Functional and structural determinants of vascular dysfunction in experimental diabetes : focus on advanced glycation end products

Chapter 8

Summary

Summary

Diabetes mellitus is a disease which is characterized by hyperglycaemia, a relative or absolute lack of insulin, and a propensity to vascular disease and neuropathy. Two forms of diabeties mellitus can be distinguished. Type 1 diabetes or insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is characterized by its juvenile onset and a state of absolute insulin deficiency caused by destruction of the insulin producing pancreatic β cells. Type 2 diabetes or non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) affects mainly older people. In NIDDM defects in insulin secretion coexist with a relative insulin resistance often related to obesity.
Two types of vascular disease have been described in diabetes. Microangiopathy, which affects capillaries and arterioles in the eye, the kidney and other organs, is relatively unique to diabetes. Macroangiopathy is morphologically very similar to atherosclerosis in nondiabetics, but is more extensive and occurs at an earlier age. The underlying mechanisms, that are involved in the development and deterioration of these diabetic complications are not yet clear. In this thesis, an attempt is made to further characterize diabetic vascular complications in an animal model for type 1 diabetes, i.e. the streptozotocin-induced diabetic rat. Furthermore, one possible mechanism, formation of advanced glycation end products (AGE), that may contribute to the development and exacerbation of the complications studied, is further investigated.

In *chapter 2*, we studied the effects of six weeks streptozotocin-induced diabetes on microvascular reactivity in male Wistar Rp rats. A dorsal microcirculatory chamber was implanted, which allows intravital microscopy of striated muscle arterioles of varying diameter in conscious animals. The effects of intravenous administration of the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine and the potassium-channel opener levcromakalim, as well as the vasoconstricting effects of angiotensin II and norepinephrine were studied. Heart rate and mean arterial pressure (MAP) were measured during the drug infusions. The absolute change in MAP after drug administration tended to be lower in the diabetic rats compared to their nondiabetic littermates. Arteriolar vasodilator responses to acetylcholine and levcromakalim were attenuated in the diabetic animals, whereras vasoconstrictor responses were not influenced by the diabetic state. Chronic treatment with aminoguanidine, an inhibitor of AGE formation, had no influence on MAP or arteriolar reactivity in diabetic animals, which indicates that formation of AGEs is likely not involved in the microvascular disturbance observed after 6 weeks of diabetes.

In *chapter 3* the mechanical properties of mesenteric conduit arteries were studied in rats with diabetes-duration of 7-9 weeks and compared with nondiabetic controls. A diabetes-induced increase in external diameter was clearly demonstrated in situ.

Pressure-induced increases in diameter were significantly larger in diabetic arteries compared to nondiabetic control arteries in a pressure range of 25 to 75 mmHg. This led to an increased arterial compliance in the diabetic animals, but no change in arterial distensibility. The same results were obtained after abolition of smooth muscle tone by poisoning with KCN. The enhanced external diameter, termed outward remodeling, is likely caused by an increased flow to the small intestine due to hyperphagia in experimental diabetes. Normally, chronic increases in flow not only induce outward remodeling, but are usually accompanied by wall hypertrophy, to normalize circumferential wall stress that increases during the expansion of the vessels. A statistical significant wall hypertrophy was, however, not detected in mesenteric arteries of diabetic rats. Possibly, advanced glycosylation of regulating proteins, such as growth factors, interferes with the hypertrophic response normally seen in situations of elevated blood flow.

In *chapter 4* the mechanism of a possible disturbance in endothelium-dependent and -independent relaxation in large arteries of 3 months diabetic rats was investigated more thoroughly. Nitric oxide, produced by the endothelium or generated by nitrovasodilators, activates soluble guanylate cyclace (sGC) to produce 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP). cGMP is the second messenger molecule which induces relaxation of vascular smooth muscle cells. Basal and stimulated cGMP concentrations were measured in intact and de-endothelialized carotid arteries of control and diabetic rats, untreated or treated with aminoguanidine or insulin for 10-12 weeks. In arteries with an intact endothelial layer, no differences in basal or stimulated cGMP concentration were found between diabetic and control rats. De-endothelialization led to a reduced sensitivity of diabetic arteries for stimulation with sodium-nitroprusside or S-nitroso-N-acetyl-penicillamine, two nitrovasodilators that increase cGMP content independently of the endothelium. Insulin, but not aminoguanidine treatment could prevent this reduced response. This implies that in diabetes, loss of endothelial integrity may have more severe consequences on vascular function than in nondiabetic subjects. AGEs are probably not involved in this disturbance.

Chapter 5 describes the hemodynamic properties of concious diabetic rats and relates these findings to the morphology of several arteries along the vascular tree. Severe cardiac dysfunction and hemodynamic changes were demonstrated in diabetic rats after 3 months of hyperglycaemia. This was indicated by reductions in cardiac output, cardiac index, stroke volume index and maximal flow acceleration. Several arteries exhibited a hypotrophic inward remodeling, without a change in media-to-lumen ratio. However, no morphological changes were found in the thoracic aorta of diabetic rats compared to controls, despite severe reductions in cardiac output. Small mesenteric arteries displayed hypertrophic outward

remodeling. These results indicate that hemodynamic changes in conscious diabetic rats were accompanied by heterogenous morphologic adaptations.

In *chapter 6* investigations are described on a new pharmacologic tool that reacts with and cleaves covalently, AGE-derived protein cross-links. The hemodynamic properties of 3 months diabetic rats under anesthesia were investigated after curative treatment for 1 or 3 weeks with this AGE-breaker. Diabetes-induced increase of large artery stiffness, as measured by systemic arterial compliance, aortic impdance, and carotid compliance and distensibility were reversed after 3 weeks of treatment. This study implies some promising findings for future treatment of diabetic patients as well as aged people and people suffering from diseases involving AGE accumulation, such as Alzheimer disease.

Finally, an integrated view on the separate studies described in this thesis is given in the general discussion (*chapter 7*). Answers to the research questions, posed in the introduction (*chapter 1*), are discussed.

Chapter 9

Samenvatting

Samenvatting

Diabetes mellitus is een chronische ziekte die gekenmerkt wordt door hoge bloedsuikers, een relatieve of absolute afwezigheid van insuline, en een neiging tot vasculaire complicaties en neuropathie. Er worden twee vormen van diabetes onderscheiden. Type 1 diabetes of de insuline afhankelijke vorm van diabetes mellitus (IADM) wordt gekenmerkt door het ontstaan op jeugdige leeftijd en een toestand van absolute insuline-deficiëntie, veroorzaakt door destructie van insuline producerende β-cellen in de pancreas. Type 2 diabetes of niet insuline afhankelijke diabetes mellitus (NIADM) komt hoofdzakelijk voor bij ouderen. Hierbij treedt er een defect op in insuline secretie, waarbij ook sprake is van een relatieve ongevoeligheid van weefsels voor insuline, hetgeen (deels) samenhangt met de aanwezigheid van overgewicht.
Twee typen vasculaire complicaties komen voor bij diabetes patiënten. Bij microangiopathie zijn kleinere vaten aangetast, zoals capillairen en arteriolen in het oog, de nieren en andere organen. Deze vorm van vasculaire complicatie is relatief uniek voor mensen met diabetes. Macroangiopathie duidt op een aantasting van de grotere vaten en is morfologisch niet te onderscheiden van atherosclerose, zoals die voorkomt bij mensen zonder diabetes. Macroangiopathie is echter vaak uitgebreider aanwezig bij diabetes patiënten en komt ook voor op jongere leeftijd. De onderliggende mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan en de verdere ontwikkeling van deze vasculaire complicaties zijn nog niet volledig opgehelderd. Dit proefschrift beoogt deze diabetische vasculaire complicaties verder te karacteriseren met behulp van een dierlijk model voor type 1 diabetes, nl. de streptozotocine-geïnduceerde diabetische rat. Verder wordt één van de mogelijke mechanismen bestudeerd die betrokken zijn bij de ontwikkeling en verergering van complicaties. Het betreft de vorming van geglycosyleerde produkten. Glycosylering, een proces veroorzaakt door de reactie van circulerende suikers zoals glucose met eiwitten en anderen macromoleculen, interfereert met de functie van een aantal weefsels die belangrijk zijn voor het normaal functioneren van het cardiovasculaire systeem.

In *hoofdstuk 2* worden de veranderingen in microvasculaire reactiviteit bestudeerd die optreden na 6 weken streptozotocine-geïnduceerde diabetes in Wistar Rp ratten. Ratten werden voorzien van een "dorsale microcirculatie kamer", die het mogelijk maakt kleine vaatjes in een dwarsgestreepte spier op de rug van de rat te bekijken met behulp van een microscoop. Op die manier konden diameterveranderingen gemeten worden in arteriolen van wakkere ratten, na intraveneuze toediening van vaatverwijders, zoals acetylcholine en levcromakalim, en vasoconstrictoren, zoals angiotensine II en noradrenaline. Tijdens de infusies van vasoactieve stoffen werden bloeddruk en hartfrequentie van de rat gemeten. De absolute verandering in

gemiddelde arteriële druk leek wat lager te zijn bij de diabete ratten in vergelijking met de controles. Arteriolaire vasodilatatie die optradt na infusie van acetylcholine en levcromakalim was minder groot bij de diabeten, terwijl vasoconstrictie na infusie van angiotensine II en noradrenaline niet verschillend was tussen diabete en controle ratten. Chronische behandeling met aminoguanidine, een remmer van de vorming van glycosyleringsproducten, had geen invloed op gemiddelde arteriële druk en arteriolaire reactiviteit bij diabete ratten. Dit geeft aan dat de vorming van glycosyleringsproducten waarschijnlijk niet betrokken is bij de microvasculaire complicatie die optreedt na 6 weken diabetes.

Hoofdstuk 3 beschrijft de mechanische eigenschappen van mesenteriale geleidingsarteriën bij ratten met een diabetes-duur van 7-9 weken in vergelijking met controle ratten. De externe diameter van mesenteriale arteriën was significant groter bij diabete ratten, zowel de uitgangsdiameter als na opvoering van de druk in stappen van 25 mmHg (range 0-150 mmHg). Een toegenomen compliantie werd vastgesteld in deze vaten, terwijl de distensibiliteit onveranderd bleef. Vergelijkbare resultaten werden verkregen na uitschakeling van de vaatspier tonus met behulp van KCN. De toegenomen externe diameter wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een toegenomen doorbloeding van de dunne darm, tengevolge van hyperfagie bij diabete ratten. Dit proces waarbij de diameter toegenomen is noemt men uitwaartse remodellering. Meestal leidt een toegenomen doorbloeding niet enkel tot uitwaartse remodellering, maar ook tot hypertrofie van de vaatwand. Dit laatste treedt op om de circumferentiële wandspanning te normaliseren tijdens uitzetting van de vaten. Een statistisch significante hypertrofie van de vaatwand kon echter niet worden vastgesteld. Mogelijk interfereert glycosylering van eiwitten zoals groeifactoren met de hypertrofe respons die normaal optreedt na een chronische toename van de bloedtoevoer.

In *hoofdstuk 4* werd dieper ingegaan op het mechanisme van een mogelijke verstoring in de endotheel-afhankelijke en -onafhankelijke relaxatie in grote arteriën van ratten met een diabetes duur van 3 maanden. Stikstofoxide, dat geproduceerd wordt door het endotheel of exogeen wordt toegediend, stimuleert het oplosbaar guanylaat cyclase tot de productie van 3', 5'-cyclisch guanosine monofosfaat (cGMP). cGMP is een boodschapper molecuul dat relaxatie van vaten induceert. Basale en gestimuleerde cGMP concentraties werden gemeten in intacte halsslagaders van diabete en controle ratten en in slagaders waarvan het endotheel was verwijderd. Er werden geen verschillen gevonden in cGMP concentratie tussen diabete en controle ratten in intacte halsslagaders. Verwijdering van het endotheel zorgde er echter voor dat de cGMP concentratie in vaten van diabete ratten significant lager was, na stimulatie met endotheel-onafhankelijke nitrovasodilatoren. Chronische behandeling met insuline voorkwam deze gereduceerde respons,

behandeling met aminoguanidine had geen effect. Hieruit kon geconcludeerd worden dat beschadiging van de endotheellaag bij diabeten ernstige gevolgen kan hebben voor het normaal functioneren van vaten. Glycosyleringsproducten zijn waarschijnlijk niet betrokken bij deze vasculaire stoornis.

Hoofdstuk 5 behandelt de hemodynamische eigenschappen in wakkere diabete ratten en tracht deze bevindingen te koppelen aan de morfologische veranderingen die optreden in verschillende arteriën na 3 maanden diabetes. Ernstige hartafwijkingen en hemodynamische veranderingen werden aangetoond in de diabete ratten in vergelijking met controle ratten. Enkele bevindingen waren: een afname in absoluut en geïndexeerd hartminuutvolume, een gereduceerd geïndexeerd slagvolume en een afname in maximale versnelling van de bloedtoevoer. Bij verschillende arteriën werd een hypotrofe inwaartse remodellering vastgesteld, zonder verandering in wand-lumen ratio. Ondanks een ernstige afname in hartminuutvolume, werden deze morfologische aanpassingen niet teruggevonden bij de thoracale aorta. Kleine mesenteriaal arteriën vertoonden hypertrofe uitwaartse remodellering, waarschijnlijk tengevolge van een toegenomen doorbloeding van het mesenteriaal vaatbed. De resultaten van dit hoofdstuk tonen aan dat hemodynamische veranderingen in wakkere diabete ratten vergezeld worden door heterogene morfologische aanpassingen aan de vaten.

In *hoofdstuk 6* worden de hemodynamische en mechanische eigenschappen beschreven van diabete ratten die curatief behandeld werden met een nieuw farmacologisch middel, dat ingrijpt op reeds gevormde glycosyleringsproducten. In tegenstelling tot aminoguanidine, dat de vorming van deze producten tegengaat, reageert dit middel met de irreversibele glycosyleringsproducten die zich opstapelen in allerlei weefsels onder invloed van hoge bloedsuikerspiegels en inactiveert het deze producten. De afgenomen elasticiteit van vaten die optreedt tengevolge van diabetes, was na 3 weken curatieve behandeling met dit farmacon opnieuw sterk toegenomen. Dit middel is waarschijnlijk veel belovend voor de toekomstige behandeling van zowel diabetes patiënten als oudere mensen en mensen met de ziekte van Alzheimer.

Tenslotte wordt in *hoofdstuk 7* een geïntegreerde visie gegeven over de studies die in de experimentele hoofdstukken van dit proefschrift werden beschreven. De antwoorden op de onderzoeksvragen, gesteld in de inleiding (hoofdstuk 1), worden in dit hoofdstuk bediscussieerd.