

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Łukasz Mateuszuk

**Rola endogennej N-metylotransferazy nikotynamidu w
przeciwzapalnej i przeciwmiażdżycowej aktywności kwasu
nikotynowego i jego pochodnej, 1-metylonikotynamidu (MNA)**

Rozprawa doktorska

promotor: prof. dr. hab. Stefan Chłopicki

Pracę wykonano w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej

Katedry Farmakologii CMUJ

Kierownik Katedry : prof. dr. hab. Ryszard Korbut

Kraków 2011

*Składam serdeczne podziękowania
Profesorowi Stefanowi Chłopickiemu, a także
wszystkim pracownikom Katedry Farmakologii,
Katedry Histologii i Katedry Żywienia Człowieka
za wielką życzliwość i cenne uwagi
dotyczące prowadzonych badań*

Spis treści

Wstęp	5.
1. Kwas nikotynowy i nikotynamid; dwie formy witaminy PP	5.
2. Kwas nikotynowy i nikotynamid jako substraty do syntezy NAD⁺	6.
3. Farmakologiczne działanie kwasu nikotynowego	7.
4. Farmakologiczne działanie nikotynamidu.....	11.
5. Metabolizm kwasu nikotynowego i nikotynamidu	14.
6. Aktywność biologiczna metabolitów kwasu nikotynowego i nikotynamidu.....	17.
Cele pracy	19.
Materiały i metody.....	20.
1. Mysi model miażdżycy	20.
2. Wybór odpowiedniego modelu żywienia myszy ApoE/LDL^{-/-} i protokołu badań	23.
3. Badanie przeciwmiażdżycowego działania egzogenego kwasu nikotynowego i MNA u myszy ApoELDLR^{-/-}	26.
3.1 Podział myszy na grupy	26.
3.1.1 Podział na grupy- eksperyment pilotażowy z wykorzystaniem diety standardowej	26.
3.1.2 Podział na grupy- eksperyment z wykorzystaniem diety aterogennej	27.
3.2 Metodyka badań	28.
3.2.1. Pomiar cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu	29.
3.2.2. Przygotowanie preparatów mikroskopowych korzenia aorty metodą <i>cross-section</i>	30.
3.2.3. Barwienie lipidów blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty.....	31.
3.2.4 Barwienia immunocytochemiczne obecności makrofagów w blaszkach miażdżycowych.....	31.
3.2.5. Pomiar stężenia SAA w osoczu.....	32.
3.2.6. Pomiar metabolitów kwasu nikotynowego w osoczu (LC/MS/MS).....	33.

4. Badanie zmian aktywności układu NNMT- MNA w toku rozwoju miażdżycy u myszy <i>ApoE/LDLR^{-/-}</i>	34.
4.1. Podział na grupy	34.
4.2. Metodyka badań	35.
4.2.1. Pomiar aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie	35.
4.2.2. Pomiar stężenia endogennych metabolitów kwasu nikotynowego w osoczu (LC/MS)..	36.
5. Statystyka	37.
Wyniki	38.
1. Pilotażowe badanie przeciwmiażdżycowego działania MNA i perindoprilu u myszy <i>ApoE/LDLR^{-/-}</i> z wykorzystaniem diety standardowej	38.
1.1. Wpływ egzogenego MNA i perindoprilu na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu	38.
1.2. Wpływ egzogenego MNA i perindoprilu na wielkość zmian miażdżycowych w korzeniu aorty	39.
1.3. Wpływ egzogenego MNA i perindoprilu na ilość makrofagów w zmianach miażdżycowych	41.
2. Badanie przeciwmiażdżycowego działania kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu u myszy <i>ApoA/LDLR^{-/-}</i> z wykorzystaniem diety aterogennej	43.
2.1. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu	43.
2.2. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na wielkość zmian miażdżycowych w korzeniu aorty	45.
2.3. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na ilość makrofagów i aktywność metaloproteinaz (MMP) w zmianach miażdżycowych	46.
2.4. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie SAA w osoczu	50.
2.5. Zmiany stężenia metabolitów kwasu nikotynowego w osoczu pod wpływem terapii kwasem nikotynowym, MNA i perindoprilem	51.
3. Zmiany aktywności endogenego układu NNMT- MNA w toku rozwoju miażdżycy u myszy <i>ApoE/LDLR^{-/-}</i>	54.
3.1. Porównanie aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie myszy <i>ApoE/LDLR^{-/-}</i> i <i>C57Bl/6J</i>	54.

3.2. Stężenie endogenego MNA i jego metabolitów w osoczu w trakcie rozwoju miażdżycy u myszy <i>ApoE/LDLR^{-/-}</i>	55.
Dyskusja	58.
1. Działanie egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na progresję miażdżycy i towarzyszący jej stan zapalny w rejonie korzenia aorty	59.
2. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie SAA (serum amyloid A) w osoczu	63.
3. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu	65.
4. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie pochodnych kwasu nikotynowego w osoczu	67.
5. Aktywność endogennej N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie myszy <i>ApoE/LDLR^{-/-}</i> i <i>C57Bl/6J</i>	68.
6. Stężenie endogenego MNA i jego metabolitów w osoczu myszy <i>C57Bl/6J</i> i <i>ApoE/LDLR^{-/-}</i>	70.
Wnioski	71.
Streszczenie	72.
Summary	75.
Wykaz stosowanych skrótów	78.
Bibliografia	84.

Wstęp

1. Kwas nikotynowy i nikotynamid; dwie formy witaminy PP

Kwas nikotynowy (*nicotinic acid, NicA, niacin, kwas 3- pirydylokarboksylowy*) i **nikotynamid** (*nicotinamide, NA, amid kwasu 3- pirydylokarboksylowego*) są dwiema formami witaminy B₃ (znanej również jako wit. PP) niezbędnymi do funkcjonowania wielu enzymów kluczowych dla metabolizmu. Niedobór związków z grupy pochodnych kwasu nikotynowego wywołany ubogą, lub nieprawidłowo zbalansowaną dietą jest przyczyną pelagry, co stwierdzono na początku lat 30- tych XX w. Do głównych objawów tej jednostki chorobowej zalicza się osłabienie i spadek masy ciała, zmiany skórne (stany zapalne), dolegliwości ze strony układu pokarmowego (biegunka) oraz reakcje ze strony układu nerwowego (początkowo rozdrażnienie, później demencja). Nikotynamid, który likwidował te objawy, został określony jako „czynnik przeciwpelagiczny” (*pellagra preventive*), skąd pochodzi obecna nazwa witaminy PP. Pochodne kwasu nikotynowego jako produkty metabolizmu nukleotydów pirydynowych są obecne głównie w produktach zwierzęcych i ich niedobór jest związany z dietą czysto roślinną, która zapewnia dostateczne ilości witaminy B₃, lecz w trudno przyswajalnej formie [83]. Również określone stany chorobowe, takie jak alkoholizm, przewlekła biegunka, przewlekłe zapalenie okrężnicy, marskość wątroby, tuberkuloza układu pokarmowego lub zespół Hartnupów mogą przyczynić się do wystąpienia pelagry [57]. Obecnie objawy niedoboru pochodnych kwasu nikotynowego występują rzadko i dotyczą głównie krajów rozwijających się.

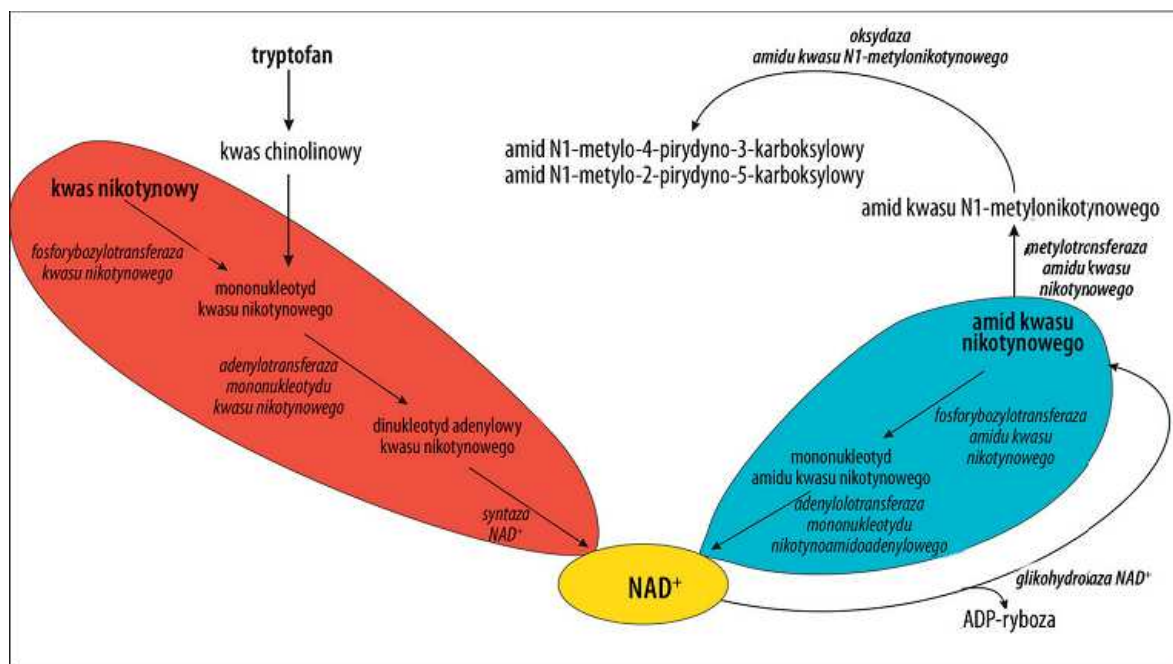
Skutki niedoboru nikotynamidu i kwasu nikotynowego wynikają z faktu, iż oba te związki są niezbędnymi substratami do syntezy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD⁺) i jego ufosforylowanej formy NADP, które pełnią rolę akceptorów lub donorów protonów w wielu istotnych reakcjach oksydo-redukcyjnych. NAD⁺ i NADP są kofaktorami enzymów aktywnych w szlaku glikolizy, przemianach metabolicznych aminokwasów, białek i pirogronianu, szlaku pentozofosforanowym, a także w biosyntezie cholesterolu i kwasów tłuszczowych [57;83;202]. Niedobór egzogenne kwasu nikotynowego i nikotynamidu ma więc niekorzystny wpływ na wszystkie wymienione powyżej szlaki metaboliczne zależne od NAD⁺/NADPH .

2. Kwas nikotynowy i nikotynamid jako substraty do syntezy NAD⁺

Zarówno kwas nikotynowy (NicA), jak i nikotynamid (NA) przyjmowane razem z pożywieniem stanowią wyjściowe substraty do syntezy NAD⁺, zachodzącej w dwóch oddzielnych szlakach (**ryc. 1**).

Egzogenny NicA wchodzi w trój etapowy szlak przemian zapoczątkowany reakcją katalizowaną przez fosforybotransferazę, w której jest przekształcany do rybonukleotydu kwasu nikotynowego. W toku dalszych przemian rybonukleotydu kwasu nikotynowego dzięki aktywności adenylotransferazy jest przekształcany do dinukleotydu adenyloвого kwasu nikotynowego. Trzeci etap szlaku obejmuje syntezę NAD⁺ katalizowaną przez swoistą syntazę.

Rybonukleotyd kwasu nikotynowego może być również syntetyzowany endogennie z tryptofanu, aminokwasu egzogenego dostarczanego wraz z pożywieniem [57]. Tryptofan stanowi istotne źródło endogennych pochodnych kwasu nikotynowego, koniecznych do utrzymania optymalnego stężenia NAD⁺. Jest on początkowym substratem dla szlaku kinurynowego, syntetyzującego kwas chinolinowy, a ten związek jest z kolei przekształcany do rybonukleotydu kwasu nikotynowego, wchodzącego w szlak przemian prowadzących do syntezy NAD⁺.



Ryc. 1. Główne szlaki syntezy NAD⁺ [123]

Oprócz szlaku reakcji prowadzących do syntezy NAD^+ , kwas nikotynowy może być przekształcany w pobocznym cyklu przemian, zapoczątkowanym przez reakcję z koenzymem A, w wyniku której powstaje nikotyno-CoA (**ryc. 2**). Związek ten po przejściu przez szlak przemian prowadzących do połączenia z glicyną tworzy kwas nikotynurynowy (NUA), który jak się sugeruje może być odpowiedzialny za występowanie rumienia u pacjentów przyjmujących niacynę [67;121], mechanizm tego zjawiska i udział receptorów kwasu nikotynowego zostały dokładniej opisane w podrozdziale 3.

Synteza NAD^+ z nikotynamidu obejmuje dwa etapy i rozpoczyna się reakcją katalizowaną przez fosforybotransferazę NA, w wyniku której powstaje mononukleotyd amidu kwasu nikotynowego. Związek ten dzięki aktywności adenylotransferazy mononukleotydu NA jest przekształcany bezpośrednio do NAD^+ .

NAD^+ może ulegać rozkładowi do wolnego nikotynamidu dzięki aktywności kompleksu cyklaza ADP-rybozy/glikohydrolaza cADPR. Jest to kompleks dwufunkcyjny, którego pierwsza aktywność enzymatyczna polega na przekształceniu NAD^+ do cyklicznej ADP-rybozy (cADPR), natomiast druga aktywność enzymatyczna hydrolizuje cADPR z uwolnieniem nikotynamidu i ADP-rybozy [123]. Poza opisanymi powyżej szlakami syntezy i przemian NAD^+ istnieją inne; min. katalizowane przez polimerazy poli(ADP)rybozy (PARP) [52;53] i sirtuiny [7;82] opisane w podrozdziale 4.

3. Farmakologiczne działanie kwasu nikotynowego

Kwas nikotynowy jest wykorzystywany od ponad 50 lat w terapii dyslipidemii i dobrze znane są korzystne działania tego związku na profil lipidowy; w tym podniesienie stężenia frakcji lipoprotein HDL, a także obniżenie stężenia frakcji LDL, chylomikronów, lipoprotein resztkowych, wolnych kwasów tłuszczowych i trójglicerydów [21;23;24]. Częsteczki frakcji HDL pełnią kluczową funkcję w trakcie procesu „wyplukiwania” (*efflux*) cholesterolu z makrofagów i komórek piankowatych, w czym pośredniczą trzy rodzaje białek transportowych zależnych od ATP (*ATP-binding cassette transporters; ABC*) obecne na powierzchni makrofagów: ABCA_1 , ABCG_1 , ABCG_4 i receptor zmiatający typu SR-BI (*scavenger receptor type BI*) na błonie hepatocytów. Przy udziale apolipoprotein AI, AII i E (głównie AI) tworzących białkowy kompartment lipoprotein HDL, cholesterol jest efektywnie

transportowany z makrofagów do wątroby [88]. Postuluje się, że kwas nikotynowy zwiększa pulę lipoprotein HDL poprzez hamowanie transportu wymiennego estrów cholesterolu i trójglicerydów między cząsteczkami HDL, a lipoproteinami bogatymi w trójglicerydy, odbywającego się za pośrednictwem osoczowego białka transportującego estry cholesterolu (CETP; *cholesteryl ester transport protein*). Stwierdzono, że kwas nikotynowy hamuje ekspresję CETP w wątrobie i jego poziom w osoczu [198], zmniejsza wychwyty przez wątrobę kompleksów HDL-ApoAI [158], oraz spowalnia katabolizm ApoAI i jego wydalanie przez nerki bez wpływu na syntezę tego białka [43]. Kwas nikotynowy zwiększa także ekspresję białek transportowych ABCA poprzez mechanizmy zależne od jądrowych receptorów typu PPAR γ [157].

Niezależnie od udziału w transporcie zwrotnym cholesterolu, lipoproteiny HDL stymulują aktywność naczynioprotekcyjnych przekaźników śródbłonka takich jak tlenek azotu [126] i prostacyklina [128], wykazują aktywność antyapoptotyczną [184], antyoksydacyjną [154;184;199], przeciwwzkrzepową; zarówno poprzez aktywację produkcji NO, jak i przez zmniejszanie aktywności niektórych czynników krzepnięcia krwi [125], a także przeciwwzapalną; poprzez hamowanie ekspresji cząsteczek adhezyjnych VCAM-1, ICAM-1 i E-selektyny na powierzchni śródbłonka [87]. Wydaje się, że kluczową rolę w w/w działaniach HDL odgrywa apolipoproteina ApoAI [34;125], ale mogą mieć również znaczenie lizofosfolipidy, takie jak S1P (*sphingosine-1-phosphate*) [126;222], a także białka enzymatyczne rozkładające cząstki oxLDL: PON-1 (*paraoxonase 1*), PAF-AH (*platelet activating factor acetyl hydrolase*), LCAT (*lecitin/cholesterol acyltransferase*) i GSPx (*glutathione selenoperoxidase*) [199-201].

Kwas nikotynowy poprzez jego zdolność do podnoszenia stężenia HDL we krwi, ma więc wiele korzystnych działań wynikających z naczynioprotekcyjnego profilu działania HDL. Jednak do uzyskania efektu klinicznego i podniesienia stężenia HDL o 10- 20% konieczne jest stosowanie gramowych dawek leku, od 2 do 4 g [87;94]. Wysokie dawki kwasu nikotynowego wywołują działania uboczne; spada tolerancja na glukozę, co ogranicza skuteczność tego leku u pacjentów hiperglikemicznych, gramowe dawki kwasu nikotynowego mogą również działać hepatotoksycznie [13;37;58]. Najbardziej typowym objawem ubocznym stosowania kwasu nikotynowego jest charakterystyczny rumień skóry twarzy i tułowia, pojawiający się szczególnie u pacjentów przyjmujących wysokie dawki w preparatach o natychmiastowym uwalnianiu kwasu nikotynowego (immediate release- „IR niacin”), natomiast słabiej zaznaczony w grupach przyjmujących niacynę w preparatach o

powolnym (sustained release- „SR niacin”) lub przedłużonym (extended release- „ER niacin”); Niaspan) uwalnianiu kwasu nikotynowego [115].

Efekt rumienia skóry związany jest z działaniem kwasu nikotynowego na receptory GPR109_A (opisane w dalszej części podrozdziału) na powierzchni makrofagów lub komórek Langerhansa tkanki podskórnej, co powoduje aktywację fosfolipazy A₂ uwalniającej kwas arachidonowy z błon komórkowych [189], który stanowi substrat dla cyklooksygenazy 1 (COX-1), syntetyzującej prostanoidy PGE₂ i PGD₂, wywołujących rozszerzenie naczyń krwionośnych skóry i tułowia [11;12;48;64;75]. Sugeruje się również, że dodatkowo za ten efekt uboczny odpowiedzialny jest kwas nikotynurowy (NUA) powstający w pobocznym szlaku przemian kwasu nikotynowego (**ryc.2**) [121]. Istotnie, stwierdzono zdolność NUA do uwalniania dużych ilości protaglandyny D₂ przez linie ludzkich makrofagów *in vitro* [117]. Inne doniesienia wskazują na rolę serotoniny uwalnianej pod wpływem kwasu nikotynowego przez komórki tuczne i płytki krwi [93]. Podanie leków blokujących receptory 5HT, takich jak cyproheptadyna [139], lub haloperidol [194] powoduje obkurczenie naczyń krwionośnych skóry, spadek jej temperatury i zmniejszenie odpowiedzi na kwas nikotynowy. Równocześnie zastosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych zmniejsza rumień skóry tylko o ok. 30%, co stwierdzono w badaniach klinicznych [140], jak również w modelach zwierzęcych [139]. Może to świadczyć o wspólnym udziale serotoniny i prostanoidów w wywoływaniu rumienia skórnoego po podaniu kwasu nikotynowego.

Mechanizmy działania kwasu nikotynowego były przez wiele lat nieznanne. Dopiero gdy odkryto w 2003 roku receptory specyficzne dla kwasu nikotynowego; GPR109_A (o dużej specyficzności dla kwasu nikotynowego), GPR81 oraz GPR109_B (będące receptorami o małej specyficzności), wiele skutków działania kwasu nikotynowego powiązano z aktywacją tych receptorów. Receptory GPR109_A i GPR81 opisano u ludzi i gryzoni, występują one w adipocytach, keratynocytach, komórkach dendrytycznych, makrofagach, komórkach Langerhansa, tkanki podskórnej i dojrzałych neutrofilach [91;133;203], a także w komórkach śledziony [16]. Ludzki receptor GPR109_A określa się jako HM74A, natomiast receptor GPR109_B znany jest jako HM74. Gen dla receptora GPR109_B, jest w 96% homologiczny z genem GPR109_A i opisano go tylko u ludzi i szympanśów. Oba z nich są zlokalizowane na chromosomie XIIq24.31 [15;133;203]. Drobne różnice w sekwencjach obu genów wpływają na odmienne powinowactwo receptorów GPR109_A i GPR109_B do kwasu nikotynowego. Ludzki gen kodujący receptor GPR81 jest homologiczny z genem GPR109_A w 74% i również jest umiejscowiony w obrębie chromosomu XII [133]. Uważa się, że kolokalizacja genów GPR109_A, GPR109_B i GPR81 oraz podobieństwa w ich sekwencji są wynikiem duplikacji

pojedynczego genu w toku ewolucji [221]. Mysi odpowiednik receptora GPR109_A jest znany jako PUMA- G. Gen kodujący ten receptor, podobnie jak gen mysiego receptora GPR81 jest zlokalizowany na mysim chromosomie V.

GPR109_A i GPR109_B są receptorami metabotropowymi, sprzężonymi z białkiem G_i [133]. Aktywacja receptorów GPR109_A na powierzchni adipocytów powoduje zahamowanie hydrolizy trójglicerydów przez hormonozależną lipazę (HSL) wewnątrz tkanki tłuszczowej i spadek uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych, które stanowią substrat dla syntezy trójglicerydów i bogatych w trójglicerydy lipoprotein VLDL w wątrobie. W dalszej konsekwencji prowadzi to do obniżenia stężenia lipoprotein LDL [75;133]. Oprócz wpływu na lipolizę trójglicerydów poprzez receptory GPR109_A, kwas nikotynowy bezpośrednio modyfikuje metabolizm tłuszczów w wątrobie. Posiada bowiem zdolność do hamowania wątrobowej acetylotransferazy 2 diacyloglicerolu (DGAT₂), enzymu odpowiedzialnego za końcową reakcję szlaku syntezy trójglicerydów z wolnych kwasów tłuszczowych [45]. Spadek syntezy trójglicerydów hamuje produkcję ApoB, wchodzącej w skład lipoprotein VLDL, LDL i IDL i równocześnie nasila jej wewnątrzkomórkową degradację [43].

Nie wszystkie skutki działania kwasu nikotynowego można wytłumaczyć jego działaniem na receptory dla kwasu nikotynowego. Częściowi agoniści receptora GPR109_A, np. MK-0354 i jego pochodne, będące związkami heterocyklicznymi zawierającymi resztę grupy pirydylokarboksylowej połączonej z pierścieniem pirazolu lub izoksazolu, zarówno w modelach zwierzęcych jak i w badaniach klinicznych wywoływały spadek wolnych kwasów tłuszczowych i trójglicerydów, nie miały jednak wpływu na frakcje cholesterolu LDL i HDL, [16;65;66;166]. Ciekawe, że te związki nie działały naczyniorozszerzająco w przeciwieństwie do samego kwasu nikotynowego, co może być związane w ich własnościami częściowego agonisty. Również związki z grupy kwasów biarylocykloheksanokarboksylowych charakteryzujące się silnym powinowactwem do receptora GPR109_A, z których najbardziej obiecującym jest MK-6892 [169], obniżały stężenia trójglicerydów w modelach zwierzęcych, ale nie posiadały działania naczyniorozszerzającego.

Zsyntetyzowano wiele innych związków które są silnymi agonistami receptora GPR109_B, np. kwas izopropylbenzotriazolo-5-karboksylowy [165;173], znane są też związki wykazującymi słabe powinowactwo do receptorów GPR109_B np. kwas 2- aminobenzoowy (antranilowy) [163], jego pochodna kwas 3-nitro-4-aminobenzoowy, a także kwas 6-aminonikotynowy [172]. Najstarszym agonistą receptorów dla kwasu nikotynowego, znanym od lat 80- tych XX w. jest acifran. Związek ten jako jeden z nielicznych agonistów

receptorów GPR nie wykazuje selektywności względem obu ich podtypów [73], wywołując umiarkowane podwyższenie poziomu HDL (ok. 10%) u ludzi i gryzoni [95].

Trwają badania nad uzyskaniem nowych agonistów receptorów GPR109_A i GPR109_B, zawierających różne grupy funkcyjne przyłączone do reszty pirydyny. Związki te dzięki dłuższemu okresowi półtrwania cząsteczki, niższym klirensie i silniejszym powinowactwie do receptorów mogłyby być stosowane w niższej dawce, co pozwoliłoby na obniżenie stężenia trójglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych bez ryzyka wystąpienia efektów ubocznych typowych dla kwasu nikotynowego [163]. Poszukiwania nowych związków działających na receptory kwasu nikotynowego trwają, żaden z nich nie jest jednak stosowany w klinice. Co więcej, żaden z obecnie znanych agonistów receptorów GPR109_A i GPR109_B nie wywołuje wzrostu stężenia HDL, co sugeruje, że efekt kwasu nikotynowego na HDL może być niezależny od jego działania receptorowego, a zależy może od metabolitów kwasu nikotynowego.

4. Farmakologiczne działanie nikotynamidu

Nikotynamid oprócz działania przeciwpelargicznego nie ma obecnie klinicznego zastosowania, choć bywa stosowany wspomagająco w leczeniu chorób naczyniowych. Nikotynamid w przeciwieństwie do kwasu nikotynowego nie ma działania na profil lipidowy, posiada jednak szereg aktywności biologicznych, które mogłyby być wykorzystane terapeutycznie.

Nikotynamid działa przeciwzapalnie, poprzez hamowanie uwalniania cytokin prozapalnych i ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek układu immunologicznego. W modelach zapalenia *in vitro* indukowanych IFN γ lub fitohemaglutyniną (PHA) wykazano zdolność nikotynamidu do hamowania ekspresji ICAM1 na powierzchni ludzkich komórek tarczycy [59] i śródbłonna [60], jak również hamowania ekspresji cząstek MHC II na powierzchni ludzkich komórek śródbłonna [60;135] i tarczycy [61]. Wpływ nikotynamidu na hamowanie ekspresji cząsteczek MHC II wykazano również w mysich komórkach trzustki pobranych z modelu cukrzycowego, przy braku wpływu na ekspresję ICAM-1 [138]. Nikotynamid hamował uwalnianie IL- 1 β , IL- 6, IL- 8 i TNF α przez ludzkie komórki zapalne krwi inkubowane *in vitro* w obecności LPS [195], zmniejszał

także ekspresję czynnika tkankowego i cząstki CD11b na powierzchni monocytów [196]. Nikotynamid zmniejszał również wytwarzanie TNF α *in vivo* w mysim modelu po podaniu LPS, prawdopodobnie poprzez hamowanie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [145]. Z powodu jego aktywności przeciwzapalnej, sugerowano skuteczność terapeutyczną nikotynamidu w łuszczycy [219;220].

We wcześniejszych pracach wykazano również cytoprotekcyjne działanie nikotynamidu [175]. Wydaje się, że przeciwzapalne, antyapoptotyczne i cytoprotekcyjne właściwości nikotynamidu są związane z zahamowaniem aktywności dwóch ważnych enzymów jądrowych wpływających na strukturę chromatyny; polimeraz poli-ADP-rybozy (PARP) i sirtuin (Sirt2).

Polimerazy poli-ADP-rybozy należą do dużej rodziny enzymów jądrowych odpowiedzialnych za naprawę DNA i regulację transkrypcji, i odgrywają istotną rolę w odpowiedzi cytoprotekcyjnej komórek na uszkodzenie i w uruchamianiu szlaku apoptozy. PARP przez swoją aktywność powodują poli-ADP-rybozylację grup karboksylowych histonów (głównie typu H₁). Grupy poli-ADP-rybozy niosą ze sobą silny ładunek anionowy i gdy są kowalencyjnie przyłączone do podjednostki histonu, powodują jego dysocjację od łańcucha DNA, który jest również naładowany ujemnie [82;83]. Skutkuje to rozluźnieniem struktury chromatyny i udostępnieniem łańcucha DNA dla procesów transkrypcji lub replikacji.

Chociaż enzymy z grupy PARP pełnią ważną rolę w utrzymaniu hemostazy organizmu, nadmierna aktywność tych enzymów pozbawia komórkę jej zasobów energetycznych poprzez zmniejszenie puli NAD⁺/ATP, hamowanie glikolizy i zaburzenie czynności mitochondrialnego łańcucha oddechowego, co uruchamia w rezultacie mechanizmy prozapalne i proapoptotyczne w komórce [52;53;85;143]. NAD⁺ aktywuje PARP, a nikotynamid, końcowy produkt cyklu przemian NAD⁺ hamuje aktywność enzymów z tej grupy [47]. Stwierdzono, że nikotynamid wpływa korzystnie na bilans energetyczny komórki i ogranicza spadek ATP/NAD⁺ w szczurzym modelu niedokrwienia mózgu [215], znosi również upośledzenie glikolizy i hamuje spadek stężenia ATP w komórkach u szczurów poddanych promieniowaniu UV [142].

Nadmierna aktywność enzymów z grupy PARP (szczególnie PARP1) jest odpowiedzialna za ekspresję czynników prozapalnych; indukowalnej izoformy syntazy tlenku azotu (iNOS), ICAM-1, MHC II [60;61;171;178], czy aktywność kolagenaz [35]. Stwierdzono również, że aktywacja PARP1 i czynnika NF- κ B, wzajemnie wzmacnia swoje działania prozapalne i

proapoptotyczne [56;134;225]. Istotnie, wykazano, że spadek aktywności PARP koreluje z zahamowaniem aktywności iNOS, i czynników transkrypcyjnych NF- κ B oraz AP-1 [227]. Z kolei, zwiększoną aktywność PARP stwierdzono w licznych jednostkach chorobowych, takich jak: choroba niedokrwienna mięśnia sercowego [193;226], niewydolności serca [119;148], wstrząsie septycznym [180], urazach mózgu, niedokrwieniu lub wylewie [100;101;103;104], w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak; choroba Alzheimera [102], choroba Parkinsona [179], stwardnienie zanikowe boczne [80;81]; dodatkowo w miażdżycy [137], cukrzycy typu 2, oraz chorobach krążenia jej towarzyszących [3;136;186] i w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc [52]. Stwierdzono również korelację między wzrostem aktywności PARP, a prawdopodobieństwem odrzucenia przez organizm dawcy transplantowanych nerek [130-132]. Tak więc blokowanie aktywności PARP może przynieść potencjalnie korzystne skutki terapeutyczne, a nikotynamid, słaby inhibitor PARP oraz inne związki silniej hamujące PARP niż nikotynamid mogą znaleźć zastosowanie w hamowaniu przebiegu wielu procesów patologicznych ustroju, w tym uszkodzeń niedokrwiennych mózgu i serca [47].

Nikotynamid hamuje również sirtuiny -zależne od NAD⁺ deacetylazy histonów, które jednak mają działanie przeciwne do enzymów z grupy PARP. Wiadomo, że grupy aminowe histonów posiadają silne powinowactwo do grup fosforanowych łańcucha DNA, co jest głównym czynnikiem wpływającym na stabilność struktury chromatyny jądrowej. Acetylacja grup aminowych powoduje rozluźnienie struktury chromatyny i umożliwia zapoczątkowanie procesu transkrypcji. Sirtuiny poprzez deacylację histonów zwiększają powinowactwo histonów do DNA, skutkiem czego zapobiegają procesom transkrypcji, oraz przedłużają długość życia komórki. Sirtuiny biorą również udział w deacetylacji wielu innych białek, między innymi czynnika transkrypcyjnego p53 [7;8], czy acetylo-CoA [82], wpływając w ten sposób na ich aktywność. Sirtuiny wykazują więc różnorodną aktywność biologiczną i wydają się odgrywać fundamentalną rolę w procesach starzenia się komórek, proliferacji komórek oraz przeżywalności komórek w odpowiedzi na uszkodzenie. Nikotynamid silniej hamuje sirtuiny niż enzymy z grupy PARP [82] i wiele różnych skutków działania nikotynamidu może być powiązane z hamowaniem aktywności sirtuin. Warto dodać, że nie tylko inhibitory, ale również aktywatory sirtuin (np. resweratrol) mają działania cytoprotekcyjne [28;120]. Tak więc farmakologia sirtuin i udział sirtuin w mechanizmie działania nikotynamidu wymaga dalszych badań.

Sugerowano również inne mechanizmy działania nikotynamidu. W komórkach nerwowych, działanie cytoprotekcyjne nikotynamidu wiązano z aktywacją kinazy serynowo-treoninowej typu B (Akt), co powoduje fosforylację proapoptotycznego czynnika FKHRL 1 (*forkhead transcription factor*) i uniemożliwia aktywację docelowych genów odpowiedzialnych za śmierć komórki [27;89;90]. W szczurzym modelu niedokrwienia mózgu nikotynamid hamował również produkcję reaktywnych form tlenu i napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek nerwowych [168]. Chociaż mechanizm cytoprotekcyjnego działania nikotynamidu nie jest do poznany, istnieje wiele dowodów na korzystny wpływ nikotynamidu w chorobach neurodegeneracyjnych [105;106], w innych modelach uszkodzenia mózgu [86] jak również w uszkodzeniach niedokrwieniowych i toksycznych innych tkanek [1].

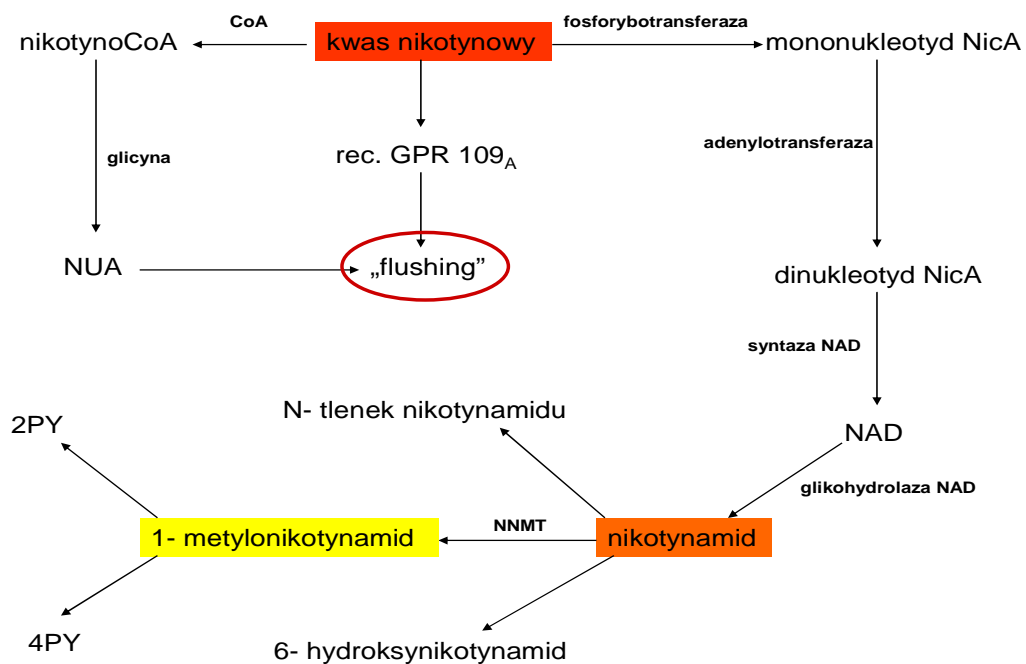
Warto dodać, że swego czasu duże nadzieje pokładano w skuteczności nikotynamidu w leczeniu cukrzycy typu 1 [197]. W modelach zwierzęcych cukrzycy indukowanej streptozocyną nikotynamid działał cytoprotekcyjnie na komórki wyspowe trzustki [74]; zmniejszał objawy neuropatii cukrzycowej [183] i zmniejszał peroksydację lipidów [113;114]. Istnieją jednak sprzeczne doniesienia na temat skuteczności terapeutycznej nikotynamidu w cukrzycy typu 2 [223], a badania kliniczne z zastosowaniem nikotynamidu w leczeniu cukrzycy typu 1 nie potwierdziły jego przeciwcukrzycowej aktywności [42].

5. Metabolizm kwasu nikotynowego i nikotynamidu

Chociaż kwas nikotynowy i nikotynamid są związkami pokrewnymi o bardzo zbliżonej strukturze chemicznej i oba te związki stanowią substrat do syntezy NAD^+ , ich szlaki metaboliczne u ssaków są w dużym stopniu niezależne od siebie. Istotnie, u ssaków nie jest znany żaden enzym przekształcający bezpośrednio kwas nikotynowy w nikotynamid [123]. Natomiast organizmy niższe posiadają zdolność do hydrolizy nikotynamidu do kwasu nikotynowego dzięki obecności nikotynamidaz (deamidaz) [39]. Ciekawe, że deamidazy występujące w mikroflorze jelitowej, znacznie zwiększają swoją aktywność w przypadku przyjmowania terapeutycznych dawek nikotynamidu [70] i niektóre opisywane efekty terapeutyczne nikotynamidu mogą być związane z jego przekształceniem do kwasu nikotynowego. Opisywano np: działanie obniżające trójglicerydy dla nikotynamidu [22]. Z

kolei, u szczurów karmionych dietą pozbawioną kwasu nikotynowego i tryptofanu, lecz wzbogaconą w nikotynamid zaobserwowano widoczny wzrost stężenia kwasu nikotynurowego (NUA), do którego syntezy niezbędny jest kwas nikotynowy. Mógł on więc powstać z nikotynamidu obecnego w diecie dzięki aktywności deamidaz mikroflory jelitowej [40].

Ponieważ zarówno kwas nikotynowy jak i nikotynamid są substratami do syntezy NAD^+ ich katabolizm jest związany z rozkładem NAD^+ do nikotynamidu przez kompleks cyklaza ADP-rybozy/glikohydrolaza cADPR (potocznie określany jako „glikohydrolaza NAD^+ ”).



Ryc. 2. Główne szlaki metabolizmu kwasu nikotynowego (według [121], zmodyfikowane)

Nikotynamid z kolei, w toku dalszych przemian katabolicznych ulega metylacji, utlenieniu lub hydroksylacji odpowiednio do; 1- metylonikotynamidu (MNA), N- tlenku nikotynamidu (NNO) lub 6- hydroksynikotynamidu (6- HNA) [223], przy czym jego najważniejszym metabolitem jest pierwszy z wymienionych związków [84;121]. Pozostałe dwa metabolity powstają w znacznie mniejszym stopniu i nie zostało ostatecznie stwierdzone, czy są one produktem metabolizmu nikotynamidu, czy też są syntetyzowane bezpośrednio z kwasu nikotynowego [146]. U szczurów traktowanych dietą wzbogaconą w nikotynamid i równocześnie pozbawioną kwasu nikotynowego stwierdzono znaczny wzrost stężenia N-

tlenku nikotynamidu wydalanego z moczem [40], co może świadczyć, iż głównym prekursorem tego związku jest nikotynamid.

1-metylonikotynamid (MNA), główny metabolit nikotynamidu, powstaje w wyniku aktywności N-metylotransferazy nikotynamidu (NNMT) w wątrobie. MNA w toku dalszych przemian jest przekształcany przez oksydazę aldehydową do N1-metylo-4-pirydono-5-karboksamidu (4PY) lub N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamidu (2PY). Sugeruje się również, że MNA jest rozkładany przy udziale oksydazy ksantynowej [19]. Zarówno MNA jak i jego metabolity 2-PY i 4-PY są wydalane z moczem [4]. Wszystkie powyższe związki powstają również w zwiększonych ilościach w toku terapii kwasem nikotynowym zarówno w modelach zwierzęcych [110;182;187], jak i u ludzi [116].

N-metylotransferaza nikotynamidu (NNMT), główny enzym szlaków katabolicznych nikotynamidu jest cytoplazmatycznym enzymem katalizującym reakcję przeniesienia grupy metylowej z S- adenozyłmetioniny (SAM) na nikotynamid, w wyniku czego powstaje nie tylko MNA, ale także S- adenozyłhomocysteina (SAH) [4]. Aktywność NNMT stwierdzono głównie w hepatocytach wątroby, ale jest też obecna w mózgu, sercu, łożysku, płucach, nadnerczach, nerkach, mięśniach szkieletowych [4;164] i tkance tłuszczowej [152]. NNMT należy do dużej rodziny metylotransferaz zależnych od SAM, liczących 39 białek enzymatycznych występujących u ssaków. Gen NNMT sklonowano i zidentyfikowano u ludzi oraz gryzoni [212-214].

Podwyższoną aktywność NNMT i odpowiadający jej zwiększony poziom endogennego MNA zaobserwowano w wielu liniach komórek nowotworowych; nowotworu żołądka [71;99], wątroby [79], płuc [191], okrężnicy [155], pęcherza moczowego [76], komórkach raka płaskonabłonkowego [161] i nowotworu nerki [160]. Sugeruje się nawet, że aktywność NNMT może stanowić biomarker zmian nowotworowych [71;155;160]. Ponadto aktywność NNMT jest zwiększona w chorobie Parkinsona [5;6;111] i marskości wątroby [29;151].

6. Aktywność biologiczna metabolitów kwasu nikotynowego i nikotynamidu

Choć od dawna znany jest fakt, że kwas nikotynowy i nikotynamid są przekształcane do MNA i jego dalszych metabolitów, sądzono, że ich pochodne są nieaktywne biologicznie.

Podwyższone stężenie endogennego MNA i jego metabolitów w wielu różnych procesach patologicznych, o których mowa powyżej, traktowano jako biomarker tych procesów. Sugerowano nawet, że ich wytwarzanie jest odpowiedzialne za hepatotoksyczność kwasu nikotynowego [112;146]. Podejrzewano również, że mogą one posiadać właściwości neurodegeneracyjne [207;208], nie istniały jednak żadne przekonujące dowody na aktywność biologiczną MNA.

Dopiero w ostatnich latach opisano przeciwzapalne właściwości MNA; zarówno w modelach zwierzęcych, badaniach klinicznych, jak również *in vitro*.

MNA posiada zdolność do hamowania rozwoju dysfunkcji śródbłonna, działając przeciwzapalnie i naczynioprotekcyjnie. W szczurzym modelu hipertriglicydemii i cukrzycy indukowanej odpowiednią dietą fruktozową lub podaniem streptozotocyny MNA przywracał czynność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu [10;205], MNA wykazywał również działanie przeciwzakrzepowe [26;118], w/w doniesienia były związane z aktywnością śródbłonkowego układu COX-2/PGI₂.

Pierwsze doniesienia dotyczące przeciwzapalnej aktywności MNA były związane z hamowaniem przez ten związek stanów zapalnych skóry, co stwierdzono zarówno w badaniach klinicznych, jak i w badaniach na modelach zwierzęcych. MNA stosowany zewnętrznie łagodził u pacjentów stan zapalny skóry [46;209]. W modelach zwierzęcych MNA wpływał na zmniejszenie stanu zapalnego skóry u myszy w odpowiedzi na oksalazon [17]. Z drugiej strony zwiększał przepuszczalność ścian naczyń krwionośnych skóry u szczurów [147], choć wcześniejsze doniesienia nie potwierdzały tej właściwości [139].

W badaniach *in vivo* MNA łagodził również skutki neuropatii cukrzycowej u szczurów traktowanych streptozotocyną [92], hamował aktywność metaloproteinazy MMP-9 w niedokrwiennym uszkodzeniu mózgu [33].

Stwierdzono również, że MNA podawany *in vivo* u szczurów posiada własności gastroprotekcyjne [18].

Istnieją doniesienia na temat antyapoptotycznego działania MNA w liniach zwierzęcych komórek układu nerwowego. W modelu apoptozy indukowanej nitrozoguanidyną (MNNG) MNA razem z nikotynamidem (choć w stopniu mniejszym od swojego prekursora) zwiększał przeżywalność w hodowli mysich astrocytów [185], MNA zwiększał także przeżywalność w szczurzych liniach komórek mózdzku inkubowanych z homocysteiną [176;177].

N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamid (2PY), jeden z dwóch głównych metabolitów MNA powstały dzięki aktywności oksydazy aldehydowej hamował *in vitro* enzymy z grupy PARP w liniach komórek śródbłoka i trzustki, wpływając na odnowienie puli ATP/NAD⁺ [150;175], MNA wydawał się nie posiadać takich właściwości [150].

Istnieją również doniesienia na temat aktywności biologicznej N- tlenku nikotynamidu, pobocznego metabolitu nikotynamidu. Związek ten obok swojego prekursora posiadał zdolność do indukcji różnicowania komórek białaczkowych ludzkiej linii HL-60 do komórek granulocytopodobnych, co obniżało ich zdolności do proliferacji i tworzenia guza, jednak działanie to w przeciwieństwie do kwasu nikotynowego nie przebiega poprzez zwiększenie ekspresji białka CD38 [63;68;69]. Związki z grupy N- tlenków nikotynamidu wykazywały również aktywność przeciwzapalną, będąc antagonistami receptorów CXCR2 na powierzchni neutrofili poprzez blokowanie miejsca wiążącego IL- 8, a także hamując chemotaksję neutrofili wywołaną czynnikiem GRO α (*growth- related oncogene α*) [30].

Odkrycie biologicznej aktywności MNA w tym jego działania przeciwzakrzepowego, przeciwzapalnego i naczynioprotekcyjnego zdaje się sugerować, że niektóre opisane skutki działania kwasu nikotynowego i nikotynamidu mogą zależeć od MNA powstającego przy udziale NNMT. Równocześnie nasuwa się przypuszczenie, że wzrost aktywności N-metylotransferazy nikotynamidu, a w konsekwencji wzrost endogennego MNA może mieć znaczenie fizjologiczne w różnych stanach patologicznych, szczególnie w miażdżycy i dysfunkcji śródbłoka.

Cele pracy

Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego i rozwijający się na tym tle stan zapalny ściany naczyń stanowią podłoże *atherothrombosis*. Doniesienia z ostatnich lat wskazują na to, że przeciwzapalna i śródbłonkowa aktywność kwasu nikotynowego jest niezależna od jego działania na receptory kwasu nikotynowego, może więc zależeć od aktywności głównego metabolitu kwasu nikotynowego, jakim jest 1-metylonikotynamid (MNA), który podawany egzogennie posiada działanie przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne i naczynioprotekcyjne. Nie zbadano jednak jak dotąd, czy MNA ma działanie przeciwmiażdżycowe, a prace opisujące wpływ kwasu nikotynowego na rozwój doświadczalnej miażdżycy nie są jednoznaczne.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zatem porównanie działania przeciwmiażdżycowego egzogenego kwasu nikotynowego oraz jego głównego metabolitu, MNA w mysim modelu miażdżycy (myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*). Jako związek referencyjny wykorzystano inhibitor ACE (perindopril), który w niskich dawkach wykazuje działanie śródbłonkowe i przeciwmiażdżycowe w innych modelach doświadczalnych miażdżycy.

Drugim celem rozprawy doktorskiej było zbadanie zmian aktywności endogenego szlaku NNMT- MNA w toku rozwoju *atherothrombosis* u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*. Aby osiągnąć zamierzony cel rozprawy doktorskiej opracowano model przyspieszonego rozwoju miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* z wykorzystaniem diety wzbogaconej w liofilizat żółtek jaj.

Materialy i metody

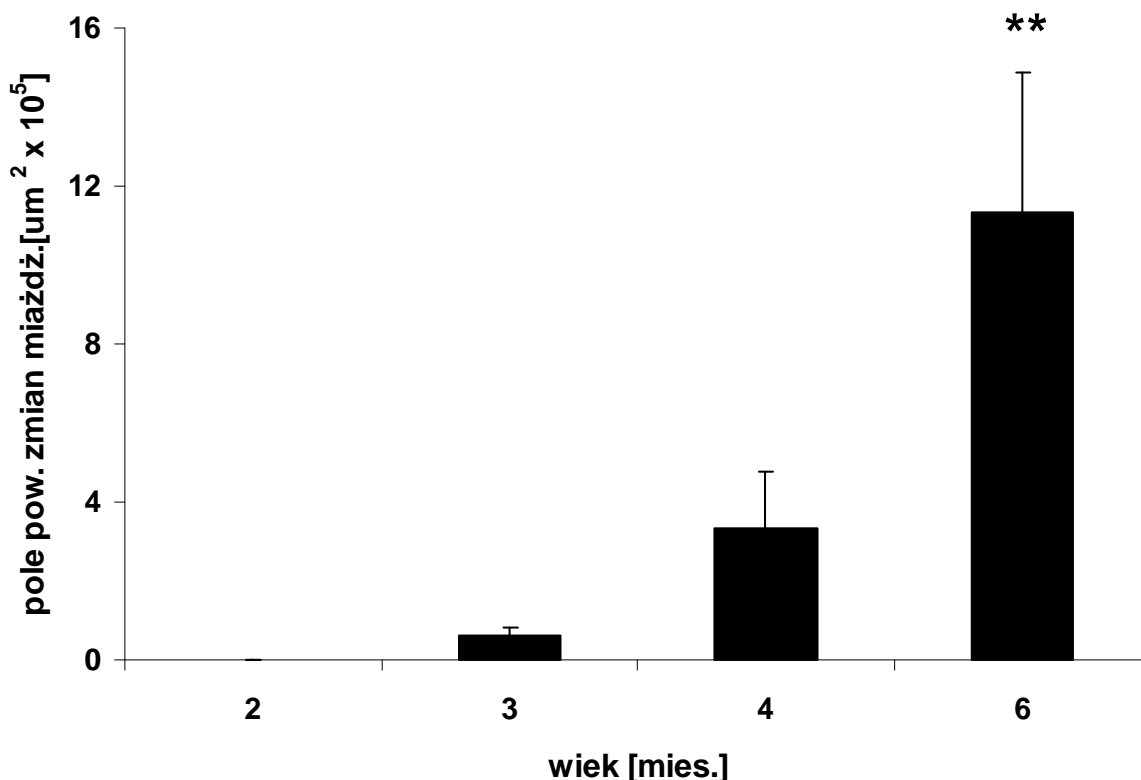
1. Mysi model miażdżycy

Myszy są ze swojej natury organizmami bardzo odpornymi na indukcję *atherothrombosis*, między innymi dlatego, że w przeciwieństwie do ludzi, głównym nośnikiem cholesterolu u myszy są lipoproteiny HDL, a nie lipoproteiny LDL. Myszy nie posiadają również białka CETP transportującego estry cholesterolu pomiędzy lipoproteinami HDL a LDL i VLDL. Wśród wielu mysich szczepów stosowanych w pracy doświadczalnej tylko jeden (*C57Bl/6J*) jest podatny na indukcję wczesnych zmian miażdżycowych poprzez zastosowanie diety bogatej w cholesterol i wyższe kwasy tłuszczowe (30% tłuszczów, 5% cholesterolu i 2% kwasu cholowego). Uzyskany w ten sposób model jest wysoce niedoskonały zarówno z powodu stosowania toksycznej dla gryzoni karmy, jak i odmiennej struktury histologicznej zmian miażdżycowych w stosunku do tych występujących u ludzi.

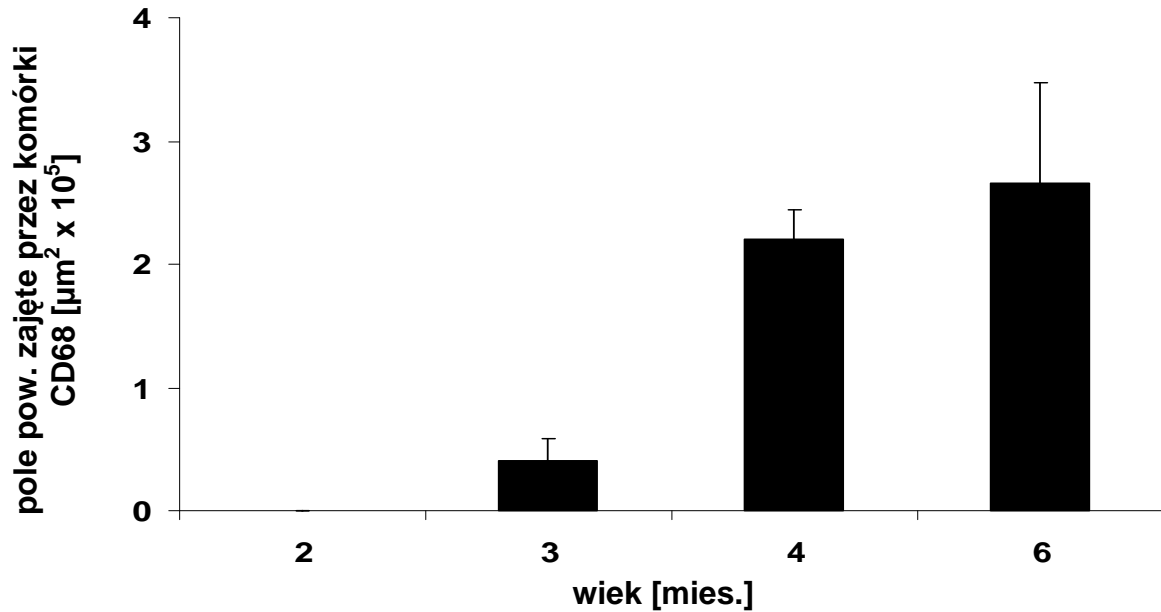
W roku 1992, przy wykorzystaniu zdobyczy biologii molekularnej w zakresie badań nad zarodkowymi komórkami macierzystymi, wytworzono na bazie myszy *C57Bl/6J* model zmodyfikowany genetycznie, zawierający nieaktywny gen kodujący apolipoproteinę E (*ApoE*^{-/-} *knockout mouse model*). Przez zastosowanie plazmidów skierowanych przeciwko fragmentom DNA kodującym ApoE, uzyskano linie komórek macierzystych z nieaktywnym genem, które następnie wstrzyknięto *in vitro* do mysich blastocyst. Uzyskano w ten sposób jeden z najczęściej stosowanych obecnie modeli doświadczalnych miażdżycy u których przez brak aktywności genu ApoE stężenie całkowite cholesterolu wynosi aż 434 mg/dl (przy 86 mg/dl u zdrowych myszy *C57Bl/6J*) [72] i dzięki temu w ciągu kilku miesięcy życia myszy *ApoE*^{-/-} rozwija się miażdżycyca.

Myszy, które wykorzystano w niniejszej rozprawie doktorskiej posiadają dwa nieaktywne geny odpowiedzialne za metabolizm cholesterolu; gen kodujący apolipoproteinę E oraz gen kodujący receptor dla cząstek LDL (*C57Bl/6J ApoE/LDLR*^{-/-} *double knockout*). U myszy z tymi dwoma wybrakowanymi genami w przeciwieństwie do myszy *ApoE*^{-/-} miażdżycyca rozwija się spontanicznie nawet przy użyciu standardowej paszy dla gryzoni. Pierwsze zmiany miażdżycowe pojawiają się między drugim a trzecim miesiącem życia myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}, w większości złożone z makrofagów (**ryc. 5**), co może świadczyć o

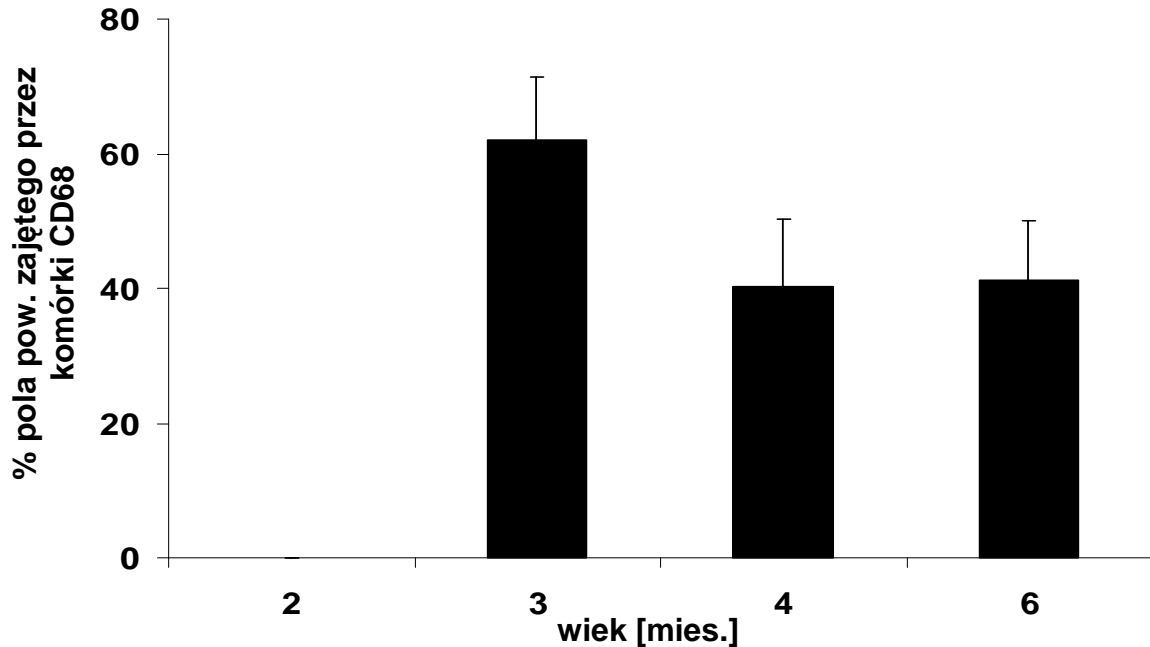
nasilonym procesie zapalnym ściany naczyń, który poprzedza rozwój blaszki miażdżycowej [110]. Pomiedzy czwartym a szóstym miesiącem życia następuje gwałtowne nasilenie progresji zmian miażdżycowych (**ryc. 3**) i towarzyszącego jej stanu zapalnego (**ryc. 4**); zwiększa się naciek komórek prozapalnych w rejonie blaszki miażdżycowej (makrofagów, kom. mięśniówki gładkiej), rośnie aktywność metaloproteinaz oraz poziom wyznaczników zapalenia w osoczu. W szóstym- ósmym miesiącu życia zmiany miażdżycowe są już bardzo zaawansowane i przypominają blaszki miażdżycowe u ludzi. Myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} stanowią bardzo dobre narzędzie do badania mechanizmów progresji miażdżycy, a także do badań farmakologicznych, tym bardziej że nasilenie zmian miażdżycowych jest większe niż u myszy *ApoE*^{-/-}.



Ryc. 3. Rozwój blaszek miażdżycowych w korzeniu aorty u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} oceniony na podstawie barwienia ORO. W 2 miesiącu życia myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} zmiany miażdżycowe nie występują, pojawiają się one ok. 3 miesiąca życia ($0,60 \pm 0,24 \mu\text{m}^2 \times 10^5$). Wyraźny rozwój progresji miażdżycy ($p \leq 0,01$) obserwuje się pomiędzy 4 miesiącem ($3,35 \pm 1,41 \mu\text{m}^2 \times 10^5$) a 6 miesiącem życia myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} ($11,35 \pm 3,54 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).



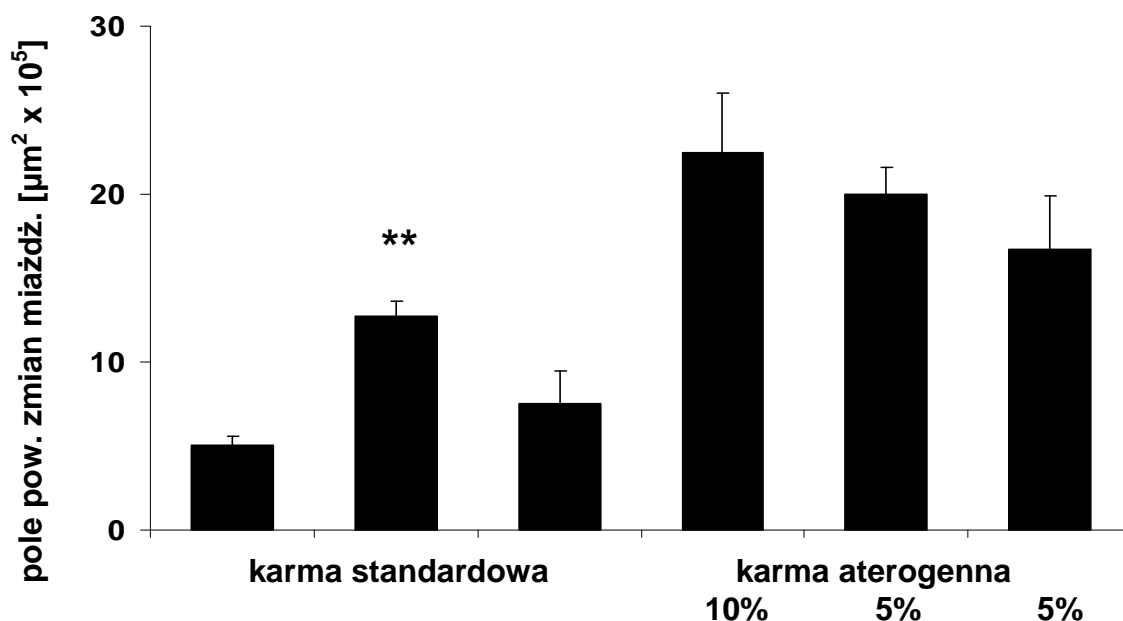
Ryc. 4. Rozwój stanu zapalnego blaszki miażdżycowej i nacieku makrofagów w korzeniu aorty u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}. Pierwsze nacieki komórek CD68- dodatnich w rejonie zmian miażdżycowych pojawiają się ok 3 miesiąca życia myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} ($0,40 \pm 0,18 \mu\text{m}^2 \times 10^5$), ich ilość znamienne ($p \leq 0,01$) rośnie od 4 miesiąca życia ($2,19 \pm 0,24 \mu\text{m}^2 \times 10^5$), utrzymując się w 6 miesiącu na zbliżonym poziomie ($2,65 \pm 0,84 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).



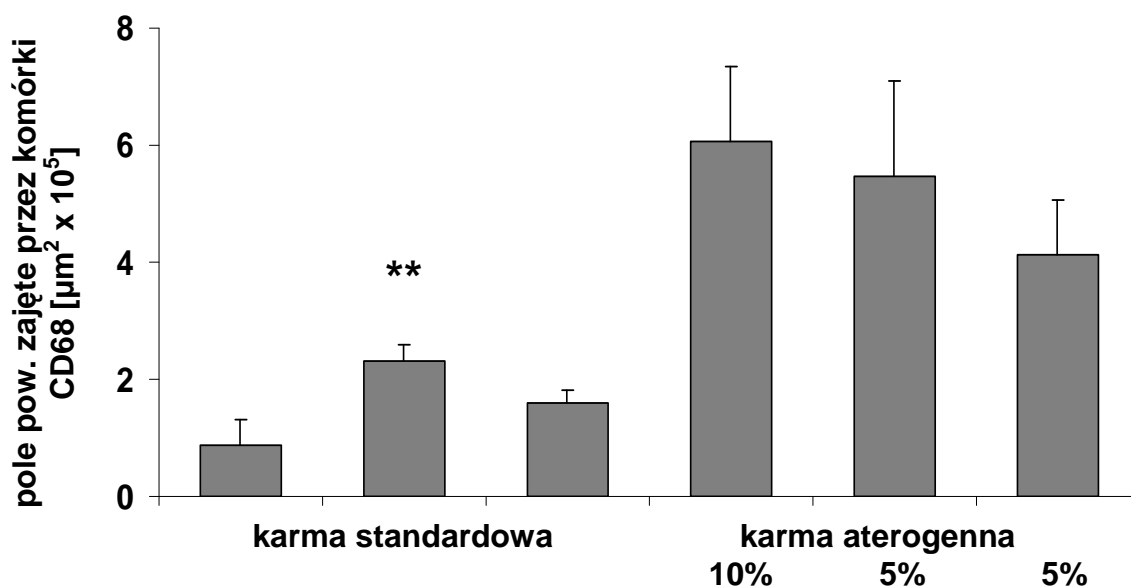
Ryc. 5. Procent powierzchni zmian miażdżycowych (barwionych ORO) zajętych przez komórki CD68- dodatnie (makrofagi). Blaszkki miażdżycowe w swej najwcześniejszej fazie rozwoju (w 3 miesiącu życia myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}) w większości składają się z makrofagów, tworzących około 60% ich powierzchni. U myszy 4-miesięcznych procent powierzchni blaszek miażdżycowych zajętych przez makrofagi spada do 40%, u myszy 6-miesięcznych ma zbliżoną wartość.

2. Wybór odpowiedniego modelu żywienia myszy *ApoE/LDL^{-/-}* i protokołu badań

W większości prac badawczych wykorzystujących myszy *ApoE^{-/-}*, lub inne analogiczne mysie modele miażdżycy badania farmakologiczne prowadzi się stosując standardowo 4 miesięczną terapię farmakologiczną, począwszy od 2 do 6 miesiąca życia myszy. W takim modelu doświadczalnym terapię rozpoczyna się przed pojawianiem się zmian miażdżycowych, a kończy w okresie powstawania zaawansowanych blaszek miażdżycowych. W ten sposób bada się więc sposoby prewencji miażdżycy a nie jej leczenia. Co więcej, według moich pilotowych doświadczeń stosując taki cykl eksperymentalny często nie można uzyskać powtarzalnych wyników w grupie kontrolnej. Grupy kontrolne 6 miesięcznych myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* różnią się znacznie pomiędzy sobą pod względem wielkości zmian miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty (**ryc. 6**), co powoduje trudności w porównywaniu niezależnie prowadzonych eksperymentów i pozwala jedynie na porównywanie grupy leczonej i kontrolnej w tym samym doświadczeniu. Tym samym praktyczne niemożliwe jest porównywanie danych, jeżeli nie zostały one przeprowadzone jednocześnie. W niniejszej rozprawie doktorskiej protokół eksperymentalny był więc zmodyfikowany. Po pierwsze: skrócono czas podawania leków z czterech do dwóch miesięcy (od 4 do 6 miesiąca życia myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*, w okresie najbardziej intensywnego wzrostu pola powierzchni blaszek miażdżycowych i towarzyszącego jej stanu zapalnego); po drugie: terapię farmakologiczną rozpoczęto u myszy 4 miesięcznych, u których zmiany miażdżycowe są już obecne. Taki podejście było możliwe tylko dzięki zastosowaniu karmy aterogennej przyspieszającej rozwój miażdżycy tak, żeby różnica wielkości zmian miażdżycowych u myszy 4 i 6 miesięcznych była znaczna. Zastosowano paszę zawierającą liofilizat z żółtek kurzych, co pozwoliło na uzyskanie wyższych stężeń cholesterolu we krwi i znacznie przyspieszonej progresji miażdżycy w porównaniu z dietą standardową. Co więcej, według przeprowadzonych badań u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* karmionych w/w dietą wielkość zmian miażdżycowych w wieku 6 miesięcy była bardziej powtarzalna niż u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* karmionych dietą standardową (**ryc. 6**). Podawanie karmy wzbogaconej w liofilizat nasilało również nacieki zapalne towarzyszące rozwojowi miażdżycy. Pole powierzchni zajęte przez komórki barwiące się dodatnio na przeciwciało przeciw CD68 (makrofagi) było znacznie większe w grupach myszy karmionych paszą aterogenną wzbogaconą w liofilizat w ilości 5%, czy 10% (**ryc. 7**).

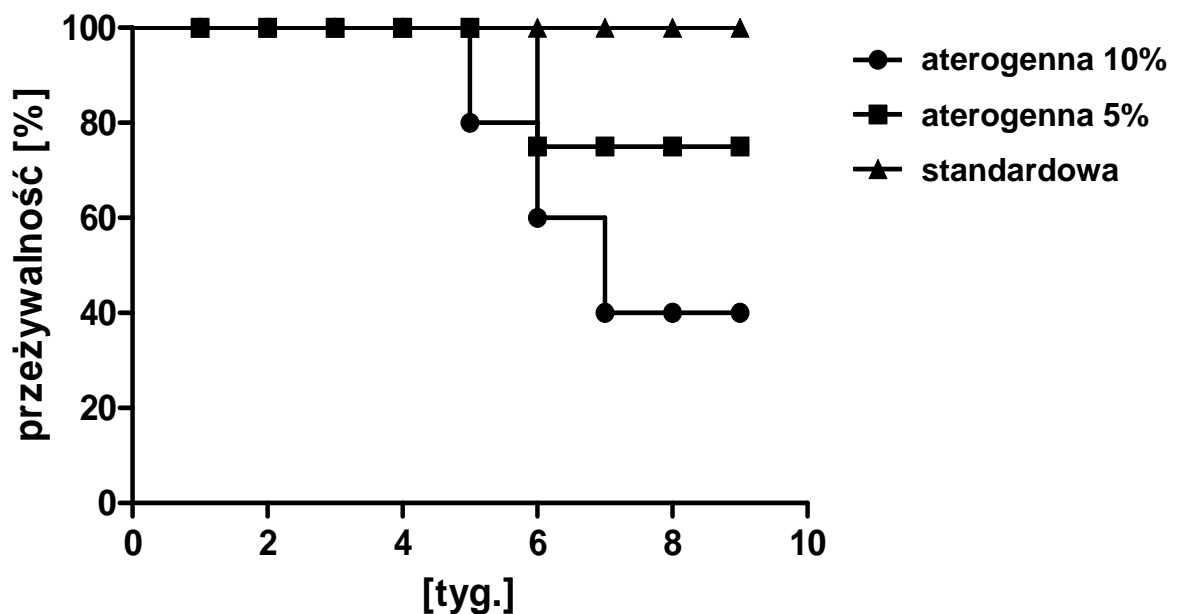


Ryc. 6. Progresja zmian miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty w grupach myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* pochodzących z sześciu oddzielnych eksperymentów, karmionych paszą standardową lub paszą aterogenną wzbogaconą o liofilizat z żółtek kurzych w ilości 5% lub 10%. Średnie pole powierzchni blaszek miażdżycowych (obszar barwiony przez czerwień oleistą– ORO) w grupach przyjmujących paszę standardową cechowało się dużą zmiennością, w granicach od $5,5 \pm 1,31$ do $12\sim 14 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ ($p \leq 0,01$); podanie paszy aterogenicznej pozwoliło na uzyskanie bardziej powtarzalnych wyników (pomiędzy 16 a $20 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).

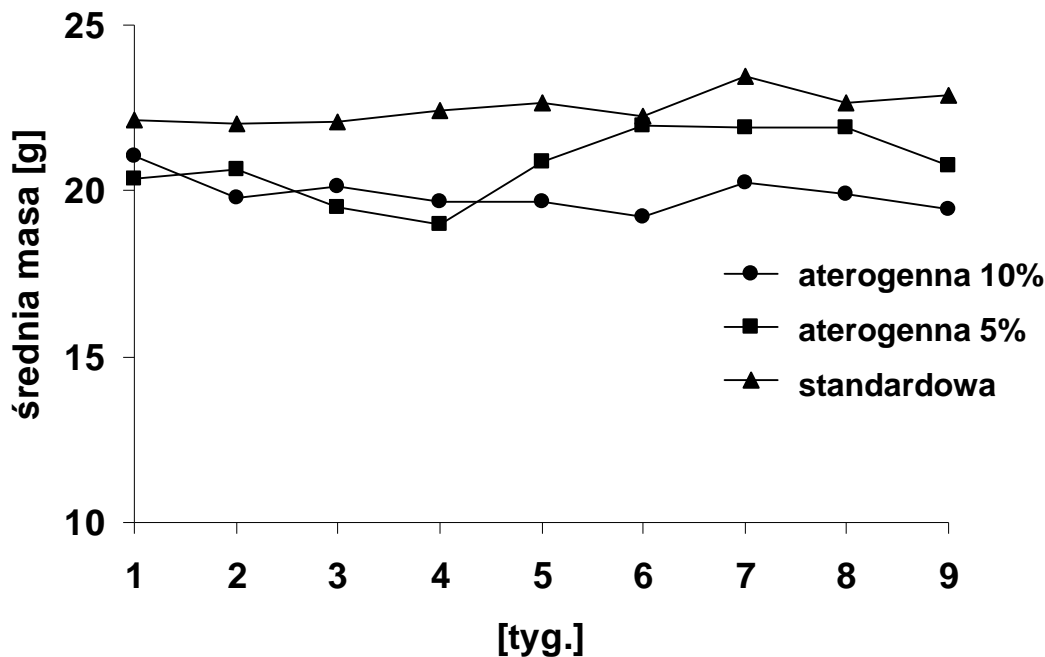


Ryc. 7. Ilość makrofagów w rejonie zmian miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty w grupach myszy pochodzących z oddzielnych eksperymentów, skarmianych paszą standardową i karmią aterogenną wzbogaconą o liofilizat z żółtek kurzych w ilości 5% lub 10%. Średnie pole powierzchni zmian miażdżycowych specyficznych dla cząstki CD68 w grupach skarmianych dietą aterogenną wynosiło $\sim 4\text{--}6 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ i było znacząco większe ($p \leq 0,01$) od wartości stwierdzonych w grupach na diecie standardowej ($\sim 1\text{--}2 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).

Chociaż wielkość miażdżycy i nasilenie nacieków makrofagów u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* karmionych dietą aterogenną 5% i 10% było porównywalne, jednak karmienie dietą zawierającą liofilizat w ilości 10% było zbytnim obciążeniem dla myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* i powodowało zwiększoną śmiertelność myszy (**ryc. 8**). Również średnie masy ciała myszy przyjmujących dietę aterogenną 10 % były niższe od myszy karmionych standardowym granulatem lub dietą aterogenną 5 % (**ryc. 9**). Tak więc obniżenie ilości liofilizatu w karmie do 5% zwiększało przeżywalność myszy, a progresja miażdżycy w korzeniu aorty (**ryc. 6**), jak i nasilenie stanu zapalnego (**ryc. 7**) były wciąż znacznie zwiększone i porównywalne z dietą aterogenną 10 %.



Ryc. 8. Przeżywalność w grupach myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* przyjmujących dietę standardową lub dietę aterogenną z 5 lub 10 % dodatkiem liofilizatu. W grupie karmionej dietą standardową przeżywalność wynosiła 100%, w grupie traktowanej karmem aterogenną z domieszką liofilizatu z żółtek kurzych w ilości 10% przeżywalność spadła do 40%; grupa przyjmująca karmę z domieszką liofilizatu w ilości 5% miała poprawioną przeżywalność na poziomie 80%.



Ryc. 9. Średnie masy ciała grup myszy przyjmujących karmę aterogenną z domieszką liofilizatu w ilości 10%, karmę aterogenną z domieszką liofilizatu w ilości 5% i standardową karmę. Myszy traktowane karmą aterogenną miały od 5 tyg. eksperymentu nieznamiennie zmniejszoną średnią masę ciała w porównaniu z grupą przyjmującą karmę standardową ($p \geq 0,05$).

3. Badanie przeciwmiażdżycowego działania egzogenego kwasu nikotynowego i MNA u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}

3.1. Podział myszy na grupy

3.1.1. Podział na grupy- eksperyment pilotażowy z wykorzystaniem diety standardowej

We wstępnej fazie eksperymentu wykorzystano 2- miesięczne samice myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} (Jackson Laboratory, Maine, USA), które podzielono na następujące grupy:

- grupa na diecie standardowej (nie traktowana lekami, n= 4)

- grupa na diecie standardowej, przyjmująca 1- metylonikotynamid (MNA) w dawce 100 mg/kg (n= 5)
- grupa na diecie standardowej, przyjmująca perindopril w dawce 0,4 mg/kg (n= 5)

Dawkę MNA (100 mg/kg) wybrano na podstawie poprzednich doniesień mówiących o śródbłonkowym [10;205], przeciwzapalnym [33;149] lub przeciwzakrzepowym [26;118;149] działaniu MNA w modelach zwierzęcych *in vivo*. Dawkę perindoprilu (0,4 mg/kg) wybrano na podstawie doniesień mówiących o przeciwzakrzepowym [49;50] i stymulującym angiogenezę [218] działaniu niskich dawek perindoprilu, nie wywołujących hipotensji i mających korzystny wpływ na śródbłonek *in vivo* w modelach zwierzęcych.

Badane substancje podawano rozpuszczone w wodzie pitnej przez okres 16 tygodni, od 2 do 6 miesiąca życia myszy. Roztwory przygotowywano *ex tempore* i dodawano co drugi dzień (w poniedziałek, środę i piątek) do poidła. Stosowane dawki badanych substancji były przeliczone na kilogram masy ciała, przy uwzględnieniu wzrastającej średniej wagi grup myszy w toku trwania eksperymentu i średniego zużycia wody w poidłach na dwie doby.

3.1.2. Podział na grupy- eksperyment z wykorzystaniem diety aterogennej

W eksperymencie wykorzystano 4- miesięczne samice myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*, które podzielono na następujące grupy:

- grupa na diecie aterogennej zawierającej 5% liofilizatu z jaj kurzych , (nie traktowana lekami, n= 5)
- grupa na diecie aterogennej zawierającej 5% liofilizatu jaj kurzych, której podawano 1- metylonikotynamid (MNA) w dawce 100 mg/kg (n= 5)
- grupa na diecie aterogennej zawierającej 5% liofilizatu jaj kurzych, której podawano 1- metylonikotynamid (MNA) w dawce 1g/kg (n= 5)
- grupa na diecie aterogennej zawierającej 5% liofilizatu, przyjmująca kwas nikotynowy (NicA) w dawce 100 mg/kg (n= 4)

- grupa na diecie aterogennej zawierającej 5% liofilizatu, przyjmująca kwas nikotynowy (NicA) w dawce 1g/kg (n= 5)
- grupa na diecie aterogennej zawierającej 5% liofilizatu, przyjmująca perindopril w dawce 2 mg/kg (kontrola pozytywna, n= 5)

Wysokie dawki kwasu nikotynowego i MNA w ilości 1 g/kg odpowiadają wysokim dawkom kwasu nikotynowego stosowanym u ludzi, niezbędnym do uzyskania efektu klinicznego [87;94]. Dawkę perindoprilu odpowiednio zwiększono z 0,4 mg/kg do 2 mg/kg w celu wzmocnienia wpływu tego związku na śródbłonek, biorąc pod uwagę nasilenie procesów miażdżycowych u myszy traktowanych karmą aterogenną. Badane substancje były podawane wraz z wodą pitną przez okres 8 tygodni (od 4 do 6 miesiąca życia myszy) trzy razy w tygodniu, z uwzględnieniem zużycia wody przez zwierzęta analogicznie do metodyki opisanej w poprzednim podrozdziale.

Karma aterogenna zawierająca 5% liofilizatu z żółtek kurzych była przygotowywana w drobnych porcjach, przy uwzględnieniu średniego dziennego spożycia karmy przez każdą grupę. Mieszanka paszowa była dostępna dzięki uprzejmości prof. Tadeusza Trziszki z Wydziału Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu , gotowa karma była przygotowywana w Katedrze Żywienia Człowieka Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie przez dr. Renatę Kostogryś i dr. inż. Magdalenę Franczyk- Żarów, według opisanej uprzednio metodyki [38].

3.2. Metodyka badań

W 6 miesiącu życia myszy były eutanazowane poprzez dootrzewnowe podanie tiopentalu (Sandoz, Francja) w dawce 50mg/kg. Przed uspieniem myszom podano fraxiparynę w ilości 1000 UI (Sanofi- Synthlabo, Santea, Francja). Po eutanazji pobrano krew z prawej komory serca, następnie nacięto prawy przedsionek i wykonano perfuzję serca i korzenia aorty zimnym roztworem PBS poprzez wkłucie w lewą komorę. Pobierano górną część serca do celów barwień histologicznych (podrozdział 3.5), immunohistochemicznych i zymograficznych (podrozdział 3.6) blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty. Górną

część serca, zamrożoną w żelu OCT (SakuraTek, Japonia) krojono na mikrotomie mrozeniowym według metody *cross-section* opisanej w podrozdziale 3.4.

Aby uzyskać osocze, krew odwirowano (14000 g przez 10 minut). W osoczu oznaczano stężenie trójglicerydów i cholesterolu całkowitego (podrozdział 3.3), białka amyloidowego SAA (podrozdział 3.7) i metabolitów kwasu nikotynowego (podrozdział 3.8). Odwirowane osocze rozporcjowano po 100 μ l i zamrażano w -80°C .

3.2.1. Pomiar cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu

Stężenia cholesterolu całkowitego, jak i trójglicerydów określano przy pomocy metody spektrofotometrycznej, przy wykorzystaniu odpowiednich zestawów diagnostycznych (PZ Cormay, Łomianki, Polska).

Poziom cholesterolu całkowitego zmierzono korzystając z zestawu Liquick Cor-CHOL60. Metoda pomiaru opierała się na enzymatycznej reakcji kompleksów esterazy i oksydazy cholesterolu, w wyniku której powstaje nadtlenek wodoru. Powstały H_2O_2 reaguje z 4- aminoantypiryną, dając barwną reakcję. Intensywność czerwonego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia cholesterolu w badanej próbce.

Roztwór reakcyjny wykorzystany w pomiarach zawierał 100 mmol/l buforu Gooda (pH= 6,4); 5 mmol/l fenolu; 0,3 mmol/l aminoantypiryny; $\sim 3,2$ μ kat/l esterazy cholesterolu (rozkładającej estry CL do wolnego cholesterolu i kwasów tłuszczowych); oksydazę cholesterolu w ilości $\sim 1,67$ μ kat/l i peroksydazę w ilości ~ 50 μ kat/l. Roztwór reakcyjny napipetowano w ilości 1 ml w trzech powtórzeniach, po czym ogrzano go do temperatury pokojowej. Po ogrzaniu, pierwsza próbka służyła jako próba zerowa, do drugiej dodawano 10 μ l standardu (roztwór cholesterolu 5,2 mmol/l), do trzeciej dodawano 10 μ l badanej próbki osocza.

Wszystkie próbki dokładnie mieszano i inkubowano w łaźni wodnej (37°C) przez okres 5 minut. Absorbancję próbek odczytano przy długości fali 500 nm z wykorzystaniem spektrofotometru Uvikon 810 (NorthStar Scientific, UK). Każdy pomiar przeprowadzano z powtórzeniem. Stężenie cholesterolu dla każdej z próbek obliczono korzystając ze wzoru podanego w instrukcji, przy uwzględnieniu absorbancji próbki zerowej i wzorcowej.

W pomiarze stężenia trójglicerydów wykorzystano zestaw diagnostyczny Liquick Cor-TG30, oparty na aktywności oksydazy glicerofosforanowej, w wyniku której powstaje

nadtlenek wodoru. Powstały H_2O_2 reaguje z 4- aminoantypiryną, dając barwną reakcję. Intensywność czerwonego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia cholesterolu w badanej próbce.

Roztwór reakcyjny składał się z dwóch składników roboczych zmieszanych w stosunku 4:1. Końcowa mieszanina reakcyjna zawierała 40 mmol/l buforu PIPES (pH= 7,0); 0,4 mmol/l aminoantypiryny; 1,5 mmol/l ATP; 1,6 mmol/l jonów Mg^{2+} ; 0,6 mmol/l ADPS; ~66,67 μ kat/l kinazy glicerolowej; ~60,00 μ kat/l oksydazy 3- fosfoglicerolu; ~20,00 μ kat/l peroksydazy i ~16,67 μ kat/l lipazy lipoproteinowej. Roztwór reakcyjny przygotowywano w trzech powtórzeniach, które ogrzewano do temperatury pokojowej. Po ogrzaniu, pierwsza próbka służyła jako próba zerowa, do drugiej dodano 10 μ l standardu (roztwór trójglicerydów o stężeniu 2,5 mmol/l), do trzeciej dodano 10 μ l badanej próbki osocza. Wszystkie próbki dokładnie wymieszano i inkubowano w łaźni wodnej (37°C) przez okres 5 minut. Do pomiaru absorbancji próbek wykorzystano spektrofotometr Uvikon 810 (NorthStar Scientific, UK), przy długości fali 550 nm. Każdy pomiar przeprowadzono z powtórzeniem. Poziom trójglicerydów dla każdej z próbek obliczono korzystając ze wzoru podanego w instrukcji, przy uwzględnieniu absorbancji próbki zerowej i wzorcowej.

3.2.2. Przygotowanie preparatów mikroskopowych korzenia aorty metodą *cross- section*

Serca zamrożone w OCT zostały pocięte na kriostacie Leica CM1800 zaopatrzonej w ruchomą głowicę, według procedury *cross- section* opisanej uprzednio [36;124]. Zamrożony materiał został pocięty na skrawki o grubości 10 μ m i zebrany na szkiełka mikroskopowe typu SuperFrost (Mentzel Glaser, Niemcy) pokryte polilizyną (Sigma Aldrich). Serca krojono pod odpowiednim kątem w celu uchwycenia wszystkich trzech płatków zastawki aortalnej wewnątrz korzenia aorty. Poszczególne skrawki zbierano od momentu pojawienia się wszystkich płatków trójdzielnej zastawki aortalnej (wysokość „0”). Materiał został podzielony na kilka serii, zawierających sąsiadujące przekroje poprzeczne od wysokości 100 do 900 μ m. Następnie część skrawków, przeznaczonych do barwień histologicznych utrwalono w 4% zbuforowanym roztworze paraformaldehydu, część przeznaczoną do barwień immunohistochemicznych utrwalono przy pomocy acetonu, serię skrawków do celów barwień zymograficznych nie utrwalano i przechowywane je w -20°C, w warunkach chroniących przed dostępem wilgoci.

3.2.3. Barwienie lipidów blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty

Skrawki utrwalone w 4% paraformaldehydzie zostały zabarwione barwnikiem Oil Red O; ORO (Sigma Aldrich) w celu wykrycia złogów lipidowych i oceny wielkości blaszek miażdżycowych. Zabarwione preparaty oceniono przy użyciu mikroskopu Olympus BX50 (Olympus, Tokio, Japonia) pod powiększeniem 4x i sfotografowano za pomocą aparatu Olympus DP71 CCD sprzężonego z mikroskopem. Uzyskane obrazy analizowano przy pomocy oprogramowania Zeiss LSM Image Browser 3.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany), pozwalającego na zmierzenie pola powierzchni blaszek miażdżycowych (μm^2). Progresję blaszek miażdżycowych w pojedynczym sercu liczono jako średnią z dziewięciu przekrojów poprzecznych (wys. 100- 900 μm).

3.2.4. Barwienia immunocytochemiczne obecności makrofagów w blaszkach miażdżycowych

W celu zobrazowania obszaru blaszki miażdżycowej zajętej przez makrofagi wykonano trój etapowe barwienie immunohistochemiczne według opisanego uprzednio protokołu [41]. Skrawki utrwalone w acetonie przepłukano w roztworze PBS i preinkubowano w mieszaninie zawierającej 5% surowicy koziej i 2% mleka odtłuszczonego w celu zablokowania nieswoistych miejsc wiązania, następnie preparaty inkubowano przez 12 godzin w roztworze szczurzych przeciwciał skierowanych na myszy antygen CD68 (Serotec, Oxford, W. Brytania). Po całonocnej inkubacji na preparaty nałożono mieszaninę drugorzędowych biotynylowanych kozich przeciwciał (Jackson IR, West Grove, PA), a po półgodzinnej inkubacji i płukaniu- roztwór zawierający kompleks streptawidyna- AMCA. Po końcowej godzinnej inkubacji preparaty wypłukano w roztworze PBS i zamknięto w medium Vectashield. Preparaty analizowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX50 wyposażonego w filtry pozwalające rejestrować zieloną (makrofagi) fluorescencję. Preparaty sfotografowano przy pomocy aparatu Olympus DP71 CCD, uzyskane zdjęcia analizowano przy pomocy

oprogramowania Zeiss LSM Image Browser 3.2. Rozwój stanu zapalnego i obecność makrofagów w rejonie blaszek miażdżycowych liczono jako średnią z sześciu przekrojów poprzecznych (wys. 100- 600 μm).

Dodatkowo wykonano barwienia zymograficzne obrazujące aktywność metaloproteinaz (MMP) w rejonie korzenia aorty, korzystając ze zmodyfikowanej metody opisanej wcześniej [153]. Skrawki nie utrwalone nawodniono w PBS, następnie inkubowano przez 3 godziny w temp. 37°C w roztworze żelatyny sprzężonej z FITC w ilości 50 $\mu\text{m}/\text{ml}$ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Po przepłukaniu w ciepłym PBS i utrwaleniu w 4% zbuforowanym paraformaldehydzie preparaty zamknięto w medium fluoromount (SigmaAldrich). Skrawki analizowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX50 wyposażonego w filtry pozwalające rejestrować zieloną fluorescencję, odpowiadającą aktywności enzymatycznej metaloproteinaz. Po sfotografowaniu, obszar aktywności MMP liczono jako średnią z sześciu przekrojów poprzecznych (wys. 100- 600 μm).

W dalszym etapie barwień, część skrawków wykorzystanych w barwieniach zymograficznych przepłukano w PBS i wykorzystano do barwień immunohistochemicznych, w celu wykazania kolokalizacji komórek prozapalnych z aktywnością metaloproteinaz.

3.2.5. Pomiar stężenia SAA w osoczu

Stężenie SAA w osoczu badanych grup myszy określono przy wykorzystaniu metody ELISA, używając zestawu diagnostycznego Mouse SAA Immunoassay Kit KMA0011 (Invitrogen, Carlsbad, USA) składającego się z 96- dołkowej płytki opłaszczonej przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla mysiej SAA₁, roztworu przeciwciał drugorzędowych, a także buforów przeznaczonych do rozcieńczenia, inkubacji, płukania i zakończenia reakcji. Pomiar opiera się na 4- stopniowym barwieniu immunologicznym z wykorzystaniem dodawanych kolejno biotynyłowanych monoklonalnych przeciwciał drugorzędowych, kompleksu streptawidyna- peroksydaza i końcowego reagenta; tetrametylobenzydyny, który stanowiąc substrat dla peroksydazy daje barwną reakcję. Intensywność barwnego produktu jest wprost proporcjonalna do stężenia SAA w badanej próbce. W pomiarach korzystano ze spektrofotometru płytkowego typu Epoch (BioTek, Winooski, USA) pracującego przy długości fali światła 450 nm. Inkubację próbek po dodaniu przeciwciał przeprowadzono przy wykorzystaniu wytrząsarki z podgrzewaniem typu SkyLine

(Elmi, Ryga, Łotwa). Ilość produktu reakcji odczytano przy pomocy odwróconej krzywej kalibracyjnej w $\mu\text{g/ml}$.

3.2.6. Pomiary stężenia metabolitów kwasu nikotynowego w osoczu (LC/MS/MS)

W pomiarach wykorzystano chromatograf cieczowy Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy) składający się z odpowietrzacza, podwójnej pompy, kolumny i automatycznego dozownika. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Waters Spherisorb® 5 μm CNRP 4.6 x 150 mm. Temperaturę dozownika ustawiono na 10 °C. Faza ruchoma składała się z acetonitrylu i 0,1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego. Każdy cykl pomiarowy LC/MS/MS trwał 15 minut. Początkowa faza ruchoma składała się z 45% acetonitrylu w gradiencie liniowym do 10% w ciągu pierwszych 6 minut. Później pomiar HPLC był kontynuowany przez 3 min. przy stałym stosunku składników frakcji ruchomej 10/90 acetonitrylu do H_2O . Kolejny gradient liniowy przebiegał w szybkim trybie, w którym w czasie 0,1 min. powrócono do poziomu 45% acetonitrylu, następnie przez okres 6,9 min. kontynuowano pomiar przy stałym stosunku składników frakcji ruchomej 45/55. Tempo przepływu ustawiono na 800 ml/min. Eluent z HPLC przed skierowaniem do próbnika ESI został podzielony w stosunku 1:5 (1 część przeznaczona do detektora spektrometra mas; 5 części odrzucono). Do układu LC/MS/MS dodano próbkę o objętości 20 μL .

Analizę spektroskopową próbek przeprowadzono na aparaturze API 2000 firmy Applied Biosystems MDS Sciex (Concord, Ontario, Canada), zaopatrzoną w system pozwalający na pomiary metodą ESI (*electrospray ionisation*; „elektrosprej”). Jonizacja została przeprowadzona w trybie kationowym. Podwójny spektrometr masowy został ustawiony w trybie SRM (*selected reaction monitoring mode*), zaś parametry pomiaru zostały wystandaryzowane dla każdego badanego składnika poprzez stałe dodawanie standardów w tempie 5 $\mu\text{L/min}$ przy pomocy pompy infuzyjnej typu Harvard. Temperatura źródła jonów została ustawiona na 450°C, napięcie układu elektrospreju na 3,5 tys. V.

Krzywe kalibracyjne określono na podstawie standardów wodnych roztworów 2PY, 4PY, kwasu nikotynowego, nikotynamidu i MNA o stężeniu 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 i 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Jako wewnętrzny standard wykorzystano 1,0 mg/mL roztwór 6- chloronikotynamidu w mieszaninie wody i acetonitrylu (50/50), w pomiarach użyto rozcieńczonego standardu wewnętrznego o stężeniu 2.5 $\mu\text{g/mL}$. W celu wyznaczenia krzywych kalibracyjnych

wykonano pomiary na 90 µl osocza, do którego dodano 10 µl standardu badanych związków w celu określenia punktów krzywej odpowiadającym 2000, 1000, 500, 250, 100, 50 i 10 ng/mL każdego badanego składnika. Każdy pomiar wykonano w pięciu powtórzeniach, wraz z dodatkowym pomiarem próbki zawierającej 10 µl wewnętrznego standardu. Między rezultatem pomiarów (stosunkiem pola pow. krzywej dla próbek analizowanych do pola pow. krzywej dla wewnętrznego standardu) a stężeniem badanych substancji wykazano zależność liniową.

Próbki do pomiarów przygotowano poprzez ich deproteinizację przy pomocy acetonitrylu. Próbki osocza zostały podzielone po 100 µl, następnie dodano do nich 10 µl wewnętrznego standardu i 200 µl acetonitrylu. Próbki były wortexowane przez 90 sek, przetrzymywane w temp. 4°C przez 20 min. i odwirowane przy 15000 r.p.m. przez okres 10 minut. Supernatant w ilości 150 µl został przeniesiony do czystych eppendorfów i odparowany w strumieniu azotu przy temp. 37°C w ewaporatorze TurboVap (Zymark, Hopkinton, MA, USA). Pozostałości po odparowaniu ponownie rozpuszczono w mieszaninie acetonitrylu z wodą (10/90 v/v) i wymieszano. Do analizy LC-ESI/MS/MS użyto próbek o objętości 20 µl. Do odczytu i analizy danych pochodzących z układu LC/MS/MS wykorzystano oprogramowanie Applied Biosystems Analyst 1.4.2. Pomiary zostały przeprowadzone przez mgr. Małgorzatę Szafarz w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmacji Collegium Medicum UJ pod kierownictwem prof. dr hab. Joanny Szymury- Oleksiak.

4. Badanie zmian aktywności układu NNMT- MNA w toku rozwoju miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}

4.1. Podział na grupy

Aktywność N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie i stężenie endogennych metabolitów kwasu nikotynowego w osoczu badano w następujących grupach myszy nie traktowanych żadnymi lekami, mających stały dostęp do wody pitnej i przyjmujących standardową dietę:

Myszy kontrolne *C57Bl/6J* (Hodowla Zwierząt Laboratoryjnych, Słaboszów/Miechów):

- grupa eutanazowana w wieku 2 miesięcy (n= 4)
- grupa eutanazowana w wieku 4 miesięcy (n= 4)
- grupa eutanazowana w wieku 6 miesięcy (n= 5)

Myszy z miażdżycą *ApoE/LDLR^{-/-}* (Jackson Laboratory, Maine, USA):

- grupa eutanazowana w wieku 2 miesiecy (n= 4)
- grupa eutanazowana w wieku 3 miesiecy (n= 4)
- grupa eutanazowana w wieku 4 miesięcy (n= 5)
- grupa eutanazowana w wieku 6 miesiecy (n= 5)

4.2. Metodyka badań

Myszy eutanazowano poprzez dootrzewnowe podanie tiopentalu (Sandoz, Francja) w dawce 50mg/kg. Przed uśpieniem podawano fraxiparynę w ilości 1000 UI (Sanofi- Synthlabo, Santea, Francja). Następnie odsłonięto serce i pobierano krew z lewej komory. Krew odwirowywano przez 6 minut w 14000 x g, osocze rozporcjowano po 100 µl i zamrażano w -20°C do pomiarów endogennych pochodnych kwasu nikotynowego (podrozdział 4.4).

Po pobraniu krwi wycinano fragment płata wątroby (ok. 300 mg), który natychmiast przepłukano w zimnym roztworze 0,9 % chlorku sodu, a następnie zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80 aż do wykonania pomiarów aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu.

4.2.1. Pomiar aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie

Pomiary aktywności NNMT przeprowadzano korzystając ze zmodyfikowanej metody opisanej uprzednio [159]. Metoda opiera się na wykorzystaniu 4- metylonikotynamidu (4-MNA), który służy jako akceptor grup metylowych w obecności kofaktora: S-adenozylu-L-

metioniny (SAM). Jako produkt powstaje 1,4- dimetylonikotynamid (1,4-DMN), który jest wykrywany fluorometrycznie dzięki jego reakcji z 4-metoksybenzaldehydem.

Zamrożoną tkankę wątroby homogenizowano w zimnym PBS (pH= 7,4) w stos. 1/9, homogenat odwirowywano w 12000 x g przez okres 20 min. w temp. 4°C. Supernatant był natychmiast pobierany do pomiarów aktywności NNMT, przy wykorzystaniu BSA jako standardu. Mieszanina reakcyjna składała się z 12 µl 2mM dithiotreitolu, 12 µl 0,8 M buforu Tris-HCl (pH= 8,6), 25 µl 16 mM roztworu 4-MNA, 50 µl 0,4 mM roztworu SAM w 0,1 mM kwasie siarkowym i 100 µl badanej próbki. Mieszaninę inkubowano przez 80 min w 37°C. Następnie reakcję transmetylacji przerwano przez zanurzenie próbek we wrzącej wodzie na okres 2 minut. Mieszaniny reakcyjne odwirowano w 10000 x g przez okres 5 min. w temp. pokojowej. Pobrano po 100 µl supernatantu do 1,5 ml naczyń reakcyjnych, zawierających 1 ml 0,02 M 4- metoksybenzaldehydu w 35% (v/v) wodnym roztworze 2- metoksyetanolu i 100 µl 0,5 M wodnego roztworu wodorotlenku sodu. Naczynia reakcyjne umieszczono w łaźni wodnej w temp. 100°C na okres 15 minut. Po ochłodzeniu próbek mierzono intensywność fluorescencji przy pomocy spektrofluorymetru Perkin Elmer LS50B przy promieniu wzbudzenia o długość 418 nm i emisji o długość fali 490 nm.

Aktywność NNMT została wyrażona jako pmol/min/mg. Ilość uzyskanego produktu reakcji (1,4 DMN) została określona na podstawie krzywej kalibracyjnej dla 1,4 DMN w zakresie 0,2- 2,0 nM, w którym wykres przebiega liniowo. Współczynnik zmienności wynosił poniżej 10% dla pomiarów wykonywanych kolejno tego samego dnia. Pomiarów zostały wykonane w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej Katedry Farmakologii CMUJ przez dr. Tamarę Khomich.

4.2.2. Pomiar stężenia endogennych metabolitów kwasu nikotynowego w osoczu (LC/MS)

Pomiary poziomów endogennego MNA i jego metabolitów w osoczu przeprowadzono korzystając z wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS) według metody opisanej uprzednio [174]. Rozdział fazy ruchomej przeprowadzono z użyciem kolumny 3 µm Hypersil C18-BDS 150 × 2.0 mm. Rozdzielany na kolumnie eluent składał się z frakcji A zawierającej 10 mM wodnego roztworu kwasu nonafluoropentanowego (NFPA) oraz frakcji B (100% roztwór acetonitrylu). Faza ruchoma była tłoczona przez pompę

stałoprzepływową w tempie 0,2 ml/min, w gradiencie od 0% do 60% frakcji B przez okres 12 minut. W pomiarach wykorzystano technikę ESI (*electrospray ionisation*), polegającą na rozpylaniu badanych próbek w polu elektrycznym w celu wywołania ich jonizacji. Detektor masowy (Thermo-Finnigan LCQ Advantage, Waltham, MA, USA) został ustawiony w tryb wykrywania pojedynczych kationów (SIM- *positive single ion monitoring*) w celu detekcji NA, MNA, 2PY i 4PY, przy czym energię kolizji ustawiono na 25%. Jako wewnętrzny standard wykorzystano sygnał 2- chloroadenozyny, wyodrębniony z trybu MS. Napięcie źródła pola elektrycznego nastawiono na 4,5 kV, temperatura kapilary wynosiła 275°C. Przepływ gazu rozpylającego eluent ustawiono na umowne 35 jednostek. Parametry optyczne zostały wystandaryzowane przy wykorzystaniu typowych procedur dla sprzętu pomiarowego po nałożeniu nikotynamidu na kolumnę. Mysie osocze dodane do fazy ruchomej zostało pozbawione białka przy użyciu 10% roztworu kwasu trichlorooctowego, który następnie wyekstrahowano wykorzystując eter dietylowy. Poziom odzyskiwania NA, 2PY i 4PY dodanych do próbek wynosił 75- 95%. Współczynnik wariancji wynosił poniżej 10% dla pomiarów powtarzanych tego samego dnia. Pomiarów zostały przeprowadzone w Katedrze Biochemii Wydziału Lekarskiego Gdańskiej Akademii Medycznej przez dr hab. Ewę M. Słomińską.

5. Statystyka

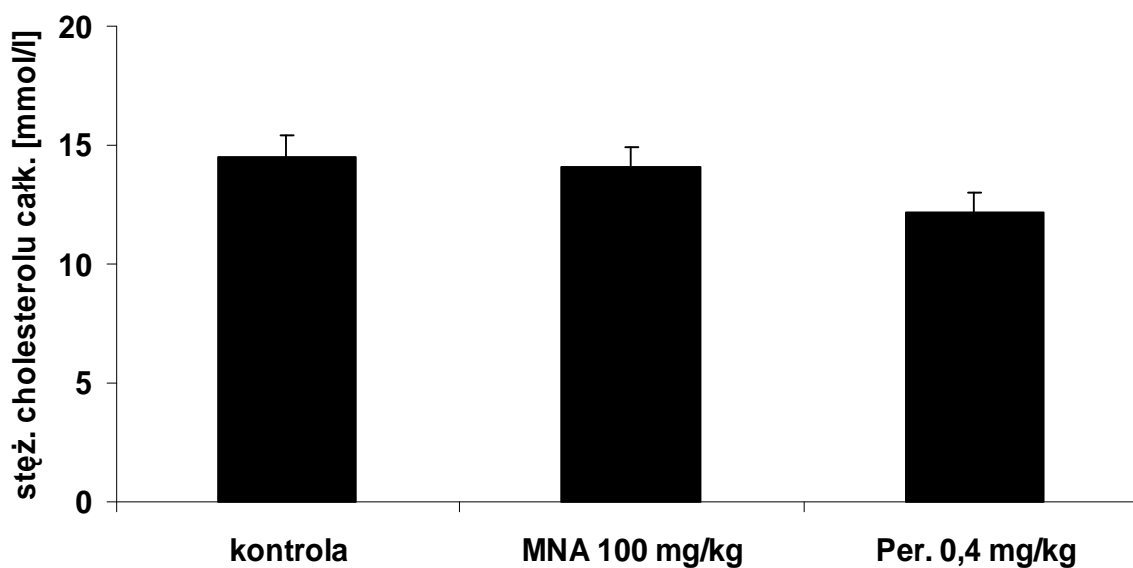
Dane z doświadczeń przedstawiono jako średnią arytmetyczną +/- odchylenie standardowe. Obróbkę danych przeprowadzono przy pomocy pakietu Prism 5.01 (Graph Pad Software). Dane z grup myszy traktowanych lekami porównywane z danymi uzyskanymi z grupy kontrolnej analizowano wykorzystując nieparametryczny test „U” Mann’a- Whitney’a, a także test nieparametryczny Kruskal’a- Wallis’a i test *post hoc* Dunn’a. Za istotne statystycznie przyjmowano różnice, dla których $p \leq 0,05$ (oznaczone na wykresach pojedynczą gwiazdką). Jeśli różnica była istotna statystycznie przy $p \leq 0,01$, wówczas na wykresach oznaczono ją podwójną gwiazdką.

Wyniki

1. Pilotażowe badanie przeciwmiażdżycowego działania MNA i perindoprilu u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* z wykorzystaniem diety standardowej

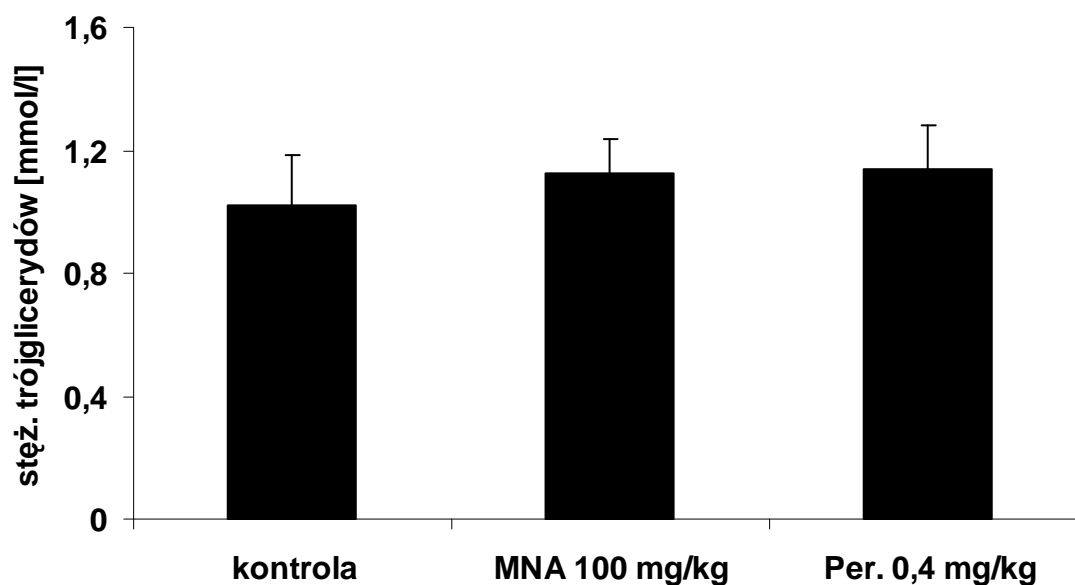
1.1. Wpływ egzogennej MNA i perindoprilu na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu

Podawanie MNA w dawce 100 mg/kg i perindoprilu w dawce 0,4 mg/kg pozostawało bez wpływu na stężenie cholesterolu całkowitego u myszy karmionych dietą standardową (**ryc. 10**). W grupie traktowanej MNA stężenie cholesterolu całkowitego wynosiło $14,11 \pm 0,82$ mmol/l, w grupie przyjmującej perindopril było nieznacznie obniżone i wynosiło $12,02 \pm 0,76$ mmol/l. Wartości te nie różniły się istotnie statystycznie ($p \geq 0,05$) od stężenia cholesterolu całkowitego w grupie kontrolnej ($14,5 \pm 0,87$ mmol/l).



Ryc. 10. Stężenie cholesterolu całkowitego w grupach myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* przyjmujących karmę standardową, traktowanych MNA 100 mg/kg lub perindoprilem 0,4 mg/kg przez okres 4 miesięcy. Brak różnic istotnych statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p \geq 0,05$).

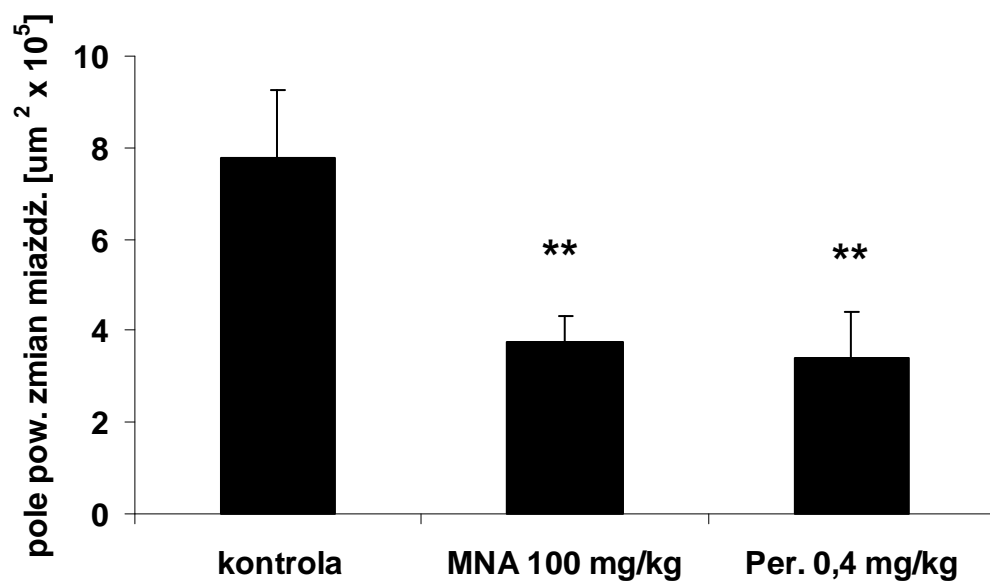
Terapia MNA oraz perindoprilem nie miała również znaczącego wpływu ($p \geq 0,05$ vs kontrola) na stężenie trójglicerydów (**ryc. 11**). W grupie kontrolnej stężenie wynosiło ono $1,02 \pm 0,16$ mmol/l, podobny wynik stwierdzono w grupie traktowanej MNA 100 mg/kg ($1,12 \pm 0,10$). W grupie traktowanej perindoprilem 0,4 mg/kg stężenie trójglicerydów było nieznacznie podwyższone i wynosiło $1,13 \pm 0,14$ mmol/l.



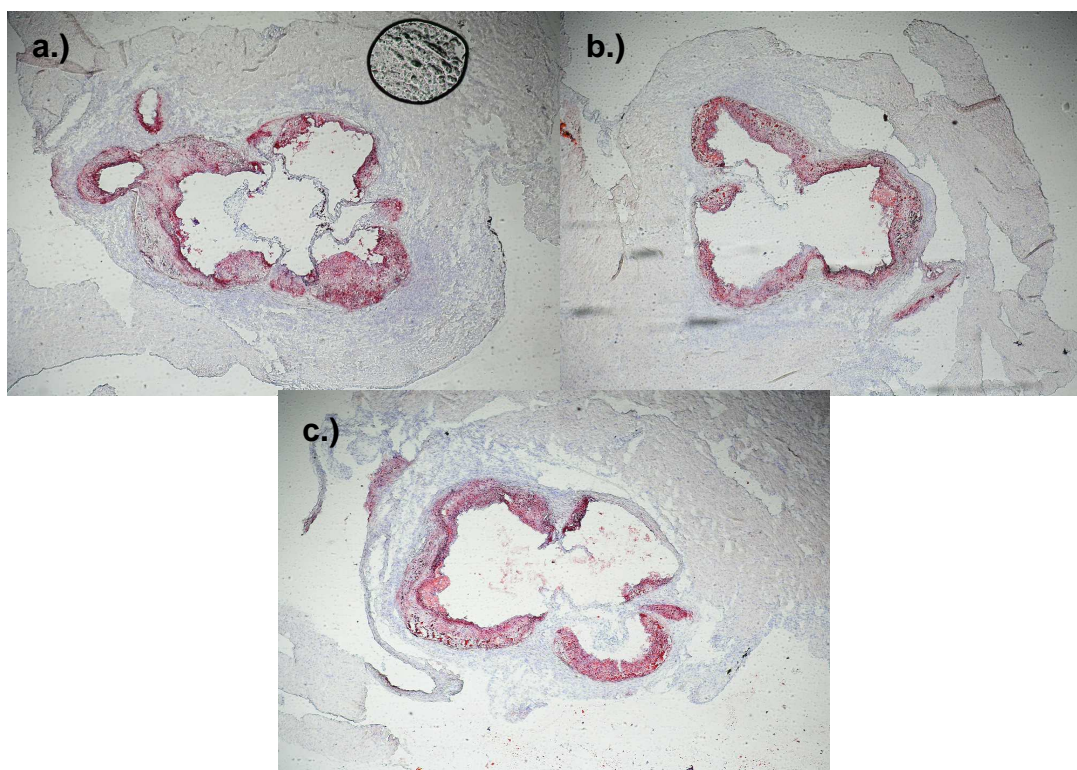
Ryc. 11. Stężenie trójglicerydów w grupach myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* przyjmujących karmę standardową, traktowanych MNA 100 mg/kg lub perindoprilem 0,4 mg/kg przez okres 4 miesiące. Brak różnic istotnych statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p \geq 0,05$).

1.2. Wpływ egzogenego MNA i perindoprilu na wielkość zmian miażdżycowych w korzeniu aorty

MNA (100 mg/kg) znamienne zmniejszał pole powierzchni blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty ($3,77 \pm 0,55 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ vs $7,76 \pm 1,42 \mu\text{m}^2 \times 10^5$, odpowiednio dla grupy traktowanej MNA i grupy kontrolnej). Efekt przeciwmiażdżycowy MNA był porównywalny z działaniem perindoprilu podawanego w dawce 0,4 mg/kg ($3,42 \pm 0,97 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).



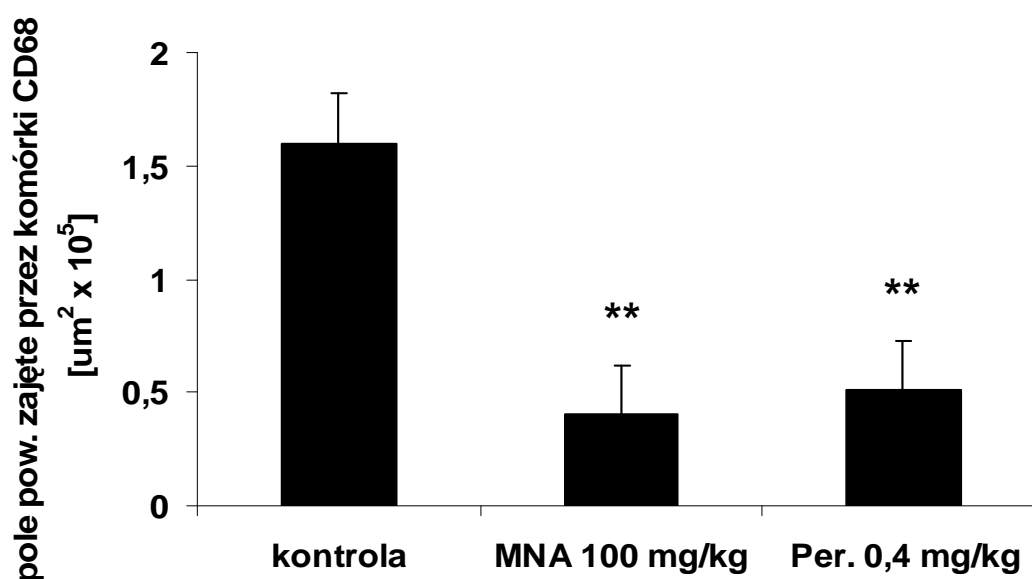
Ryc. 12. Średnie pole powierzchni zmian miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*, traktowanych karmą standardową, przyjmujących przez 4 miesiące MNA w dawce 100 mg/kg lub perindopril w dawce 0,4 mg/kg.



Ryc. 13. Zdjęcia ukazujące przekroje poprzeczne przez korzenie aorty; grupa kontrolna (a), przyjmująca MNA w dawce 100 mg/kg (b) i perindopril w dawce 0,4 mg/kg (c). Przekroje poprzeczne pochodzą z wysokości 500 μm , licząc od momentu pojawienia się pierwszych płatków zastawki aortalnej. Barwienie Oil Red O na obecność lipidów blaszki miażdżycowej, powiększenie 4 x.

1.3. Wpływ egzogenego MNA i perindoprilu na ilość makrofagów w zmianach miażdżycowych

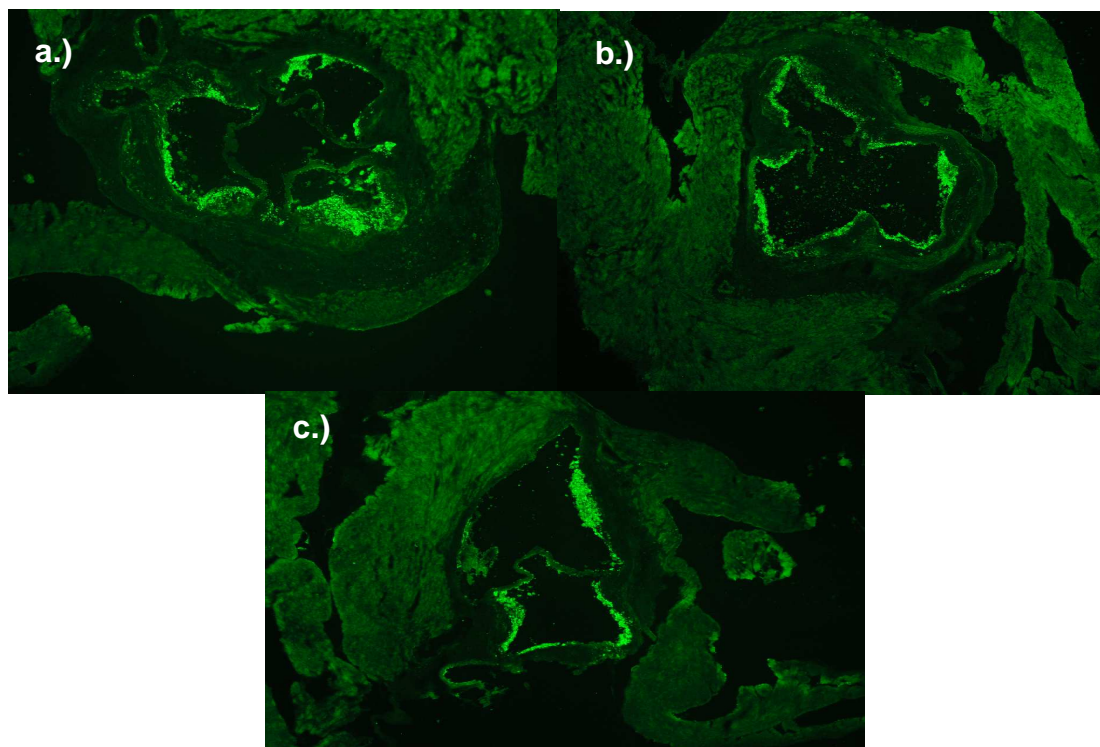
W grupach traktowanych MNA (100 mg/kg) lub perindoprilem 0,4 (mg/kg) stwierdzono istotny statystycznie ($p \leq 0,01$ vs grupa kontrolna) spadek pola powierzchni zajętego przez komórki CD68 (odpowiednio $0,40 \pm 0,21 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ i $0,51 \pm 0,21 \mu\text{m}^2 \times 10^5$) w porównaniu z grupą kontrolną ($1,59 \pm 0,22 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).



Ryc. 14. Wpływ MNA i perindoprilu na ilość komórek CD68 w rejonie zmian miażdżycowych u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* traktowanych karmą standardową. W grupach przyjmujących MNA lub perindopril zaobserwowano wyraźne obniżenie pola powierzchni zajętego przez komórki CD68 ($p \leq 0,01$) w porównaniu z grupą kontrolną.

Podsumowując; w tej serii doświadczeń zaobserwowano silny efekt przeciwmiażdżycowy 4- miesięcznej terapii MNA i perindoprilem (zarówno w odniesieniu do wielkości zmian miażdżycowych, jak i nacieku makrofagów wewnątrz korzenia aorty), przy braku działania tych związków na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów. Wyniki tej serii doświadczeń były bardzo obiecujące, jednak zaobserwowano zmienność wielkości miażdżycy w grupach kontrolnych pochodzących z odrębnych eksperymentów (rozdział Materiały i Metody, ryc. 6). Ten fakt mógłby kwestionować wartość uzyskanych wyników porównawczych przeciwmiażdżycowego działania kwasu nikotynowego MNA i perindoprilu, dlatego też postanowiono opracować zmodyfikowany protokół doświadczenia, tak aby

przyśpieszyć rozwój miażdżycy i zmniejszyć różnice w wielkości miażdżycy pomiędzy grupami kontrolnymi. Zasadniczą część wyników tej rozprawy doktorskiej uzyskano wykorzystując nowy protokół doświadczeń.

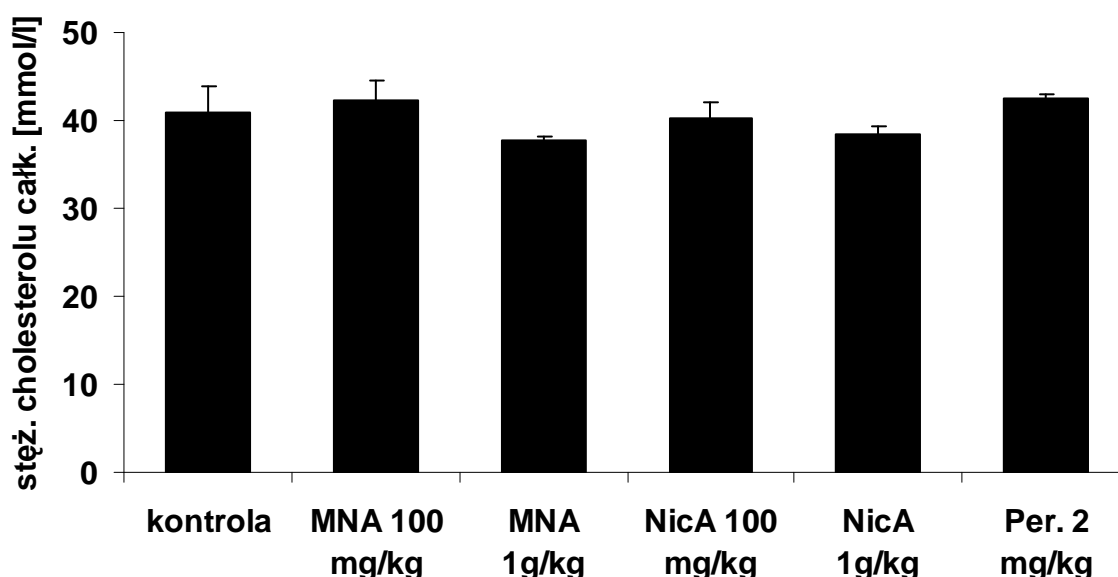


Ryc. 15. Zdjęcia ukazujące przekroje poprzeczne przez korzenie aorty; grupa kontrolna (a), przyjmująca MNA w dawce 100 mg/ kg (b) i perindopril w dawce 0,4 mg/ kg (c). Przekroje poprzeczne pochodzą z wysokości 500 μm , licząc od momentu pojawienia się pierwszych płatków zastawki aortalnej. Trójetapowe barwienie IHC anti-CD- 68, powiększenie 4 x.

2. Badanie przeciwmiażdżycowego działania kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu u myszy *ApoA/LDLR*^{-/-} z wykorzystaniem diety aterogennej

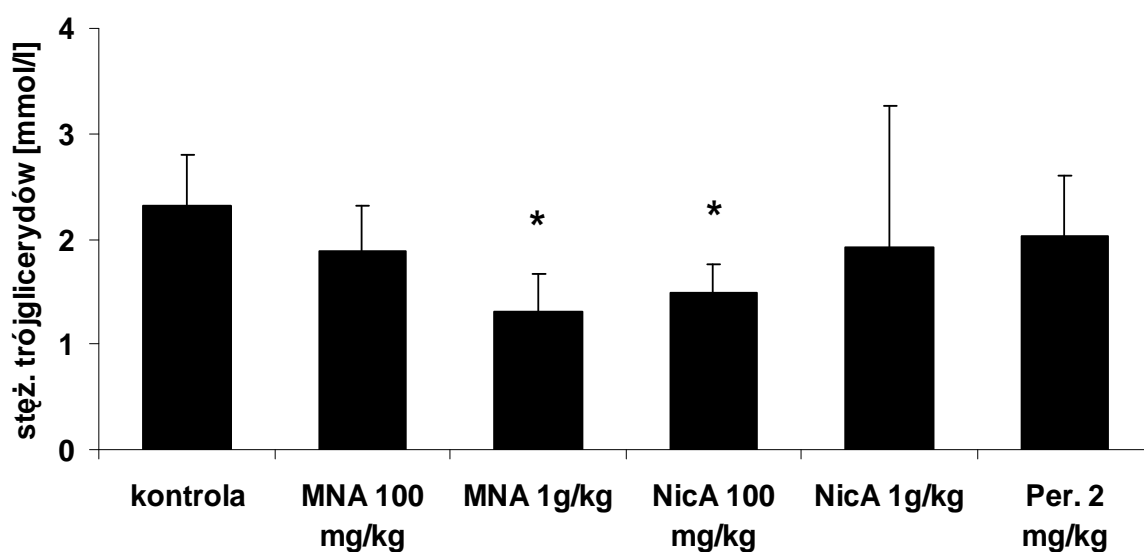
2.1. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu

U myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} karmionych dietą aterogenną stężenie cholesterolu całkowitego w grupie kontrolnej nie traktowanej lekami było znamienne wyższe ($p \leq 0,01$) w porównaniu do myszy karmionych dietą standardową (odpowiednio $42,27 \pm 1,23$ mmol/l vs $14,5 \pm 0,87$ mmol/l). Podawanie MNA w dawce 100 mg/kg, kwasu nikotynowego w dawce 100 mg/kg lub perindoprilu w dawce 2 mg/kg nie wpłynęło na stężenie cholesterolu całkowitego w porównaniu z grupą kontrolną. Jedynie MNA i kwas nikotynowy w dawkach 1g/kg miały nieznaczny wpływ na obniżenie stężenia cholesterolu (**ryc. 16**), ale ten efekt nie był znamieny (odpowiednio $37,74 \pm 0,38$ mmol/l i $38,38 \pm 1,04$ mmol/l; $p \geq 0,05$).



Ryc. 16. Porównanie stężenia cholesterolu całkowitego w osoczu u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} przyjmujących karmę aterogenną z zawartością 5% liofilizatu, traktowanych MNA i kwasem nikotynowym w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg, oraz perindoprilem w dawce 2 mg/kg oraz grupą nieleczoną. Nie wykazano żadnych różnic istotnych statystycznie ($p \geq 0,05$) pomiędzy grupami traktowanymi lekami, a grupą kontrolną.

Podobnie do stężenia całkowitego cholesterolu, stężenie trójglicerydów u myszy *ApoELDLR*^{-/-} karmionych dietą aterogenną było znacznie podwyższone w stosunku do myszy karmionych dietą standardową (odpowiednio $2,32 \pm 0,37$ vs $1,02 \pm 0,16$ mmol/l; $p \leq 0,05$). Jednak u myszy *ApoELDLR*^{-/-} karmionych dietą aterogenną dla niektórych dawek MNA (1g/kg) i kwasu nikotynowego (100 mg/kg) obserwowano znamienne statystycznie ($p \leq 0,05$ vs grupa kontrolna) efekt obniżający stężenie trójglicerydów (odpowiednio $1,31 \pm 0,35$ mmol/l i $1,49 \pm 0,45$ mmol/l vs $2,32 \pm 0,37$ mmol/l). W pozostałych grupach doświadczalnych leczenie nie wpłynęło na stężenie trójglicerydów ($p \geq 0,05$).

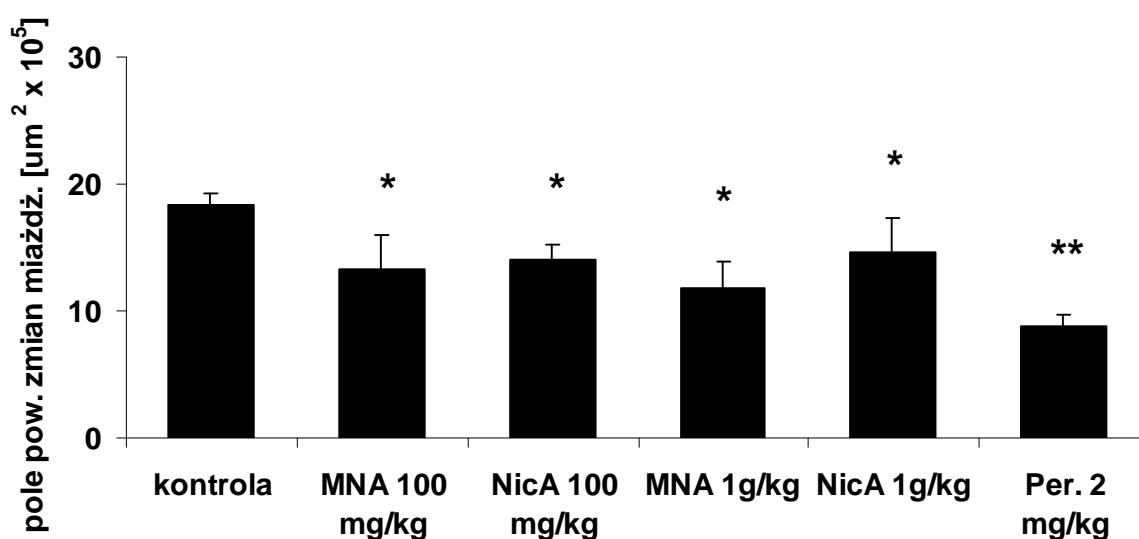


Ryc. 17. Porównanie stężenia trójglicerydów w osoczu myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} przyjmujących paszę aterogenną, traktowanych MNA i kwasem nikotynowym w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg, oraz perindopilem w dawce 2 mg/kg. W porównaniu z grupą kontrolną obniżony poziom trójglicerydów stwierdzono w grupach traktowanych MNA 1 g/kg i kwasem nikotynowym 100 mg/kg ($p \leq 0,05$).

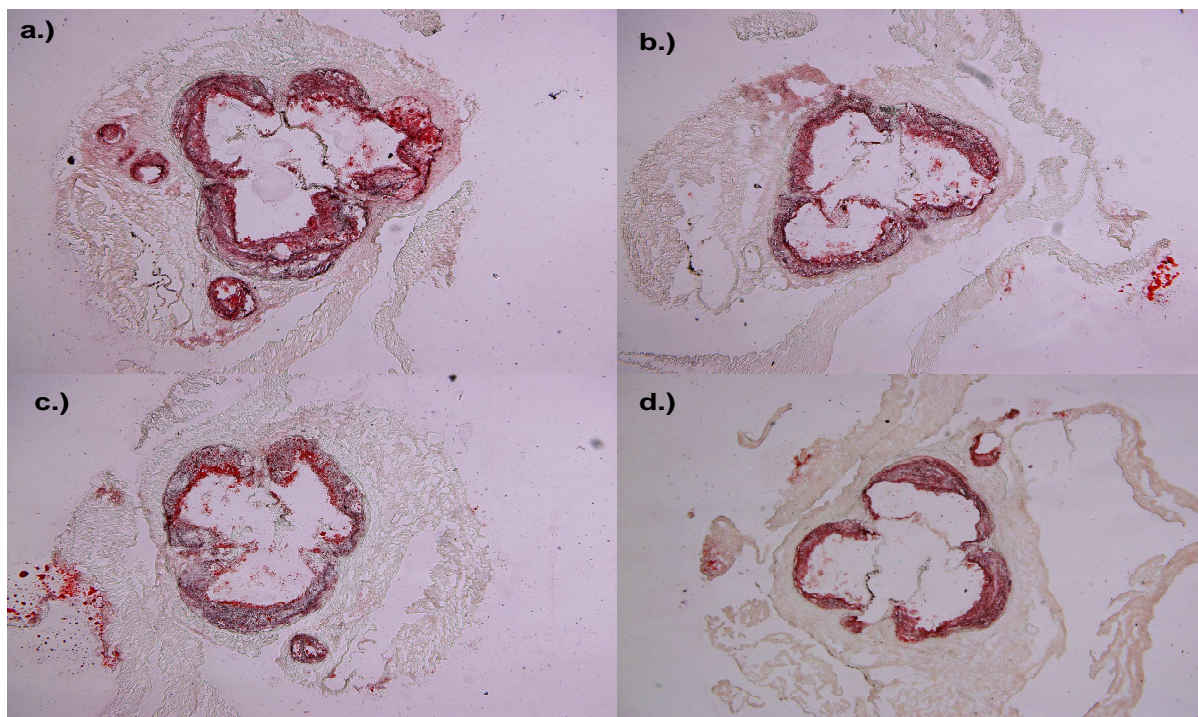
2.2. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na wielkość zmian miażdżycowych w korzeniu aorty

Stosowanie karmy aterogennej przez okres 2 miesięcy wywołało znacznie zwiększoną progresję pola powierzchni blaszek miażdżycowych w grupie nieleczonej ($18,40 \pm 0,80 \mu\text{m}^2 \times 10^5$) w porównaniu z grupą przyjmującą karmę standardową przez okres 4 miesięcy ($7,76 \pm 1,42 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).

W grupach traktowanych MNA w dawce 1 g/kg lub 100 mg/kg pole powierzchni zmian miażdżycowych było znamienne obniżone ($p \leq 0,05$ vs grupa kontrolna) i wynosiło odpowiednio $11,76 \pm 2,14 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ i $13,26 \pm 2,69 \mu\text{m}^2 \times 10^5$. Kwas nikotynowy miał nieco słabsze działanie przeciwmiażdżycowe (**ryc. 18**), obniżając znamienne ($p \leq 0,05$ vs grupa kontrolna) pole powierzchni zmian miażdżycowych do $14,05 \pm 1,19 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ w dawce 100 mg/kg i $14,65 \pm 2,61 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ w dawce 1g/kg. Najsilniejsze zahamowanie progresji blaszek miażdżycowych stwierdzono w grupie traktowanej perindoprilem w dawce 2 mg/kg ($8,76 \pm 0,86 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).



Ryc. 18. Wpływ kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na pole powierzchni blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty u myszy przyjmujących karmę aterogenną. Stwierdzono zahamowanie progresji miażdżycy wewnątrz korzenia aorty po 2 miesiącach podawania MNA w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg ($p \leq 0,05$ vs kontrola), kwasu nikotynowego w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg ($p \leq 0,05$), oraz perindoprilu w dawce 2 mg/kg ($p \leq 0,01$).



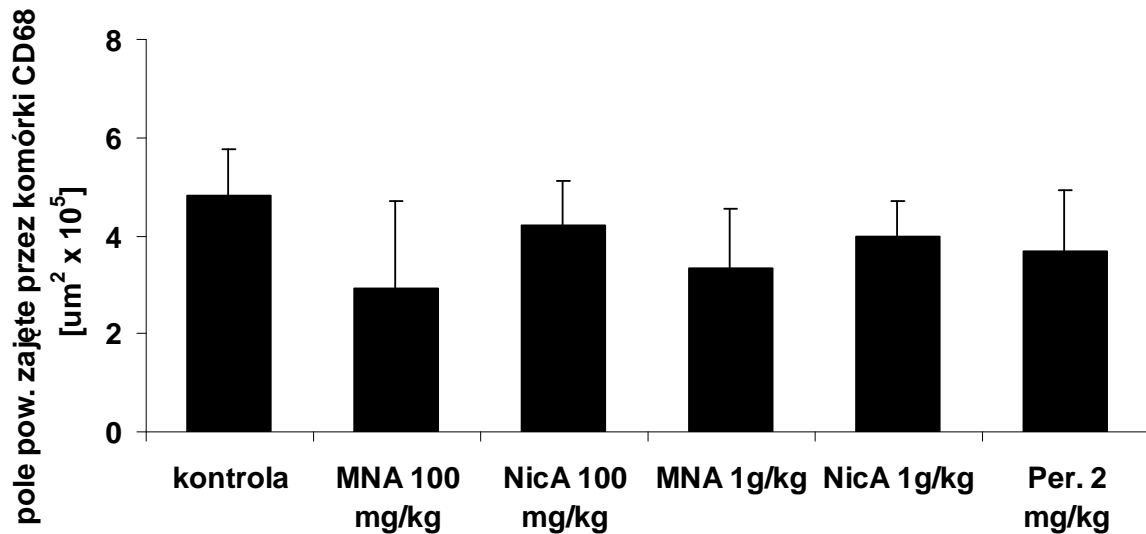
Ryc. 19 Zdjęcia ukazujące przekroje poprzeczne przez korzenie aorty; grupa kontrolna (a), przyjmująca MNA w dawce 100 mg/ kg (b), kwas nikotynowy w dawce 100 mg/kg (c) i perindopril w dawce 2 mg/ kg (d). Przekroje poprzeczne pochodzą z wysokości 400 μm , licząc od momentu pojawienia się pierwszych płatków zastawki aortalnej. Barwienie Oil Red O na obecność lipidów, powiększenie 4 x.

2.3. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na ilość makrofagów i aktywność metaloproteinaz (MMP) w zmianach miażdżycowych

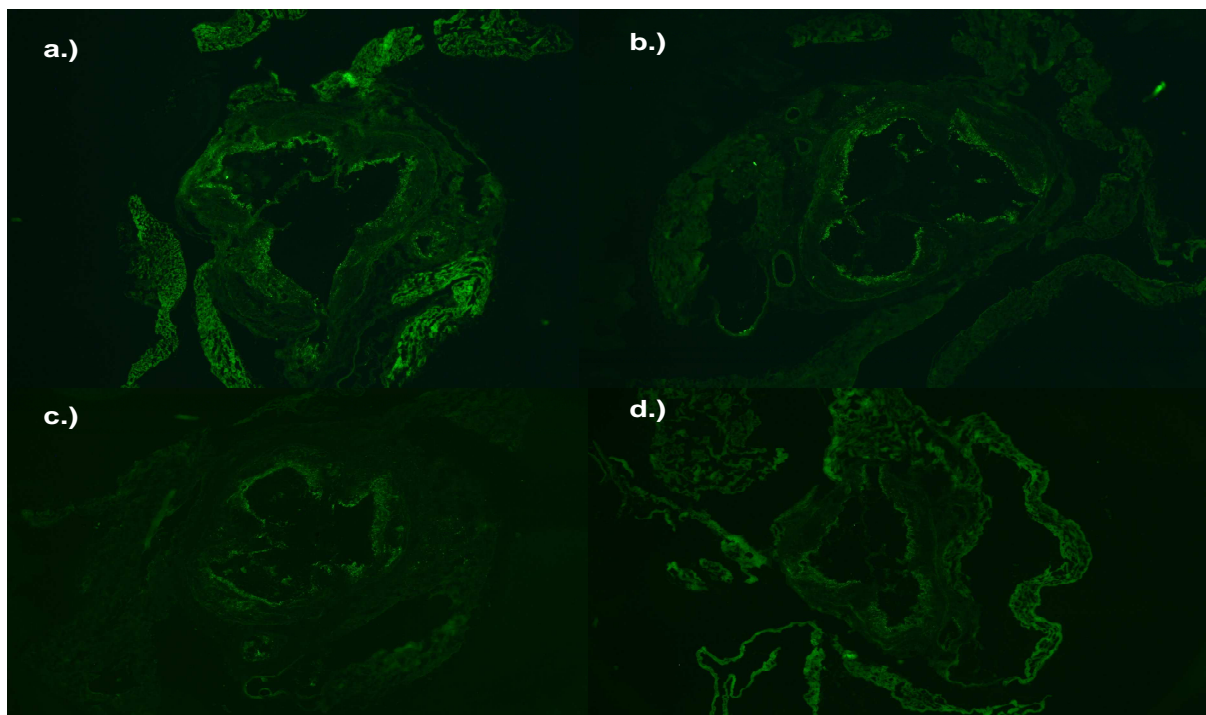
Stosowanie karmy aterogennej przez okres 2 miesięcy wpłynęło znamienne na zwiększenie średniego pola powierzchni blaszek miażdżycowych zajętego przez komórki CD68- pozytywne (ryc. 20). W grupie traktowanej karmą aterogenną wartość ta wynosiła $4,80 \pm 0,95 \mu\text{m}^2 \times 10^5$, w grupie przyjmującej karmę standardowa przez okres 4 miesięcy ilość komórek CD68 była znamienne niższa ($p \leq 0,01$) i wynosiła $1,59 \pm 0,22 \mu\text{m}^2 \times 10^5$.

W grupach traktowanych MNA w dawce 1 g/kg lub 100 mg/kg pole powierzchni zajęte przez komórki CD68 było obniżone i wynosiło odpowiednio $2,93 \pm 1,76 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ i $3,33 \pm 0,27 \mu\text{m}^2 \times 10^5$, jednak stwierdzona różnica nie była znamieną statystycznie ($p \geq 0,05$ vs grupa kontrolna). Niewielki spadek obszaru specyficznego dla cząstki CD68 wykazano również w grupach traktowanych kwasem nikotynowym; $4,21 \pm 0,89 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ dla dawki

100 mg/kg i $3,97 \pm 0,70 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ dla dawki 1 g/kg .W grupie przyjmującej perindopril w dawce 2 mg/kg pole obszaru zajętego przez komórki CD 68 również był niezamiennie obniżony ($3,67 \pm 1,24 \mu\text{m}^2 \times 10^5$).



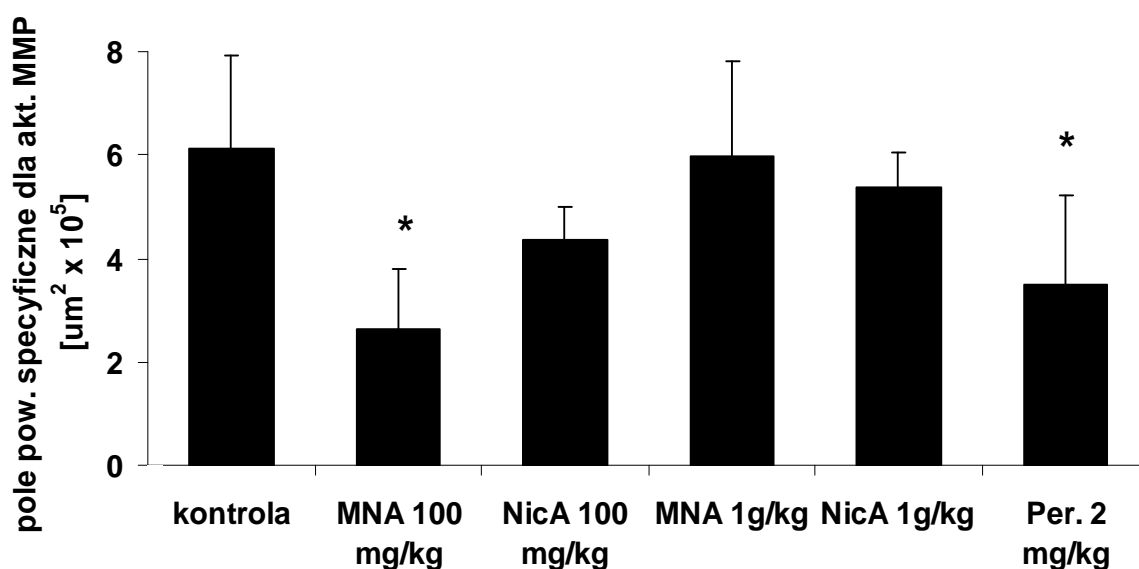
Ryc. 20. Wpływ MNA, kwasu nikotynowego i perindoprilu na poziom komórek CD68 w rejonie zmian miażdżycowych u myszy traktowanych dietą aterogenną. Stwierdzono nieznaczne obniżenie pola powierzchni specyficznego dla cząstki CD68 w grupach traktowanych MNA 100 mg/kg i 1 g/kg w porównaniu z grupą kontrolną, bez znamienności statystycznej ($p \geq 0,05$).



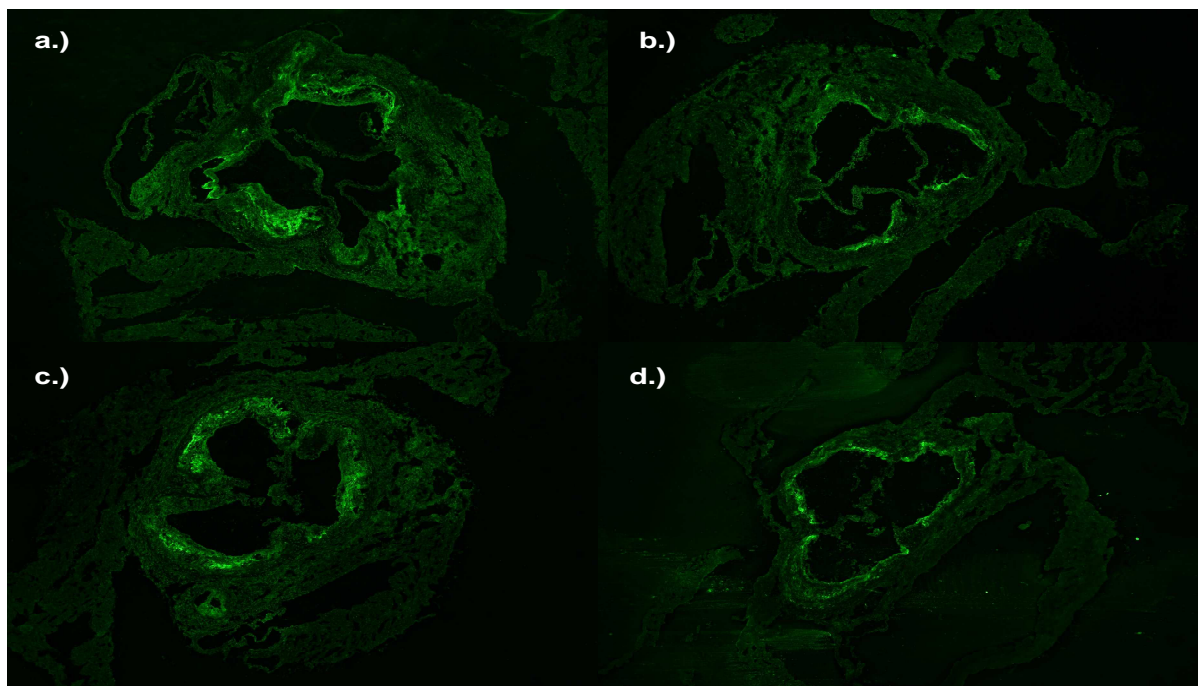
Ryc. 21. Zdjęcia ukazujące przekroje poprzeczne przez korzenie aorty; grupa kontrolna (a), przyjmująca MNA w dawce 100 mg/ kg (b), kwas nikotynowy w dawce 100 mg/kg (c) i perindopril w dawce 2 mg/ kg (d).

Przekroje poprzeczne pochodzą z wysokości 400 μm , licząc od momentu pojawienia się pierwszych płatków zastawki aortalnej. Trójetapowe barwienie IHC anty- CD68, powiększenie 4 x.

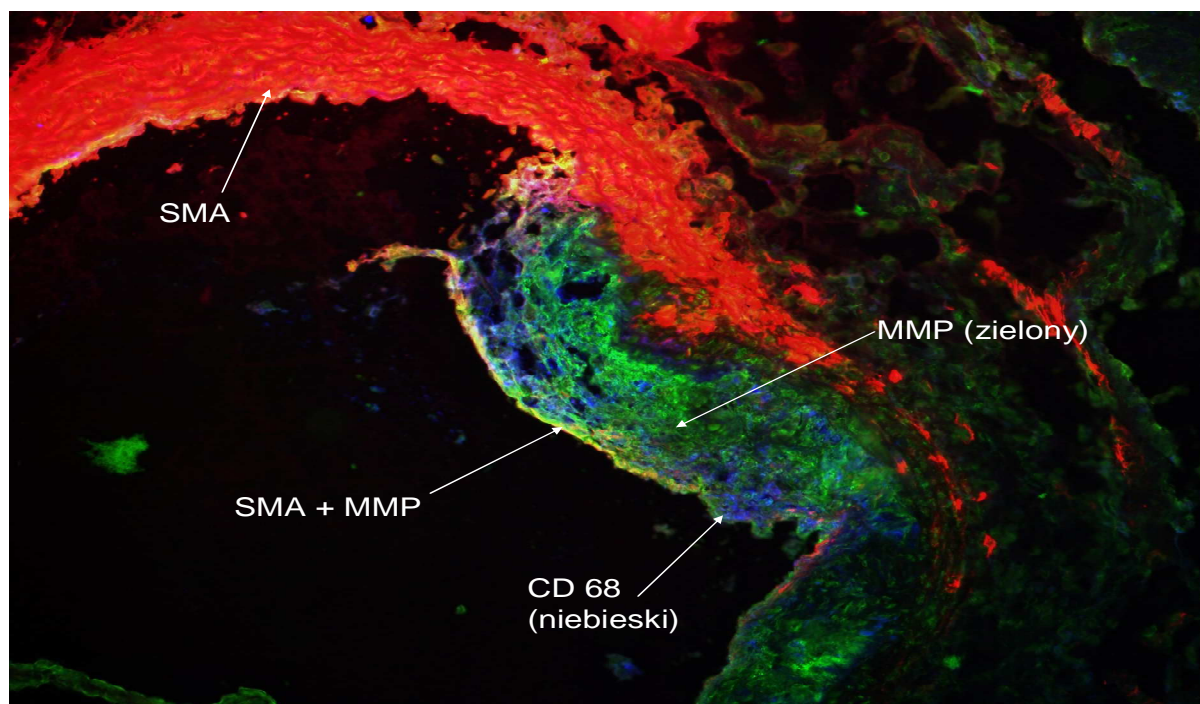
W grupach przyjmujących karmę aterogenną i traktowanych MNA w dawce 100 mg/kg, lub perindoprilem w dawce 2 mg/kg stwierdzono znamienne obniżenie pola powierzchni specyficznego dla aktywności MMP (**ryc. 22**) w porównaniu z grupą kontrolną ($2,63 \pm 0,64$ i $3,47 \pm 0,63 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ vs $6,13 \pm 2,0 \mu\text{m}^2 \times 10^5$, odpowiednio dla grup MNA 100 mg/kg, perindopril 2 mg/kg i kontroli). Podawanie MNA w dawce 1 g/kg nie miało wyraźnego wpływu na aktywność MMP ($5,95 \pm 1,85 \mu\text{m}^2 \times 10^5$). W grupie przyjmującej kwas nikotynowy w dawkach 100 mg/kg lub 1g/kg pole powierzchni specyficzne dla aktywności MMP było obniżone (odpowiednio $4,34 \pm 0,68 \mu\text{m}^2 \times 10^5$ i $5,35 \pm 1,73 \mu\text{m}^2 \times 10^5$), jednak bez stwierdzenia istotności statystycznej. Stwierdzono dodatkowo, że obszary zabarwione na obecność komórek CD68 i wykazujące aktywność MMP nie pokrywają się, choć mają zbliżoną wielkość (**ryc. 24**).



Ryc. 22. Aktywność metaloproteinaz w rejonie zmian miażdżycowych w grupach myszy traktowanych karmą aterogenną, przyjmujących MNA, kwas nikotynowy, lub perindopril. Podawanie MNA w dawce 100 mg/kg i perindoprilu w dawce 2 mg/kg w zbliżonym stopniu hamuje aktywność MMP ($p \leq 0,05$ vs kontrola). Dane przedstawiono jako średnie z 9 przekrojów poprzecznych ($n=6$ lub $n=5$) \pm SD.



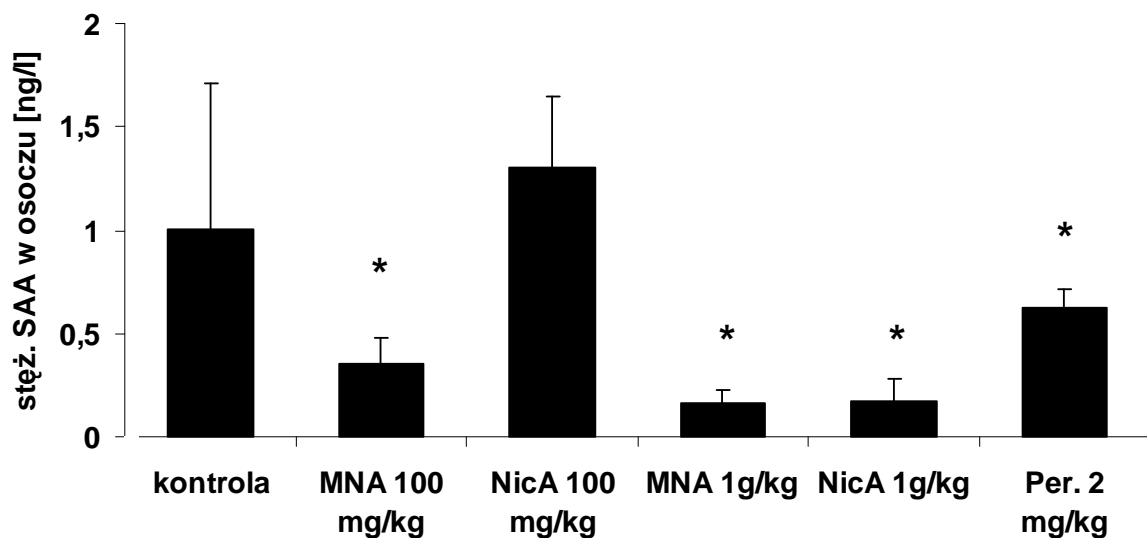
Ryc. 23. Zdjęcia ukazujące przekroje poprzeczne przez korzenie aorty; grupa kontrolna (a), przyjmująca MNA w dawce 100 mg/ kg (b), kwas nikotynowy w dawce 100 mg/kg (c) i perindopril w dawce 2 mg/ kg (d). Widoczna różnica w aktywności MMP między grupą kontrolną a przyjmującą MNA. Przekroje poprzeczne pochodzą z wysokości 400 μ m, licząc od momentu pojawienia się pierwszych płatków zastawki aortalnej. Barwienie zymograficzne na aktywność MMP przy użyciu żelatyny sprzężonej z FITC, powiększenie 4 x.



Ryc. 24. Zbliżenie na blaszkę miażdżycową, kanał czerwony (α - aktyna mięśniówki gładkiej), niebieski (makrofagi) i zielony (aktywność MMP). Obraz sugeruje, że aktywność metaloproteinaz jest bardziej specyficzna dla komórek mięśniówki gładkiej, niż dla makrofagów (nakładanie się kanałów zielonego i czerwonego). Kombinowane barwienie IHC anty- SMA i anty- CD68 połączone z zymografią przy wykorzystaniu żelatyny sprzężonej z FITC, powiększenie 20 x.

2.4. Wpływ egozogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie SAA w osoczu

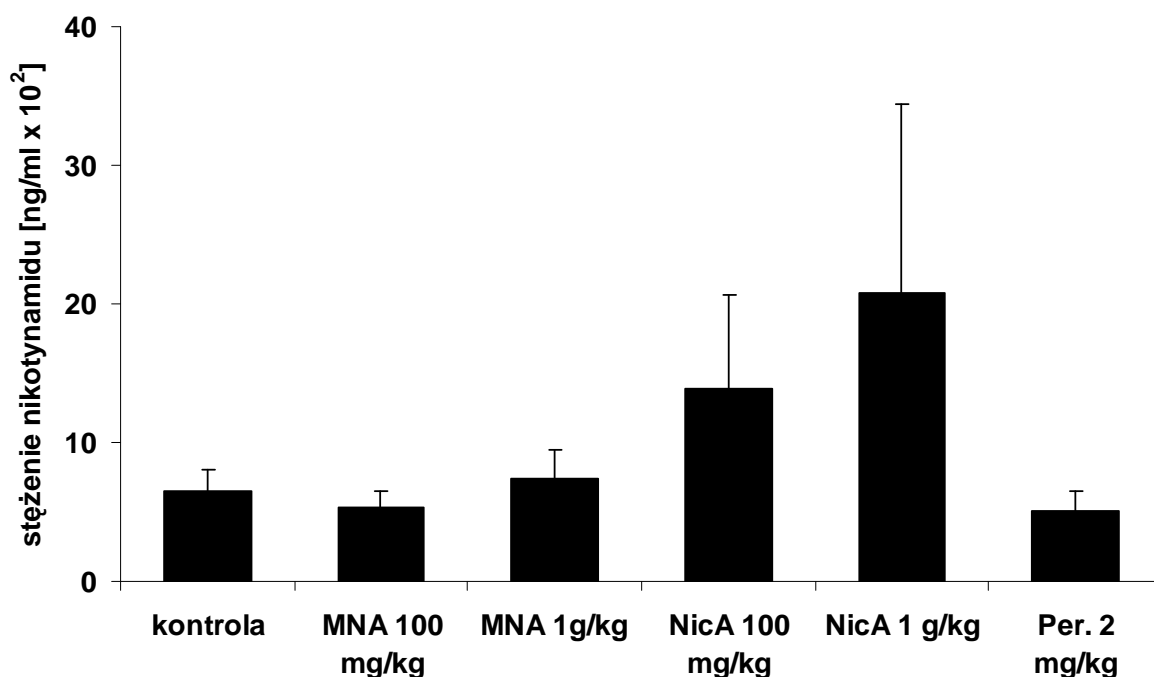
Na ryc. 25 przedstawiono stężenia SAA w osoczu u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* karmionych dietą aterogenną, którym podawano MNA, kwas nikotynowy lub perindopril. We wszystkich leczonych grupach z wyjątkiem grupy leczonej kwasem nikotynowym w dawce 100 mg/kg stężenie SAA było znacząco obniżone ($p \leq 0,05$ vs grupa kontrolna). W grupie kontrolnej wynosiło $1,0 \pm 0,34$ ng/l, a w grupach traktowanych MNA w dawce 100 mg/kg lub 1 g/kg oraz kwasem nikotynowym w dawce 1 g/kg było obniżone w podobnym stopniu, wynosząc odpowiednio $0,35 \pm 0,12$ ng/l; $0,16 \pm 0,06$ ng/l; $0,17 \pm 0,1$ ng/l. Perindopril (2 mg/kg) również znacząco obniżał poziom SAA ($0,62 \pm 0,09$ ng/l), lecz w mniejszym stopniu niż MNA (100 mg/kg, 1 g/kg) i kwas nikotynowy (1 g/kg).



Ryc. 25. Porównanie wpływu MNA, kwasu nikotynowego i perindoprilu na stężenie białka SAA w osoczu u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* przyjmujących karmę aterogenną. MNA w dawce 100 mg/kg lub 1 g/kg, kwas nikotynowy w dawce 1 g/kg i perindopril w dawce 2 mg/kg po 2 miesiącach terapii wywołały istotny statystycznie spadek stężenia SAA w porównaniu z grupą kontrolną.

2.5. Zmiany stężenia metabolitów kwasu nikotynowego w osoczu pod wpływem terapii kwasem nikotynowym, MNA i perindoprilem

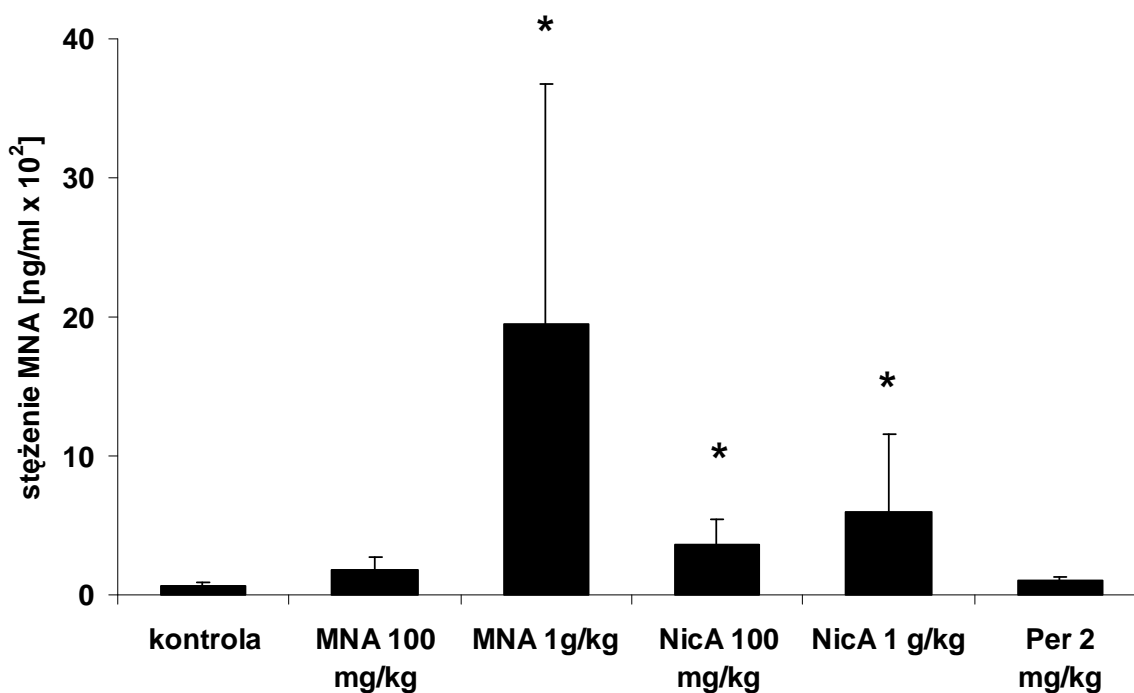
Stężenie nikotynamidu u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} przyjmujących karmę aterogenną było najwyższe w grupach traktowanych kwasem nikotynowym w dawce 1 g/kg (wynosząc $20,73 \pm 13,62$ ng/ml $\times 10^2$) i 100 mg/kg ($13,87 \pm 6,81$ ng/ml $\times 10^2$), jednak ze względu na duży błąd pomiaru nie różniły się istotnie statystycznie od wartości w grupie kontrolnej ($6,51 \pm 1,57$ ng/ml $\times 10^2$). W przeciwieństwie do myszy traktowanych kwasem nikotynowym myszy traktowane MNA w dawce 100 mg/kg lub 1 g/kg oraz perindoprilem w dawce 2 mg/kg posiadały średnie stężenie nikotynamidu zbliżone do stężenia w grupie kontrolnej ($5,36 \pm 1,17$; $7,35 \pm 2,1$ oraz $5,00 \pm 1,54$; odpowiednio dla grupy MNA 100 mg/kg, MNA 1 g/kg i perindopril 2 mg/kg).



Ryc. 26. Stężenia nikotynamidu w grupach myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} traktowanych dietą aterogenną, kwasem nikotynowym w dawkach 100 mg/kg lub 1 g/kg, MNA w dawkach 100 mg/kg lub 1 g/kg, oraz perindoprilem w dawce 2 mg/kg. Dane przedstawiono jako średnią z $n = 6 \pm$ SD.

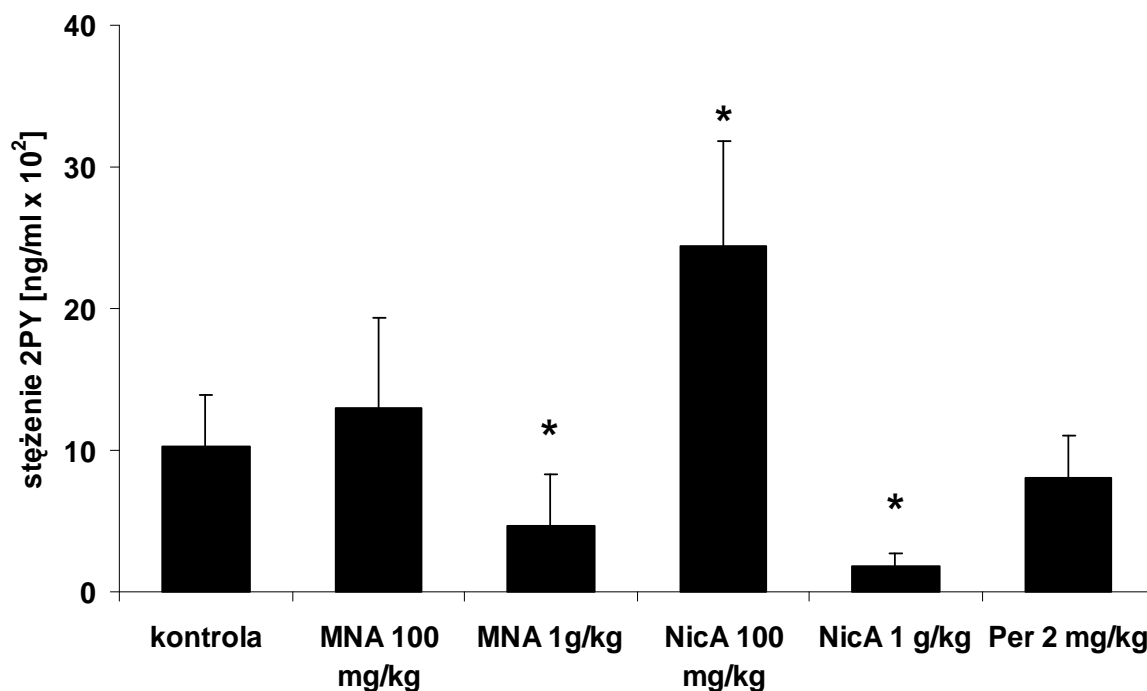
Stężenie MNA w osoczu było najwyższe ($p \leq 0,05$ vs grupa kontrolna) u myszy traktowanych MNA w dawce 1 g/kg (wynosiło $19,48 \pm 17,25$ ng/ml $\times 10^2$) w porównaniu z grupami myszy traktowanymi kwasem nikotynowym w dawce 100 mg/kg ($3,61 \pm 1,78$ ng/ml

$\times 10^2$) lub 1 g/kg ($5,93 \pm 5,68$ ng/ml $\times 10^2$). W grupie kontrolnej stężenie MNA było najniższe, wynosząc $0,7 \pm 0,22$ ng/ml $\times 10^2$. W grupach przyjmującej MNA w dawce 100 mg/kg, lub perindopril w dawce 2 mg/kg stężenie MNA nie różniło się znacząco od grupy kontrolnej.

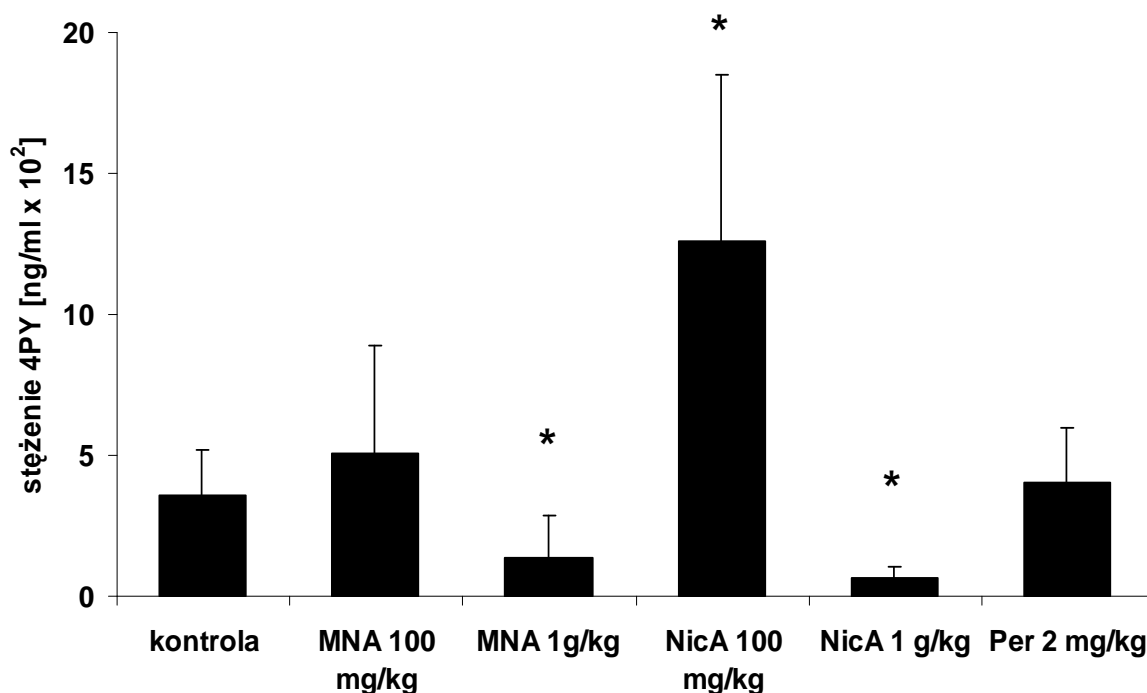


Ryc. 27. Stężenia MNA w osoczu myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* traktowanych dietą aterogenną, kwasem nikotynowym w dawkach 100 mg/kg lub 1 g/kg, MNA w dawkach 100 mg/kg lub 1 g/kg, oraz perindopilem w dawce 2 mg/kg. Dane przedstawiono jako średnią z $n=6 \pm$ SD.

Stężenie metabolitów MNA (2PY i 4PY) w osoczu myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* wszystkich grup doświadczalnych przedstawiono odpowiednio na ryc. 28 i 29. Najwyższe stężenie 2PY i 4PY stwierdzono w grupie myszy traktowanej kwasem nikotynowym (100 mg/kg), a najniższe, mniejsze nawet od stężenia w grupie kontrolnej stężenie obu metabolitów stwierdzono w grupach traktowanych kwasem nikotynowym (1 g/kg) i MNA (1 g/kg).



Ryc. 28. Stężenie 2PY w osoczu myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} traktowanych dietą aterogenną, kwasem nikotynowym w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg, MNA w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg, oraz perindopilem w dawce 2 mg/kg. Dane przedstawiono jako średnią z n= 6 +/- SD.

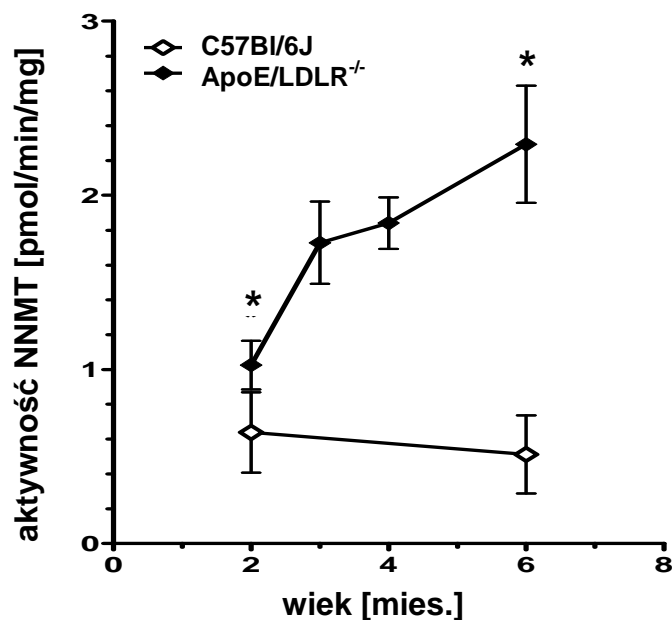


Ryc. 29. Stężenie 4PY w osoczu grupach myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} traktowanych dietą aterogenną, kwasem nikotynowym w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg, MNA w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg, oraz perindopilem w dawce 2 mg/kg. Dane przedstawiono jako średnie (n= 6) +/- SD.

3. Zmiany aktywności endogennego układu NNMT- MNA w toku rozwoju miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*

3.1. Porównanie aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* i *C57Bl/6J*

Pomiary aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu w homogenatach wątrobowych pobranych od myszy miażdżycowych *ApoE/LDLR^{-/-}* pozwoliły na stwierdzenie znamiennego wzrostu stężenia wykrywanego produktu reakcji (1,4- dimetylonikotynamidu) w porównaniu do myszy kontrolnych ($p \leq 0,05$). U myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* przyrost 1,4- MNA zwiększał się wraz z wiekiem myszy; od $\sim 1,0$ pmol/min/mg u myszy 2- miesięcznych do $\sim 2,5$ pmol/min/mg u myszy 6- miesięcznych. U myszy kontrolnych przyrost 1,4- MNA niezależnie od wieku myszy nie przekraczał $1,0$ pmol/min/mg (ryc. 30).

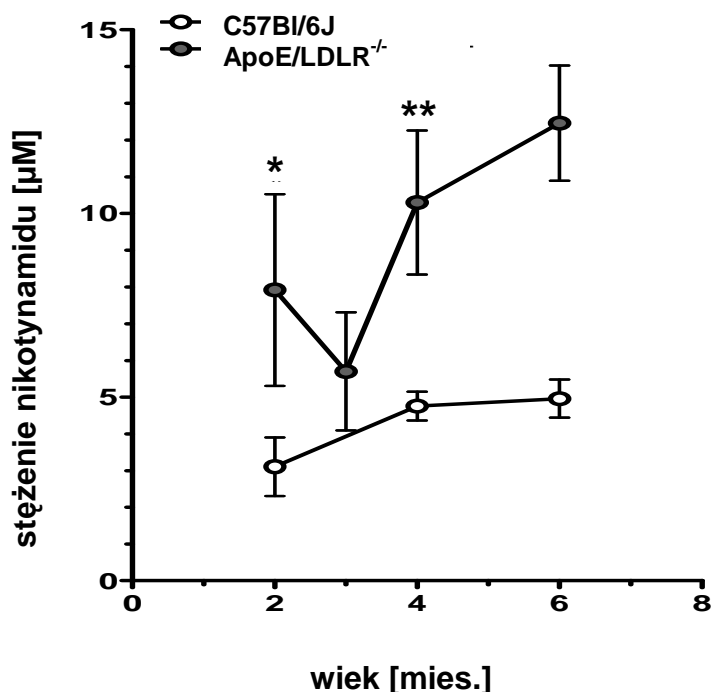


Ryc. 30. Znamienne statystycznie wzrost aktywności NNMT u myszy miażdżycowych *ApoE/LDLR^{-/-}* w porównaniu z myszami *C57Bl/6J* ($p \leq 0,05$). Dane dotyczące każdej z grup wiekowych przedstawiono jako średnie ($n=5$) \pm SD.

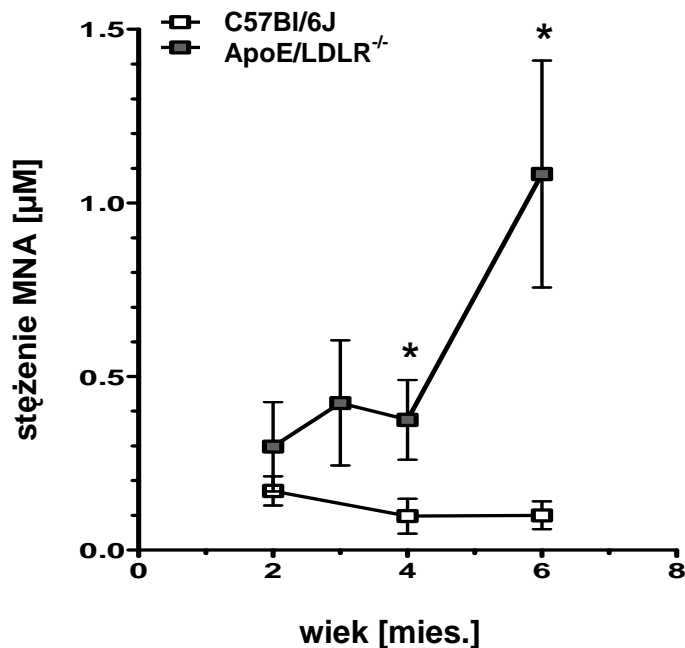
3.2. Stężenie endogennego MNA i jego metabolitów w osoczu w trakcie rozwoju miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}

Już u 2- miesięcznych myszy miażdżycowych *ApoE/LDLR*^{-/-} stwierdzono znamienne wzrost stężenia endogennego nikotynamidu w osoczu w porównaniu z myszami *C57Bl/6J* (odpowiednio; $7,92 \pm 2,61$ vs $3,11 \pm 0,80$ μM , $p \leq 0,05$, **ryc. 31**). Również stężenie MNA u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} było wyraźnie wyższe, niż u myszy *C57Bl/6J*, choć nie wykazano w tym przypadku istotności statystycznej z powodu dużego rozrzutu wyników (odpowiednio $0,30 \pm 0,13$ vs. $0,17 \pm 0,04$ μM). Także stężenia 2PY i 4PY były znamienne wyższe u myszy miażdżycowych (odpowiednio $0,43 \pm 0,05$ vs $0,1 \pm 0,02$ μM i $1,12 \pm 0,3$ vs $0,2 \pm 0,02$ μM , $p \leq 0,05$).

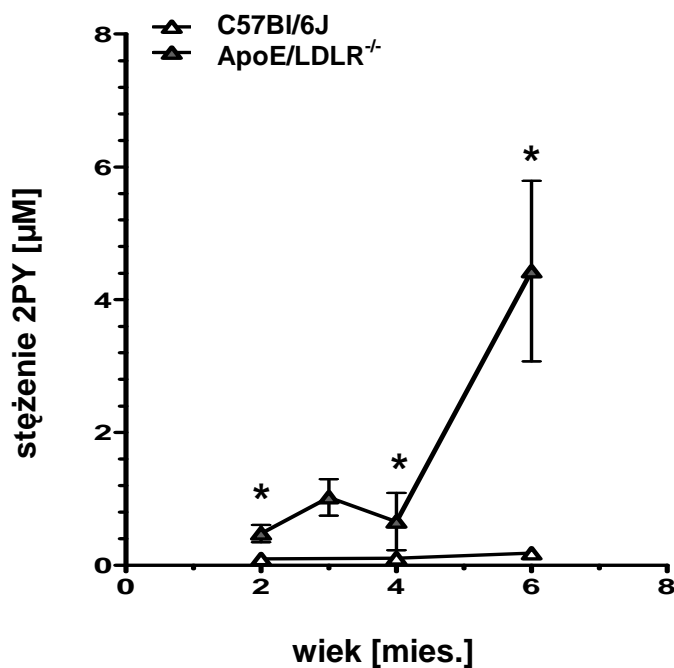
Różnice w osoczowych stężeniach nikotynamidu, MNA, 2PY i 4PY pomiędzy myszami *ApoE/LDLR*^{-/-} i *C57Bl/6J* były jeszcze wyraźniejsze u 4- miesięcznych i 6- miesięcznych osobników. U 6- miesięcznych myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} stężenie MNA było już niemal 10-krotnie wyższe **ryc.32** w porównaniu do myszy *C57Bl/6J* (odpowiednio $1,1$ μM vs $0,1$ μM).



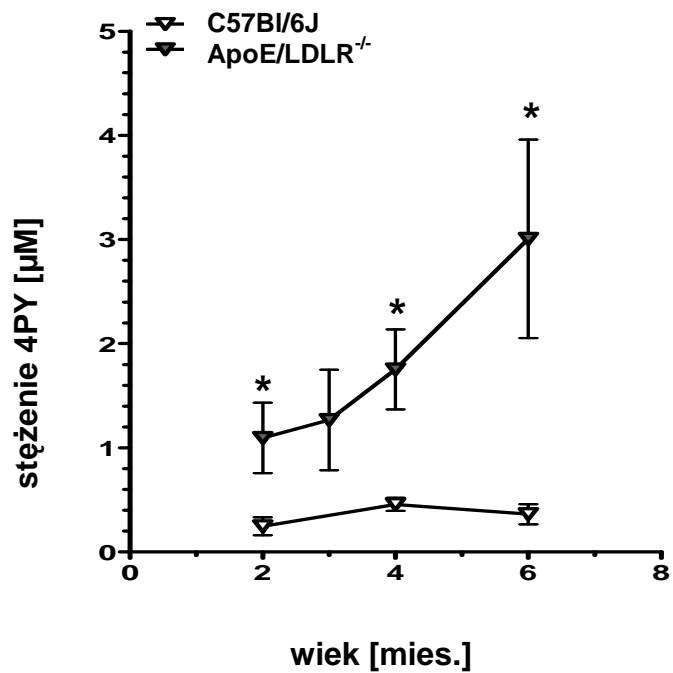
Ryc. 31. Wzrost stężenia endogennego nikotynamidu w osoczu myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} nie traktowanych pochodnymi kwasu nikotynowego, w porównaniu z myszami *C57Bl/6J* nie dotkniętymi miażdżycą.



Ryc.32. Stężenie endogennego MNA w osoczu myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* nie traktowanych pochodnymi kwasu nikotynowego, w porównaniu z myszami *C57Bl/6J*. Wzrost stężenia MNA w toku rozwoju miażdżycy zaznacza się wyraźnie od 4 miesiąca życia myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* ($p \leq 0,05$).



Ryc. 33. Stężenie 2PY, metabolitu MNA w osoczu myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* nie traktowanych pochodnymi kwasu nikotynowego, w porównaniu z myszami *C57Bl/6J*. Znamiennego wzrostu stężenia 2PY ($p \leq 0,05$) od 4 miesiąca życia myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* odpowiada zaobserwowanemu wzrostowi stężenia endogennego MNA.



Ryc. 33. Stężenie 4PY, metabolitu MNA w osoczu myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* nie traktowanych pochodnymi kwasu nikotynowego, w porównaniu z myszami *C57Bl/6J*. Podobnie, jak w przypadku 2PY, zaobserwowano znamienne ($p \leq 0,05$) wzrost stężenia 4PY już od 2 miesiąca życia myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*.

Dyskusja

Myszy miażdżycowe typu „double knockout” są modelem genetycznie indukowanej hipercholesterolemii opartym o brak ekspresji genów kodujących apolipoproteinę E i receptor dla cząsteczek LDL (*ApoE/LDLR^{-/-}*), rozwijającym spontanicznie zmiany miażdżycowe wewnątrz korzenia aorty, niezwykle użytecznym do badań aktywności farmakologicznej leków układu krążenia. Model ten został wykorzystany w niniejszej rozprawie doktorskiej do porównania aktywności przeciwzapalnej i przeciwmiażdżycowej kwasu nikotynowego i jego głównego metabolitu- 1- metylonikotynamidu (MNA), a także inhibitora ACE, perindoprilu użytego w charakterze kontroli pozytywnej.

Przedstawione wyniki wskazują po raz pierwszy na wyraźne przeciwmiażdżycowe działanie egzogenego MNA, zarówno w grupach myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* traktowanych dietą standardową (eksperyment pilotażowy), jak i w grupach przyjmujących wysokotłuszczową karmę aterogenną. MNA, dotychczas postrzegany głównie jako nieaktywny metabolit kwasu nikotynowego, miał porównywalny do swego prekursora wpływ na redukcję pola powierzchni zmian miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty, ocenianego na podstawie barwienia czerwienią oleistą. Równocześnie stwierdzono wpływ MNA na parametry zapalenia towarzyszące rozwojowi miażdżycy; związek ten w różnym stopniu (w zależności od stosowanej diety) zmniejszał pole powierzchni zajęte przez komórki CD68 w rejonie blaszek miażdżycowych, a także wpływał na redukcję pola powierzchni specyficznego dla aktywności metaloproteinaz (MMP) i obniżał stężenie białka ostrej fazy SAA w osoczu u myszy traktowanych karmą aterogenną.

W dalszej części wyników przedstawiono również dowody na zwiększoną aktywność N-metylotranferazy nikotynamidu (NNMT) w toku rozwoju miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* i równoległy znaczny wzrost stężenia endogenego MNA i jego metabolitów w porównaniu ze zdrowymi myszami C57Bl/6J. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o kompensacyjnej roli endogenego układu MNA- NNMT w odpowiedzi ustroju na aktywację czynników prozapalnych i prozakrzepowych w rozwoju *atherothrombosis* u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*.

1. Działanie egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na progresję miażdżycy i towarzyszący jej stan zapalny w rejonie korzenia aorty

Wyniki uzyskane w pilotażowej fazie eksperymentu wskazywały na wyraźną przeciwmiażdżycową aktywność MNA mierzoną jako spadek pola powierzchni zmian miażdżycowych barwionych czerwieńią oleistą względem grupy kontrolnej, porównywalną z działaniem kontroli pozytywnej- perindoprilu (wyniki, podrozdział 1.2, ryc. 12). Obok wpływu na hamowanie progresji blaszki miażdżycowej MNA w znacznym stopniu redukowało ilość prozapalnych komórek CD68 w rejonie blaszki (ryc. 14). Uzyskane dane potwierdzały wcześniejsze doniesienia dotyczące przeciwwzapalnej aktywności MNA w modelach zwierzęcych [17] i w badaniach klinicznych [46;209]. Doniesienia z ostatnich 15 lat podkreślają istotną rolę szlaków zapalnych w patogenezie *atherothrombosis* [54;55], ich aktywacja oraz rozwój dysfunkcji śródbłonna naczyniowego poprzedzają pojawienie się widocznych blaszek miażdżycowych. Zostało to pośrednio zaobserwowane również u 3-miesięcznych myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*, gdzie blaszki miażdżycowe w najwcześniejszej fazie rozwoju były w większości tworzone przez komórki CD68 i produkty ich rozpadu (materiały i metody, podrozdział 1, ryc. 5). Poprzez swoje działanie przeciwwzapalne i/lub plejotropowe MNA i perindopril mogły wpłynąć na zahamowanie progresji blaszki miażdżycowej. Równocześnie opisywano wielokrotnie przeciwwzapalne działanie kwasu nikotynowego nie związane z jego wpływem na lipoproteiny osocza. Jest prawdopodobne, że za te właściwości odpowiada główny metabolit kwasu nikotynowego, MNA.

Aby zweryfikować powyższą hipotezę, porównano przeciwmiażdżycową i przeciwwzapalną aktywność prekursora i jego metabolitu, podawanych w jednakowych dawkach myszom *ApoE/LDLR^{-/-}* traktowanych karmą aterogenną. Wyniki uzyskane w tej fazie badań potwierdziły przeciwmiażdżycową aktywność MNA zaobserwowaną w eksperymencie pilotażowym, choć spadek pola powierzchni zmian miażdżycowych był słabiej zaznaczony (ryc. 18 vs ryc. 12), co wynikało z zastosowania karmy aterogenicznej wpływającej na osłabienie farmakologicznego efektu badanych substancji. Grupy traktowane kwasem nikotynowym miały pole powierzchni zmian miażdżycowych zbliżone do grup traktowanych takimi samymi dawkami MNA. Równocześnie w grupach traktowanych MNA stwierdzono silniejszy efekt przeciwwzapalny mierzony jako ilość komórek CD68 (ryc. 20) i

aktywność MMP (**ryc. 22**) w rejonie zmian miażdżycowych, choć w tym pierwszym przypadku różnice między grupą kontrolną były nieznamiennie i słabiej zaznaczone.

Kwas nikotynowy niezależnie od dobrze znanego wpływu na lipoproteiny osocza może dodatkowo działać przeciwmiażdżycowo i przeciwzapalnie.

Działanie przeciwzapalne kwasu nikotynowego zachodzi poprzez receptory GPR109_A i GPR81 obecne na powierzchni komórek dendrytycznych, makrofagów, adipocytów i neutrofilii, co tłumaczy wpływ tego związku na uwalnianie cytokin/chemokin prozapalnych [32;210;217], ekspresję cząsteczek adhezyjnych [210], migrację aktywowanych komórek układu immunologicznego [91] i wzrost produkcji czynników przeciwzapalnych [32;144;206]. Za część przeciwzapalnej aktywności kwasu nikotynowego może odpowiadać nikotynamid, powstający dzięki aktywności kompleksu cyklaza ADP- rybozy/glikohydrolaza NAD⁺. W wielu doniesieniach potwierdzono przeciwzapalne, cytoprotekcyjne i antyapoptotyczne działanie nikotynamidu poprzez jego wpływ na hamowanie aktywności PARP1 i sirtuin (wstęp, podrozdział 4.).

W niniejszej rozprawie doktorskiej, w przeciwieństwie do grup myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} traktowanych MNA nie stwierdzono wpływu kwasu nikotynowego na hamowanie aktywności metaloproteinaz w rejonie zmian miażdżycowych. Metaloproteinazy (MMP) to rodzina 28 enzymów proteolitycznych rozkładających macierz międzykomórkową (ECM- *extracellular matrix*). Pełnia one ważną funkcję fizjologiczną, mając wpływ na remodeling ECM (min. lamininy, fibronektyny, kolagenu typu IV i elastyny) i migrację komórek, co bezpośrednio wpływa na angiogenezę, morfogenezę, wzrost, gojenie ran i naprawę tkanek po urazie [33;167]. Ich aktywność jest ograniczana przez cztery typy endogennych inhibitorów tkankowych (TIMP), uwalnianych przez komórki tkanki łącznej i makrofagi [153;170]. Nadmierną aktywność MMP stwierdzono w przebiegu większości chorób układu krążenia; nadciśnieniu, miażdżycy, zawałe, niewydolności serca, chorobie niedokrwiennej serca, czy w patogenezie tętniaka, dodatkowo w cukrzycy i w stanach zapalnych [141]. Aktywność metaloproteinaz 2 i 9 (szczególnie MMP-9) jest jednym z ważnych czynników prozapalnych, promujących migrację i proliferację komórek mięśniówki gładkiej, limfocytów T i makrofagów [77]. Dodatkowo wiele czynników wzrostu (IGF, FGF, TGFβ i HGF) związanych z macierzą międzykomórkową ulega uwolnieniu i aktywacji po degradacji ECM przez MMP, co wpływa na wzrost, migrację i proliferację komórek układu immunologicznego [188]. We wczesnej fazie tworzenia się blaszki miażdżycowej wzrost aktywności MMP uszkadza błonę podstawną śródbłonna, co ułatwia infiltrację intymy przez limfocyty T i makrofagi. W późniejszej fazie nadmierna aktywność MMP-9 i MMP-2 jest

czynnikiem osłabiającym stabilność blaszki i zwiększającym prawdopodobieństwo jej pęknięcia [97]. MMP-2 i MMP-9 są uwalniane przez wszystkie komórki biorące udział w tworzeniu struktury blaszki, jak i indukujących stan zapalny towarzyszący rozwojowi *atherothrombosis*: makrofagi, komórki mięśniówki gładkiej, komórki śródbłonna, limfocyty T [77]. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono, czy spadkowi aktywności MMP w rejonie zmian miażdżycowych wywołanym podawaniem MNA towarzyszył wzrost ekspresji tkankowych inhibitorów TIMP. Wyniki badań potwierdzają wcześniejsze doniesienie dotyczące zmniejszania aktywności MMP przez stosowanie MNA w zbliżonej dawce 62,5 mg/kg. W szczurzym modelu niedokrwienego uszkodzenia mózgu MNA zmniejszało aktywność MMP-9 we wczesnej fazie uszkodzenia, natomiast zwiększało aktywności MMP-2 w fazie późnej. Wpływało to na wygaszenie procesów zapalnych mających udział w degradacji komórek nerwowych po okresie hipoksji/ischemii i zarazem wspomagało procesy naprawcze w uszkodzonej tkance podczas reperfuzji [33]. Co ciekawe, w przeprowadzonych doświadczeniach MNA miało wpływ na hamowanie aktywności MMP tylko w dawce 100 mg/kg (**ryc. 22**), dawka 1 g/kg nie wywołała takiego efektu.

Drugim szlakiem działania kwasu nikotynowego niezależnym od wpływu na profil lipidowy osocza jest aktywność śródbłonna. W badaniach klinicznych stwierdzono wpływ kwasu nikotynowego na śródbłonek mierzony jako redukcja grubości ściany tętnicy szyjnej badanej nieinwazyjnie przy pomocy MRI i poprawę parametrów naczyniowych u pacjentów przyjmujących niacynę [96], jak również zdolność do odwracania dysfunkcji śródbłonna mierzonej jako zależny od śródbłonna rozkurcz tętnicy ramieniowej [190;204]. Również w badaniach *in vitro* na liniach komórek śródbłonna zaobserwowano wpływ kwasu nikotynowego na spadek ekspresji cząsteczek adhezyjnych [44;181] i wydzielanie TNF- α [44].

Mechanizm plejotropowego działania kwasu nikotynowego na śródbłonek naczyniowy wciąż pozostaje zagadką. Nie może on być tłumaczony poprzez wpływ na specyficzne receptory- dotychczas nie stwierdzono obecności GPR109_A i GPR109_B na powierzchni komórek śródbłonna. Za wpływem receptorów GPR109_A na czynność śródbłonna nie przemawia również fakt, iż agoniści tych receptorów; MK-0354 i MK-6892 nie posiadały działania naczyniorozszerzającego [166;169]. Efekty działania kwasu nikotynowego na śródbłonek naczyniowy mogą więc zależeć od jego endogennych metabolitów.

Choć w tej pracy nie badano mechanizmu przeciwmiażdżycowego działania MNA, wcześniejsze doniesienia wykazały, że przeciwwapalny profil działania MNA różni się od aktywności swoich prekursorów; nikotynamidu i kwasu nikotynowego. Na przykład; w

przeciwieństwie do nikotynamidu MNA nie wpływał na poziom TNF α [14;149], posiadał również znacznie mniejszy wpływ na hamowanie aktywności PARP1 [185]. O ile właściwości nikotynamidu i kwasu nikotynowego wydają się dotyczyć bezpośredniego hamowania komórek układu immunologicznego, przeciwzapalne działanie MNA wynika głównie z aktywacji śródbłonkowego układu cyklooksygenazy 2 (COX-2), odpowiedzialnego za produkcję przeciwzapalnej i przeciwzakrzepowej prostacykliny (PGI $_2$). Podanie MNA w szczurzym modelu skutkowało zwiększeniem w osoczu poziomu 6-keto-PGF1 α , stabilnego metabolitu PGI $_2$ [26;118;149], dodatkowo przeciwzakrzepowy efekt 1-metylonikotynamidu został zniesiony po podaniu rofekoksybu, selektywnego inhibitora COX-2 [26]. Wydaje się więc, że przeciwzakrzepowe i przeciwzapalne działanie MNA, związane z aktywacją układu COX-2/PGI $_2$, może być odpowiedzialne za obserwowane w tej pracy przeciwmiażdżycowe działanie MNA. Interesujące byłoby przeprowadzenie analogicznych badań nad przeciwmiażdżycowym działaniem MNA z wykorzystaniem myszy z wybrakowanym genem dla COX-2 i receptora IP, aby ostatecznie udowodnić prawdopodobny udział szlaku COX-2/PGI $_2$ w przeciwmiażdżycowym działaniu MNA.

W przeprowadzonych badaniach stosowano również perindopril jako kontrolę pozytywną, podając go w niskich dawkach (0,4 mg/kg i 2 mg/kg), nie mających wpływu na ciśnienie krwi. Przeciwmiażdżycową i przeciwzapalną aktywność perindoprilu można wytłumaczyć poprzez jego zdolność do blokowania konwertazy angiotensyny obecnej na powierzchni śródbłonka. Osoczowa frakcja ACE stanowi tylko niewielką część puli tego enzymu obecnej w organizmie; śródbłonek naczyniowy stanowi główną lokalizację konwertazy angiotensyny [25;156]. Perindopril i inne leki z grupy ACE-I blokują aktywność śródbłonkowej konwertazy angiotensyny już w niskich dawkach, niewywołujących spadku ciśnienia krwi [224]. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem stojącym za plejotropową aktywnością ACE-I jest zwiększenie stężenia bradykininy, która działa poprzez receptory B $_2$ na powierzchni śródbłonka [51]. Dodatkowo aktywacji ulega synteza NO i PGI $_2$, wnoszących swoją aktywność wazodylatacyjną i przeciwzapalną. W późniejszej fazie zwiększony poziom bradykininy może dodatkowo aktywować receptory B $_1$ obecne na powierzchni śródbłonka [109]. Równocześnie zablokowanie aktywności konwertazy angiotensyny skutkuje spadkiem ekspresji oksydazy NADPH i zmniejszeniem produkcji reaktywnych form tlenu [122]. Oba powyższe mechanizmy, zależny od bradykininy i pochodzący z wygaszenia aktywności oksydazy NADPH mogą dopełniać się wzajemnie w śródbłonkowym działaniu ACE-I [25].

Co ciekawe, w grupach myszy przyjmujących karmę standardową już bardzo niska dawka perindoprilu (0,4 mg/kg) podawanego przez okres 4 miesięcy miała silny wpływ na redukcję

ilości makrofagów w korzeniu aorty, natomiast w grupach myszy traktowanych karmą aterogenną pięć razy wyższa dawka perindoprilu (2 mg/kg) podawanego przez okres 2 miesięcy nie wywołała znaczącego zahamowania nacieku komórek CD 68 w rejon zmian miażdżycowych. Stwierdzone różnice między grupami wynikają z zastosowania odmiennej karmy i odmiennej długości czasu trwania eksperymentu (4 miesiące vs 2 miesiące), podobnie jak w przypadku różnic w przeciwmiażdżycowym działaniu 1- metylonikotynamidu. Dodatkowo istotny wydaje się fakt, że perindopril zaczęto podawać od 2 miesiąca życia myszy, w okresie poprzedzającym pojawienie się blaszek miażdżycowych, lecz już w trakcie zachodzenia procesów zapalnych poprzedzających *atherothrombosis*. Odpowiednio wczesna interwencja farmakologiczna mogła mieć wpływ na wyraźne przeciwzapalne działanie nawet bardzo niskiej dawki perindoprilu i późniejsze znaczne zahamowanie progresji blaszek miażdżycowych.

Podsumowując; uzyskane w tej rozprawie doktorskiej wyniki wskazują na to, że MNA posiada porównywalne właściwości przeciwmiażdżycowe do swojego prekursora, kwasu nikotynowego i zarazem wykazuje tendencję do silniejszej aktywności przeciwzapalnej. W świetle uzyskanych danych można sądzić, że przeciwzapalne i naczynioprotekcyjne działanie kwasu nikotynowego opisywane u ludzi [2;162;190] jest zależne od aktywności N-metylotransferazy nikotynamidu i powstawania endogennego MNA; mechanizm ten może wyjaśniać przeciwmiażdżycowe właściwości kwasu nikotynowego niezależne od wpływu tego związku na profil lipidowy.

2. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie SAA (serum amyloid A) w osoczu

Zaobserwowano wyraźny spadek stężenia SAA w osoczu myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} przyjmujących karmę aterogenną w grupach traktowanych MNA, kwasem nikotynowym (w wyższej dawce) i perindoprilem (**ryc. 25**). SAA jest jednym z głównych białek ostrej fazy u kręgowców, produkowanym przez wątrobę, adipocyty i ścianę naczyń tętniczych [108], którego poziom w osoczu wzrasta od 100 do 1000 razy w odpowiedzi na ostre stany zapalne. Znacznie niższe, lecz wyraźnie zwiększone stężenia SAA występują u ludzi otyłych lub cierpiących na zespół metaboliczny (wysoki poziom cholesterolu LDL, nadciśnienie,

oporność na insulinę i inne czynniki ryzyka *atherothrombosis*) prowadzący do dysfunkcji śródbłonna i późniejszej miażdżycy. Biorąc to pod uwagę, wysokie stężenie SAA w osoczu jest uważane za jeden z czynników predykcyjnych dla rozwoju chorób układu krążenia [98;107]. Białko SAA wybrano w bieżącym badaniu jako znacznik stanu zapalnego w osoczu, gdyż u myszy nie występuje białko C-reaktywne, będące głównym ludzkim białkiem ostrej fazy.

Aterogenne działanie SAA polega na wypieraniu apolipoproteiny AI z cząstek cholesterolu HDL, skutkiem czego powstają „dysfunkcjonalne” cząsteczki HDL, które tracą swoje aktywności biologiczne. Wzrost stężenia SAA w ostrej fazie odpowiedzi zapalnej jest skorelowany ze spadkiem ApoAI w cząsteczkach HDL, jak i spadkiem syntezy tej apolipoproteiny w wątrobie [78]. Po zastąpieniu ApoAI przez SAA HDL zyskuje zdolność do łączenia się z zewnątrzkomórkowymi proteoglikanami ściany naczynia dzięki specyficznej dla proteoglikanów domenie białkowej obecnej w cząsteczce SAA [98;129]. Efektem tego jest unieruchomienie cząsteczek HDL w ścianie naczynia i zahamowanie redystrybucji cholesterolu z makrofagów i komórek piankowatych do wątroby, co nasila progresję blaszki miażdżycowej [87;88]. SAA posiada również zdolność do zastępowania apolipoproteiny B w cząsteczkach VLDL, co podobnie jak w przypadku HDL zwiększa prawdopodobieństwo przechwycenia VLDL przez ścianę naczynia [107]. Dodatkowo SAA może wypierać z HDL PON-1 [199;201], lub wpływać na inne białka enzymatyczne rozkładające cząstki oxLDL, co zmniejsza zdolności przeciwzapalne i antyoksydacyjne HDL.

Niezależnie od wpływu aterogenego poprzez cząsteczki HDL, wolne SAA stymuluje migrację, adhezję do śródbłonna i penetrację tkanek przez monocyty, granulocyty [9] i limfocyty T [211], pełniąc rolę chemoatraktanta i wzmacniając na tej drodze odpowiedź zapalną ustroju.

Spadek poziomu SAA w obu grupach myszy traktowanych MNA można wytłumaczyć poprzez przeciwzapalną aktywność tego związku, polegającą na aktywacji układu COX-2/PGE₂. W poprzednich doniesieniach stwierdzono zdolność cząsteczek HDL do indukcji uwalniania prostacykliny przez komórki śródbłonna [127;128], jak i zwiększenia produkcji tlenku azotu [126]. Przy powstaniu dysfunkcyjnych kompleksów HDL-SAA powyższe mechanizmy ulegają upośledzeniu i zostają uruchomione szlaki promujące rozwój zapalenia i progresję blaszki miażdżycowej. Egzogenne MNA poprzez stymulację produkcji PGE₂ nasila odpowiedź przeciwzapalną ustroju, co mogłoby skutkować spadkiem produkcji SAA w wątrobie. Równocześnie kwas nikotynowy w dawce 1 g/kg mógłby wykazywać swój wpływ na stężenie SAA poprzez zwiększanie ilości funkcjonalnych lipoprotein frakcji HDL, co

pociąga za sobą nasiloną syntezę apolipoproteiny AI w wątrobie, jak i poprzez fakt, że stanowi substrat do produkcji przeciwzapalnego MNA. Brak działania kwasu nikotynowego w dawce 100 mg/kg jest trudny do wytłumaczenia, ale koreluje ze słabszym wpływem tej dawki na pole powierzchni blaszki miażdżycowej, ilość komórek CD68 i aktywność MMP. Wpływ perindoprilu, słabszy od działania MNA i kwasu nikotynowego w dawce 1 g/kg wynika prawdopodobnie z aktywacji mechanizmów śródbłonkowych, co opisano w podrozdziale 1. dyskusji.

W niniejszej pracy doktorskiej nie stwierdzono, czy zmiana stężenia SAA w osoczu była związana ze wzrostem produkcji ApoAI w wątrobie i zwiększeniem cholesterolu frakcji HDL w osoczu, jednak można przypuszczać, że uruchomienie szlaków przeciwzapalnych u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} obniża stężenie kompleksu HDL-SAA na korzyść HDL-ApoAI.

3. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu

W grupach myszy karmionych paszą aterogenną i traktowanych kwasem nikotynowym, MNA i perindoprilem nie zaobserwowano znaczącego spadku cholesterolu całkowitego w porównaniu z grupą kontrolną ($p \geq 0,05$). Poziomy cholesterolu całkowitego w wymienionych grupach były do siebie zbliżone (**ryc. 16**) i istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupami traktowanymi karmą standardową. W eksperymencie pilotażowym, w grupach myszy traktowanych MNA i perindoprilem również nie stwierdzono wpływu podawanych substancji na stężenie cholesterolu (**ryc. 10**). Można więc stwierdzić, że przeciwmiażdżycowe i przeciwzapalne działanie kwasu nikotynowego i MNA opisane w podrozdziałach 1 i 2 nie wynika z wpływu tych związków na stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu. W badaniach klinicznych wykazano wielokrotnie zdolność kwasu nikotynowego do obniżania cholesterolu całkowitego w hiperlipidemiach typu II-V [21;23]. Brak wpływu kwasu nikotynowego na stężenie cholesterolu u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} może wynikać ze znacznego upośledzenia metabolizmu lipidów w tym modelu i silnie podwyższonego poziomu cholesterolu w osoczu, wynikającego dodatkowo ze stosowania karmy aterogenicnej zawierającej 5% liofilizatu z żółtek kurzych, bogatej w cholesterol [38]. W badaniach dotyczących niniejszej pracy doktorskiej nie wykonano analizy całego profilu

lipidowego osocza, a zmierzono jedynie stężenie cholesterolu i trójglicerydów, więc trudno powiedzieć, czy kwas nikotynowy w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg miał wpływ na zwiększenie odsetka frakcji lipoprotein HDL. Dane uzyskane z pomiarów stężenia białka ostrej fazy SAA (dyskusja, podrozdział 2.) pozwalają pośrednio przypuszczać, że suplementacja kwasem nikotynowym w dawce 1 g/kg może wpływać na zwiększenie puli funkcjonalnych cząsteczek HDL.

We wcześniejszych doniesieniach nie stwierdzono zdolności MNA do obniżania stężenia cholesterolu, jak i wpływu na lipoproteiny HDL, LDL i VLDL [10;205], lecz MNA poprzez obniżanie poziomu SAA w osoczu również może pośrednio wpływać na wzrost udziału funkcjonalnych cząsteczek HDL, jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga szczegółowej analizy profilu lipidowego, lub dodatkowych badań na mysim modelu miażdżycowym upośledzonym w mniejszym stopniu pod względem metabolizmu lipidów (*C57Bl/6J ApoE^{-/-}* lub *LDLR^{-/-}*). Perindopril, jako inhibitor konwertazy angiotensyny stosowany w niskiej dawce działającej na śródbłonek również nie miał wpływu na stężenie cholesterolu.

W eksperymencie pilotażowym nie stwierdzono wpływu MNA i perindoprilu na stężenie trójglicerydów w osoczu myszy traktowanych standardową karmą (**ryc. 11**), natomiast co zaskakujące, zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu trójglicerydów w osoczu myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* przyjmujących karmę aterogenną i traktowanych MNA w dawce 1 g/kg. Obniżenie poziomu trójglicerydów po przyjmowaniu MNA stwierdzono wcześniej w badaniach na szczurzym modelu hipertrójglicerydemii [10], jak również w klinicznych badaniach pilotażowych przeprowadzanych w Zakładzie Kardiologii i Kardiochirurgii Akademii Medycznej w Łodzi, gdzie u kilkunastu pacjentów przyjmujących 3 razy dziennie przez okres 2 tyg. MNA w dawce 30 mg/kg zaobserwowano prawie dwukrotny spadek TG w osoczu (Kawiński i wsp. 2006, wyniki nie opublikowane). W obu powyższych doniesieniach stosowano dawkę MNA 100 mg/kg, która nie miała żadnego wpływu na obniżenie poziomu TG u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*, zarówno przyjmujących karmę standardową, jak i aterogenną. Dotychczas nie wiadomo, czy MNA w wysokiej dawce posiada zdolność do obniżania syntezy trójglicerydów; czy to poprzez hamowanie hormonozależnej lipazy adipocytów, czy też dzięki obniżaniu aktywności acetylotransferazy 2 diacyloglicerolu w wątrobie. Być może hipolipidemizujące właściwości MNA wynikają z jego zdolności do aktywacji śródbłonkowej lipazy lipoproteinowej (LPL), której dysfunkcja przyczynia się do wzrostu poziomu trójglicerydów [62]. Przypuszcza się również, że MNA może oddziaływać na metabolizm adipocytów poprzez receptory dla kwasu nikotynowego, lecz brak wpływu kwasu nikotynowego w dawce 1 g/kg na poziom trójglicerydów stoi w sprzeczności z tą tezą (**ryc.**

17). W tym kontekście trudne jest wytłumaczenie spadku stężenia TG w grupie myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} traktowanej kwasem nikotynowym w dawce 100 mg/kg.

4. Wpływ egzogenego kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na stężenie pochodnych kwasu nikotynowego w osoczu

U myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} przyjmujących karmę aterogenną i traktowanych kwasem nikotynowym zaobserwowano podwyższony poziom nikotynamidu w osoczu, co może świadczyć o zwiększonej aktywności kompleksu cyklaza ADP-rybozy/glikohydrolaza NAD⁺ (wstęp, podrozdział 2.), a zarazem zahamowaniu enzymów z rodziny PARP i/lub sirtuin, oraz zmniejszeniu na tej drodze intensywności szlaków prozapalnych. Jednak dane uzyskane z tych grup cechują się zbyt dużym rozrzutem, aby można wykazać istotne statystycznie różnice wobec grupy kontrolnej. W grupach traktowanych MNA i perindoprilem nie stwierdzono podwyższonego stężenia nikotynamidu; był on zbliżony do poziomów z grupy kontrolnej na diecie aterogennej i grupy żywionej standardową karmą.

Najwyższy poziom MNA stwierdzono w osoczu grup myszy przyjmujących 1-metylonikotynamid w dawce 1 g/kg. W grupie myszy przyjmujących MNA w dawce 100 mg/kg lub perindopril w dawce 2 mg/kg poziom MNA w osoczu był nieznacznie zwiększony, bez stwierdzenia różnic istotnych statystycznie wobec kontroli. W grupach traktowanych kwasem nikotynowym w dawce 100 mg/kg i 1 g/kg stężenie MNA było znamienne wyższe, co może świadczyć o aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie i koreluje ze zwiększonymi poziomami nikotynamidu w tych grupach, będącego bezpośrednim substratem do syntezy MNA.

Duże różnice między grupą kontrolną a grupami traktowanymi kwasem nikotynowym i MNA stwierdzono w przypadku poziomów 2PY i 4PY, bezpośrednich metabolitów 1-metylonikotynamidu. Podawanie kwasu nikotynowego i MNA w dawce 100 mg/kg wywołało znamienne statystycznie wzrost stężenia 2PY i 4PY, co świadczy o zwiększonej aktywności oksydazy aldehydowej, rozkładającej MNA do 2PY i 4PY. Działanie oksydazy aldehydowej skutkujące zwiększeniem stężenia produktów jej aktywności może tłumaczyć niski poziom 1-metylonikotynamidu w grupie traktowanej MNA w dawce 100 mg/kg i zarazem świadczyć o dużym zapotrzebowaniu na ten związek u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}. Wcześniejsze doniesienia

dotyczące śródbłonkowego i przeciwzapalnego działania MNA wydają się potwierdzać fakt dużego zapotrzebowania na MNA i inne korzystne czynniki wygaszające stan zapalny towarzyszący rozwojowi miażdżycy.

Co zaskakujące, wysokie dawki kwasu nikotynowego i MNA nie wywołały wzrostu stężenia 2PY i 4PY w osoczu. Przeciwnie; w grupie traktowanej kwasem nikotynowym w dawce 1 g/kg stężenia metabolitów MNA były statystycznie znacznie niższe, niż endogenne 2PY i 4PY zmierzone w grupie kontrolnej, natomiast u myszy traktowanych MNA w dawce 1 g/kg poziomy jego metabolitów były zbliżone do wyników stwierdzonych w grupie kontrolnej i niższe, niż w grupie traktowanej perindopilem (**ryc. 28** i **ryc. 29**). Wynika to prawdopodobnie z hamowania enzymów szlaku przemian nikotynamidów przez nadmiar kwasu nikotynowego, nikotynamidu i MNA. Przy długotrwałym podawaniu wysokich dawek kwasu nikotynowego i jego pochodnych może nastąpić spadek aktywności N-metylotransferazy nikotynamidu i oksydazy aldehydowej, które dochodzą do granicy swojej wydajności wobec nadmiaru substratów reakcji katalizowanych przez te enzymy. Z drugiej strony, wysokie dawki kwasu nikotynowego podawane przez dłuższy okres czasu mogą mieć działanie hepatotoksyczne, wpływając niekorzystnie na metabolizm wątroby i ograniczać aktywność wątrobowej N-metylotransferazy [13;20;37;58].

5. Aktywność endogennej N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} i *C57Bl/6J*

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono wzrost aktywności N- metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} przebiegający równolegle do rozwoju progresji blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty. U myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} zmiany miażdżycowe pojawiają się wewnątrz korzenia aorty od 3 miesiąca życia, pole powierzchni blaszek osiąga maksymalną wartość między 6- 8 miesiącem (**ryc. 3**) Porównując z myszami *C57Bl/6J* nie dotkniętymi miażdżycą, aktywność NNMT w u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} była znacznie zwiększona już w drugim miesiącu życia (**ryc. 30**), następnie rosła w grupach 3, 4 i 6- miesięcznych.

We wcześniejszych doniesieniach wzrost aktywności NNMT wykazano w wielu jednostkach chorobowych; min. w chorobie Parkinsona [5;6;111] i wielu liniach komórek

nowotworowych [71;155;160;161], co może sugerować rolę tego enzymu we wzroście, migracji i metastazie guza nowotworowego, sugerowano również udział produktów aktywności NNMT w hepatotoksyczności kwasu nikotynowego [112;146] i podejrzewano je o działanie neurodegeneracyjne [207;208].

Wyniki wcześniejszych badań sugerują powiązanie pomiędzy rozwojem miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*, wzrostem aktywności wątrobowej NNMT (**ryc. 30**) i odpowiadającym mu wzroście stężenia endogennego MNA oraz jego metabolitów 2PY i 4PY (**ryc. 32 -34**) [110]. Inne doniesienie wskazuje na wzrost aktywności NNMT w mysim modelu uszkodzenia wątroby indukowanym konkanawaliną [182]. Biorąc pod uwagę przeciwzapalne właściwości MNA i jego zdolność do aktywacji układu COX/PGI₂ można postawić hipotezę mówiącą, iż endogenny 1- metylonikotynamid powstający z nikotynamidu dzięki aktywności N-metylotransferazy w wątrobie może pełnić rolę mechanizmu kompensacyjnego uruchamianego w stanach zapalnych. Należy również zwrócić uwagę, że NNMT wykazywała wzrost aktywności w mysim modelu miażdżycowym już od 2 miesiąca życia wobec braku widocznych zmian miażdżycowych, jednak przy obecności procesów zapalnych poprzedzających właściwą *atherothrombosis*. U myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* w 2 miesiącu życia zaobserwowano rozwój dysfunkcji śródbłonna i upośledzenie mechanizmów rozkurczu aorty zależnych od tlenu azotu [Canyi G, zgłoszone do druku]. Również analiza struktury wczesnych blaszek miażdżycowych (u myszy 3- miesięcznych) wykazała, że składają się one w większości z komórek CD68- pozytywnych, co wskazuje na aktywację komórek układu immunologicznego we wczesnej fazie rozwoju miażdżycy (**ryc. 4 i ryc. 5**).

Wczesne uruchomienie syntezy endogennego MNA na drodze zależnej od wątrobowej N-metylotransferazy nikotynamidu może stanowić wewnętrzny mechanizm przeciwzapalny i przeciwmiażdżycowy, będący reakcją kompensacyjną ustroju na intensyfikację procesów prowadzących do rozwoju *atherothrombosis*. Na tej samej drodze upośledzona aktywność NNMT może być przyczyną braku [31], lub ograniczonego działania przeciwmiażdżycowego kwasu nikotynowego [216] w mysim modelu *ApoE^{-/-}*.

W bieżących badaniach nie wykazano mechanizmu aktywacji N- metylotransferazy nikotynamidu, jednak wcześniejsze doniesienia wskazują na wzrost aktywności NNMT w odpowiedzi na cytokiny prozapalne takie jak IL-6, co skutkowało wzrostem ekspresji czynnika transkrypcyjnego STAT3 [192]. Czynniki prozapalne uwalniane przez aktywowany śródbłonek lub ścianę naczynia, będące znacznikiem dysfunkcji śródbłonna [54] mogłyby stanowić impuls aktywujący NNMT w wątrobie i wpływający na wzrost syntezy endogennego MNA, mającego działanie przeciwzapalne [110;182].

6. Poziomy endogennego MNA i jego metabolitów w osoczu myszy *C57Bl/6J* i *ApoE/LDLR^{-/-}*

Zgodnie z wynikami przedstawionymi w podrozdziale 5, wskazującymi na stopniowy wzrost aktywności N- metylotransferazy u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*, stwierdzono wzrost stężenia produktu reakcji katalizowanej przez NNMT: endogennego MNA, jego metabolitów 2PY i 4PY, a także endogennego nikotynamidu (ryc. 31 -34). W porównaniu z myszami *C57Bl/6J*, gdzie stężenia nikotynamidu, MNA, 2PY i 4PY były porównywalne niezależnie od wieku myszy, model miażdżycowy charakteryzował się rosnącymi stężeniami endogennych pochodnych kwasu nikotynowego. Porównując grupy myszy *C57Bl/6J* i *ApoE/LDLR^{-/-}*, już w wieku 2 miesięcy stwierdzono znamienne statystycznie wzrost stężenia nikotynamidu, MNA ($p \geq 0,05$; duży rozrzut wyników), 2PY i 4PY w osoczu myszy miażdżycowych, co jest zgodne z wyższą aktywnością NNMT u młodych osobników, jeszcze przed pojawieniem się widocznych blaszek miażdżycowych (ryc. 30). Stężenia nikotynamidu i MNA u myszy miażdżycowych były ponad dwa razy wyższe w porównaniu z modelem dzikim. W grupie 3-miesięcznych myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* poziom endogennego nikotynamidu obniżył się w porównaniu z grupą 2- miesięczną (ryc. 31), równocześnie zwiększyło się stężenie MNA. Świadczy to o wzroście aktywności NNMT w początkowej fazie *atherothrombosis* i wczesnym uruchomieniu procesów przeciwzapalnych poprzez zwiększenie puli endogenego MNA produkowanego z nikotynamidu, co stanowi reakcję ustroju na dysfunkcję śródbłonna naczyniowego rozwijającą się od 2 miesiąca życia. Wzrost stężenia nikotynamidu i MNA był najsilniej zaznaczony w starszych grupach myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*. W grupie 6- miesięcznej był on o jeden rząd wielkości większy w porównaniu z grupą *C57Bl/6J*. Również poziomy metabolitów MNA: 2PY i 4PY były znacznie zwiększone w 6- miesięcznym modelu miażdżycowym, co świadczy o wzroście aktywności oksydazy aldehydowej.

Wnioski

1.) Model przyspieszonej miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* karmionych dietą aterogenną (zawierającą dodatek 5% liofilizatu jaj kurzych) cechuje się szybkim wzrostem pola powierzchni blaszek miażdżycowych, intensywnym rozwojem stanu zapalnego. Opracowany model jest przydatny do badań farmakologii miażdżycy, bowiem pozwala na skrócenie czasu trwania doświadczenia oraz na uzyskanie bardziej powtarzalnego nasilenia zmian miażdżycowych w grupie kontrolnej myszy. Model ten pozwala również na badanie wpływu leków na progresję już istniejącej miażdżycy, co ma istotne znaczenie kliniczne

2.) U myszy *ApoE/LDLR^{-/-}* zarówno w modelu miażdżycy opartym o dietę standardową jak i w opracowanym modelu przyspieszonej miażdżycy MNA wywierał działanie przeciwmiażdżycowe i przeciwzapalne bez większego wpływu na profil lipidowy. Przeciwmiażdżycowe działanie MNA było porównywalne do działania kwasu nikotynowego, co mogłoby sugerować, że za przeciwmiażdżycowe działanie kwasu nikotynowego, które jest również niezależne od jego działania na profil lipidowy, odpowiada jego główny metabolit MNA

3.) W roku rozwoju miażdżycy aktywność N-metylotrasferazy nikotynamidu (NNMT) w wątrobie rośnie, jak również zwiększa się stężenie endogenego MNA i jego dalszych metabolitów (2PY i 4 PY). Biorąc pod uwagę profil farmakologicznego działania MNA, a zwłaszcza wykazane po raz pierwszy w tej pracy jego działanie przeciwmiażdżycowe, można sądzić, że aktywacja endogenego szlaku NNMT - MNA może odgrywać rolę w hamowaniu procesów prozapalnych i prozakrzepowych *atherothrombosis*

Streszczenie

Kwas nikotynowy (NicA, niacyna, wit. PP, wit. B₃) jest lekiem wpływającym korzystnie na lipidy osocza, zwiększającym poziom cholesterolu HDL i obniżającym stężenie LDL. Jego działanie hamuje rozwój miażdżycy i zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia epizodów sercowo- naczyniowych. Poza aktywnością hipolipidemizującą kwas nikotynowy posiada dodatkowe właściwości przeciwzapalne i śródbłonkowe, które są niezależne od jego wpływu na profil lipidowy. Jest prawdopodobne, że za część tej aktywności odpowiada główny metabolit tego związku; 1- metylonikotynamid (MNA), syntetyzowany przez N-metylotransferazę nikotynamidu (NNMT) w wątrobie. Przez długi czas MNA uważano za nieaktywny metabolit swojego prekursora. Badania na modelach zwierzęcych i liniach komórkowych dowiodły przeciwzapalnej, przeciwzakrzepowej, kardioprotekcyjnej, wazoprotekcyjnej, neuroprotekcyjnej, gastroprotekcyjnej i częściowo przeciwcukrzycowej aktywności MNA, prawdopodobnie związanej z aktywacją układu COX-2/PGI₂. Nie zbadano jednak jak dotąd, czy MNA ma działanie przeciwmiażdżycowe, a prace opisujące wpływ kwasu nikotynowego na rozwój doświadczalnej miażdżycy nie są jednoznaczne.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zatem porównanie działania przeciwmiażdżycowego egzogenego kwasu nikotynowego oraz jego głównego metabolitu, MNA w mysim modelu miażdżycy (myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}). Jako związek referencyjny wykorzystano inhibitor ACE (perindopril), który w niskich dawkach wykazuje działanie śródbłonkowe i przeciwmiażdżycowe w innych modelach doświadczalnych miażdżycy.

Drugim celem rozprawy doktorskiej było zbadanie zmian aktywności endogenego szlaku NNMT- MNA w toku rozwoju *atherothrombosis* u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-}. Aby osiągnąć zamierzony cel rozprawy doktorskiej opracowano model przyspieszonego rozwoju miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR*^{-/-} z wykorzystaniem diety aterogennej wzbogaconej w domieszkę 5% liofilizatu żółtek jaj. Porównano działanie przeciwmiażdżycowe i przeciwzapalne kwasu nikotynowego (w dawkach 100 mg/kg i 1 g/kg) i jego głównego metabolitu MNA (100 mg/kg i 1 g/kg) w odniesieniu do działania perindoprilu (inhibitora ACE) podawanego w dawce 2 mg/kg w mysim modelu miażdżycowym *ApoE/LDLR*^{-/-} traktowanym przez okres 2 miesiące (od 4 do 6 miesiąca życia) dietą aterogenną.

Wielkość miażdżycy i towarzyszące jej zapalenie w korzeniu aorty analizowano na podstawie ogólnej powierzchni blaszki miażdżycowej (barwienie czerwienią oleistą),

obecności nacieków makrofagów (barwienie IHC anty- CD68) i aktywności metaloproteinaz (barwienie zymograficzne). Aktywność NNMT badano w homogenatach wątroby metodą fluorymetryczną. Dodatkowo w osoczu mierzono następujące parametry: stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów (metodą spektrofotometryczną), stężenie białka ostrej fazy SAA (metodą ELISA), oraz stężenie metabolitów kwasu nikotynowego (metodą LC/MS/MS).

W tej rozprawie doktorskiej stwierdzono, że:

1). w grupach myszy *ApoE/LDL^{-/-}* traktowanych dietą standardową MNA i perindopril wywierały silne działanie przeciwmiażdżycowe (oceniane na podstawie barwienia czerwienią oleistą, ORO), oraz przeciwzapalne (oceniane na podstawie powierzchni blaszki miażdżycowej zajętej przez komórki CD68).

2). W grupach myszy *ApoE/LDL^{-/-}* przyjmujących karmę aterogenną kwas nikotynowy, MNA i perindopril wywierały wyraźne i porównywalne działanie przeciwmiażdżycowe (oceniane na podstawie barwienia czerwienią oleistą, ORO). Nie stwierdzono dawkozależności działania ani dla kwasu nikotynowego, ani dla MNA. Ponadto wpływ kwasu nikotynowego, MNA i perindoprilu na ilość komórek CD-68 w blaszkach miażdżycowych był niezbyt silnie zaznaczony i nieznamienisty.

3). W grupach myszy *ApoE/LDL^{-/-}* przyjmujących karmę aterogenną kwas nikotynowy, MNA i perindopril wywierały działanie przeciwzapalne i obniżały stężenie SAA, jednak w tym przypadku obserwowano pewną dawkozależność dla kwasu nikotynowego i MNA.

4). Terapia MNA i perindoprilem nie miała wpływu na stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w osoczu myszy *ApoE/LDL^{-/-}* przyjmujących karmę standardową. U myszy *ApoE/LDL^{-/-}* przyjmujących karmę aterogenną nie stwierdzono wpływu MNA, kwasu nikotynowego ani perindoprilu na stężenie cholesterolu całkowitego, natomiast stężenie trójglicerydów było nieznacznie obniżone w grupach myszy traktowanych MNA 1 g/kg i kwasem nikotynowym 100 mg/kg.

5). W osoczu myszy *ApoE/LDL^{-/-}* przyjmujących karmę aterogenną najwyższe stężenie MNA stwierdzono w grupach traktowanych MNA (1 g/kg) i kwasem nikotynowym (100 mg/kg i 1 g/kg). Stężenia 2PY i 4PY były najwyższe w grupach traktowanych MNA i kwasem

nikotynowym w dawce 100 mg/kg, natomiast w grupach przyjmujących kwas nikotynowy i MNA w dawce 1 g/kg stężenia 2PY i 4PY były niższe w porównaniu z grupą kontrolną.

6). W toku rozwoju miażdżycy w osoczu myszy *ApoE/LDL^{-/-}* stwierdzono znacznie podwyższone stężenie endogenego MNA i jego metabolitów w porównaniu z myszami C57Bl/6J; różnice te były wyraźne już u 2 miesięcznych myszy, a szczególnie wyraźnie zaznaczały się w grupach myszy 4 i 6- miesięcznych. W toku rozwoju miażdżycy u myszy *ApoE/LDL^{-/-}* zwiększona była również aktywność NNMT w wątrobie w porównaniu z myszami C57Bl/6J.

Podsumowując; w niniejszej rozprawie doktorskiej opracowano i zcharakteryzowano model przyspieszonej miażdżycy u myszy *ApoE/LDLR^{-/-}*. Wykazano, że zarówno w modelu miażdżycy opartym o dietę standardową, jak i w opracowanym modelu przyspieszonej miażdżycy wywołanej dietą aterogenną MNA wywierał działanie przeciwmiażdżycowe i przeciwzapalne, które było porównywalne do działania kwasu nikotynowego, co mogłoby sugerować, że za przeciwmiażdżycowe działanie kwasu nikotynowego odpowiada jego główny metabolit MNA. Wykazano również, że w toku rozwoju miażdżycy aktywności N-metylotrasferazy nikotynamidu (NNMT) w wątrobie rośnie, jak również zwiększa się stężenie endogenego MNA i jego dalszych metabolitów, takich jak 2PY i 4PY. Biorąc pod uwagę profil farmakologicznego działania MNA, a zwłaszcza wykazane po raz pierwszy w tej pracy jego działanie przeciwmiażdżycowe, można sądzić, że aktywacja endogenego szlaku NNMT - MNA może odgrywać rolę w hamowaniu procesów prozapalnych i prozakrzepowych *atherothrombosis*.

Summary

Nicotinic acid (NicA, niacin, vit. PP, vit. B₃) is HDL raising and LDL lowering hypolipidemic drug. It possesses anti- atherosclerotic properties and reduces the risk of cardiovascular events. Apart from its hypolipidemic action nicotinic acid displays additional anti- inflammatory and endothelial activities, which are independent of its beneficial effect on plasma lipoprotein profile. It is possible, that many of this hypolipidemic- independent actions are connected with nicotinic acid major primary metabolite, 1- methylnicotinamide (MNA), synthesised by nicotinamide N- methyltransferase (NNMT) in liver. MNA was considered for a long time as an inactive metabolite of its precursor. Recent studies on animal models and cell cultures has revealed, that MNA possesses anti- inflammatory, anti- thrombotic, cardioprotective, vasoprotective, neuroprotective, gastroprotective and anti- diabetic properties, probably related to COX-2/PGE₂ activity. It is still unknown if MNA possesses anti- atherosclerotic properties, and previous studies on nicotinic acid and its anti- atherosclerotic effect in animal models was not clear.

The main aim of this doctoral thesis was to compare anti- atherosclerotic activity of exogenous nicotinic acid with its main metabolite, MNA in mouse model of genetically- induced atherosclerosis (*ApoE/LDLR*^{-/-}). ACE inhibitor perindopril was used in small non- hypotensive doses, which displays endothelial and anti- inflammatory properties.

The second aim of this study was to examine the activity of endogenous NNMT- MNA pathway during the progression of *atherothrombosis* in *ApoE/LDLR*^{-/-} mice.

The model of accelerated atherosclerosis was established using atherogenic diet containing 5% of yolk egg lyophilisate. The anti- atherosclerotic and anti- inflammatory action of nicotinic acid (100 mg/kg and 1 g/kg) and its main metabolite MNA (100 mg/kg and 1 g/kg) was compared, *versus* perindopril (2 mg/kg), administered to *ApoE/LDLR*^{-/-} mice fed with atherogenic diet during 2 months, between 4 and 6 month of life.

The progression of atherosclerotic lesions and inflammation in aortic arch were analyzed using Oil Red O (ORO) staining for plaque lipids, immunohistochemical staining for macrophage content (IHC anti-CD68) and zymographic staining for metalloproteinase (MMP) activity. NNMT activity (fluorometry) was estimated in liver homogenates from *ApoE/LDLR*^{-/-} and *C57Bl/6J* mice. Additionally, concentrations of total cholesterol/triglycerides, SAA and nicotinic acid derivatives (nicotinamide, MNA, 2PY and 4PY) were measured in plasma.

The following results were obtained:

- 1). In *ApoE/LDLR*^{-/-} mice fed a standard diet and treated with MNA and perindopril the mean area of atherosclerotic plaques (analyzed by ORO staining) and macrophage content (IHC anti- CD68 staining) were significantly reduced.
- 2). In *ApoE/LDLR*^{-/-} mice fed an atherogenic diet nicotinic acid, MNA and perindopril displayed comparable and dose- independent anti- atherosclerotic properties, measured as a reduction of ORO stained plaque area. Nicotinic acid, MNA and perindopril had no significant effect on quantity of CD68- positive cells in lesion area.
- 3). In mice *ApoE/LDLR*^{-/-} fed an atherogenic diet nicotinic acid, MNA and perindopril displayed partially dose- dependent anti- inflammatory action by lowering SAA concentration in plasma.
- 4). MNA and perindopril treatment had no effect on total cholesterol/triglyceride concentration in plasma taken from *ApoE/LDLR*^{-/-} mice fed a standard diet. In *ApoE/LDLR*^{-/-} mice fed an atherogenic diet MNA, nicotinic acid and perindopril had no effect on total cholesterol concentration, but lower concentrations of triglycerides were observed in MNA (1 g/kg) and NicA (100 mg/kg) treated groups.
- 5). The highest concentration of MNA was observed in MNA (1 g/kg) and NicA (100 mg/kg and 1 g/kg) treated groups of *ApoE/LDLR*^{-/-} mice fed an atherogenic diet. The highest concentrations of 2PY and 4PY were observed in MNA (100 mg/kg) and NicA (100 mg/kg) treated groups. In MNA (1 g/kg) and NicA (1 g/kg) treated groups the concentrations of 2PY/4PY were significantly lower, comparing with control group.
- 6). During atherothrombotic progression in *ApoE/LDLR*^{-/-} mice the elevated concentration of endogenous MNA was observed in comparison with *C57Bl/6J* mice, the difference was significant even in 2 month old groups, and evident in 4- 6 month old groups of mice. According to this results, the activity of NNMT in liver was also increased in *ApoE/LDLR*^{-/-} mice compared with healthy *C57Bl/6J* mice.

Summarizing, in this doctoral thesis the mouse model of accelerated atherosclerosis using *ApoE/LDLR^{-/-}* mice fed an atherogenic diet were established. The presented studies revealed the anti- atherosclerotic and anti- inflammatory activity of MNA in this model, comparable with nicotinic acid anti- atherosclerotic properties. This results may suggest MNA- dependent mechanisms of anti- atheroclerotic action of nicotinic acid. High levels of endogenous MNA and its metabolites 2PY/4PY observed simultaneously with increased NNMT activity during atherosclerotic progression suggest, that NNMT- MNA pathway may have a regulatory role in atherosclerosis.

Wykaz stosowanych skrótów

ABC: białko transportowe zależne od ATP (*ATP-binding cassette transporter*)

ABCA₁: białko transportowe zależne od ATP typu A₁

ABCG₁: białko transportowe zależne od ATP typu G₁

ABCG₄: białko transportowe zależne od ATP typu G₄

ac-CoA: **acetylo- koenzym A**ACE: konwertaza angiotensyny (*angiotensin converting enzyme*)

ACE-I: inhibitory konwertazy angiotensyny (*angiotensin converting enzyme inhibitors*)

ADP: adenzynodifosforan

ADPS: sól sodowa adenzynodifosforanu (*adenosine 5-diphosphate sodium salt*)

Akt: kinaza serynowo- treoninowa typu B (*protein kinase B*)

AldOX: oksydaza aldehydowa (*aldehyde oxidase*)

AlAT: **aminotransferaza alaninowa** (*glutamic pyruvic transferase*)

AMCA: acetylo- amino- metylokumaryna, znacznik fluorescencyjny (*aminomethylcoumarin acetate*)

AP-1: czynnik transkrypcyjny 1 (*activator protein 1*)

ApoAI: apolipoproteina AI (*apolipoprotein AI*)

ApoB: apolipoproteina B (*apolipoprotein B*)

ApoE: apolipoproteina E (*apolipoprotein E*)

ApoE/LDLR^{-/-}: myszy model miażdżycowy stworzony na bazie szczepu C57/Bl/6J, posiadający nieaktywne geny kodujące apolipoproteinę E i receptor dla cząsteczek LDL (*C57bl/6J ApoE/LDLR^{-/-} 'double knockout' atherosclerotic mouse model*)

AspAT: **aminotransferaza asparaginowa** (*glutamic oxaloacetic transaminase*)

ATP: adenzynotrójfosforan

cADPR: cykliczna ADP- ryboza (*cyclic ADP- ribose*)

CD68: znacznik makrofagów, glikoproteina łącząca się z cząsteczkami LDL (*cluster of differentiation 68*)

CD38: hydrolaza cyklicznej ADP- rybozy, obecna na powierzchni komórek układu immunologicznego, znacznik komórek białaczkowych (*cluster of differentiation 38*)

CE: estry cholesterolu (*cholesteryl esters*)

CETP: białko transportujące estry cholesterolu (*cholesteryl ester transport protein*)

CL: cholesterol

CoA: koenzym A

chow: standardowa dieta stosowana w chowie myszy laboratoryjnych

COX-1: cyklooksygenaza typu 1 (*cyclooxygenase 1*)

COX-2: cyklooksygenaza typu 2 (*cyclooxygenase 2*)

C57Bl/6J: szczep myszy wykorzystywany najpowszechniej w badaniach ekperymentalnych, na bazie którego stworzono model genetycznie indukowanej hipercholesterolemii

Cy3: fluorescencyjny barwnik cyjaninowy (*indocarbocyanine*)

CXCR2: receptor typu 2 dla chemokin z grupy CXC (zawierających sekwencję Glu- Leu- Arg)

4-MNA: 4- metylonikotynamid (*4-methylnicotinamide*)

4PY: N1-metylo-4-pirydono-5-karboksamid

2PY: N1-metylo-2-pyridono-5-karboksamid

DGAT₂: acetylotransferaza 2 diacyloglicerolu (*diacylglycerol-O-acyltransferase 2*)

DNA: kwas deoksyrybonukleinowy (*deoxyribonucleic acid*)

ECM: macierz międzykomórkowa (*extracellular matrix*)

ELISA: test immunoenzymatyczny (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

ESI: jonizacja przy pomocy elektrorozpylania (*electrospray ionisation*)

ER- niacin: niacyna o przedłużonym uwalnianiu (*extended- release niacin*)

FGF: czynnik wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor*)

FKHRL1: proapoptotyczny czynnik transkrypcyjny FKHRL1 (*forkhead homolog rhabdomyosarcoma like 1*)

FITC: izotiocyanian fluoresceiny, barwnik fluorescencyjny (*fluorescein isothiocyanate*)

GSPx: selenozależna peroksydaza glutationu (*glutathione selenoperoxidase*)

GPR109_A: receptor kwasu nikotynowego o wysokim powinowactwie, sprzężony z białkiem G (*G protein-coupled receptor 109_A*)

GPR109_B: receptor kwasu nikotynowego o niskim powinowactwie, sprzężony z białkiem G (*G protein-coupled receptor 109_B*)

GPR81: receptor kwasu nikotynowego o niskim powinowactwie, sprzężony z białkiem G (*G protein-coupled receptor 81*)

GRO α : wzrostowy czynnik onkogenny alfa (*growth- related oncogene α*)

HDL: lipoproteiny wysokiej gęstości (*high density lipoproteins*)

HDL-ApoAI: funkcjonalne czasteczki HDL, posiadające prawidłowy kompleks ApoAI

HDL-SAA: dysfunkcjonalne cząsteczki HDL, z których kompleks ApoAI został wyparty przez białko ostrej fazy SAA

HGF: czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor*)

HL- 60: linia ludzkich komórek białaczki (*human leukemia cell line 60*)

HM74A: ludzki receptor GPR109_A

HM74: ludzki receptor GPR109_B

HPLC: wysokosprawna chromatografia cieczowa (*high performance liquid chromatography*)

HSL: lipaza zależna od hormonów (*hormone-sensitive lipase*)

ICAM-1: międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna typu 1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*)

IDL: lipoproteiny pośredniej gęstości (*intermediate density lipoproteins*)

IFN γ : interferon gamma

IGF: insulinopodobny czynnik wzrostu (*insulin-like growth factor*)

IHC: immunohistochemiczne metody barwienia preparatów mikroskopowych (*immunohistochemistry*)

IL-1: interleukina 1

IL-1 β : interleukina 1 β

IL-6: interleukina 6

IL-8: interleukina 8

iNOS: indukowalna forma syntazy tlenku azotu (*inducible nitric oxide synthase*)

IP: receptor dla prostacykliny

IR- niacin: niacyna uwalniana natychmiastowo (*immediate-release niacin*)

1,4-DMN: 1,4- dimetylonikotynamid (*1,4-dimethylnicotinamide*)

LCAT: acylotransferaza lecytyna- cholesterol (*lecitin/cholesterol acyltransferase*)

LC-ESI/MS/MS: chromatografia cieczowa (*liquid chromatography*) w połączeniu ze spektrometrią mas (*mass spectrometry*) z wykorzystaniem techniki elektrorozpylania (*electrospray ionisation*)

LC/MS: chromatografia cieczowa (*liquid chromatography*) w połączeniu ze spektrometrią mas (*mass spectrometry*)

LC/MS/MS: chromatografia cieczowa (*liquid chromatography*) w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (*mass spectrometry*)

LDL: lipoproteiny niskiej gęstości (*low density lipoproteins*)

liof. 5%: aterogenna dieta dla gryzoni zawierająca 5% domieszki liofilizatu z żółtek kurzych

LPL: lipaza lipoproteinowa (*lipoprotein lipase*)

LPS: bakteryjny lipopolisacharyd

MCP-1: białko chemotaktyczne monocytów typu 1 (*monocyte chemoattractant protein 1*)

MHC II: główny układ zgodności tkankowej typu II (*major histocompatibility complex II*)

MK-6892: agonista receptorów kwasu nikotynowego GPR109_A

MK-0354: częściowy agonista receptorów GPR109_A

MNNG: nitrozoguanidyna (*N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine*)

MMP : metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (*matrix metalloproteinases*)

MMP-2: metaloproteinaza typu 2

MMP-9: metaloproteinaza typu 9

MNA: 1- metylonikotynamid (*N-methylnicotinamide*)

MRI: obrazowanie rezonansu magnetycznego (*magnetic resonance imaging*)

MS: spektrometria mas (*mass spectrometry*)

NA: nikotynamid (*nicotinamide*)

NAD⁺: dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (*nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADP: fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NF-κB: jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NFPA: kwas nonafluoropentanowy (*nonafluoropentanoic acid*)

NicA: kwas nikotynowy (*nicotinic acid*)

NNMT: N- metylotransferaza nikotynamidu (*nicotinamide N-methyltransferase*)

NNO: N- tlenek nikotynamidu (*nicotinamide N- oxide*)

NO: tlenek azotu (*nitric oxide*)

NUA: kwas nikotynurynowy (*nicotinurinic acid*)

OCT: medium do zamrażania tkanek (*optimal freezing compound*)

oxLDL: utleniona forma lipoprotein małej gęstości (*oxidized low density lipoproteins*)

PAI-1: inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (*plasminogen activator inhibitor-1*)

PAF-AH: acetylohydrolaza inhibitora aktywatora plazminogenu (*platelet activating factor acetylhydrolase*)

PARP: polimeraza poli(ADP)rybozy (*poly [ADP-ribose] polymerase*)

PARP-1: polimeraza poli(ADP)rybozy typu 1 (*poly [ADP-ribose] polymerase 1*)

PBS: zbuforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej (*phosphate buffer saline*)

Per: perindopril

PGE₂: prostaglandyna E₂

PGD₂: prostaglandyna D₂

PGI₂: prostacyklina

PHA: fitohemaglutynina

5HT: serotonina (*5-hydroxytryptamine*)

PIPES: bufor kwasu 1,4-piperazodietanosulfonowego

PON-1: paroksonaza 1 (*paraoxonase 1*)

PUMA- G: białko makrofagów o podwyższonej ekspresji wywołanej interferonem gamma; mysi ekwiwalent receptora GPR109_A (*protein upregulated in macrophages by interferon-gamma*)

RANTES: chemokina działająca poprzez aktywację limfocytów T i wydzielana przez nie (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*)

RO 3244794: specyficzny antagonist receptoru protacyklinowego

SAA: amyloidowe białko ostrej fazy typu A (*serum amyloid A*)

SAA₁: podtyp 1 białka ostrej fazy SAA

SAA₂: podtyp 2 białka ostrej fazy SAA

SAA₄: podtyp 4 białka ostrej fazy SAA

SAM: **S**- adenozyłmetionina

SAH: **S**- adenozyłhomocysteina

SD: odchylenie standardowe (*standard deviation*)

Sirt2: sirtuiny, deacetylazy zależne od NAD⁺

SIM: tryb wykrywania pojedynczych kationów, stosowany w metodzie LC/MS (*positive single ion monitoring*)

S1P: sfingozyno-1-fosforan (*sphingosine-1-phosphate*)

SMA: α-aktyna mięśni gładkich (*smooth muscle actin*)

SR-BI: receptor zmiatający typu B1 (*scavenger receptor type BI*)

SRM: system monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów wystandaryzowany dla tandemowej spektrometrii mas w metodzie LC/MS/MS (*selected reaction monitoring mode*)

SR- niacin: niacyna o opóźnionym uwalnianiu (*sustained-release niacin*)

STAT3: transducer sygnału i aktywator transkrypcji typu 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)

6-keto-PGF1α: 6- keto- prostaglandyna 1Fα, stabilny metabolit PGI₂

6- HNA: 6- hydroksynikotynamid (*6-hydroxynicotinamide*)

TG: trójglicerydy (*triglycerides*)

TGFβ: transformujący czynnik wzrostu beta (*transforming growth factor beta*)

TIMP: tkankowy inhibitor metaloproteinaz (*tissue inhibitor of metalloproteinases*)
TNF α : czynnik matrycy nowotworów typu alfa (*tumor necrosis factor alpha*)
totCL: cholesterol całkowity (*total cholesterol*)
Tris-HCl: roztwór tris-hydrokymetylo-aminometanu zbuforowany chlorowodem
(*tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered with hydrochloric acid*)
UI: jednostka międzynarodowa, obrazująca aktywność biologiczną (*international unit*)
UV: promieniowanie ultrafioletowe (*ultraviolet radiation*)
VCAM-1: naczyniowa cząsteczka adhezyjna typu 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)
VLDL: lipoproteiny bardzo małej gęstości (*very low density lipoproteins*)

Bibliografia

- 1 Abdallah,D.M. (2010) Nicotinamide alleviates indomethacin-induced gastric ulcers: a novel antiulcer agent. *Eur.J.Pharmacol.*, **627**, 276-280.
- 2 Accinni,R., Rosina,M., Bamonti,F., Della,N.C., Tonini,A., Bernacchi,F., Campolo,J., Caruso,R., Novembrino,C., Ghersi,L., Lonati,S., Grossi,S., Ippolito,S., Lorenzano,E., Ciani,A. and Gorini,M. (2006) Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. *Nutr.Metab Cardiovasc.Dis.*, **16**, 121-127.
- 3 Adaikalakoteswari,A., Rema,M., Mohan,V. and Balasubramanyam,M. (2007) Oxidative DNA damage and augmentation of poly(ADP-ribose) polymerase/nuclear factor-kappa B signaling in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **39**, 1673-1684.
- 4 Aksoy,S., Szumlanski,C.L. and Weinshilboum,R.M. (1994) Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *J.Biol.Chem.*, **269**, 14835-14840.
- 5 Aoyama,K., Matsubara,K., Kondo,M., Murakawa,Y., Suno,M., Yamashita,K., Yamaguchi,S. and Kobayashi,S. (2001) Nicotinamide-N-methyltransferase is higher in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.*, **298**, 78-80.
- 6 Aoyama,K., Matsubara,K., Okada,K., Fukushima,S., Shimizu,K., Yamaguchi,S., Uezono,T., Satomi,M., Hayase,N., Ohta,S., Shiono,H. and Kobayashi,S. (2000) N-methylation ability for azaheterocyclic amines is higher in Parkinson's disease: nicotinamide loading test. *J.Neural Transm.*, **107**, 985-995.
- 7 Avalos,J.L., Bever,K.M. and Wolberger,C. (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol.Cell*, **17**, 855-868.
- 8 Avalos,J.L., Celic,I., Muhammad,S., Cosgrove,M.S., Boeke,J.D. and Wolberger,C. (2002) Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol.Cell*, **10**, 523-535.
- 9 Badolato,R., Wang,J.M., Murphy,W.J., Lloyd,A.R., Michiel,D.F., Bausserman,L.L., Kelvin,D.J. and Oppenheim,J.J. (1994) Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.*, **180**, 203-209.
- 10 Bartus,M., Lomnicka,M., Kostogrysz,R.B., Kazmierczak,P., Watala,C., Slominska,E.M., Smolenski,R.T., Pisulewski,P.M., Adamus,J., Gebicki,J. and Chlopicki,S. (2008) 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol.Rep.*, **60**, 127-138.
- 11 Benyo,Z., Gille,A., Bennett,C.L., Clausen,B.E. and Offermanns,S. (2006) Nicotinic acid-induced flushing is mediated by activation of epidermal langerhans cells. *Mol.Pharmacol.*, **70**, 1844-1849.

- 12 Benyo,Z., Gille,A., Kero,J., Csiky,M., Suchankova,M.C., Nusing,R.M., Moers,A., Pfeffer,K. and Offermanns,S. (2005) GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing. *J.Clin.Invest.*, **115**, 3634-3640.
- 13 Bhardwaj,S.S. and Chalasani,N. (2007) Lipid-lowering agents that cause drug-induced hepatotoxicity. *Clin.Liver Dis.*, **11**, 597-613, vii.
- 14 Biedron,R., Ciszek,M., Tokarczyk,M., Bobek,M., Kurnyta,M., Slominska,E.M., Smolenski,R.T. and Marcinkiewicz,J. (2008) 1-Methylnicotinamide and nicotinamide: two related anti-inflammatory agents that differentially affect the functions of activated macrophages. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)*, **56**, 127-134.
- 15 Boatman,P.D., Richman,J.G. and Semple,G. (2008) Nicotinic acid receptor agonists. *J.Med.Chem.*, **51**, 7653-7662.
- 16 Boatman,P.D., Schrader,T.O., Kasem,M., Johnson,B.R., Skinner,P.J., Jung,J.K., Xu,J., Cherrier,M.C., Webb,P.J., Semple,G., Sage,C.R., Knudsen,J., Chen,R., Taggart,A.K., Carballo-Jane,E. and Richman,J.G. (2010) Potent tricyclic pyrazole tetrazole agonists of the nicotinic acid receptor (GPR109a). *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **20**, 2797-2800.
- 17 Bryniarski,K., Biedron,R., Jakubowski,A., Chlopicki,S. and Marcinkiewicz,J. (2008) Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin. *Eur.J.Pharmacol.*, **578**, 332-338.
- 18 Brzozowski,T., Konturek,P.C., Chlopicki,S., Sliwowski,Z., Pawlik,M., Ptak-Belowska,A., Kwiecien,S., Drozdowicz,D., Pajdo,R., Slonimska,E., Konturek,S.J. and Pawlik,W.W. (2008) Therapeutic potential of 1-methylnicotinamide against acute gastric lesions induced by stress: role of endogenous prostacyclin and sensory nerves. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **326**, 105-116.
- 19 Bunting,J.W., Laderoute,K.R. and Norris,D.J. (1980) The pH dependence of xanthine oxidase catalysis in basic solution. *Can.J.Biochem.*, **58**, 394-398.
- 20 Capuzzi,D.M., Guyton,J.R., Morgan,J.M., Goldberg,A.C., Kreisberg,R.A., Brusco,O.A. and Brody,J. (1998) Efficacy and safety of an extended-release niacin (Niaspan): a long-term study. *Am.J.Cardiol.*, **82**, 74U-81U.
- 21 Carlson,L.A. (2005) Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J.Intern.Med.*, **258**, 94-114.
- 22 Carlson,L.A., Froberg,S. and Oro,L. (1972) A case of massive hypertriglyceridemia corrected by nicotinic acid or nicotinamide therapy. *Atherosclerosis*, **16**, 359-368.
- 23 Carlson,L.A. and Oro,L. (1973) Effect of treatment with nicotinic acid for one month on serum lipids in patients with different types of hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, **18**, 1-9.

- 24 Carlson,L.A. and Oro,L. (1962) The effect of nicotinic acid on the plasma free fatty acid; demonstration of a metabolic type of sympathicolysis. *Acta Med.Scand.*, **172**, 641-645.
- 25 Chlopicki,S. and Gryglewski,R.J. (2005) Angiotensin converting enzyme (ACE) and HydroxyMethylGlutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors in the forefront of pharmacology of endothelium. *Pharmacol.Rep.*, **57 Suppl**, 86-96.
- 26 Chlopicki,S., Swies,J., Mogielnicki,A., Buczko,W., Bartus,M., Lomnicka,M., Adamus,J. and Gebicki,J. (2007) 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. *Br.J.Pharmacol.*, **152**, 230-239.
- 27 Choi,S., Yoon,H., Oh,K.S., Oh,Y.T., Kim,Y.I., Kang,I. and Youn,J.H. (2010) Widespread effects of nicotinic acid on gene expression in insulin-sensitive tissues: implications for unwanted effects of nicotinic acid treatment. *Metabolism*.
- 28 Csiszar,A., Labinsky,N., Podlutzky,A., Kaminski,P.M., Wolin,M.S., Zhang,C., Mukhopadhyay,P., Pacher,P., Hu,F., de,C.R., Ballabh,P. and Ungvari,Z. (2008) Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol*, **294**, H2721-H2735.
- 29 Cuomo,R., Dattilo,M., Pumpo,R., Capuano,G., Boselli,L. and Budillon,G. (1994) Nicotinamide methylation in patients with cirrhosis. *J.Hepatol.*, **20**, 138-142.
- 30 Cutshall,N.S., Ursino,R., Kucera,K.A., Latham,J. and Ihle,N.C. (2001) Nicotinamide N-oxides as CXCR2 antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **11**, 1951-1954.
- 31 Declercq,V., Yeganeh,B., Moshtaghi-Kashanian,G.R., Khademi,H., Bahadori,B. and Moghadasian,M.H. (2005) Paradoxical effects of fenofibrate and nicotinic acid in apo E-deficient mice. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **46**, 18-24.
- 32 Digby,J.E., McNeill,E., Dyar,O.J., Lam,V., Greaves,D.R. and Choudhury,R.P. (2010) Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in adipocytes demonstrated by suppression of fractalkine, RANTES, and MCP-1 and upregulation of adiponectin. *Atherosclerosis*, **209**, 89-95.
- 33 Dragun,P., Makarewicz,D., Wojcik,L., Ziemka-Nalecz,M., Slomka,M. and Zalewska,T. (2008) Matrix metaloproteinases activity during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. The effect of 1-methylnicotinamide (MNA). *J.Physiol Pharmacol.*, **59**, 441-455.
- 34 Drew,B.G., Fidge,N.H., Gallon-Beaumier,G., Kemp,B.E. and Kingwell,B.A. (2004) High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101**, 6999-7004.

- 35 Ehrlich,W., Huser,H. and Kroger,H. (1995) Inhibition of the induction of collagenase by interleukin-1 beta in cultured rabbit synovial fibroblasts after treatment with the poly(ADP-ribose)-polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Rheumatol.Int.*, **15**, 171-172.
- 36 Elhage,R., Jawien,J., Rudling,M., Ljunggren,H.G., Takeda,K., Akira,S., Bayard,F. and Hansson,G.K. (2003) Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc.Res.*, **59**, 234-240.
- 37 Etchason,J.A., Miller,T.D., Squires,R.W., Allison,T.G., Gau,G.T., Marttila,J.K. and Kottke,B.A. (1991) Niacin-induced hepatitis: a potential side effect with low-dose time-release niacin. *Mayo Clin.Proc.*, **66**, 23-28.
- 38 Franczyk-Zarow,M., Kostogrys,R.B., Szymczyk,B., Jawien,J., Gajda,M., Cichocki,T., Wojnar,L., Chlopicki,S. and Pisulewski,P.M. (2008) Functional effects of eggs, naturally enriched with conjugated linoleic acid, on the blood lipid profile, development of atherosclerosis and composition of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor double-knockout mice (apoE/LDLR^{-/-}). *Br.J.Nutr.*, **99**, 49-58.
- 39 French,J.B., Cen,Y., Vrablik,T.L., Xu,P., Allen,E., Hanna-Rose,W. and Sauve,A.A. (2010) Characterization of nicotinamidases: steady state kinetic parameters, classwide inhibition by nicotinaldehydes, and catalytic mechanism. *Biochemistry*, **49**, 10421-10439.
- 40 Fukuwatari,T., Wada,H., Sasaki,R. and Shibata,K. (2004) Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide N-oxide and nicotinuric acid by rats. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **68**, 44-50.
- 41 Gajda,M., Jawien,J., Mateuszuk,L., Lis,G.J., Radziszewski,A., Chlopicki,S. and Litwin,J.A. (2008) Triple immunofluorescence labeling of atherosclerotic plaque components in apoE/LDLR^{-/-} mice. *Folia Histochem.Cytobiol.*, **46**, 143-146.
- 42 Gale,E.A., Bingley,P.J., Emmett,C.L. and Collier,T. (2004) European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet*, **363**, 925-931.
- 43 Ganji,S.H., Kamanna,V.S. and Kashyap,M.L. (2003) Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (review). *J.Nutr.Biochem.*, **14**, 298-305.
- 44 Ganji,S.H., Qin,S., Zhang,L., Kamanna,V.S. and Kashyap,M.L. (2009) Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, **202**, 68-75.
- 45 Ganji,S.H., Tavintharan,S., Zhu,D., Xing,Y., Kamanna,V.S. and Kashyap,M.L. (2004) Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *J.Lipid Res.*, **45**, 1835-1845.

- 46 Gebicki,J., Sysa-Jedrzejowska,A., Adamus,J., Wozniacka,A., Rybak,M. and Zielonka,J. (2003) 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin. *Pol.J.Pharmacol.*, **55**, 109-112.
- 47 Gero,D. and Szabo,C. (2008) Poly(ADP-ribose) polymerase: a new therapeutic target? *Curr.Opin.Anaesthesiol.*, **21**, 111-121.
- 48 Grodzinska,L., Basista,M., Kedzior,A., Korbut,R., Kostka-Trabka,E. and Gryglewski,R. (1983) Fibrinolytic activity and the effects of beta-pyridylcarbinol (Ronicol) in patients with arteriosclerosis obliterans. *Thromb.Haemost.*, **50**, 797-799.
- 49 Gryglewski,R.J., Chlopicki,S. and Swies,J. (2005) In vivo endothelial interaction between ACE and COX inhibitors. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, **72**, 129-131.
- 50 Gryglewski,R.J., Swies,J., Uracz,W., Chlopicki,S. and Marcinkiewicz,E. (2003) Mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor induced thrombolysis in Wistar rats. *Thromb.Res.*, **110**, 323-329.
- 51 Gryglewski,R.J., Uracz,W., Chlopicki,S. and Marcinkiewicz,E. (2002) Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function. *Pediatr.Pathol.Mol.Med.*, **21**, 279-290.
- 52 Hageman,G.J., Larik,I., Pennings,H.J., Haenen,G.R., Wouters,E.F. and Bast,A. (2003) Systemic poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, chronic inflammation, and oxidative stress in COPD patients. *Free Radic.Biol.Med.*, **35**, 140-148.
- 53 Hageman,G.J. and Stierum,R.H. (2001) Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutat.Res.*, **475**, 45-56.
- 54 Hansson,G.K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N.Engl.J.Med.*, **352**, 1685-1695.
- 55 Hansson,G.K. and Libby,P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat.Rev.Immunol.*, **6**, 508-519.
- 56 Hassa,P.O., Buerki,C., Lombardi,C., Imhof,R. and Hottiger,M.O. (2003) Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J.Biol.Chem.*, **278**, 45145-45153.
- 57 Hegyi,J., Schwartz,R.A. and Hegyi,V. (2004) Pellagra: dermatitis, dementia, and diarrhea. *Int.J.Dermatol.*, **43**, 1-5.
- 58 Henderson,L.M. (1983) Niacin. *Annu.Rev.Nutr.*, **3**, 289-307.
- 59 Hiromatsu,Y., Sato,M., Tanaka,K., Ishisaka,N., Kamachi,J. and Nonaka,K. (1993) Inhibitory effects of nicotinamide on intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured human thyroid cells. *Immunology*, **80**, 330-332.

- 60 Hiromatsu, Y., Sato, M., Yamada, K. and Nonaka, K. (1992) Inhibitory effects of nicotinamide on recombinant human interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and HLA-DR antigen expression on cultured human endothelial cells. *Immunol.Lett.*, **31**, 35-39.
- 61 Hiromatsu, Y., Sato, M., Yamada, K. and Nonaka, K. (1992) Nicotinamide and 3-aminobenzamide inhibit recombinant human interferon-gamma-induced HLA-DR antigen expression, but not HLA-A, B, C antigen expression, on cultured human thyroid cells. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **36**, 91-95.
- 62 Hu, Y., Ren, Y., Luo, R.Z., Mao, X., Li, X., Cao, X., Guan, L., Chen, X., Li, J., Long, Y., Zhang, X. and Tian, H. (2007) Novel mutations of the lipoprotein lipase gene associated with hypertriglyceridemia in members of type 2 diabetic pedigrees. *J.Lipid Res.*, **48**, 1681-1688.
- 63 Ida, C., Ogata, S., Okumura, K. and Taguchi, H. (2008) Changes in the gene expression of C-myc and CD38 in HL-60 cells during differentiation induced by nicotinic acid-related compounds. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **72**, 868-871.
- 64 Iejewski-Lenoir, D., Richman, J.G., Hakak, Y., Gaidarov, I., Behan, D.P. and Connolly, D.T. (2006) Langerhans cells release prostaglandin D2 in response to nicotinic acid. *J.Invest Dermatol.*, **126**, 2637-2646.
- 65 Imbriglio, J.E., Chang, S., Liang, R., Raghavan, S., Schmidt, D., Smenton, A., Tria, S., Schrader, T.O., Jung, J.K., Esser, C., Holt, T.G., Wolff, M.S., Taggart, A.K., Cheng, K., Carballo-Jane, E., Waters, M.G., Tata, J.R. and Colletti, S.L. (2010) GPR109a agonists. Part 2: pyrazole-acids as agonists of the human orphan G-protein coupled receptor GPR109a. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **20**, 4472-4474.
- 66 Imbriglio, J.E., Chang, S., Liang, R., Raghavan, S., Schmidt, D., Smenton, A., Tria, S., Schrader, T.O., Jung, J.K., Esser, C., Taggart, A.K., Cheng, K., Carballo-Jane, E., Gerard, W.M., Tata, J.R. and Colletti, S.L. (2009) GPR109a agonists. Part 1: 5-Alkyl and 5-aryl-pyrazole-tetrazoles as agonists of the human orphan G-protein coupled receptor GPR109a. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **19**, 2121-2124.
- 67 Inamadugu, J.K., Damaramadugu, R., Mullangi, R. and Ponneri, V. (2010) Simultaneous determination of niacin and its metabolites--nicotinamide, nicotinuric acid and N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide--in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Biomed.Chromatogr.*, **24**, 1059-1074.
- 68 Iwata, K., Ogata, S., Okumura, K. and Taguchi, H. (2003) Expression of CD38 in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line during differentiation by niacin-related compounds. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **67**, 1836-1839.
- 69 Iwata, K., Ogata, S., Okumura, K. and Taguchi, H. (2003) Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line by niacin-related compounds. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **67**, 1132-1135.

- 70 Jackson,T.M., Rawling,J.M., Roebuck,B.D. and Kirkland,J.B. (1995) Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD⁺ and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats. *J.Nutr.*, **125**, 1455-1461.
- 71 Jang,J.S., Cho,H.Y., Lee,Y.J., Ha,W.S. and Kim,H.W. (2004) The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol.Res.*, **14**, 491-499.
- 72 Jawien,J., Nastalek,P. and Korbut,R. (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J.Physiol Pharmacol.*, **55**, 503-517.
- 73 Jirkovsky,I. and Cayen,M.N. (1982) Hypolipidemic 4,5-dihydro-4-oxo-5,5-disubstituted-2-furancarboxylic acids. *J.Med.Chem.*, **25**, 1154-1156.
- 74 Jung,D.Y., Park,J.B., Joo,S.Y., Joh,J.W., Kwon,C.H., Kwon,G.Y. and Kim,S.J. (2009) Effect of nicotinamide on early graft failure following intraportal islet transplantation. *Exp.Mol.Med.*, **41**, 782-792.
- 75 Kamanna,V.S., Ganji,S.H. and Kashyap,M.L. (2009) The mechanism and mitigation of niacin-induced flushing. *Int.J.Clin.Pract.*, **63**, 1369-1377.
- 76 Kassem,H.S., Sangar,V., Cowan,R., Clarke,N. and Margison,G.P. (2002) A potential role of heat shock proteins and nicotinamide N-methyl transferase in predicting response to radiation in bladder cancer. *Int.J.Cancer*, **101**, 454-460.
- 77 Katsuda,S. and Kaji,T. (2003) Atherosclerosis and extracellular matrix. *J.Atheroscler.Thromb.*, **10**, 267-274.
- 78 Khovidhunkit,W., Duchateau,P.N., Medzihradzsky,K.F., Moser,A.H., Naya-Vigne,J., Shigenaga,J.K., Kane,J.P., Grunfeld,C. and Feingold,K.R. (2004) Apolipoproteins A-IV and A-V are acute-phase proteins in mouse HDL. *Atherosclerosis*, **176**, 37-44.
- 79 Kim,J., Hong,S.J., Lim,E.K., Yu,Y.S., Kim,S.W., Roh,J.H., Do,I.G., Joh,J.W. and Kim,D.S. (2009) Expression of nicotinamide N-methyltransferase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *J.Exp.Clin.Cancer Res.*, **28**, 20.
- 80 Kim,S.H., Engelhardt,J.I., Henkel,J.S., Siklos,L., Soos,J., Goodman,C. and Appel,S.H. (2004) Widespread increased expression of the DNA repair enzyme PARP in brain in ALS. *Neurology*, **62**, 319-322.
- 81 Kim,S.H., Henkel,J.S., Beers,D.R., Sengun,I.S., Simpson,E.P., Goodman,J.C., Engelhardt,J.I., Siklos,L. and Appel,S.H. (2003) PARP expression is increased in astrocytes but decreased in motor neurons in the spinal cord of sporadic ALS patients. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, **62**, 88-103.
- 82 Kirkland,J.B. (2009) Niacin status impacts chromatin structure. *J.Nutr.*, **139**, 2397-2401.
- 83 Kirkland,J.B. (2009) Niacin status, NAD distribution and ADP-ribose metabolism. *Curr.Pharm.Des.*, **15**, 3-11.

- 84 Kitamura,S., Nitta,K., Tayama,Y., Tanoue,C., Sugihara,K., Inoue,T., Horie,T. and Ohta,S. (2008) Aldehyde oxidase-catalyzed metabolism of N1-methylnicotinamide in vivo and in vitro in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos.*, **36**, 1202-1205.
- 85 Klaidman,L., Morales,M., Kem,S., Yang,J., Chang,M.L. and Adams,J.D., Jr. (2003) Nicotinamide offers multiple protective mechanisms in stroke as a precursor for NAD⁺, as a PARP inhibitor and by partial restoration of mitochondrial function. *Pharmacology*, **69**, 150-157.
- 86 Klaidman,L.K., Mukherjee,S.K., Hutchin,T.P. and Adams,J.D. (1996) Nicotinamide as a precursor for NAD⁺ prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Neurosci.Lett.*, **206**, 5-8.
- 87 Kontush,A. and Chapman,M.J. (2006) Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.*, **3**, 144-153.
- 88 Kontush,A. and Chapman,M.J. (2006) Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol.Rev.*, **58**, 342-374.
- 89 Kops,G.J., Dansen,T.B., Polderman,P.E., Saarloos,I., Wirtz,K.W., Coffey,P.J., Huang,T.T., Bos,J.L., Medema,R.H. and Burgering,B.M. (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, **419**, 316-321.
- 90 Kops,G.J., Medema,R.H., Glassford,J., Essers,M.A., Dijkers,P.F., Coffey,P.J., Lam,E.W. and Burgering,B.M. (2002) Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol.Cell Biol.*, **22**, 2025-2036.
- 91 Kostylina,G., Simon,D., Fey,M.F., Yousefi,S. and Simon,H.U. (2008) Neutrophil apoptosis mediated by nicotinic acid receptors (GPR109A). *Cell Death.Differ.*, **15**, 134-142.
- 92 Kuchmerovska,T., Shymanskyi,I., Chlopicki,S. and Klimenko,A. (2010) 1-methylnicotinamide (MNA) in prevention of diabetes-associated brain disorders. *Neurochem.Int.*, **56**, 221-228.
- 93 Kushnir-Sukhov,N.M., Brown,J.M., Wu,Y., Kirshenbaum,A. and Metcalfe,D.D. (2007) Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J Allergy Clin.Immunol.*, **119**, 498-499.
- 94 Kuvin,J.T., Dave,D.M., Sliney,K.A., Mooney,P., Patel,A.R., Kimmelstiel,C.D. and Karas,R.H. (2006) Effects of extended-release niacin on lipoprotein particle size, distribution, and inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *Am.J.Cardiol.*, **98**, 743-745.
- 95 LaRosa,J.C., Miller,V.T., Edwards,K.D., DeBovis,M.R. and Stoy,D.B. (1987) Acifran: a double-blind, randomized, placebo-controlled efficacy study in type IIa hyperlipoproteinemic patients. *Artery*, **14**, 338-350.
- 96 Lee,J.M., Robson,M.D., Yu,L.M., Shirodaria,C.C., Cunningham,C., Kyllintireas,I., Digby,J.E., Bannister,T., Handa,A., Wiesmann,F., Durrington,P.N., Channon,K.M., Neubauer,S. and Choudhury,R.P. (2009) Effects of

high-dose modified-release nicotinic acid on atherosclerosis and vascular function: a randomized, placebo-controlled, magnetic resonance imaging study. *J.Am.Coll.Cardiol.*, **54**, 1787-1794.

97 Lemaitre,V., Kim,H.E., Forney-Prescott,M., Okada,Y. and D'Armiento,J. (2009) Transgenic expression of matrix metalloproteinase-9 modulates collagen deposition in a mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **205**, 107-112.

98 Lewis,K.E., Kirk,E.A., McDonald,T.O., Wang,S., Wight,T.N., O'Brien,K.D. and Chait,A. (2004) Increase in serum amyloid a evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice. *Circulation*, **110**, 540-545.

99 Lim,B.H., Cho,B.I., Kim,Y.N., Kim,J.W., Park,S.T. and Lee,C.W. (2006) Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in gastric cancer tissues and its potential post-translational modification. *Exp.Mol.Med.*, **38**, 455-465.

100 Love,S. (1999) Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.*, **9**, 119-131.

101 Love,S., Barber,R. and Wilcock,G.K. (2000) Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*, **26**, 55-66.

102 Love,S., Barber,R. and Wilcock,G.K. (1999) Increased poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain*, **122 (Pt 2)**, 247-253.

103 Love,S., Barber,R. and Wilcock,G.K. (1999) Neuronal accumulation of poly(ADP-ribose) after brain ischaemia. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*, **25**, 98-103.

104 Love,S., Barber,R. and Wilcock,G.K. (1998) Apoptosis and expression of DNA repair proteins in ischaemic brain injury in man. *Neuroreport*, **9**, 955-959.

105 Maiese,K. and Chong,Z.Z. (2003) Nicotinamide: necessary nutrient emerges as a novel cytoprotectant for the brain. *Trends Pharmacol.Sci.*, **24**, 228-232.

106 Maiese,K., Chong,Z.Z., Hou,J. and Shang,Y.C. (2009) The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Molecules.*, **14**, 3446-3485.

107 Malle,E. and De Beer,F.C. (1996) Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur.J.Clin.Invest*, **26**, 427-435.

108 Malle,E., Steinmetz,A. and Raynes,J.G. (1993) Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis*, **102**, 131-146.

109 Marin-Castano,M.E., Schanstra,J.P., Neau,E., Praddaude,F., Pecher,C., Ader,J.L., Girolami,J.P. and Bascands,J.L. (2002) Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation*, **105**, 627-632.

- 110 Mateuszuk,L., Khomich,T.I., Slominska,E., Gajda,M., Wojcik,L., Lomnicka,M., Gwozdz,P. and Chlopicki,S. (2009) Activation of nicotinamide N-methyltransferase and increased formation of 1-methylnicotinamide (MNA) in atherosclerosis. *Pharmacol.Rep.*, **61**, 76-85.
- 111 Matsubara,K., Aoyama,K., Suno,M. and Awaya,T. (2002) N-methylation underlying Parkinson's disease. *Neurotoxicol.Teratol.*, **24**, 593-598.
- 112 McCarty,M.F. (2000) Co-administration of equimolar doses of betaine may alleviate the hepatotoxic risk associated with niacin therapy. *Med.Hypotheses*, **55**, 189-194.
- 113 Melo,S.S., Arantes,M.R., Meirelles,M.S., Jordao,A.A., Jr. and Vannucchi,H. (2000) Lipid peroxidation in nicotinamide-deficient and nicotinamide-supplemented rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol.*, **37**, 33-39.
- 114 Melo,S.S., Meirelles,M.S., Jordao Junior,A.A. and Vannucchi,H. (2000) Lipid peroxidation in nicotinamide-deficient and nicotinamide-supplemented rats. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.*, **70**, 321-323.
- 115 Menon,R.M., Adams,M.H., Gonzalez,M.A., Tolbert,D.S., Leu,J.H. and Cefali,E.A. (2007) Plasma and urine pharmacokinetics of niacin and its metabolites from an extended-release niacin formulation. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.*, **45**, 448-454.
- 116 Menon,R.M., Gonzalez,M.A., Adams,M.H., Tolbert,D.S., Leu,J.H. and Cefali,E.A. (2007) Effect of the rate of niacin administration on the plasma and urine pharmacokinetics of niacin and its metabolites. *J.Clin.Pharmacol.*, **47**, 681-688.
- 117 Meyers,C.D., Liu,P., Kamanna,V.S. and Kashyap,M.L. (2007) Nicotinic acid induces secretion of prostaglandin D2 in human macrophages: an in vitro model of the niacin flush. *Atherosclerosis*, **192**, 253-258.
- 118 Mogielnicki,A., Kramkowski,K., Pietrzak,L. and Buczek,W. (2007) N-methylnicotinamide inhibits arterial thrombosis in hypertensive rats. *J.Physiol Pharmacol.*, **58**, 515-527.
- 119 Molnar,A., Toth,A., Bagi,Z., Papp,Z., Edes,I., Vaszily,M., Galajda,Z., Papp,J.G., Varro,A., Szuts,V., Lacza,Z., Gero,D. and Szabo,C. (2006) Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Mol.Med.*, **12**, 143-152.
- 120 Morris,K.C., Lin,H.W., Thompson,J.W. and Perez-Pinzon,M.A. (2011) Pathways for ischemic cytoprotection: Role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. *J Cereb.Blood Flow Metab*, **31**, 1003-1019.
- 121 Mullangi,R. and Srinivas,N.R. (2011) Niacin and its metabolites: role of LC-MS/MS bioanalytical methods and update on clinical pharmacology. An overview. *Biomed.Chromatogr.*, **25**, 218-237.
- 122 Munzel,T. and Keaney,J.F., Jr. (2001) Are ACE inhibitors a "magic bullet" against oxidative stress? *Circulation*, **104**, 1571-1574.

- 123 Nagalski,A. and Bryla,J. (2007) [Niacin in therapy]. *Postepy Hig.Med.Dosw.(Online.)*, **61**, 288-302.
- 124 Nicoletti,A., Kaveri,S., Caligiuri,G., Bariety,J. and Hansson,G.K. (1998) Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. *J.Clin.Invest*, **102**, 910-918.
- 125 Nofer,J.R., Kehrel,B., Fobker,M., Levkau,B., Assmann,G. and von,E.A. (2002) HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, **161**, 1-16.
- 126 Nofer,J.R., van der,G.M., Tolle,M., Wolinska,I., von Wnuck,L.K., Baba,H.A., Tietge,U.J., Godecke,A., Ishii,I., Kleuser,B., Schafers,M., Fobker,M., Zidek,W., Assmann,G., Chun,J. and Levkau,B. (2004) HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J.Clin.Invest*, **113**, 569-581.
- 127 Norata,G.D., Callegari,E., Inoue,H. and Catapano,A.L. (2004) HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **24**, 871-877.
- 128 Norata,G.D. and Catapano,A.L. (2005) Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc.Health Risk Manag.*, **1**, 119-129.
- 129 O'Brien,K.D., McDonald,T.O., Kunjathoor,V., Eng,K., Knopp,E.A., Lewis,K., Lopez,R., Kirk,E.A., Chait,A., Wight,T.N., deBeer,F.C. and LeBoeuf,R.C. (2005) Serum amyloid A and lipoprotein retention in murine models of atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **25**, 785-790.
- 130 O'Valle,F., Benitez,M.C., Gomez-Morales,M., Bravo,J., Osuna,A., Del Moral,R.M., Martin-Oliva,D., Oliver,F.J. and Del Moral,R.G. (2005) Role of poly-(ADP-ribose) polymerase in transplant acute tubular necrosis and its relationship with delayed renal function. *Transplant.Proc.*, **37**, 1421-1423.
- 131 O'Valle,F., Benitez,M.C., Gomez-Morales,M., Bravo,J., Osuna,A., Martin-Oliva,D., Oliver,F.J. and Del Moral,R.G. (2005) Role of poly (ADP-ribose) polymerase in kidney transplant and its relationship with delayed renal function: multivariate analysis. *Transplant.Proc.*, **37**, 3684-3687.
- 132 O'Valle,F., Gomez-Morales,M., Del Moral,R.M., Seron,D., Moreso,F., Osuna,A., Oliver,F.J. and Del Moral,R.G. (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase expression in kidney transplantation: from alfa (alpha) to Omega (Omega). *Transplant.Proc.*, **39**, 2099-2101.
- 133 Offermanns,S. (2006) The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends Pharmacol.Sci.*, **27**, 384-390.
- 134 Oliver,F.J., Menissier-de,M.J., Nacci,C., Decker,P., Andriantsitohaina,R., Muller,S., de la,R.G., Stoclet,J.C. and de,M.G. (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.*, **18**, 4446-4454.

- 135 Otsuka,A., Hanafusa,T., Miyagawa,J., Kono,N. and Tarui,S. (1991) Nicotinamide and 3-aminobenzamide reduce interferon-gamma-induced class II MHC (HLA-DR and -DP) molecule expression on cultured human endothelial cells and fibroblasts. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.*, **13**, 263-280.
- 136 Pacher,P. and Szabo,C. (2005) Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxid.Redox.Signal.*, **7**, 1568-1580.
- 137 Pacher,P. and Szabo,C. (2007) Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc.Drug Rev.*, **25**, 235-260.
- 138 Papaccio,G., Ammendola,E. and Pisanti,F.A. (1999) Nicotinamide decreases MHC class II but not MHC class I expression and increases intercellular adhesion molecule-1 structures in non-obese diabetic mouse pancreas. *J.Endocrinol.*, **160**, 389-400.
- 139 Papaliadis,D., Boucher,W., Kempuraj,D., Michaelian,M., Wolfberg,A., House,M. and Theoharides,T.C. (2008) Niacin-induced "flush" involves release of prostaglandin D2 from mast cells and serotonin from platelets: evidence from human cells in vitro and an animal model. *J Pharmacol Exp.Ther.*, **327**, 665-672.
- 140 Papaliadis,D., Boucher,W., Kempuraj,D. and Theoharides,T.C. (2008) The flavonoid luteolin inhibits niacin-induced flush. *Br.J Pharmacol*, **153**, 1382-1387.
- 141 Papazafiropoulou,A. and Tentolouris,N. (2009) Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia.*, **13**, 76-82.
- 142 Park,J., Halliday,G.M., Surjana,D. and Damian,D.L. (2010) Nicotinamide prevents ultraviolet radiation-induced cellular energy loss. *Photochem.Photobiol.*, **86**, 942-948.
- 143 Peralta-Leal,A., Rodriguez-Vargas,J.M., guilar-Quesada,R., Rodriguez,M.I., Linares,J.L., de Almodovar,M.R. and Oliver,F.J. (2009) PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radic.Biol.Med.*, **47**, 13-26.
- 144 Perelas,A., Tsoukani,A. and Perrea,D. (2010) Effects of Lipid-Lowering Drugs on Adiponectin. *Curr.Vasc.Pharmacol.*
- 145 Pero,R.W., Axelsson,B., Siemann,D., Chaplin,D. and Dougherty,G. (1999) Newly discovered anti-inflammatory properties of the benzamides and nicotinamides. *Mol.Cell Biochem.*, **193**, 119-125.
- 146 Pieper,J.A. (2002) Understanding niacin formulations. *Am.J.Manag.Care*, **8**, S308-S314.
- 147 Pietrzak,L., Mogielnicki,A. and Buczko,W. (2009) Nicotinamide and its metabolite N-methylnicotinamide increase skin vascular permeability in rats. *Clin.Exp.Dermatol.*, **34**, 380-384.

- 148 Pillai,J.B., Russell,H.M., Raman,J., Jeevanandam,V. and Gupta,M.P. (2005) Increased expression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 contributes to caspase-independent myocyte cell death during heart failure. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, **288**, H486-H496.
- 149 Przygodzki,T., Kazmierczak,P., Sikora,J. and Watala,C. (2010) 1-methylnicotinamide effects on the selected markers of endothelial function, inflammation and haemostasis in diabetic rats. *Eur.J.Pharmacol.*, **640**, 157-162.
- 150 Przygodzki,T., Slominska,E., Polakowska,E., Mlynarski,W. and Watala,C. (2011) Effects of 1-methylnicotinamide and its metabolite N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide on streptozotocin-induced toxicity in murine insulinoma MIN6 cell line. *Acta Biochim.Pol.*, **58**, 75-77.
- 151 Pumpo,R., Sarnelli,G., Spinella,A., Budillon,G. and Cuomo,R. (2001) The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production. *Am.J.Gastroenterol.*, **96**, 1183-1187.
- 152 Riederer,M., Erwa,W., Zimmermann,R., Frank,S. and Zechner,R. (2009) Adipose tissue as a source of nicotinamide N-methyltransferase and homocysteine. *Atherosclerosis*, **204**, 412-417.
- 153 Rivera,S., Ogier,C., Jourquin,J., Timsit,S., Szklarczyk,A.W., Miller,K., Gearing,A.J., Kaczmarek,L. and Khrestchatsky,M. (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur.J.Neurosci.*, **15**, 19-32.
- 154 Robbesyn,F., Auge,N., Vindis,C., Cantero,A.V., Barbaras,R., Negre-Salvayre,A. and Salvayre,R. (2005) High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced epidermal [corrected] growth factor receptor activation and subsequent matrix metalloproteinase-2 upregulation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **25**, 1206-1212.
- 155 Roessler,M., Rollinger,W., Palme,S., Hagmann,M.L., Berndt,P., Engel,A.M., Schneidinger,B., Pfeffer,M., Andres,H., Karl,J., Bodenmuller,H., Ruschoff,J., Henkel,T., Rohr,G., Rossol,S., Rosch,W., Langen,H., Zolg,W. and Tacke,M. (2005) Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.*, **11**, 6550-6557.
- 156 Rogerson,F.M., Chai,S.Y., Schlawe,I., Murray,W.K., Marley,P.D. and Mendelsohn,F.A. (1992) Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. *J.Hypertens.*, **10**, 615-620.
- 157 Rubic,T., Trottman,M. and Lorenz,R.L. (2004) Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoïd cells by niacin. *Biochem.Pharmacol.*, **67**, 411-419.
- 158 Sakai,T., Kamanna,V.S. and Kashyap,M.L. (2001) Niacin, but not gemfibrozil, selectively increases LP-AI, a cardioprotective subfraction of HDL, in patients with low HDL cholesterol. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **21**, 1783-1789.
- 159 Sano,A., Takimoto,N. and Takitani,S. (1989) Fluorometric assay of nicotinamide methyltransferase with a new substrate, 4-methylnicotinamide. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, **37**, 3330-3332.

- 160 Sartini,D., Muzzonigro,G., Milanese,G., Pierella,F., Rossi,V. and Emanuelli,M. (2006) Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel tumor marker for renal clear cell carcinoma. *J.Urol.*, **176**, 2248-2254.
- 161 Sartini,D., Santarelli,A., Rossi,V., Goteri,G., Rubini,C., Ciavarella,D., Lo,M.L. and Emanuelli,M. (2007) Nicotinamide N-methyltransferase upregulation inversely correlates with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Mol.Med.*, **13**, 415-421.
- 162 Scheurig,A.C., Thorand,B., Fischer,B., Heier,M. and Koenig,W. (2008) Association between the intake of vitamins and trace elements from supplements and C-reactive protein: results of the MONICA/KORA Augsburg study. *Eur.J.Clin.Nutr.*, **62**, 127-137.
- 163 Schmidt,D., Smenton,A., Raghavan,S., Shen,H., Ding,F.X., Carballo-Jane,E., Luell,S., Ciecko,T., Holt,T.G., Wolff,M., Taggart,A., Wilsie,L., Krsmanovic,M., Ren,N., Blom,D., Cheng,K., McCann,P.E., Waters,M.G., Tata,J. and Colletti,S. (2010) Anthranilic acid replacements in a niacin receptor agonist. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **20**, 3426-3430.
- 164 Seifert,R., Hoshino,J. and Kroger,H. (1984) Nicotinamide methylation. Tissue distribution, developmental and neoplastic changes. *Biochim.Biophys.Acta*, **801**, 259-264.
- 165 Semple,G., Skinner,P.J., Cherrier,M.C., Webb,P.J., Sage,C.R., Tamura,S.Y., Chen,R., Richman,J.G. and Connolly,D.T. (2006) 1-Alkyl-benzotriazole-5-carboxylic acids are highly selective agonists of the human orphan G-protein-coupled receptor GPR109b. *J.Med.Chem.*, **49**, 1227-1230.
- 166 Semple,G., Skinner,P.J., Gharbaoui,T., Shin,Y.J., Jung,J.K., Cherrier,M.C., Webb,P.J., Tamura,S.Y., Boatman,P.D., Sage,C.R., Schrader,T.O., Chen,R., Colletti,S.L., Tata,J.R., Waters,M.G., Cheng,K., Taggart,A.K., Cai,T.Q., Carballo-Jane,E., Behan,D.P., Connolly,D.T. and Richman,J.G. (2008) 3-(1H-tetrazol-5-yl)-1,4,5,6-tetrahydro-cyclopentapyrazole (MK-0354): a partial agonist of the nicotinic acid receptor, G-protein coupled receptor 109a, with antilipolytic but no vasodilatory activity in mice. *J.Med.Chem.*, **51**, 5101-5108.
- 167 Shapiro,S.D. (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **10**, 602-608.
- 168 Shen,C.C., Huang,H.M., Ou,H.C., Chen,H.L., Chen,W.C. and Jeng,K.C. (2004) Protective effect of nicotinamide on neuronal cells under oxygen and glucose deprivation and hypoxia/reoxygenation. *J.Biomed.Sci.*, **11**, 472-481.
- 169 Shen,H.C., Ding,F.X., Raghavan,S., Deng,Q., Luell,S., Forrest,M.J., Carballo-Jane,E., Wilsie,L.C., Krsmanovic,M.L., Taggart,A.K., Wu,K.K., Wu,T.J., Cheng,K., Ren,N., Cai,T.Q., Chen,Q., Wang,J., Wolff,M.S., Tong,X., Holt,T.G., Waters,M.G., Hammond,M.L., Tata,J.R. and Colletti,S.L. (2010) Discovery of a biaryl cyclohexene carboxylic acid (MK-6892): a potent and selective high affinity niacin receptor full agonist with reduced flushing profiles in animals as a preclinical candidate. *J.Med.Chem.*, **53**, 2666-2670.

- 170 Silence, J., Collen, D. and Lijnen, H.R. (2002) Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ.Res.*, **90**, 897-903.
- 171 Simbulan-Rosenthal, C.M., Ly, D.H., Rosenthal, D.S., Konopka, G., Luo, R., Wang, Z.Q., Schultz, P.G. and Smulson, M.E. (2000) Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **97**, 11274-11279.
- 172 Skinner, P.J., Cherrier, M.C., Webb, P.J., Sage, C.R., Dang, H.T., Pride, C.C., Chen, R., Tamura, S.Y., Richman, J.G., Connolly, D.T. and Semple, G. (2007) 3-Nitro-4-amino benzoic acids and 6-amino nicotinic acids are highly selective agonists of GPR109b. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **17**, 6619-6622.
- 173 Skinner, P.J., Webb, P.J., Sage, C.R., Dang, T.H., Pride, C.C., Chen, R., Tamura, S.Y., Richman, J.G., Connolly, D.T. and Semple, G. (2009) 5-N,N-Disubstituted 5-aminopyrazole-3-carboxylic acids are highly potent agonists of GPR109b. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **19**, 4207-4209.
- 174 Slominska, E.M., Adamski, P., Lipinski, M., Swierczynski, J. and Smolenski, R.T. (2006) Liquid chromatographic/mass spectrometric procedure for measurement of NAD catabolites in human and rat plasma and urine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 1245-1249.
- 175 Slominska, E.M., Yuen, A., Osman, L., Gebicki, J., Yacoub, M.H. and Smolenski, R.T. (2008) Cytoprotective effects of nicotinamide derivatives in endothelial cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **27**, 863-866.
- 176 Slomka, M., Zieminska, E. and Lazarewicz, J. (2008) Nicotinamide and 1-methylnicotinamide reduce homocysteine neurotoxicity in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Acta Neurobiol.Exp.(Wars.)*, **68**, 1-9.
- 177 Slomka, M., Zieminska, E., Salinska, E. and Lazarewicz, J.W. (2008) Neuroprotective effects of nicotinamide and 1-methylnicotinamide in acute excitotoxicity in vitro. *Folia Neuropathol.*, **46**, 69-80.
- 178 Smulson, M.E., Simbulan-Rosenthal, C.M., Boulares, A.H., Yakovlev, A., Stoica, B., Iyer, S., Luo, R., Haddad, B., Wang, Z.Q., Pang, T., Jung, M., Dritschilo, A. and Rosenthal, D.S. (2000) Roles of poly(ADP-ribose) polymerase and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1. *Adv.Enzyme Regul.*, **40**, 183-215.
- 179 Soos, J., Engelhardt, J.I., Siklos, L., Havas, L. and Majtenyi, K. (2004) The expression of PARP, NF-kappa B and parvalbumin is increased in Parkinson disease. *Neuroreport*, **15**, 1715-1718.
- 180 Soriano, F.G., Nogueira, A.C., Caldini, E.G., Lins, M.H., Teixeira, A.C., Cappi, S.B., Lotufo, P.A., Bernik, M.M., Zsengeller, Z., Chen, M. and Szabo, C. (2006) Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med.*, **34**, 1073-1079.

- 181 Stach,K., Zaddach,F., Nguyen,X.D., Elmas,E., Kralev,S., Weiss,C., Borggreffe,M. and Kalsch,T. (2011) Effects of nicotinic acid on endothelial cells and platelets. *Cardiovasc.Pathol.*
- 182 Sternak,M., Khomich,T.I., Jakubowski,A., Szafarz,M., Szczepanski,W., Bialas,M., Stojak,M., Szymura-Oleksiak,J. and Chlopicki,S. (2010) Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) and 1-methylnicotinamide (MNA) in experimental hepatitis induced by concanavalin A in the mouse. *Pharmacol.Rep.*, **62**, 483-493.
- 183 Stevens,M.J., Li,F., Drel,V.R., Abatan,O.I., Kim,H., Burnett,D., Larkin,D. and Obrosova,I.G. (2007) Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **320**, 458-464.
- 184 Sugano,M., Tsuchida,K. and Makino,N. (2000) High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **272**, 872-876.
- 185 Suzuki,E., Okuda,H., Nishida,K., Fujimoto,S. and Nagasawa,K. (2010) Protective effect of nicotinamide against poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated astrocyte death depends on its transporter-mediated uptake. *Life Sci.*, **86**, 676-682.
- 186 Szabo,C., Zanchi,A., Komjati,K., Pacher,P., Krolewski,A.S., Quist,W.C., LoGerfo,F.W., Horton,E.S. and Veves,A. (2002) Poly(ADP-Ribose) polymerase is activated in subjects at risk of developing type 2 diabetes and is associated with impaired vascular reactivity. *Circulation*, **106**, 2680-2686.
- 187 Szafarz,M., Lomnicka,M., Sternak,M., Chlopicki,S. and Szymura-Oleksiak,J. (2010) Simultaneous determination of nicotinic acid and its four metabolites in rat plasma using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (LC/MS/MS). *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, **878**, 895-902.
- 188 Taipale,J. and Keski-Oja,J. (1997) Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.*, **11**, 51-59.
- 189 Tang,Y., Zhou,L., Gunnet,J.W., Wines,P.G., Cryan,E.V. and Demarest,K.T. (2006) Enhancement of arachidonic acid signaling pathway by nicotinic acid receptor HM74A. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **345**, 29-37.
- 190 Thoenes,M., Oguchi,A., Nagamia,S., Vaccari,C.S., Hammoud,R., Umpierrez,G.E. and Khan,B.V. (2007) The effects of extended-release niacin on carotid intimal media thickness, endothelial function and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Int.J.Clin.Pract.*, **61**, 1942-1948.
- 191 Tomida,M., Mikami,I., Takeuchi,S., Nishimura,H. and Akiyama,H. (2009) Serum levels of nicotinamide N-methyltransferase in patients with lung cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **135**, 1223-1229.
- 192 Tomida,M., Ohtake,H., Yokota,T., Kobayashi,Y. and Kurosumi,M. (2008) Stat3 up-regulates expression of nicotinamide N-methyltransferase in human cancer cells. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **134**, 551-559.

- 193 Toth-Zsamboki,E., Horvath,E., Vargova,K., Pankotai,E., Murthy,K., Zsengeller,Z., Barany,T., Pek,T., Fekete,K., Kiss,R.G., Preda,I., Lacza,Z., Gero,D. and Szabo,C. (2006) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol.Med.*, **12**, 221-228.
- 194 Turenne,S.D., Seeman,M. and Ross,B.M. (2001) An animal model of nicotinic-acid-induced vasodilation: effect of haloperidol, caffeine and nicotine upon nicotinic acid response. *Schizophr.Res.*, **50**, 191-197.
- 195 Ungerstedt,J.S., Blomback,M. and Soderstrom,T. (2003) Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin.Exp.Immunol.*, **131**, 48-52.
- 196 Ungerstedt,J.S., Heimersson,K., Soderstrom,T. and Hansson,M. (2003) Nicotinamide inhibits endotoxin-induced monocyte tissue factor expression. *J.Thromb.Haemost.*, **1**, 2554-2560.
- 197 Vague,P., Picq,R., Bernal,M., Lassmann-Vague,V. and Vialettes,B. (1989) Effect of nicotinamide treatment on the residual insulin secretion in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, **32**, 316-321.
- 198 van der Hoorn,J.W., de,H.W., Berbee,J.F., Havekes,L.M., Jukema,J.W., Rensen,P.C. and Princen,H.M. (2008) Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE*3Leiden.CETP mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **28**, 2016-2022.
- 199 Van Lenten,B.J., Navab,M., Shih,D., Fogelman,A.M. and Lusis,A.J. (2001) The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc.Med.*, **11**, 155-161.
- 200 Van Lenten,B.J., Reddy,S.T., Navab,M. and Fogelman,A.M. (2006) Understanding changes in high density lipoproteins during the acute phase response. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **26**, 1687-1688.
- 201 Van Lenten,B.J., Wagner,A.C., Nayak,D.P., Hama,S., Navab,M. and Fogelman,A.M. (2001) High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation*, **103**, 2283-2288.
- 202 Viljoen,A. (2009) Resurrecting an old drug--a flash in the pan or here to stay? *Int.J.Clin.Pract.*, **63**, 3-6.
- 203 Vosper,H. (2009) Niacin: a re-emerging pharmaceutical for the treatment of dyslipidaemia. *Br.J.Pharmacol.*, **158**, 429-441.
- 204 Warnholtz,A., Wild,P., Ostad,M.A., Elsner,V., Stieber,F., Schinzel,R., Walter,U., Peetz,D., Lackner,K., Blankenberg,S. and Munzel,T. (2009) Effects of oral niacin on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: results of the randomized, double-blind, placebo-controlled INEF study. *Atherosclerosis*, **204**, 216-221.
- 205 Watala,C., Kazmierczak,P., Dobaczewski,M., Przygodzki,T., Bartus,M., Lomnicka,M., Slominska,E.M., Durackova,Z. and Chlopicki,S. (2009) Anti-diabetic effects of 1-methylnicotinamide (MNA) in streptozocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol.Rep.*, **61**, 86-98.

- 206 Westphal,S., Borucki,K., Taneva,E., Makarova,R. and Luley,C. (2007) Extended-release niacin raises adiponectin and leptin. *Atherosclerosis*, **193**, 361-365.
- 207 Willets,J.M., Lunec,J., Williams,A.C. and Griffiths,H.R. (1993) Neurotoxicity of nicotinamide derivatives: their role in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem.Soc.Trans.*, **21 (Pt 3)**, 299S.
- 208 Williams,A.C., Cartwright,L.S. and Ramsden,D.B. (2005) Parkinson's disease: the first common neurological disease due to auto-intoxication? *QJM.*, **98**, 215-226.
- 209 Wozniacka,A., Wiczorkowska,M., Gebicki,J. and Sysa-Jedrzejowska,A. (2005) Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot study. *Clin.Exp.Dermatol.*, **30**, 632-635.
- 210 Wu,B.J., Yan,L., Charlton,F., Witting,P., Barter,P.J. and Rye,K.A. (2010) Evidence that niacin inhibits acute vascular inflammation and improves endothelial dysfunction independent of changes in plasma lipids. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **30**, 968-975.
- 211 Xu,L., Badolato,R., Murphy,W.J., Longo,D.L., Anver,M., Hale,S., Oppenheim,J.J. and Wang,J.M. (1995) A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. *J.Immunol.*, **155**, 1184-1190.
- 212 Yan,L., Otterness,D.M., Craddock,T.L. and Weinshilboum,R.M. (1997) Mouse liver nicotinamide N-methyltransferase: cDNA cloning, expression, and nucleotide sequence polymorphisms. *Biochem.Pharmacol.*, **54**, 1139-1149.
- 213 Yan,L., Otterness,D.M., Kozak,C.A. and Weinshilboum,R.M. (1998) Mouse nicotinamide N-methyltransferase gene: molecular cloning, structural characterization, and chromosomal localization. *DNA Cell Biol.*, **17**, 659-667.
- 214 Yan,L., Otterness,D.M. and Weinshilboum,R.M. (1999) Human nicotinamide N-methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence analysis and promoter characterization. *Pharmacogenetics*, **9**, 307-316.
- 215 Yang,J., Klaidman,L.K., Nalbandian,A., Oliver,J., Chang,M.L., Chan,P.H. and Adams,J.D., Jr. (2002) The effects of nicotinamide on energy metabolism following transient focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Neurosci.Lett.*, **333**, 91-94.
- 216 Yeganeh,B., Moshtaghi-Kashanian,G.R., Declercq,V. and Moghadasian,M.H. (2005) Combination of dietary phytosterols plus niacin or fenofibrate: effects on lipid profile and atherosclerosis in apo E-KO mice. *J.Nutr.Biochem.*, **16**, 222-228.
- 217 Yoshinari,O. and Igarashi,K. (2010) Anti-diabetic effect of trigonelline and nicotinic acid, on KK-A(y) mice. *Curr.Med.Chem.*, **17**, 2196-2202.

- 218 You,D., Cochain,C., Loinard,C., Vilar,J., Mees,B., Duriez,M., Levy,B.I. and Silvestre,J.S. (2008) Combination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril and the diuretic indapamide activate postnatal vasculogenesis in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp.Ther.*, **325**, 766-773.
- 219 Zackheim,H.S. (1975) Treatment of psoriasis with 6-aminonicotinamide. *Arch.Dermatol.*, **111**, 880-882.
- 220 Zackheim,H.S. (1978) Topical 6-aminonicotinamide plus oral niacinamide therapy for psoriasis. *Arch.Dermatol.*, **114**, 1632-1638.
- 221 Zellner,C., Pullinger,C.R., Aouizerat,B.E., Frost,P.H., Kwok,P.Y., Malloy,M.J. and Kane,J.P. (2005) Variations in human HM74 (GPR109B) and HM74A (GPR109A) niacin receptors. *Hum.Mutat.*, **25**, 18-21.
- 222 Zhang,B., Tomura,H., Kuwabara,A., Kimura,T., Miura,S., Noda,K., Okajima,F. and Saku,K. (2005) Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis*, **178**, 199-205.
- 223 Zhou,S.S., Li,D., Sun,W.P., Guo,M., Lun,Y.Z., Zhou,Y.M., Xiao,F.C., Jing,L.X., Sun,S.X., Zhang,L.B., Luo,N., Bian,F.N., Zou,W., Dong,L.B., Zhao,Z.G., Li,S.F., Gong,X.J., Yu,Z.G., Sun,C.B., Zheng,C.L., Jiang,D.J. and Li,Z.N. (2009) Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes. *World J.Gastroenterol.*, **15**, 5674-5684.
- 224 Zhuo,J.L., Froomes,P., Casley,D., Liu,J.J., Murone,C., Chai,S.Y., Buxton,B. and Mendelsohn,F.A. (1997) Perindopril chronically inhibits angiotensin-converting enzyme in both the endothelium and adventitia of the internal mammary artery in patients with ischemic heart disease. *Circulation*, **96**, 174-182.
- 225 Zingarelli,B., Hake,P.W., O'Connor,M., Denenberg,A., Kong,S. and Aronow,B.J. (2003) Absence of poly(ADP-ribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury. *Mol.Med.*, **9**, 143-153.
- 226 Zingarelli,B., Hake,P.W., O'Connor,M., Denenberg,A., Wong,H.R., Kong,S. and Aronow,B.J. (2004) Differential regulation of activator protein-1 and heat shock factor-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury: role of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, **286**, H1408-H1415.
- 227 Zingarelli,B., O'Connor,M. and Hake,P.W. (2003) Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways in colitis. *Eur.J.Pharmacol.*, **469**, 183-194.