

Intracellular glycation and endothelial dysfunction : role of methylglyoxal

Citation for published version (APA):

Brouwers, O. (2011). *Intracellular glycation and endothelial dysfunction : role of methylglyoxal*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20110518ob>

Document status and date:

Published: 01/01/2011

DOI:

[10.26481/dis.20110518ob](https://doi.org/10.26481/dis.20110518ob)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

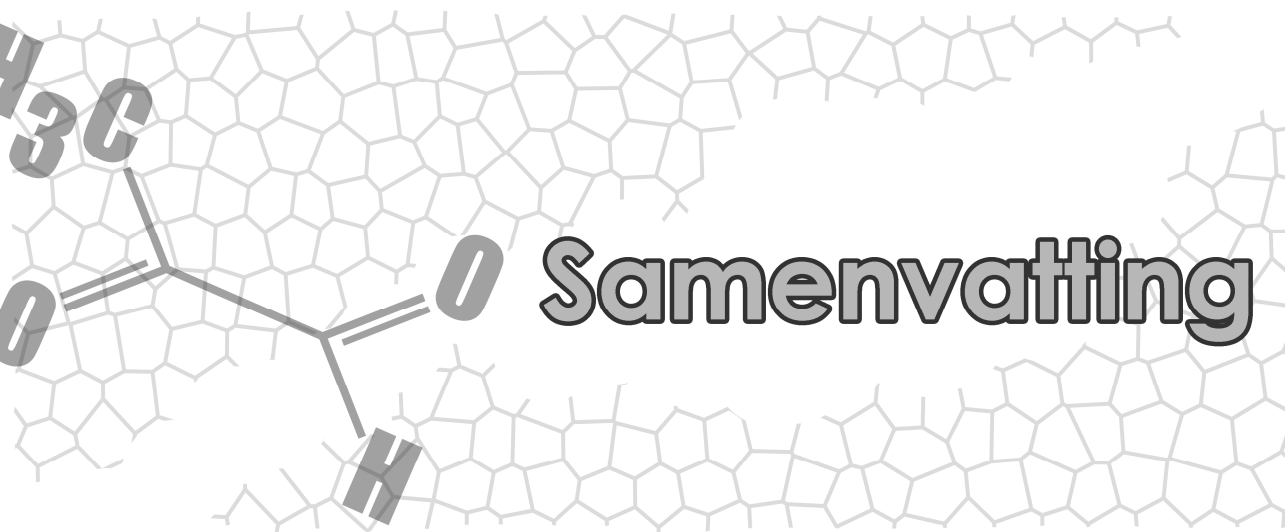
www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



Diabetes mellitus is een metabole aandoening die gekarakteriseerd wordt door een chronische deficiëntie in de productie (type 1 diabetes; T1DM) of het effect van insuline (type 2 diabetes; T2DM). Dit defect resulteert in verhoogde bloedglucose spiegels, die vervolgens schade veroorzaken aan de bloedvaten en belangrijke sterk gevasculeerde organen, zoals de retina, de nieren, het hart en het zenuwstelsel. Langdurige blootstelling aan hyperglycemie is daardoor de belangrijkste causale factor in de ontwikkeling van diabetes gerelateerde complicaties.

Een belangrijk mechanisme waardoor hyperglycemie diabetische complicaties kan veroorzaken is de formatie van advanced glycation endproducts (AGEs). AGEs zijn een heterogene familie van niet-enzymatisch door koolhydraten gemodificeerde eiwitten, die verhoogd zijn in patiënten met diabetes. Er zijn meerdere mechanismen waardoor AGEs kunnen bijdragen aan het ontstaan van vasculaire complicaties. Deze zijn onder andere de interactie van glyceringsproducten met hun receptor, de formatie van cross-links in de basaal membraan en intracellulaire accumulatie van geglyceerde eiwitten.

Het reactieve oxoaldehyde methylglyoxaal (MGO), wat voornamelijk wordt gevormd als een bijproduct van de glycolyse, wordt gezien als de belangrijkste AGE "precursor" in de hyperglycemische endotheelcellen van de bloedvaten. De accumulatie van MGO wordt onder fysiologische omstandigheden voorkomen door het glyoxalase ontgiftingsmechanisme, waarin glyoxalase-I (GLO-I) het belangrijkste enzym is.

Er bestaat geen twijfel dat AGEs een rol spelen in de ontwikkeling van vasculaire complicaties in diabetes, maar de exacte modificaties en mechanismen die hierbij betrokken zijn, zijn nog grotendeels onbekend. Het belangrijkste doel van dit proefschrift was dan ook om de rol van intracellulair MGO en van MGO afkomstige AGEs in het ontstaan van endotheelschade en vasculaire complicaties te onderzoeken.

In **Hoofdstuk 1**, de algemene introductie van dit proefschrift, worden bovengenoemde onderwerpen, zoals hyperglycemische schade, de vorming en detoxificatie van MGO en de schadelijke effecten van glyceringsproducten uitgebreid besproken. Tevens wordt in dit hoofdstuk uiteengezet wat in dit proefschrift onderzocht is.

De mechanismen waardoor diabetes leidt tot endotheeldisfunctie en vervolgens de ontwikkeling van orgaanschade zijn nog niet geheel opgehelderd. Een verstoring in de beschikbaarheid van het vaatverwijdende stikstof oxide (NO) lijkt echter een belangrijke stap te zijn in de ontwikkeling van vasculaire complicaties bij diabetes. Bij de synthese van NO is een oxidatie van het aminozuur L-arginine betrokken. L-Arginine analogen zoals het endogene asymmetrisch dimethylarginine (ADMA), staan bekend als remmers van het NO synthase enzym. Toename van intracellulair MGO in de endotheelcellen van diabetes leidt tot verhoogde spiegels van de arginine modificaties arginine-pyrimidine (AP) en N_ε-(5-

hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-L-ornithine (MG-H1). Ondanks dat deze modificaties structurele homologie vertonen met bekende NO inhibitoren, laten we in **Hoofdstuk 2** zien dat pathofysiologische waarden van vrij MGO, AP en MG-H1, in tegenstelling tot ADMA geen direct effect hebben op de activiteit van het endotheliale NO synthase enzym *in vitro*.

Een andere manier waarop de beschikbaarheid van NO verlaagd kan worden is door een versnelde afbraak. De vorming van oxidatieve stress door hyperglycemie en daarna de snelle reactie tussen vrije zuurstof radicalen met NO is een bekend fenomeen dat hiertoe bijdraagt. In **Hoofdstuk 3** van dit proefschrift beschrijven we dat incubatie van endotheelcellen met MGO leidt tot een toename in MG-H1 en ook oxidatieve stress. Het feit dat we in aan MGO blootgestelde *ex vivo* geïsoleerde ratten arteriolen een toename van het oxidatieve NO product peroxynitriet detecteren, bevestigt de vermeende reactie tussen MGO geïnduceerde zuurstof radicalen (ROS) en NO. Ten gevolge van deze verlaagde beschikbaarheid van NO is de acetylcholine geïnduceerde endotheel-afhankelijke vasculaire relaxatie beduidend lager in arteriolen die blootgesteld zijn aan MGO vergeleken met controle arteriolen. Experimenten in arteriolen afkomstig van ratten met een GLO-I overexpressie laten zien dat ook door hoog glucose geïnduceerde verslechtering van de vaatfunctie voor een groot deel afhankelijk is van MGO. Vermindering van oxidatieve stress door middel van antioxidanten normaliseert de vaatfunctie. Ondanks dat we ook aantonen dat MGO een klein direct effect heeft op de afbraaksnelheid van NO, lijkt de indirecte vorming van ROS de belangrijkste reden van de verslechterde vaatfunctie. De additionele observatie dat extracellulair MGO gemodificeerd albumine geen effect heeft op de vaatfunctie, versterkt de opvatting dat vooral intracellulaire verhoging van MGO belangrijke schadelijke effecten ten gevolge heeft.

Om de chronische effecten van hyperglycemie *in vivo* te bestuderen wordt er veelal gebruik gemaakt van ratten of muizen die diabetes gemaakt zijn met behulp van een streptozotocine (STZ) injectie. Om de rol van AGEs in de ontwikkeling van vasculaire complicaties te onderzoeken in dit proefdiermodel is er vóór het verschijnen van dit proefschrift vooral gebruik gemaakt van een interventie met de specifieke α -oxo-aldehyde "scavenger" aminoguanidine. In **Hoofdstuk 4** beschrijven we een nieuw GLO-I overexpressie model in ratten met diabetes, waarmee het mogelijk werd om de betrokkenheid van MGO in de ontwikkeling van vasculaire complicaties nauwkeuriger te onderzoeken. Dit hoofdstuk laat zien dat GLO-I overexpressie in staat is om de door diabetes verhoogde spiegels van MGO, AGEs en oxidatieve stress te verlagen. De observatie dat essentiële eiwitten van de mitochondriële ademhalingsketen gereguleerd

worden door MGO en GLO-I geeft weer dat mitochondriële ROS en glycering nauw aan elkaar verbonden zijn.

In **Hoofdstuk 5** onderzochten we de potentiële positieve effecten van GLO-I overexpressie op vaat- en nierfunctie na 12 en 24 weken STZ geïnduceerde diabetes in ratten. Door gebruik te maken van geïsoleerde mesenteriale arteriolen ontdekten we dat de NO gemedieerde relaxatie verminderd was in de ratten met diabetes en dat dit verbeterd kon worden door GLO-I overexpressie. Ook de verhoogde expressie van markers voor endotheeldisfunctie zoals VCAM-1 en ICAM-1 kon worden voorkomen. Deze verbeterde vaatfunctie had verder tot gevolg dat de door diabetes veroorzaakte stijging in vroege markers van nefropathie afgezwakt kon worden. De sterke positieve correlatie tussen urinaire albumine, osteopontine, lipocaline-2 en kidney injury molecule-1 waardes en de plasma AGEs N_ε-(1-carboxymethyl)lysine en N_ε-(1-carboxyethyl)lysine, weerspiegelen de betrokkenheid van AGEs bij het ontstaan van vroege nierschade.

Ratten met STZ geïnduceerde diabetes worden gekenmerkt door hypotensie. Met behulp van hartechoscopie en intra-arteriele bloeddruk metingen ontdekten we dat ratten met diabetes en een GLO-I overexpressie, onafhankelijk van hun hartfunctie een hogere bloeddruk vertoonden dan de wildtype ratten met diabetes. Deze observatie staat beschreven in **Hoofdstuk 6**, en kan worden verklaard door een betere contractie van zowel mesenteriale als renale vaten in de GLO-I rat.

De resultaten van dit proefschrift worden in **Hoofdstuk 7** samengevat en in relatie tot elkaar besproken. Er werd geconcludeerd dat MGO schadelijke effecten heeft op endotheelcel- en vaatfunctie, wat grotendeels afhankelijk is van de formatie van reactieve zuurstof radicalen. Verder laten we in een *in vivo* ratten model van diabetes zien dat detoxificatie van MGO door GLO-I overexpressie niet alleen de van MGO afkomstige AGEs verlaagd, maar ook oxidatieve stress gedeeltelijk voorkomt. Vervolgens verbetert deze detoxificatie ook de verminderde endotheelafhankelijke bloedvat relaxatie, de ontwikkeling van vroege nephropathie en diabetes geïnduceerde bloeddruk verlaging in ratten met type 1 diabetes. In de toekomst zal nieuwe kennis over de regulatie van het belangrijkste MGO detoxificerende enzym GLO-I, wellicht kunnen zorgen voor nieuwe aangrijpingspunten in de bestrijding van diabetes geïnduceerde vasculaire complicaties.