

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A mikroerek vazomotor működésének vizsgálata diabetes mellitusban

Dr. Beleznai Tímea Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Bagi Zsolt



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2012

A mikroerek vazomotor működésének vizsgálata diabetes mellitusban

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Beleznai Tímea Zsuzsanna okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Bagi Zsolt, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Szekeres Mária, Ph.D.
Dr. Páll Dénes, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. június 5. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Koller Ákos, az MTA doktora
Dr. Lontay Beáta, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Koller Ákos, az MTA doktora
Dr. Lontay Beáta, Ph.D.
Dr. Szekeres Mária, Ph.D.
Dr. Páll Dénes, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. június 5. 13:00

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1 Kardiovaszkuláris megbetegedések diabetes mellitusban

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

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

cerebrális-, kardiális, és alsó végtagi mikrokeringési zavarok nagymértékben hozzájárulnak az e betegségben szenvedők fokozott morbiditási és mortalitási rizikójához. A megváltozott mikroér működés természete és a háttérben álló pontos kórélettani mechanizmusok azonban nem kellően ismertek, ezért a szöveti keringést fenntartó, illetve az azt javító terápiás lehetőségek még nem kellő mértékben kidolgozottak.

1.2 Az L-arginin szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben

Az elmúlt években az L-arginin a kutatások középpontjába került a NO szintézisben betöltött szerepe miatt, valamint az állatkísérletes modellekben tapasztalt kedvező hatásai következtében, ahol annak egyszerű adása megállította, vagy visszafordította az erek atherogenezisét. Korábbi klinikai vizsgálatokban kimutatták, hogy 5g L-arginin adása orálisan vagy intravénásan naponta, növelte a NO felszabadulást endothel diszfunkcióval rendelkező betegekben. Exogén L-arginin adására az eNOS aktivációja jön létre annak ellenére, hogy az L-arginin már eleve feleslegben van jelen, ez az „arginin-paradox”-nak nevezett jelenség. Az L-arginin szintje a plazmában nem változik kardiovaszkuláris betegségekben, azonban felvetődött, hogy a biológiai hozzáférhetősége csökkent az eNOS számára a megnövekedett argináz aktivitás következtében, amely ezáltal az NO produkció csökkenéséhez vezet. Az eNOS endogén inhibitorának az aszimmetrikus dimetil-arginin-nek (ADMA), a megemelkedett szintje pathofiziológiás állapotokban (pl kardiovaszkuláris betegség) gátolja a NO termelést. Az ADMA az L-arginin helyére kötődve gátolja az eNOS működését, amely felveti azt a hipotézist, hogy L-arginin adása hatásos az emelkedett ADMA szinttel rendelkező betegekben, de hatástalan normál, vagy alacsony ADMA szint esetén. Az L-arginin első klinikai alkalmazása kardiovaszkuláris betegségben szenvedő betegeken 1991-ben Drexler és munkatársai nevéhez fűződik. Koronária-katéterezés közben ACh-t és L-arginint jutattak a koronária erekbe és mérték az áramlásfokozódást. A

kardiovaszkuláris betegségben szenvedők esetében jelentős áramlás növekedést tapasztaltak, míg kontroll esetekben az L-arginin adásának nem volt hatása.

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

1.3. A fokozódott argináz 1 expresszió lehetséges szerepe diabetes mellitusban

Az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz szubsztrátja az L-arginin csakúgy, mint az arginázok családjába tartozó argináz 1-nek. Az argináznak két izomere ismert. Az argináz 1 citoszolikus enzim, nagy mennyiségben fordul elő a májban az urea-ciklus részeként, míg az argináz 2 mitokondriális lokalizációjú, és főleg a vesében található, valamint mindkét izomer előfordul endothelsejtekben. A megnövekedett argináz aktivitást különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekben mutatták ki eddig, mint például pulmonáris hipertóniában, erektilis diszfunkcióban, koronária betegségekben. Streptozotocinnal (β -sejtek elpusztítása) indukált diabetes mellitusban megfigyelték az argináz 1 expressziójának a növekedését patkány aortában és májban, ami az ACh által kiváltott vazorelaxáció károsodásával párosult a koronária arteriolákban. Az argináz 2 gyengén volt detektálható utalva ezzel az argináz 1 súlyozott szerepére. Jól ismert, hogy az inzulin gátolja az urea szintézis génjeinek expresszióját, aminek az abszolút vagy relatív hiánya T1DM és T2DM-ben, fokozott argináz aktivitáshoz és csökkent L-arginin mennyiségéhez vezet. Az argináz fokozott működése képes az L-arginin

biológiai hozzáférhetőségét korlátozni az eNOS számára, ezáltal az endothelsejtek NO termelését csökkenti. Az argináz 1 lehetséges kolokalizációja az eNOS-al, megnövekedett argináz 1 aktivitás esetén csökkentheti az L-arginin mennyiségét az NO produkció számára. Az nem teljesen tisztázott, hogy az argináz 2 hogyan befolyásolja az eNOS működését. Lehetséges magyarázata, hogy a fokozott mitokondriális L-arginin degradáció megnöveli annak transzportját a citoplazmából a mitokondriumba, ezáltal csökkentve a NO termelés szubsztrátját. Li és munkatársai, bovine vénából származó endothelsejtekbe argináz 1-et vagy 2-t kódoló patkány cDNS-t jutattak az L-arginin felhasználás fokozására, amelynek következtében az argináz 1 aktivitása 258%-al nagyobb volt, mint az argináz 2-é. A megemelkedett argináz 1 expresszió hatására az eNOS NO termelése 60%-kal csökkent a kontrollhoz viszonyítva, amelyet a nitrit-nitrát szint csökkenésének a mérésével határoztak meg, valamint megfigyelték az L-arginin felvételének enyhe emelkedését a sejtekbe. A megemelkedett argináz 1 aktivitás kialakulásában a diabetes mellitusra jellemző hiperglikémia is szerepet játszhat. Magas glükóz koncentrációjú oldatban (25 mmol/L, 24 órás) inkubált bovine koronária endothelsejtekben fokozott argináz aktivitást, valamint 50%-kal csökkent NO termelést tapasztaltak. A fokozott argináz 1 aktivitás kimutatására, az endothelsejteket argináz 1 siRNA-val transzfektálták, amely teljesen meggátolta a magas glükóz koncentráció által okozott NO termelés csökkenését. Anthony R. White és munkatársai szolgáltak először közvetlen bizonyítékkal az eNOS és argináz reciprok regulációjáról, argináz knock-down (géncsendesített) patkány vaszkuláris endothelsejtekben. Argináz 1 knock-down endothelsejtekben jelentősen javult az eNOS aktivitása, míg argináz 2 esetében nem történt változás, ami az argináz 1 domináns szerepére utal a patkány endothelsejtekben. Ezen eredmények azt tükrözik, hogy a fokozott argináz aktivitásnak vagy expresszióknak a befolyásolása, egy lehetséges terápiás utat nyújthat az egyes kardiovaszkuláris betegségek kezelésében diabetes mellitusban.

1.4. Az fehérjék O-GlcNAc módosulása diabetes mellitusban

A glikoziláció egyik speciális formája az úgynevezett O-GlcNAc (oxigén-kapcsolt N-acetilglükózamin) típusú glikoziláció, ami a hexózamin bioszintézis útvonalhoz tartozik (HBP). Ennek során a glükóz a hexózamin útvonal enzimatis lépésein keresztül átalakulva a fehérjék szerin és treonin oldalláncaihoz kapcsolódik. *In vitro* sejtkultúrán végzett tanulmányok alapján a sejtek által felvett glükóz közel 2- 5%-a lép be a HBP-ba. A belépés folyamatát és sebességét az *L*-glutamin-*D*-fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz (GFAT) szabályozza, mely a fruktóz-6-foszfátot (Fru-6-P) alakítja glükózamin-6-foszfáttá (Glc-NH₂-6-P), glutamint használva amino-csoport donorként. A glükózamin-6-foszfát átalakulása számtalan intermedier terméken keresztül az uridin 5'-difoszfo-*N*-acetilglükózamin (UDP-GlcNAc) szintéziséhez vezet. Az UDP-GlcNAc glikozid prekuzorként szerepel glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok szintézisében, ugyanakkor esszenciális donor a fehérjék O-GlcNAc módosulásához. Számos fehérjén az O-GlcNAc csoport verseng a foszfátcsoporttal a szerin és treonin helyekért, ezáltal potenciálisan befolyásolja a fehérjék (pl: a kinázok, foszfatázok, transz-kripciók faktorok, metabolikus enzimek) működését. Újabban felmerült annak lehetősége, hogy hasonló glikozilációs folyamatok következtében funkcionális változás következhet be az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz működésében is hiperglikémia esetében. Köztudott, hogy a diabetes mellitus kardiovaszkuláris szövődményeinek kialakulásában a hiperglikémia jelentős szerepet játszik. A megemelkedett plazma glükóz koncentráció következtében az endothelsejtekbe bejutó glükóz mennyisége megnő. A glükóz endothelsejtekbe lépése inzulintól független mechanizmussal, a GLUT-1 glükóz-transzporter révén, a koncentráció gradienst követve jön létre. A krónikusan megemelkedett glükóz fluxus a HBP-ban inzulin rezisztenciához és glükóz toxicitáshoz vezet. Húsz évvel ezelőtt Marshall és munkatársai mutatták ki először a direkt kapcsolatot a fluxus megemelkedése HBP-ban és az inzulin rezisztencia között patkány zsírsejtekben. A HBP fluxusa

kísérleti úton növelhető exogén glükóz vagy glükózamin adásával. A glükózamin szintén a glükóz-transzporter rendszeren keresztül jut be a sejtekbe, ahol glükózamin-6-foszfáttá foszforilálódik hexokinázok által, így képes megkerülni a HBP sebességét szabályozó GFAT enzimet, ezáltal gyors UDP-GlcNAc szintemelkedést eredményez. A megnövekedett fluxus a HBP-ben károsítja az IR (inzulin receptor)/IRS (inzulin receptor szubsztrát)/PI3-K/Akt útvonalat, a foszforilációs helyek glikozilálásával létrehozva az eNOS működészavarát és a következményes endothel diszfunkciót. A NO nem csak elengedhetetlen az érátmérő szabályozásában, hanem fontos szabályozó szerepe van a thrombocyta aggregációban, gyulladásos folyamatokban, remodellingben valamint az atherogenesis gátlásában. Az eNOS-t elsősorban a Ca^{2+} szint emelkedése aktiválja, de működését a tetrahidrobiopterin (BH_4)-koncentráció, a kaveolinhoz kötődés és számos foszforilációs hely foszforiláltsági állapota (Ser114, Ser1177, Thr495, Ser615, Ser633) is jelentősen befolyásolja. Az eNOS foszforilációs helyei közül, a Thr495 foszforilációja gátolja, a Ser1177 foszforilációja aktiválja az enzimet. Federici és munkatársai, humán koronária endothelsejteket 20 mmol/L glükóz vagy 7.5 mmol/L glükózamin jelenlétében inkubált 72 órán keresztül. Az eNOS enzimen az O-GlcNAc-csoport jelenléte 294%-kal emelkedett a kontrolléhoz képest, amelyet a GFAT inhibitor azaserin teljes mértékben gátolt magas glükóz koncentráció jelenlétében, de nem volt hatással a glükózaminnal kezelt sejtekre. In vitro kináz assay alkalmazásával, a ^{32}P –nak a jelenléte 46%-kal (magas glükóz) és 83%-kal (glükózamin) csökkent, amely az eNOS aktivációjának a szignifikáns gátlását mutatja a megemelkedett glikoziláció következtében. Az eNOS Ser1177 foszforilációs hely vizsgálata Western blot analízissel 37%-os (magas glükóz) és 42%-os (glükózamin) csökkenést eredményezett inzulin stimulációra. Az O-GlcNAc szerepét a sejtfunkció szabályozásában számos betegségghez kötötték, köztük az inzulinrezisztenciához és diabetes mellitushoz, azonban az ennek a talaján

kialakuló károsodott endothel működés mechanizmusa és ennek a hatása a mikroerek működésére még nem pontosan ismert.

2. CÉLKITŰZÉS

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

Mindezek alapján tudományos kutatásaimban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

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

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

3. MÓDSZERTAN

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

3.1. *A betegek jellemzése*

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

Vizsgálatainkba 41 szívsebészeti műtéten átesett beteget vontunk be. A betegeket a dokumentáltan ismert diabetes mellitus betegség megléte (DM+) illetve annak hiánya (DM-) alapján két csoportra osztottuk.

3.2. *Izolált mikroértechnika*

Izolált mikroér kísérleteinknek egy részét koronária arteriolákon (~100 µm átmérő), valamint patkány gracilis vázizomból izolált arteriolákon (~150 µm) végeztük. A koronária arteriolákat koronária bypass műtét vagy billentyűcsere során eltávolított jobb fülcsé darabból izoláltuk. Nembutállal altatott állatokból steril körülmények között eltávolítottuk a musculus gracilis vázizmot. A jobb fülcsét, valamint a musculus gracilis vázizmot egy hideg (0-4°C, pH 7,4) Krebs-oldatot tartalmazó szilikon alapú Petri-csészében tűkkel rögzítettük, majd Nikon SMZ 1000 sztereomikroszkóp segítségével, mikrosebészeti eszközökkel az elsőrendű koronária arteriola 2-3 mm-es szakaszát, valamint a gracilis arteriola másodrendű ágának 2-3 mm-es szakaszát izoláltuk. Az izolált arteriolát először egyik végén (ez lett a proximális vég) kanülálva rögzítettük, majd 20 Hgmm-es

perfúziós nyomással a lumenből a vérsejteket eltávolítottuk. Ezután az ér disztális végét is megkanuláltuk és miután egy mikrocavar segítségével beállítottuk az eredeti érhosszt, egy állandó hőmérsékletű ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$) szervfürdőbe helyeztük. A szervkamrát folyamatosan oxigenizált Krebs-oldattal áramoltattuk át (40 ml/min). Az intraluminális nyomást folyadékoszlop segítségével lassan 80 Hgmm-re emeltük és körülbelül 60 percig ott tartottuk, amíg az ér állapota stabilizálódott. Közben az intraluminális nyomást folyamatosan nyomástranzducerrel mértük. A felvételek egy mikroszkóphoz (Nikon, Eclipse 80i) rögzített digitális kamerával (CFW1310, Scion Corp, USA) készültek. Az izolált arteriola belső átmérőjét az Image J software-rel mértük (NIH Image, MD, USA).

3.3. A humán koronária arteriolák működésének vizsgálata vazoaktív szerekkel

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

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

A jobb fülcséből izolált koronária arteriolákat 30 percig NO szintáz gátló N^{ω} -

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

3.4. Kísérleti protokollok patkány izolált vázizom ereken

Arterioláris dilatáció vizsgálata vazoaktív szerekkel patkány izolált vázizom ereken

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

kialakuló átmérőváltozásokat.

A magas glükóz koncentráció és a glükózamin vazoaktív hatásának vizsgálata

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

3.5. Immunhisztokémia

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

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

3.6. Western immunoblot

A diabetes mellitus hatása az argináz 1 expresszióra humán koronária arteriolákban

A DM (-) és DM (+) betegek jobb fülcséjéből izolált koronária arteriolákat, a környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd 20 µl SDS mintapufferben homogenizáltuk. A fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen 125 V feszültségen 1 óra alatt szeparáltuk, majd polyvinil membránra transzferáltuk. Ezt követően membrán szabad kötőhelyeit 5% tejet tartalmazó T-BST-vel 1 óráig blokkoltuk. A membránt az argináz 1 ellenes elsődleges antitesteket 1:1000 hígításban 5% tejet tartalmazó T-BST oldatban inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcencia segítségével autoradiográfiás módszerrel vizualizáltuk. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, β-aktin ellenes antitestet 1:5000 hígításban használtunk 5% tejet tartalmazó T-BST-ben. Az optikai denzitást Image J szoftver segítségével mértük és az argináz 1 expresszióját β-aktinra normalizáltuk.

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

Wistar patkányokból izolált arteriolákat (artéria femorális ágai), a környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd három csoportra osztva: **normál glükóz (5.5 mmol/L, 2 órás inkubáció)**, **magas glükóz (30 mmol/L, 2 órás inkubáció)** és **glükózamin (5 mmol/L, 2 órás inkubáció)** kezelésnek vetettük alá. A mintákat folyékony nitrogénben megfagyasztottuk, majd 20 µl RIPA bufferben homogenizáltuk, 20 µl mintapuffer hozzáadásával a fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen 125 V feszültségen 1 óra alatt szeparáltuk, majd polyvinil

membránra transzferáltuk. Ezt követően az eNOS és a GlcNAc detektálására szánt membránok szabad kötőhelyeit 5% tejet, míg a P-eNOS detektálása esetén 1% marha szérumban albumint tartalmazó T-BST-vel 1 óráig blokkoltuk. Az O-GlcNAc és eNOS ellenes elsődleges antitesteket 1:1000 hígításban 5% tejet tartalmazó T-BST-ben alkalmaztuk, míg a P-eNOS antitestet 1:500 hígításban 1% marha szérumban albumint tartalmazó T-BST oldatban inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcencia segítségével autoradiográfiás módszerrel vizualizáltuk. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, β -aktin ellenes antitestet 1:5000 hígításban használtunk 5% tejet tartalmazó T-BST-ben. Az optikai denzitást Image J szoftver segítségével mértük és az O-GlcNAc és eNOS expresszióját β -aktinra, míg a P-eNOS expresszióját eNOS-ra normalizáltuk.

3.7. Az eredmények statisztikai értékelése

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

4. EREDMÉNYEK

4.1. *A diabetes mellitus hatása a koronária arteriolák vazomotor működésére*

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

Az egyórás inkubáció során az izolált humán koronária arteriolákon 80 Hgmm-es intraluminális nyomás hatására spontán miogén tónus alakult ki. Nem volt szignifikáns különbség a diabeteses [DM(+)] és nem diabeteses [DM(-)] betegekből izolált arteriolák között sem az aktív [AD, az egyórás inkubáció után kialakult átmérő], sem a passzív [PD, a kalcium mentes Krebs-oldatban mérhető átmérő] érátmérőkben, sem az ezek alapján kalkulált $([PD-AD/PD]*100)$ miogén tónusban.

Elsőként az endothel-függő vazodilatátor acetilkolin kumulatív dózisait alkalmazva (ACh; 0,1 nmol/L – 0,1 μ mol/L), a humán koronária arteriolák konstriktója alakult ki mindkét csoportban. A NO szintáz gátló (L-NAME, 2×10^{-4} mol/L) kezelésnek nem volt további hatása a kialakult válaszra. A NO-donor nitroprusszid nátrium (SNP, 1 nmol/L és 10 μ mol/L) adására az izolált koronária arteriolák jelentős mértékű vazodilatációja alakult ki, ami nem különbözött a két betegcsoport koronária mikroerein. Ezek az eredmények és a kezdetben kalkulált közel azonos miogén tónus a simaizom megtartott reaktivitását mutatja a két ércsoportban.

Korábbi vizsgálatokban, a diabetes mellitusban megfigyelték a NO termelés csökkenését, vagy teljes károsodását. Ennek a hátterében álló okok feltárására a továbbiakban a szelektív argináz gátló jelenlétében is (L-NOHA, 10 μ mol/L, 30 percig) vizsgáltuk a válaszokat. Míg a nem diabeteses betegek arterioláin a szelektív argináz gátló nem befolyásolta jelentősen az acetilkolin indukált érválaszokat, addig a diabetes mellitusban szenvedő betegek koronária arterioláiban szignifikáns mértékben javította az ACh válaszokat.

A megnövekedett argináz aktivitás csökkentheti a NO szintézishez szükséges szubsztrát, az L-arginin mennyiségét. Ennek igazolására, L-arginin hozzáadása után is (3 mmol/L, 30 percig) megvizsgáltuk a válaszokat. Míg a nem diabeteses betegek arterioláin az L-arginin nem befolyásolta az acetilkolin indukált érválaszokat, addig a diabetes mellitusban szenvedő betegek koronária arterioláiban szignifikáns mértékben javította azokat. A szelektív argináz gátlóval (L-NOHA) történő előkezelés a mikroerek kiindulási belső átmérőjét nem befolyásolta jelentős mértékben, azonban az L-arginin kezelés növelte az átmérőt.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a DM(+) betegekből izolált erek falában az argináz 1 festődés jelentősen fokozott volt az endothelsejtekben összehasonlítva a DM(-) betegek mintáival, valamint az argináz 1 kolokalizációt mutatott az eNOS festődéssel a DM(+) betegekből, míg a DM(-) csoportban ez nem volt megfigyelhető. Az argináz 1 fehérje fokozott expresszióját sikerült kimutatni a DM(+) betegek koronária arterioláiban Western immunoblot segítségével.

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

elváltozásoknak szerepe van a mikrovaszkuláris diszfunkció kialakulásában diabetes mellitusban.

4.2. A magas glükóz koncentráció hatása vázizom arteriolák vazomotor működésére

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

Elsőként az endothel-függő vazodilatátor acetilkolin (ACh; 1 nmol/L – 1 μ mol/L) és hisztamin (1 nmol/L – 10 μ mol/L) által kiváltott vazodilatációt vizsgáltuk kontroll körülmények között. Az ACh ~90%-os a hisztamin ~ 70%-os kezdeti vazodilatációt eredményezett. A NO szintáz gátló (L-NAME, 2 X 10⁻⁴ mol/L) kezelésnek nem volt hatása az acetilkolin általt kiváltott vazodilatációra, azonban a hisztamin válaszát szignifikánsan csökkentette. Ennek oka, hogy az ACh elsősorban EDHF-en keresztül váltja ki az erek vazodilatációját és kevésbé hangsúlyos a NO útvonal szerepe.

A következő kísérletekben az arteriolákat magas glükóz koncentrációjú oldatban (30 mmol/L, 2 órás inkubáció) inkubáltuk és ismét megvizsgáltuk az acetilkolin és hisztamin válaszokat. A magas glükózszint szignifikánsan csökkentette a hisztamin által kiváltott vazodilatációt, míg az acetilkolin válaszra nem volt hatással. Hiperozmotikus kontroll kísérletekben a hisztamin válasz nem változott mannitol (25 mmol/L, 2 órás inkubáció) jelenlétében. A NO szintáz gátlónak (2 X 10⁻⁴ mol/L) nem volt hatása a magas glükóz koncentrációjú oldattal (30 mmol/L) kezelt arteriolák hisztamin és acetilkolin válaszára. A HBP útvonal egyik kulcs enzime az *L*-glutamin-*D*-fruktóz-6-foszfát

amidotranszferáz (GFAT). A GFAT enzim antagonistája azaserin ($20\ \mu\text{mol/L}$), a hisztamin indukálta vazodilatációt a kontroll (normál glükóz koncentrációjú) válasz szintjére emelte vissza a magas glükóz szintnek kitett gracilis erekben. Az azaserin és a magas glükóz koncentráció jelenlétében a NO szintáz gátló (L-NAME) adására a hisztamin kiváltotta vazodilatáció mértéke szignifikánsan csökkent.

A HBP-n való átáramlás kísérleti úton növelhető exogén glükózamin adásával, mely a glükóz -transzporter rendszeren keresztül jut be a sejtekbe, glükózamin-6-foszfáttá foszforilálódik hexokinázok által, így képes megkerülni a HBP sebességét szabályozó GFAT enzimet, ezáltal gyors UDP-GlcNAc szint emelkedést eredményezve. A következőekben a glükózamin (5mmol/L) hatását vizsgáltuk izolált gracilis arteriolákon. A hisztamin indukálta vazodilatáció szignifikánsan csökkent glükózamin adására, azonban az azaserinnel való inkubációnak nem volt hatása, a magas glükóz esetéhez hasonlóan. Vizsgálatainkat kiterjesztettük az endothelium-független nitroprusszid-nátrium (SNP) vazodilatátorra, valamint a simaizmon ható vazokonstriktor norepinefrin (NE) és szerotonin (5HT) anyagokra. Kontroll körülmények között a NO-donor SNP növekvő dózisának adására az izolált gracilis arteriolák jelentős mértékű vazodilatációja alakult ki, míg a NE és az 5-HT vazokonstriktort okozott. Mindhárom esetben a magas glükóz koncentrációjú ($30\ \text{mmol/L}$) kezelésnek nem volt hatása a SNP, 5-HT és NE válaszokra.

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

Második lépésben arra kerestük a választ, hogy az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz foszforiláltsági szintje hogyan változik magas glükóz koncentráció hatására. Ismert, hogy reciprok kapcsolat van a foszforiláció és az

O-GlcNAc-glikoziláció között – tekintettel arra, hogy a foszforilációt végző kinázok ugyancsak a szerin/treonin kötőhelyeket célozzák. A Ser1177 hely foszforiláltsága az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz enzimen, annak aktivációjához vezet. A magas glükóz koncentrációval kezelt femorális artériákban a (P)eNOS szintje szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz hasonlítva.

5. MEGBESZÉLÉS

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

Tudományos kutatásaimban ezért célul tűztem ki, hogy tanulmányozzam a diabetes mellitusban a humán koronária erek vazomotor működésében létrejövő elváltozásokat. E cél érdekében a szívsebészeti műtéten átesett betegekből származó, izolált koronária mikroerekben vizsgáltam a létrejövő patológiás

mechanizmusokat és lehetséges okait az endothel-függő és simaizom által közvetített vazomotor működésében. Továbbá célul tűztem ki, hogy feltárjam az egyes vázizom mikroerek vazomotor működészavarában szerepet játszó lehetséges mechanizmusokat, különös tekintettel a megemelkedett glükóz koncentráció mikrovaszkuláris hatásaira.

5.1. Diabetes mellitus hatása a koronária mikroerek vazomotor működésére

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

A NO fontos szerepet tölt be az érátmérő szabályozásában test szerte, így a koronária arteriolák átáramlásában is. Nagyszámú kutatási eredmény mutatja a nagy- és rezisztencia erek csökkent NO termelését diabetes mellitusban. A diabeteses betegek koronária ereiben kimutatott endothel diszfunkció kórélettani szerepe és a háttérben húzódó mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a szívműtéten átesett betegek jobb fülcséjéből izolált koronária arteriolákon az endothel-függő vazodilatátor ACh vazokonstrikciót indukált mind a diabeteses mind a nem diabeteses csoportban

egyaránt, feltételezhetően az eNOS kóros működése következtében. A NO szintáz gátló L-NAME kezelésnek nem volt hatása a kialakult válaszra. Ezek az eredmények a NO mediálta vazomotor válasz hiányára utalnak mind a diabeteses és nem diabetes csoportban egyaránt. Az endothel-független, direkt NO-donor SNP hatására kialakult vazodilatáció mértéke vizsgálatainkban nem különbözött a két betegcsoport koronária arterioláiban, ami arra utal, hogy a szolubilis guanilát cikláz és a cGMP-függő jelátvitel megtartott a simaizomban. A humán koronária arteriolákon végzett kísérletek egyik limitáló tényezője az igazi kontroll hiánya. Fiatal, koronária betegségben nem szenvedő egyedekből (billentyű műtét) származó jobb pitvari fülcséből izolált koronária arteriolák, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ACh hatására jelentős (~60%) vazodilatációt mutattak, amely L-NAME jelenlétében gátolható volt (Bagi, munkacsoportunk nem közölt eredménye), utalva ezzel a NO útvonal jelentős szerepére a humán koronária arteriolákban.

A NO szintézishez különböző kofaktorok és szubsztrátok szükségesek, mint például tetrahydrobiopterin és L-arginin. Ezen anyagoknak a biológiai hozzáférhetősége az eNOS számára csökkent diabetes mellitusban. Orális glükóz terhelésnek kitett egészséges egyedekben csökkent brachiális áramlást tapasztaltak, ami előzetes BH_4 kezeléssel megelőzhető volt, valamint L-arginin adása orálisan vagy intravénásan javítja az endothel diszfunkciót diabeteses betegekben. Az L-arginin adása felvet bizonyos kételyeket, mert a NO szintáz szükséges L-arginin K_m értéke 2.9 $\mu\text{mol/l}$, az L-arginin intracelluláris koncentrációja 0.1-1mmol/l között változik, ami jóval meghaladja az eNOS igényeit. Ez a jelenség az úgynevezett „arginin paradox”. Újabb eredmények felvetik az argináz lehetséges szerepét az L-arginin szintjének csökkenésében az eNOS közvetlen közelében, ezáltal befolyásolva a NO szintézis mértékét. Ezzel összhangban, egy másik munkacsoport fokozott argináz 1 aktivitást mutatott ki diabeteses patkányok koronária arterioláiban.

Ezek a megfigyelések felvetik az argináz szerepét a diabetes mellitusban kialakuló endothel diszfunkcióban, ezért diabeteses humán koronária

arteriolákban tanulmányoztam az argináz expresszióját. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a diabeteses betegekből izolált erek falában az argináz 1 festődés jelentős fokozódását találtuk az endothelsejtekben, összehasonlítva a nem diabeteses betegek mintáival, valamint az argináz 1 kolokalizációt mutatott az eNOS festődéssel a diabeteses betegekben, míg a nem diabeteses csoportban ez nem volt megfigyelhető. Az argináz 1 fehérje fokozott expresszióját sikerült kimutatni a diabeteses betegek koronária arterioláiban Western immunoblot segítségével is. A fokozott argináz 1 expresszió funkcionális következményeinek a feltárására, a diabeteses és nem diabeteses betegekből származó koronária arteriolák L-argininnel történő inkubációja a diabeteses csoportban visszaállította az endothel függő agonista által kiváltott vazodilatációt, amely során az ACh vazodilatációt váltott ki az L-argininnel történő inkubáció előtt megfigyelt vazokonstrikció helyett. A nem diabeteses csoport esetében nem tapasztaltunk változást az ACh indukálta válaszban L-argininnel történő inkubáció esetén. A megnövekedett argináz aktivitás további alátámasztására, a szelektív argináz gátló (L-NOHA) alkalmazására az ACh szintén vazodilatációt váltott ki a diabeteses csoportban, míg a válasz változatlan maradt a nem diabeteses betegekből származó koronária arteriolában. Mivel nem áll rendelkezésünkre szelektív argináz 1 vagy 2 gátló, ezért nem tudjuk kizárni az argináz 2 lehetséges szerepét a diabetesben kialakult endothel diszfunkcióban. Azonban, Romero és munkatársai streptozotocin injekcióval létrehozott diabetikus egerek aortáján vizsgálták az argináz két izoformájának, az argináz 1(AI) és 2(AII)-nek a hatását az endothel függő vazodilatációra, valamint felmérték az erek fibrotikus állapotát és stiffness-ét. Diabetes mellitusban az endothel-függő vazodilatáció szignifikánsan csökkent a wild type (WT, 53%) és az $AI^{+/+}AII^{-/-}$ (44%) aortákban, összehasonlítva az $AI^{+/-}AII^{-/-}$ (27%) egerekből származó mintákkal. Az erek stiffness-e és a koronáriák fibrózisa szintén szignifikánsan fokozott volt WT és az $AI^{+/+}AII^{-/-}$ egerekben, amely arra utal, hogy az argináz 1-nek jelentős szerepe van a diabetes

mellitusban létrejövő endothel diszfunkcióban. Azok a mechanizmusok, amelyek a fokozott argináz 1 expresszióhoz vezetnek a diabeteses betegek koronária arterioláiban továbbra is tisztázatlanok. Ismert, hogy az inzulin gátolja az urea ciklus enzimeinek az expresszióját és a kialakult inzulin rezisztencia (T2DM), vagy abszolút inzulin hiány (T1DM) következtében ez a regulációs mechanizmus károsodik és hozzájárul a fokozott argináz 1 expressziójához. A vizsgálataink során felvetődött az a kérdés, hogy azon betegeknél, akik nem szenvedtek diabetes mellitusban, viszont más kardiovaszkuláris és egyéb betegségeik voltak, a koronária arteriolák nem mutattak javulást az L-NOHA és L-arginin kezelésre, amely kizárja a fokozott argináz expresszió lehetőségét. Így a károsodott endothel-függő vazodilatáció hátterében egyéb mechanizmusok lehetnek, mint például a megemelkedett endogen NO szintáz inhibitor ADMA, vagy csökkent kofaktorok (BH4) szintje. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a diabetes mellitusban szenvedő betegekben fokozódik az argináz 1 expresszió, amely az L-arginin szubsztrát nagyobb mértékű felhasználása következtében csökkenti annak biológiai hozzáférhetőségét az eNOS számára, így csökkenti vagy teljesen eltörli a NO-mediált vazodilatációt a koronária arteriolákban. Feltételezzük, hogy ezen elváltozásoknak szerepe van a mikrovaskuláris diszfunkció kialakulásában diabetes mellitusban.

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

Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a magas glükóz koncentráció károsítja az áramlás-mediálta endothel-függő vazodilatációt és a különböző endothel-függő agonisták által kiváltott vazodilatációt, ezáltal hozzájárulva a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához. A magas glükóz koncentráció hatására létrejövő elváltozások kialakulásáért több molekuláris mechanizmust tesznek felelőssé, többek között a polyol utat, a fehérjék nem enzimátikus glikációját (előrehaladott glikációs végtermékek: AGE-advanced glycation end

products), a HBP útvonalat és a Protein kináz C (PKC) aktivációt. A polyol út feltételezhetően a fokozott oxidatív stressz következtében fejti ki káros hatását, ugyanis az aldóz reduktáz, mely a glükózt szorbitollá alakítja, depletálja a sejt NADPH tartalmát, s ezen keresztül a redukált glutationt is, így az egyensúly az oxidatív irányba mozdul el. Az AGE képzés mind sejtben belül, mind extracellulárisan olyan nem-specifikus glikált fehérjéket eredményez, melyek közvetlenül vagy közvetve, jelátviteli folyamatokat beindítva járnak káros következményekkel. A glükóz úgyszintén növeli *de novo* a diacil-glicerol (DAG) szintjét, mely a PKC aktiválásához vezet. A PKC számos folyamat beindítója, növekedési faktorok termelődését serkenti (VEGF, transzformáló növekedési faktor- β [TGF- β]), NAD(P)H oxidázon keresztül növeli a szabadgyökök mennyiségét, valamint csökkenti az eNOS aktivitását [147]. A HBP megemelkedett fluxusa hiperglikémia következtében a fehérjék szerin és treonin oldalláncainak O-GlcNAc glikozilációját eredményezi. Tartósan magas glükóz-expozíció az egyensúlyt a fokozott glikoziláció irányába tolja el, amely különböző kóros folyamatok beindításához vezet.

Jelen kutatásaimban ezért a magas glükóz koncentráció vázizom arteriolák vazomotor működésére gyakorolt hatását tanulmányoztam. Továbbá, vizsgáltam az elváltozások hátterében álló endothel- és simaizom sejtek által közvetített mechanizmusokat is. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a patkány gracilis vázizmából izolált arteriolákban a magas glükóz koncentráció hatására a hisztamin által kiváltott dilatáció teljes mértékben gátlódott, összehasonlítva a kontroll csoporttal. A hisztamin által kiváltott dilatáció endothel-függő, H_1 receptoron keresztül mediált. A hisztamint választottuk az eNOS működésének vizsgálatára magas glükóz koncentráció esetén, mivel korábban kimutattuk, hogy az L-NAME-nek jelentős gátló hatása van a hisztamin által kiváltott vazodilatációra a gracilis arteriolán, amely a NO súlyozott szerepére utal. Továbbá, vizsgáltuk az ACh (szintén endothel-függő vazodilatátor) által

kiváltott vazodilatációt, de ebben az esetben a magas glükóz koncentrációjú oldatban történt kezelésnek nem volt hatása az ACh válaszra.

A magas glükóz kezelés hatására kialakult károsodott hisztamin indukálta vazodilatáció megelőzhető volt a HBP útvonal egyik sebesség-meghatározó enzimének, a GFAT-nek (amely a fruktóz-6-foszfátot alakítja glükózamin-6-foszfáttá) a gátlásával azaserinnel, ami az O-GlcNAc típusú glikoziláció jelentőségére utal ebben a folyamatban. Ennek alátámasztására a GFAT enzimet kikerülő glükózaminnal történő inkubáció szignifikánsan csökkentette a hisztamin által kiváltott vazodilatációt, azonban az azaserinnel történő inkubáció nem javította a károsodott vazodilatációt a magas glükóz koncentrációjú csoporttal összehasonlítva. Ennek oka: a HBP útvonal fluxusa emelhető glükózamin exogén adásával, amely a glükóz transzport rendszeren keresztül bejutva a sejtekbe, hexokinázok segítségével glükózamin-6-foszfáttá alakul, ezáltal hozzájárul az UDP-GlcNAc szint emelkedéséhez és a következményes O-GlcNAc fehérje glikozilációhoz a GFAT enzim megkerülésével. Az endothel független, direkt NO donor (SNP) vazodilatátor hatásában nem találtunk különbséget a kontroll erekhez viszonyítva, ami arra enged következtetni, hogy a vaszkuláris simaizom NO érzékenysége nem változik magas glükóz koncentráció hatására. Hasonló eredményeket mutattak ki fruktózzal etetett inzulin rezisztens patkányok a cerebri mediajában, ahol csökkent mértékű endothel-függő vazodilatációt találtak, míg az endothel független SNP-kiváltott dilatáció nem különbözött a kontroll csoporthoz viszonyítva. A simaizom sejteken ható vazokonstriktor norepinefrin és szerotonin hatásában szintén nem találtunk különbséget a kontroll és a magas glükóz csoport között. Azonban rendelkezésre állnak olyan tanulmányok, ahol streptozotocinnal kezelt patkányokban a norepinefrin és a hisztamin által kiváltott konstriktó csökkenését találták. A funkcionális eredményekkel összhangban, a fehérjék fokozott O-GlcNAc típusú glikozilációját találtuk a magas glükózzal és glükózaminnal kezelt vázizom arteriolákban a kontroll csoporthoz képest.

Ismert, hogy reciprok kapcsolat van a foszforiláció és az *O*-GlcNAc glikoziláció között – tekintettel arra, hogy a foszforilációt végző kinázok ugyancsak a szerin/treonin kötőhelyeket célozzák. A Ser1177 hely foszforiláltsága az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz enzimen annak aktivációjához vezet. A magas glükózzal kezelt femorális artériákban szignifikánsan csökkent az eNOS foszforiláltsági állapota a Ser1177 helyen a kontroll csoporthoz hasonlítva. Előzőekben, magas glükóz koncentrációnak kitett sertés aorta endothelsejteken kimutatták az eNOS Ser1177 helyének a gátolt foszforilációját és Th495 (inhibitor hely, ha foszforilált az eNOS inaktivációjához vezet) defoszforilációjának csökkenését bradykinin hatására. Ezért lehetséges, hogy a fehérjék *O*-GlcNAc típusú glikozilációja interferál mind az aktivációs, mind az inhibitor helyekkel az eNOS enzimen.

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

6. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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



További Közlemények

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

Összesített impakt faktor: 22.775

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

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

Debrecen, 2012.01.20

