deterioration.

3.2 PARP activity is not altered upon PARP-2 depletion

Reactive oxygen species produced by mitochondrial redox cycling of DOX has previously been shown to trigger PARP activation and PAR synthesis. Moreover, ablation of PARP-1 resulted in suppressed PAR synthesis and protection against DOX-evoked cardiovascular damage.^{12,13} Since PARP-2 also possesses PARP activity,¹⁴ we set out to investigate the role of PARP-2 in DOX-evoked PAR synthesis and vascular smooth muscle dysfunction.

We detected free radical production in both aortas and MOVAS cells upon DOX treatment (Figure 2A and B). Moreover, free radical production was increased upon PARP-2 ablation. Enhanced free radical production resulted in DNA-strand breakage in both types of samples as shown by increased TUNEL staining (Figure 2C and D). However, there was no apparent change in TUNEL positivity upon PARP-2 ablation or depletion neither in mice nor in MOVAS cells (Figure 2C and D). The level of DOX-induced PARP activity was not different between *PARP-2*^{+/+} and *PARP-2*^{-/-} mice (Figure 2E). Similarly, there was no marked difference in PARP activation between MOVAS cells in which PARP-2 was silenced by specific shRNA (shPARP-2) or its unspecific scrambled version (scPARP-2) (Figure 2F). These results suggested a dominant role for PARP-1 in DOX-evoked PAR formation. PAR was detected only in smooth muscle cells, suggesting that

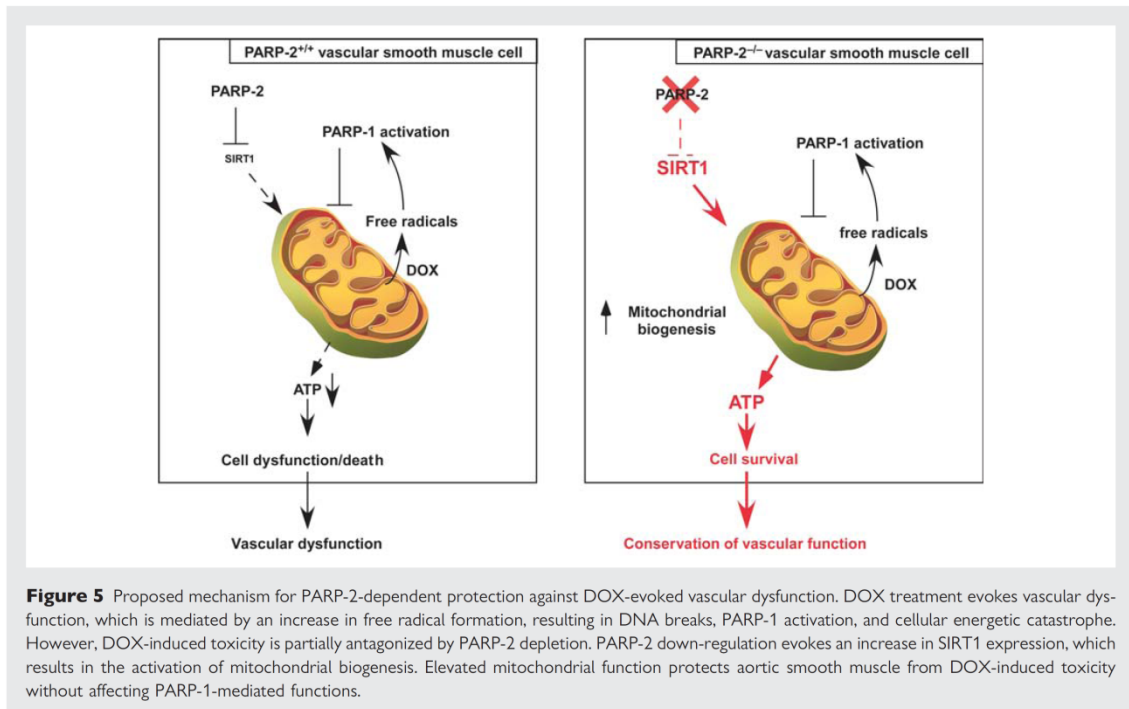


Figure 5 Proposed mechanism for PARP-2-dependent protection against DOX-evoked vascular dysfunction. DOX treatment evokes vascular dysfunction, which is mediated by an increase in free radical formation, resulting in DNA breaks, PARP-1 activation, and cellular energetic catastrophe. However, DOX-induced toxicity is partially antagonized by PARP-2 depletion. PARP-2 down-regulation evokes an increase in SIRT1 expression, which results in the activation of mitochondrial biogenesis. Elevated mitochondrial function protects aortic smooth muscle from DOX-induced toxicity without affecting PARP-1-mediated functions.

DOX-evoked endothelial dysfunction is both PARP-1- and PARP-2-independent. Cellular NAD^+ depletion was also similar in control and PARP-2-depleted cells (Figure 2G), suggesting again a minor, if any, role for PARP-2 in this process. Taken together, PARP-2 depletion or deletion results in vascular protection without affecting DOX-induced overall PARP activity.

3.3 SIRT1 overexpression counteracts DOX toxicity

Apparently, the protection provided by the depletion of PARP-2 has a different mechanism than the one responsible for the protective effect of PARP-1 inhibition. Mitochondrial function and structure is deteriorated upon DOX treatment.²⁶ Moreover, preservation of mitochondrial function is associated with protection against DOX toxicity.^{27–29} These observations prompted us to investigate pathways that modulate mitochondrial function. SIRT1 is an NAD^+ -dependent class III deacetylase that promotes mitochondrial biogenesis,^{30–32} while PARP-2 has been identified as a repressor of SIRT1 expression.¹⁹ Danz et al. have shown that pharmacological activation of SIRT1 by resveratrol enhances mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes. Thus, induction of SIRT1 by PARP-2 depletion might be capable of counteracting the free radical-evoked mitochondrial dysfunction that occurs upon DOX treatment.³³ Accordingly, we tested whether increased SIRT1 expression might be the key protective mechanism against DOX treatment in *PARP-2*^{-/-} mice.

Disruption or depletion of PARP-2 in aortas or in MOVAS cells (Figure 3A and B) resulted in an increase in *SIRT1* mRNA and SIRT1 protein levels (Figure 3C and D). This increase in SIRT1 expression was associated with the induction of the SIRT1 promoter

(Figure 3E), which was mediated by a decrease in the occupancy of the SIRT1 promoter by PARP-2 (Figure 3F).

SIRT1 activation enhances mitochondrial oxidative capacity of multiple metabolic tissues.³¹ We detected increased mitochondrial DNA content both in the aorta and in MOVAS cells upon the deletion or depletion of PARP-2 (Figure 4A and C). Increased mitochondrial biogenesis was further supported by increased expression of genes involved in biological oxidation (*Foxo1*, *ATP5g1*, *ndufa2*, and *ndufb5*) in aortas (Figure 4B). Higher expression of oxidative genes was maintained in *PARP-2*^{-/-} mice even after DOX treatment compared with *+/+* mice (Figure 4B). To provide further evidence for the involvement of increased mitochondrial activity, mitochondrial membrane potential and oxygen consumption were determined in MOVAS cells upon DOX treatment (Figure 4D and E). Without DOX treatment, scPARP-2 and shPARP-2 MOVAS cells displayed similar mitochondrial membrane potential, but PARP-2 silencing resulted in a slightly higher oxygen consumption rate. Oxygen consumption and free radical production increased at 7 h after DOX treatment (Figures 2B and 4D), suggesting mitochondrial uncoupling and mitochondrial dysfunction. Mitochondrial membrane potential in scPARP-2 MOVAS cells increased in line with the increment of DOX concentration, suggesting mitochondrial hyperpolarization (Figure 4E). Hyperpolarization of mitochondrial membrane has been described as an early event in apoptosis supporting impaired mitochondrial biogenesis.³⁴ Overall oxygen consumption was higher in shPARP-2 MOVAS cells than in scPARP-2 cells. The difference in oxygen consumption increased upon DOX treatment similarly, while mitochondrial hyperpolarization was much lower suggesting milder mitochondrial damage (Figure 4D and E).

4. Discussion

DOX toxicity affects both cardiac and vascular functions.¹ In the vasculature, DOX treatment has been shown to affect endothelial function⁹ but no definitive data are available for its effect on the vascular smooth muscle and the extracellular matrix.^{4,5,10} We have affirmed the deterioration of endothelial function in DOX-treated animals but it seems to be independent of both PARP-2 and PARP-1, at least 2 days post-treatment. Importantly, however, early upon DOX administration, vascular smooth muscle is also damaged. We have shown that the deletion of PARP-2 provided protection against the vascular failure induced by DOX. Moreover, this protective phenotype was linked to the preservation of vascular smooth muscle. PARP-2 depletion did not modulate the DNA breakage–PARP-1 activation–cell death pathway. Therefore, it is likely that PARP-2 does not affect PARP-1 activation that may exert its deleterious effects.

As a possible alternative protective mechanism, we have investigated the preservation of mitochondrial functions, as it has been shown to protect against DOX toxicity.^{26–29,33} PARP-2 depletion has been recently associated with the induction of mitochondrial oxidation through the induction of SIRT1 expression.¹⁹ The link between PARP-2 depletion–SIRT1 activation–enhancement of mitochondrial biogenesis was further supported by the fact that SIRT1 activation has been shown to induce mitochondrial biogenesis in various tissues.^{30–32} Indeed, we have detected increased SIRT1 content after PARP-2 ablation both *in vivo* and in cultured aortic smooth muscle cells which was the consequence of the induction of the SIRT1 promoter.

The augmented expression and activity of SIRT1 caused enhanced mitochondrial biogenesis, which may have contributed to the resistance of PARP-2^{-/-} animals against vascular DOX toxicity. It appears that higher level of mitochondrial activity provides an advantage for PARP-2-depleted cells over control cells upon oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction (e.g. DOX treatment). Mitochondrial biogenesis, induced by PARP-2 depletion, may counterbalance the DOX-induced loss of mitochondrial activity (Figure 5).

To the best of our knowledge, this is the first study reporting the protective properties of SIRT1-induced mitochondrial biogenesis in blood vessels. Indeed, SIRT1 has been shown to act as a cardioprotective factor.^{33,35–38} Pharmacological activation of SIRT1 by resveratrol has been demonstrated to induce mitochondrial activity in cardiomyocytes.³³ However, it must be noted that results obtained with resveratrol cannot simply be attributed to SIRT1 activation, as the specificity of resveratrol towards SIRT1 is debated.³⁹ Moreover, it may act as a free radical scavenger;⁴⁰ hence, it may eliminate reactive species released by DOX. Therefore, resveratrol may interfere with PARP-1 activation by quenching free radicals and hence protect mitochondria, or may act on unknown pharmacological targets to confer protection. As Danz *et al.*³³ have detected a complete loss of free radical production upon resveratrol treatment, it cannot be ruled out that resveratrol treatment acted upstream of mitochondrial biogenesis induction interfering with PARP-1 activation and provided protection through blunting PARP-1-mediated cell death.

In the heart, SIRT1 can activate other protective mechanisms. SIRT1 may deacetylate p53 and induce the expression of Bax family proteins.⁴¹ SIRT1 may also impair PARP-1 activation and the consequent cellular dysfunction through deacetylating PARP-1³⁸ or by consuming NAD⁺.³⁷ However, we did not observe differences in PARP activity or NAD⁺ consumption in PARP-2-depleted smooth muscle

cells or in the PARP-2^{-/-} aorta, but observed an up-regulation of SIRT1 and increased mitochondrial protein expression and function. These apparent differences suggest that the mechanism of vascular protection may consist of different pathways than the ones observed in the heart. Importantly, however, preservation of mitochondrial function seems to be a key issue in the protection against DOX toxicity.

It is tempting to speculate that SIRT1-mediated induction of mitochondrial biogenesis may also have contributed to the protective phenotype of PARP-2 ablation in oxidative stress-mediated diseases such as colitis¹⁶ or cerebral ischaemia^{15,17} and could be exploited in other oxidative stress-related diseases. This hypothesis calls for the continuation of the development of PARP-2-specific inhibitors that may be used in such settings.¹⁷

In summary, here, we provide evidence for the protective role of SIRT1 in the vasculature and implicate PARP-2 as a new target to limit DOX-induced vascular damage. Furthermore, we propose that modulation of the PARP-2–SIRT1 axis to enhance mitochondrial activity may be a new therapeutic pathway to revert mitochondrial hypofunction in the cardiovascular system or in other organs.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We acknowledge the help of Mrs Erzsébet Herbály and Mrs Anita Jeney and the helpful corrections of György Haskó.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by a Bolyai fellowship to P.B. and A.T.; National Innovation Office (FR-26/2009, Baross program ÉletMent and Seahorse grants); Hungarian National Science Foundation (CNK80709, IN80481, K60780, K84300, K73003, K82009, PD83473); University of Debrecen, Medical and Health Science Center (Mecenatura Mec-8/2011); Hungarian Ministry of Health (ETT 430/2006); TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 and TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0019 projects implemented through the New Hungary Development Plan, co-financed by the European Social Fund.

References

- Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;**339**: 900–905.
- Pacher P, Liaudet L, Bai P, Mabley JG, Kaminski PM, Virag L *et al.* Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* 2003;**107**:896–904.
- Doroshov JH, Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* 1986;**261**:3068–3074.
- Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virag L, Szabo C, Pacher P. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep* 2004;**11**: 505–508.
- Dawer SP, Featherstone T, Ratcliffe MA, Weir J, Dawson AA, Bennett B *et al.* Accelerated increase in aortic diameter in patients treated for lymphoma. *Heart Vessels* 1988;**4**:237–240.
- Pedrycz A, Wiczorski M, Czerny K. The influence of a single dose of adriamycin on the pregnant rat female liver-histological and histochemical evaluation. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 2004;**59**:319–323.
- Bristow MR, Minobe WA, Billingham ME, Marmor JB, Johnson GA, Ishimoto BM *et al.* Anthracycline-associated cardiac and renal damage in rabbits. Evidence for mediation by vasoactive substances. *Lab Invest* 1981;**45**:157–168.

8. Ochodnický P, Henning RH, Buikema H, Kluppel AC, van Wattum M, de Zeeuw D et al. Renal endothelial function and blood flow predict the individual susceptibility to adriamycin-induced renal damage. *Nephrol Dial Transplant* 2009;**24**:413–420.
9. Murata T, Yamawaki H, Yoshimoto R, Hori M, Sato K, Ozaki H et al. Chronic effect of doxorubicin on vascular endothelium assessed by organ culture study. *Life Sci* 2001;**69**:2685–2695.
10. Taga I, Yamamoto K, Kawai H, Kawabata H, Masada K, Tsuyuguchi Y. The effects of intra-arterially injected adriamycin on microvascular anastomosis. *J Reconstr Microsurg* 1987;**3**:153–158.
11. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 1985;**101**:4–15.
12. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Virag L, Mabley JG, Hasko G et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**300**:862–867.
13. Pacher P, Liaudet L, Mabley JG, Cziraki A, Hasko G, Szabo C. Beneficial effects of a novel ultrapotent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in murine models of heart failure. *Int J Mol Med* 2006;**17**:369–375.
14. Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P et al. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 1999;**274**:17860–17868.
15. Kofler J, Otsuka T, Zhang Z, Noppens R, Grafte MR, Koh DW et al. Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;**26**:135–141.
16. Popoff I, Ijion H, Monia B, Tavernini M, Ma M, McKay R et al. Antisense oligonucleotides to poly(ADP-ribose) polymerase-2 ameliorate colitis in interleukin-10-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**303**:1145–1154.
17. Moroni F, Formentini L, Gerace E, Camaioni E, Pellegrini-Giampietro DE, Chiarugi A et al. Selective PARP-2 inhibitors increase apoptosis in hippocampal slices but protect cortical cells in models of post-ischaemic brain damage. *Br J Pharmacol* 2009;**157**:854–862.
18. Menissier-de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J* 2003;**22**:2255–2263.
19. Bai P, Canto C, Brunyanszki A, Huber A, Szanto M, Cen Y et al. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab* 2011;**13**:450–460.
20. Bai P, Hegedus C, Erdelyi K, Szabo E, Bakondi E, Gergely S et al. Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-treated thymocytes: implication for cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2007;**170**:203–213.
21. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* 2004;**306**:2105–2108.
22. Scaduto RC Jr, Grotyhann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 1999;**76**:469–477.
23. Erdelyi K, Bai P, Kovacs I, Szabo E, Mocsar G, Kakuk A et al. Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J* 2009;**23**:3553–3563.
24. Brunyanszki A, Hegedus C, Szanto M, Erdelyi K, Kovacs K, Schreiber V et al. Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress. *J Invest Dermatol* 2010;**130**:2629–2637.
25. Bai P, Houten SM, Huber A, Schreiber V, Watanabe M, Kiss B et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma heterodimer. *J Biol Chem* 2007;**282**:37738–37746.
26. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;**98**:1253–1260.
27. Hasinoff BB, Schnabl KL, Marusak RA, Patel D, Huebner E. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria. *Cardiovasc Toxicol* 2003;**3**:89–99.
28. Tao R, Karlner JS, Simonis U, Zheng J, Zhang J, Honbo N et al. Pyrroloquinoline quinone preserves mitochondrial function and prevents oxidative injury in adult rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**363**:257–262.
29. Xu M, Ashraf M. Melatonin protection against lethal myocyte injury induced by doxorubicin as reflected by effects on mitochondrial membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 2002;**34**:75–79.
30. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006;**444**:337–342.
31. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006;**127**:1109–1122.
32. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005;**434**:113–118.
33. Danz ED, Skramsted J, Henry N, Bennett JA, Keller RS. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. *Free Radic Biol Med* 2009;**46**:1589–1597.
34. Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, Ledgerwood EC, Ku HH, Murphy MP. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett* 2000;**475**:267–272.
35. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 2007;**100**:1512–1521.
36. Borradaile NM, Pickering JG. NAD(+), sirtuins, and cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2009;**15**:110–117.
37. Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD+ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem* 2005;**280**:43121–43130.
38. Rajamohan SB, Pillai VB, Gupta M, Sundaresan NR, Konstantin B, Samant S et al. SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol Cell Biol* 2009;**29**:4116–4129.
39. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS et al. SIRT1720, SIRT2183, SIRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 2010;**285**:8340–8351.
40. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. Oxysresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 2003;**9**:64–76.
41. Zhang C, Feng Y, Qu S, Wei X, Zhu H, Luo Q et al. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. *Cardiovasc Res* 2011;**90**:538–545.