

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

JUSTYNA TOTOŃ-ŻURAŃSKA

**Badania nad możliwością farmakologicznego hamowania progresji
miażdżycy, poprzez regulację funkcji receptora dla angiotensyny (1-7)**

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. med. Jacek Jawień

Praca wykonana została w Katedrze Farmakologii UJ CM

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Ryszard Korbut

Kraków 2011

*Chciałabym bardzo serdecznie podziękować
mojemu Promotorowi, Panu dr hab. med. Jackowi
Jawieniowi - za Jego wielki trud, a jednocześnie ogromną
życzliwość i opiekę nade mną podczas tworzenia niniejszej
pracy*

*Pragnę również złożyć gorące podziękowania
Kierownikowi Katedry Farmakologii Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego – Panu Profesorowi dr hab.
med. Ryszardowi Korbutowi – za umożliwienie mi owocnej
pracy naukowej w Katedrze*

*Dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom za
stworzenie miłej i pełnej inspiracji naukowej atmosfery w
Katedrze Farmakologii*

*Na koniec, pragnę także podziękować mojemu
Mężowi oraz Rodzicom – za wyrozumiałość i cierpliwość
podczas długotrwałego procesu tworzenia doktoratu*

„Altera manu fert lapidem, panem ostentat altera”

„Jedną ręką trzyma kamień, drugą pokazuje chleb”

sentencja rzymska

SPIS TREŚCI

Spis skrótów	str. 5
I. Wstęp	str. 7
I.1 Miażdżycza	str. 7
I.2 Układ renina-angiotensyna-aldosteron	str. 10
I.3 Rola angiotensyny II	str. 12
I.4 Leki działające na układ RAA	str. 14
I.5 Nowe spojrzenie na oś RAA	str. 15
I.6 Rys historyczny odkrywania komponent osi RAA i ACEI	str. 20
I.7 Najnowszy model eksperymentalny miażdżycy	str. 20
II. Cele pracy	str. 24
III. Materiał i metody	str. 25
III.1 Zwierzęta i leki	str. 25
III.2 Pobieranie narządów	str. 26
III.3 Oznaczanie wielkości miażdżycy	str. 30
III.4 Badania immunohistochemiczne	str. 39
III.5 Badania biochemiczne	str. 40
III.6 Lipidy osocza	str. 40
III.7 Badanie rozkurczu naczyń.....	str. 40
III.8 Analiza statystyczna	str. 42
IV. Wyniki	str. 43
IV.1 Lipidy	str. 43
IV.2 Masa myszy	str. 43
IV.3 Wielkość miażdżycy	str. 44
IV.4 Struktura blaszki i jej stabilność	str. 47
IV.5 Osoczowe markery zapalenia	str. 49
IV.6 Rozkurcz naczyń	str. 52
V. Dyskusja	str. 53
VI. Wnioski	str. 59
VII. Streszczenie	str. 60
VIII. Summary	str. 62
IX. Piśmiennictwo	str. 64
X. Spis tabel	str. 82
XI. Spis rycin	str. 83

SPIS SKRÓTÓW

- ACE (*angiotensin converting enzyme*) – konwertaza angiotensyny
- ACEI (*angiotensin converting enzyme inhibitor*) – inhibitor konwertazy angiotensyny
- apoE (*apolipoprotein E*) – apolipoproteina E
- ARB (*angiotensin receptor blocker*) – bloker receptora angiotensynowego
- ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) - test immunoenzymatyczny
- eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) –śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
- gene KO (*knockout*) – wyłączenie genu
- HDL (*high density lipoprotein*) - lipoproteina o wysokiej gęstości
- HSP (*heat shock protein*) – białko szoku cieplnego
- IDL (*intermediate density lipoprotein*) – lipoproteina o pośredniej gęstości
- IFN- γ (*interferon gamma*) – interferon gamma
- IL (*interleukin*) – interleukina
- IMA (*internal mammary artery*) - tętnica piersiowa wewnętrzna
- LDL (*low density lipoprotein*) – lipoproteina o małej gęstości
- MCP-1 (*macrophage chemotactic protein-1*) – białko chemotaktyczne dla makrofagów
- NO (*nitric oxide*) – tlenek azotu
- OCT (*Optimal Cutting Temperature*) – żel mrożeniowy
- ORO (*oil Red-O*) – czerwień oleista
- oxLDL (*oxidized LDL*) – utlenowana cząsteczka LDL
- PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) - inhibitor aktywatora plazminogenu 1
- PBS (*phosphate saline buffer*) – bufor fosforanowy
- RAA (*renin angiotensin aldosterone*) – oś renina–angiotensyna-aldosteron
- SAA (*serum amyloid A*) – surowiczy amyloid A

SMA (*smooth muscle actin*) – α -aktyna mięśniówki gładkiej

TF (*tissue factor*) - czynnik tkankowy

TGF- β (*transforming growth factor beta*) – transformujący czynnik wzrostu beta

Th lymphocyte (*T helper*) – limfocyt T pomocniczy

TLR (*Toll-like receptor*) - receptor Toll podobny

TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworów alfa

Treg (*regulatory T cells*) – limfocyt T regulatorowy (dawniej zwany supresorowym)

sVCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) – rozpuszczalna w osoczu adhezyna komórek naczyń typu 1

VLDL (*very low density lipoprotein*) - lipoproteina o bardzo małej gęstości

I. WSTĘP

I.1 Miażdżyca

Miażdżyca tętnic jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych [112, 156, 157]. To przewlekła choroba tętnic, cechująca się tworzeniem charakterystycznych zmian w ścianie naczynia, z naciekami zapalnymi, gromadzeniem lipidów i włóknieniem. Aktualna wiedza o patofizjologii miażdżycy pochodzi głównie z badań prowadzonych na modelach zwierzęcych, zwłaszcza na myszach wrażliwych na rozwój choroby, wskutek pozbawienia ich genów dla apolipoproteiny E lub receptora LDL [197].

Wiek XX był erą pojmowania miażdżycy jako wyłącznie odkładania się cholesterolu i lipoprotein w ścianie naczyń, z kulminacją tego poglądu w postaci serii przeprowadzonych na wielką skalę badań klinicznych, ukazujących jednoznacznie, że skorygowanie hipercholesterolemii zmniejszało znacząco zachorowalność i śmiertelność w miażdżycy tętnic wieńcowych [53, 144, 173, 196].

Niemal do końca lat 90. zakładano, że miażdżyca rozwija się jako przewlekła odpowiedź na uraz, który powoduje utratę komórek śródbłonna [152]. Uznawano ją przede wszystkim za chorobę zwyrodnieniową [153-155]. Około 20 lat temu badacze zaczęli jednak w coraz większym stopniu skupiać się na innym, dotychczas nieuwzględnianym, aspekcie patogenetycznym miażdżycy — procesie zapalnym.

W 1986 roku Hansson *i wsp.* przy użyciu przeciwciał monoklonalnych odkryli, że małe komórki o okrągłym jądrze, obecne w blaszce miażdżycowej, które dotąd określano jako „małe monocyty”, są limfocytami T [94]. Kilka lat później stwierdzili oni, że limfocyty te jako antygen rozpoznają utlenione cząsteczki lipoprotein o małej gęstości (LDL) — oxLDL [185]. Ponadto w wielu doniesieniach raportowano o

istnieniu korelacji pomiędzy miażdżycą a obecnością co najmniej 2 typów mikroorganizmów zakaźnych: *Chlamydia pneumoniae* i *Herpes simplex virus* [191].

Zaczęto się więc zastanawiać, czy proces zapalny nie bierze udziału w miażdżycy. Te rozważania początkowo jednak przyjmowano z dużym sceptycyzmem. Brakowało bowiem jednoznacznego dowodu na istotny wpływ zapalenia na rozwój miażdżycy. Uzyskano go dzięki nowemu zwierzęcemu modelowi miażdżycy — myszy, u której zastosowano technikę celowania genowego (*gene-targeting*), za której wynalezienie Mario R. Capecchi (Stany Zjednoczone), Martin J. Evans (Wielka Brytania) oraz Oliver Smithies (Stany Zjednoczone) otrzymali w 2007 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny.

Dlatego też w 1999 roku Russell Ross ogłosił, że miażdżycą jest chorobą zapalną [156, 157]. Zapalenie występuje jako odpowiedź na czynnik destabilizujący miejscową homeostazę. Czynniki powodującymi aktywację makrofagów w ścianie tętnic poprzez receptor Toll-podobny (TLR) są: utlenione cząsteczki lipoprotein o małej gęstości LDL (oxLDL), białko szoku cieplnego 60 (HSP60) oraz endotoksyny bakteryjne [76].

Pierwszym etapem rozwoju miażdżycy jest dysfunkcja śródbłonna. Dotyczy to przede wszystkim regionów rozgałęzień tętniczych, gdzie przepływ krwi często nie ma charakteru laminarnego. Stąd predylekcja do rozwoju miażdżycy w tych miejscach. Tu następuje odkładanie się cząsteczek LDL w przestrzeni podśródbłonkowej. Akumulacja LDL jest zwiększona, gdy stężenie LDL w surowicy krwi jest zwiększone. Cząsteczka LDL dyfunduje pasywnie i jej odkładanie się w ścianie naczynia wydaje się wynikać z interakcji pomiędzy apolipoproteina B cząsteczki LDL a proteoglikanami macierzy [13].

Udowodniono, że niezmienione cząsteczki LDL są zbyt wolno „pobierane” przez makrofagi, aby spowodować ich przekształcenie w komórki piankowe. Zasugerowano więc, że cząsteczka LDL zostaje „zmodyfikowana” w ścianie naczynia. Najbardziej znaczącą modyfikacją jest utlenienie (oksydacja) lipidów [65]. W jej wyniku powstaje tak zwana „minimalnie utleniona” cząsteczka LDL. W wyniku powstania tych cząstek jako „obcych” dla organizmu następuje reakcja zapalna [64, 137]. Zanim „minimalnie utleniona” cząsteczka LDL zostanie sfagocytowana przez makrofagi, musi ulec dalszej modyfikacji do „wysocze utlenionej” LDL. Szybki wychwytywanie takich zmienionych cząstek LDL przez makrofagi zachodzi poprzez receptory zmiatające [186]. Następnym etapem jest „prezentacja antygenów” limfocytom T przez komórki dendrytyczne. Antygenem tym może być fragment „strawionej” przez makrofag, utlenionej lipoproteiny LDL, białko szoku cieplnego 60 (HSP60), β_2 glikoproteina I lub fragmenty antygenów bakteryjnych [73].

W wyniku oddziaływania tych komórek następuje odpowiedź immunologiczna typu T helper 1 (komórkowa) lub typu T helper 2 (humoralna). Obecnie uważa się, że odpowiedź typu Th_1 i jej mediatorzy: interferon gamma ($IFN-\gamma$), czynnik martwicy nowotworów ($TNF-\alpha$), interleukina 1, interleukina 12 oraz interleukina 18 działają przyspieszająco na rozwój miażdżycy, podczas gdy odpowiedź typu limfocytów Treg (dawniej zwanych limfocytami T supresorowymi) i jej mediatorzy: transformujący czynnik wzrostu beta ($TGF-\beta$) oraz interleukina 10 hamują rozwój miażdżycy [43].

Stabilna blaszka miażdżycowa najczęściej posiada względnie grubą pokrywą włóknistą chroniącą jądro lipidowe przed zetknięciem z krwią. W niestabilnej blaszce obserwuje się duże jądro lipidowe ze względnie cienką pokrywą włóknistą. W obrębie tak zmienionej blaszki czynniki prozapalne produkowane przez limfocyty T (jak $IFN-\gamma$) wydają się odgrywać kluczową rolę, z jednej strony zmniejszając produkcję przez

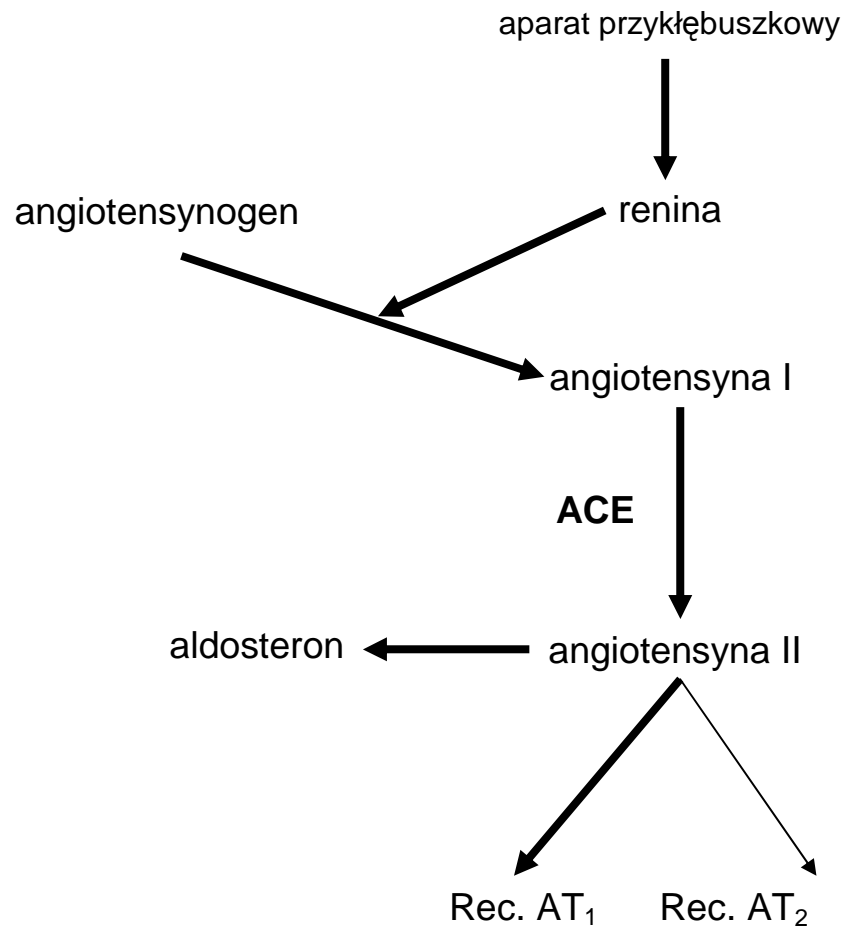
mięśniówkę gładką macierzy zewnątrzkomórkowej, z drugiej zaś — zwiększając produkcję metaloproteinaz przez makrofagi [177].

Miażdżycza jest zatem przewlekłą chorobą zapalną, w większości przypadków zapoczątkowaną i rozwijającą pod wpływem hipercholesterolemii. Hipercholesterolemię oraz zapalenie określono jako „wspólników przestępstwa” (*partners of crime*) [183]. Koncepcja miażdżycy jako zapalenia ukształtowała się dopiero w ostatnich latach, lecz obecnie jej wartość jest niekwestionowana, co wiąże się z określonymi konsekwencjami terapeutycznymi [88].

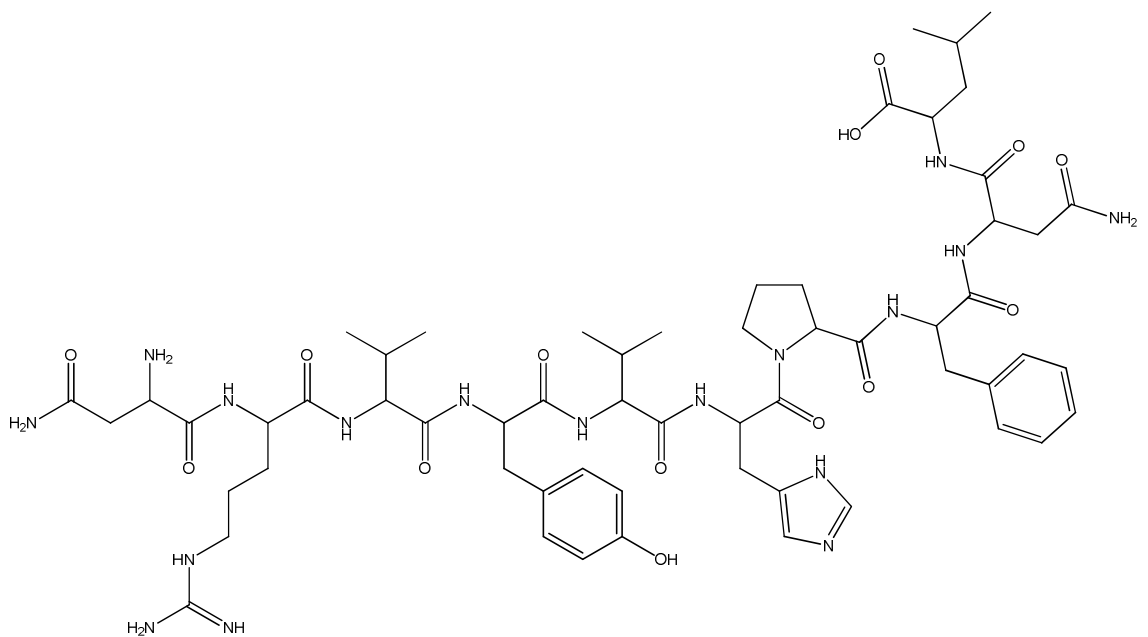
I.2 Układ renina – angiotensyna – aldosteron

System renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) odgrywa kluczową rolę w regulacji układu sercowo-naczyniowego. Peptydy angiotensynowe wywierają potężny wpływ na układ krążenia i gospodarkę wodno-elektrolitową zarówno bezpośrednio, jak i na drodze regulacji nerwowej oraz za pośrednictwem aldosteronu. Modulacja systemu RAA jest podstawową strategią leczenia nadciśnienia tętniczego oraz niewydolności serca.

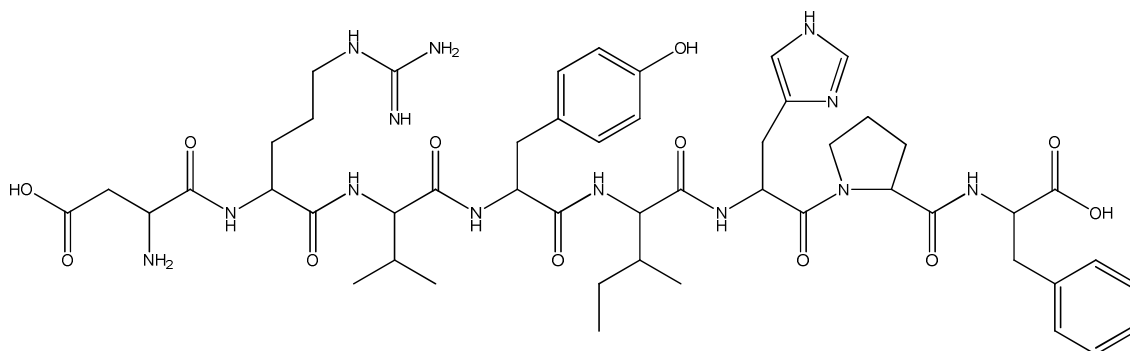
W „klasycznym” opisie systemu RAA, pod wpływem spadku ciśnienia tętniczego krwi, zmniejszenia stężenia jonów sodu w osoczu lub pobudzenia receptorów β -adrenergicznych - z aparatu przykłębuszkowego nerek uwalniany jest enzym proteolityczny renina (ryc. 1). Działa on na α -globulinę osocza – angiotensynogen, odszczepiając od niego dekapeptyd angiotensynę I (AT I) (ryc. 2). Ta z kolei pod wpływem enzymu konwertazy angiotensyny (*angiotensin converting enzyme* - ACE) przekształcana jest do oktapeptydu - angiotensyny II (AT II) (ryc. 3) - silnej substancji bioaktywnej. ACE jest karboksydazą dipeptydową i spełnia równocześnie rolę kininazy II, która rozkłada m.in. bradykininę do nieaktywnych peptydów.



Ryc. 1. „Klasyczne” ujęcie systemu RAA



Ryc. 2. Angiotensyna I ($\text{H}_2\text{N}-\text{Asp}-\text{Arg}-\text{Val}-\text{Tyr}-\text{Ile}-\text{His}-\text{Pro}-\text{Phe}-\text{His}-\text{Leu}-\text{COOH}$).



Ryc. 3. Angiotensyna II ($\text{H}_2\text{N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$).

I.3 Rola angiotensyny II

Angiotensyna II powoduje:

1. bezpośredni silny skurcz naczyń krwionośnych (40-krotnie silniejszy niż po noradrenalinie) - poprzez aktywację receptora AT_1 , który m.in. przez białko G_q aktywuje fosfolipazę C
2. wzrost uwalniania noradrenaliny z synapsy sympatycznej
3. wzrost produkcji aldosteronu w korze nadnerczy
4. wzrost wydzielania hormonu antydiuretycznego (wazopresyny) z przysadki mózgowej
5. pobudzenie ośrodka pragnienia
6. *remodeling* mięśnia sercowego i naczyń krwionośnych, polegający na rozroście komórek. AT II jest bowiem jednym z najważniejszych peptydowych czynników wzrostu.
7. działanie arytmogenne
8. wydzielanie reniny
9. obkurczenie mięśniówki gładkiej naczyń doprowadzających krew do kłębuszków nerkowych, zmniejszając w ten sposób przesączanie kłębuszkowe

10. pobudzenie stanu zapalnego

11. działanie promiażdżycowe

Istnieją dwa typy receptorów dla AT II:

AT₁ – „klasyczny”, powodujący poniżej wymienione działania AT II. Mechanizm działania: między innymi przez białko G_q aktywuje fosfolipazę C.

AT₂ - rzadziej występujący, którego pobudzenie wywołuje efekt hipotensyjny, natriuretyczny i antyproliferacyjny (a więc przeciwny do działania receptora AT₁) Aktywacja receptorów AT₂ prowadzi do zwiększonego wytwarzania tlenu azotu, prostacykliny i bradykininy, otwarcia kanałów potasowych i hamowania aktywności kanałów wapniowych T [102].

AT II posiada szereg potencjalnych mechanizmów, poprzez które zwiększa proces aterosogenezy [40, 76]. Po pierwsze, może ona niebezpośrednio wpływać na powstawanie miażdżycy poprzez efekty hemodynamiczne, wynikające ze zwiększonego ciśnienia tętniczego krwi. Po drugie, wykazano, że AT II nasila szereg zjawisk, bezpośrednio prowadzących do rozwoju miażdżycy: stymuluje rekrutację monocytów, aktywację makrofagów, nasila stres oksydacyjny. Zjawiska te pojawiają się niezależnie od wzrostu ciśnienia tętniczego krwi [126].

Angiotensyna II wykazuje silne działanie promiażdżycowe, związane także ze stymulacją wytwarzania białka VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) – adhezyny komórek naczyń, z aktywacją błonowego enzymu NADPH oksydazy naczyń, z aktywacją komórkowych białek regulujących procesy proliferacyjne, z działaniem prozakrzepowym [wzrost uwalniania inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (*plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) oraz czynnika tkankowego (*tissue factor* - TF)], z hamowaniem śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (*endothelial nitric oxide*

synthase - eNOS), ze zwiększeniem oksydatywnej modyfikacji LDL, wreszcie ze zwiększeniem ekspresji interleukiny-6 i indukowaniem stanu zapalnego naczyń.

I.4 Leki działające na układ RAA

Aktywacja osi renina – angiotensyna II – aldosteron jest podstawą patofizjologii wielu chorób układu sercowo-naczyniowego (nadciśnienie tętnicze, niewydolność serca, remodeling serca po zawale, niestabilna blaszka miażdżycowa) [15, 28].

Blokowanie powstawania i działania AT II jest ważnym celem terapeutycznym w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. Dlatego też w ostatnich dekadach włożono wiele wysiłku w stworzenie leków hamujących oś renina – AT II – aldosteron. Uzyskano zatem blokery receptora aldosteronowego, inhibitory konwertazy angiotensyny (*angiotensin converting enzyme inhibitors* – ACEI), następnie blokery receptora angiotensynowego typu AT₁ (*angiotensin receptor blockers* – ARB) Niedawno zaś do kliniki trafił pierwszy inhibitor reniny – aliskiren [179].

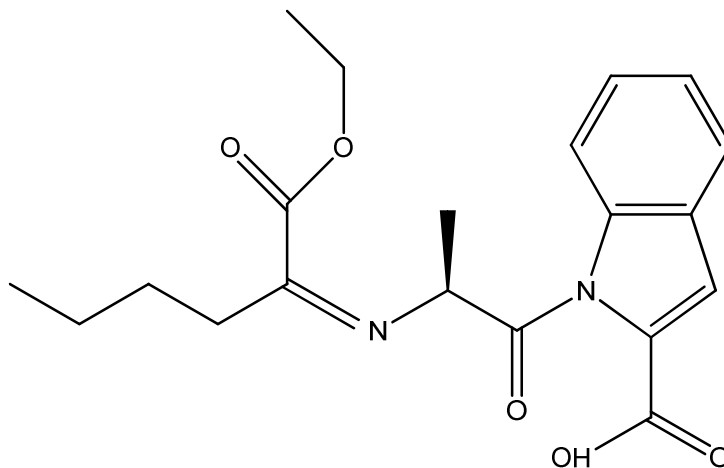
Inhibitory konwertazy angiotensyny to ważna grupa leków. Prototypem był teprotyd, wyizolowany w latach 70-tych z jadu żmii brazylijskiej *Bothrops jararaca*.

Można podzielić ACEI ze względu na powinowactwo do krążącej i tkankowej frakcji ACE na: inhibitory „osoczowe” - hamujące głównie krążącą frakcję ACE, takie jak: kaptopryl, enalapryl, cilazapryl, benazepryl oraz na inhibitory „tkankowe” – leki wysoce lipofilne, obdarzone zdolnością penetracji tkankowej i w wysokim stopniu hamujące tkankowe układy ACE: chinapryl, fosynopryl, peryndopryl, ramipryl i trandolapryl.

Zastosowanie kliniczne ACEI to: nadciśnienie tętnicze, przewlekła niewydolność krążenia, leczenie zawału mięśnia serca, nefropatia cukrzycowa oraz

leczenie stabilnej choroby wieńcowej.

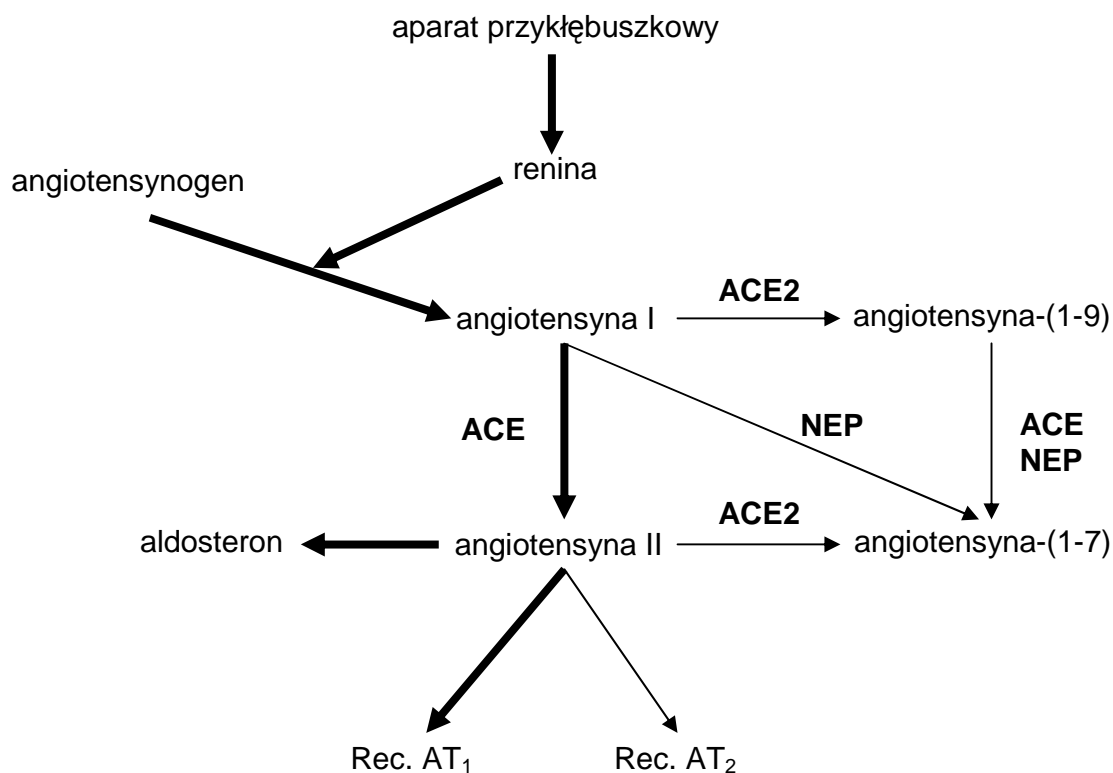
Peryndopryl to kwas (2S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-etoksy-1-oksopentan-2-ylo]amino]propanoylo]-2,3,3a,4,5,6,7,7a-oktahydroindolo-2-karboksylowy (ryc. 4).



Ryc. 4. Budowa chemiczna peryndoprylu.

I.5 Nowe spojrzenie na oś RAA

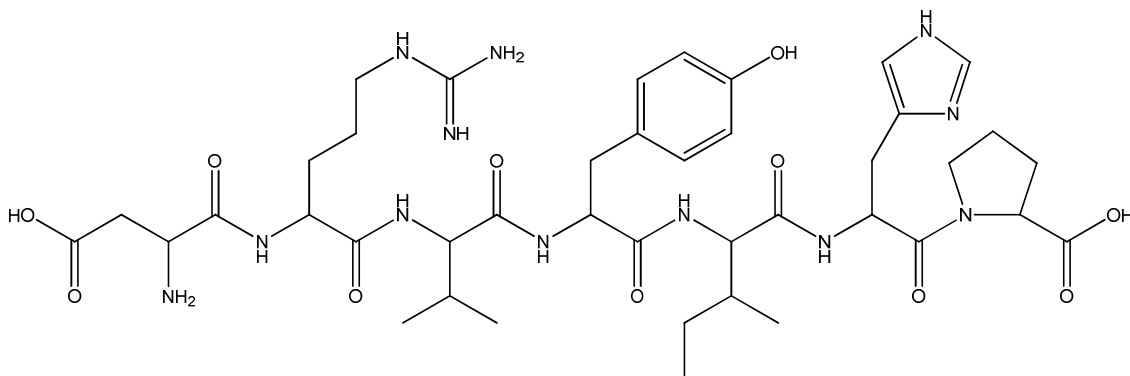
Rozumienie systemu renina – angiotensyna uległo wielkim zmianom w ciągu ostatnich dwudziestu lat [11, 23]. Podczas tego okresu opisano nowe komponenty funkcjonalne [200] oraz drogi przemiany [27, 63, 103, 162, 167]. Stało się również jasne, że wszystkie bioaktywne peptydy angiotensynowe mogą być generowane nie tylko w krążeniu systemowym, ale także w szeregu tkanek i narządów. Nastąpiła zatem istotna zmiana w pojmowaniu funkcjonowania układu RAA , co obrazuje rycina 5.



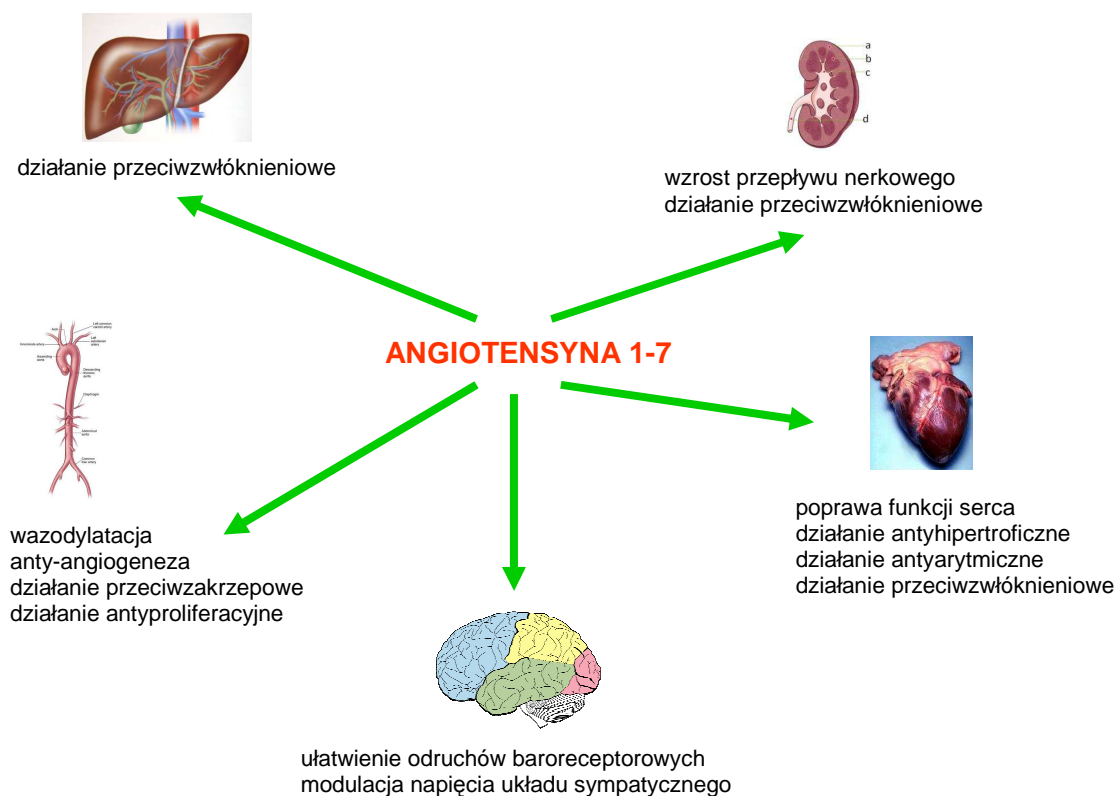
Ryc. 5. Nowe ujęcie osi renina – angiotensyna – aldosteron.

Stwierdzono bowiem, że oprócz AT II, z AT I powstają także inne peptydy, jak nonapeptyd AT-(1-9) i heptapeptyd AT-(1-7) (ryc. 6). Ta ostatnia posiada biologiczne działanie *przeciwstawne* w stosunku do AT II (ryc. 7).

Odkryto również enzym ACE2 (homolog ACE), który w odróżnieniu od ACE odszczepia tylko jeden aminokwas z peptydów. Poprzez działanie tego właśnie enzymu powstaje AT-(1-7) [27] (ryc. 5).



Ryc. 6. Budowa strukturalna AT-(1-7) (H₂N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-COOH).



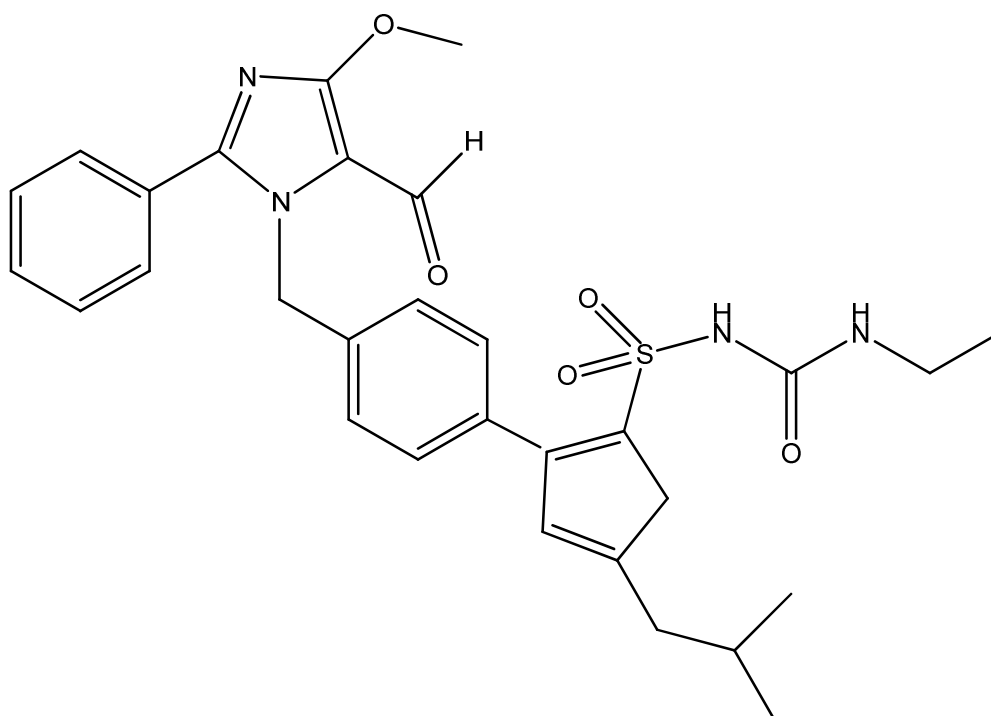
Ryc. 7. Działanie AT-(1-7) na narządy.

Angiotensyna (1-7) była przez długi czas uważana za nieaktywny produkt osi RAA [68]. Ta koncepcja zaczęła się zmieniać wraz z badaniami Schiavone *i wsp.* [174], w których wykazano, że AT-(1-7) jest tak samo zdolna do uwalniania wazopresyny z neuronów biegnących do tylnego płata przysadki mózgowej *in vitro*, oraz po badaniach Campagnole-Santos *i wsp.* [19], opisujących spadek ciśnienia tętniczego krwi po mikroiniekcji bardzo niskich dawek (femtomoli) AT-(1-7) do jądra pasma samotnego (*nucleus tractus solitarii*).

Angiotensyna (1-7) jest zatem aktywnym peptydem osi RAA [69, 166, 167]. Przeciwdziała ona wazokonstrykcji poprzez uwalnianie tlenku azotu i prostacykliny [9]. Ponadto hamuje mitogenne, arytmogenne i prozakrzepowe działanie AT II [104, 105]. Nasilając natriurezę i diurezę, działa przeciwnie do retencji sodu i wody, powodowanej przez AT II. Wykazano, że aktywności wazodylatacyjne oraz diuretyczne AT-(1-7) są

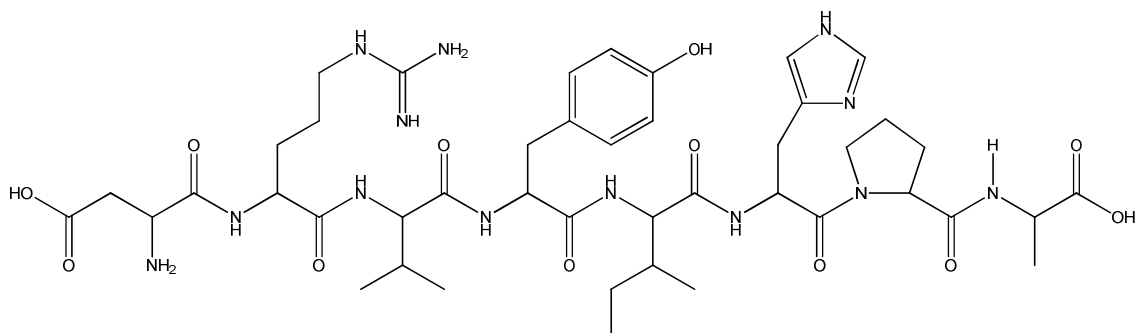
mediowane przez *Mas* – receptor związany z białkiem G [164, 170]. AT-(1-7) zwiększa również aktywność bradykininy (a poprzez nią syntezę śródbłonkową tlenu azotu) i antagonizuje hipertroficzne działanie AT II [158].

W 2002 roku zsyntetyzowano związek, będący niepeptydowym agonistą receptora *Mas* dla angiotensyny (1-7): AVE 0991 [108, 139, 165, 206]. Jest to 5-formylo-4-metoksy-2-fenylo-1-[[4-[2-etylo-aminokarbonylsulfonamido-5-izobutylo-3-tienylo]-fenylo]-metylo]-imidazol (ryc. 8).



Ryc. 8. Budowa chemiczna AVE 0991.

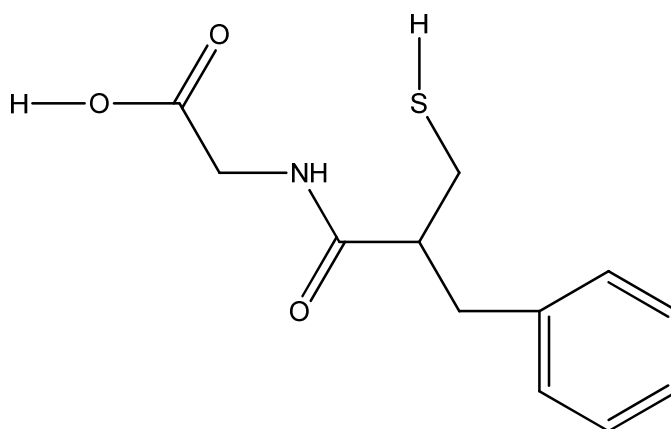
W latach 90. stworzono także peptydowego antagonistę AT-(1-7): związek A-779 [(D-Alanina⁷)-Angiotensyna (1-7)] [95, 163, 167, 198] (ryc. 9).



Ryc. 9. Budowa chemiczna A-779.

Obojętna endopeptydaza (*neutral endopeptidase* – NEP) zaś jest głównym enzymem przekształcającym AT I oraz AT-(1-9) w AT-(1-7) (ryc. 5) [119, 205]. Dlatego hamowanie tego enzymu blokuje powstawanie AT-(1-7) [32].

Jednym z inhibitorów NEP jest tiorfan: kwas 2-{{2-(fenylometylo)-3-sulfanylopropanolo}amino} octowy (ryc. 10).



Ryc. 10. Budowa chemiczna tiorfanu.

I.6. Rys historyczny odkrywania osi RAA i ACEI

Renina została odkryta w roku 1898 przez Roberta Tigerstedta - profesora fizjologii w Instytucie Karolinska w Sztokholmie [7]. W 1934 roku Harry Goldblatt wyindukował eksperymentalne nadciśnienie u psa, częściowo zaciskając jego tętnicę nerkową – potwierdzając tym samym rolę nerek w zapoczątkowaniu pobudzenia osi renina – angiotensyna – aldosteron (RAA). Angiotensyna II (AT II) została po raz pierwszy wyizolowana w latach 30., przez dwie niezależne od siebie grupy: pod kierownictwem Irvina Page'a w laboratorium firmy Eli Lilly w Indianapolis (USA) oraz w kierowaną przez Bernarda Houssay'a w Buenos Aires, pod odpowiednimi nazwami („*angiotonina*” oraz „*hipertensyna*”). Ostatecznie oktapeptyd ten został zsyntetyzowany w 1957 roku jednocześnie przez dwie grupy: pod dalszym kierownictwem Irvina Page'a – pracującego tym razem w Cleveland (USA) oraz przez Roberta Schwytzera i wsp. w laboratorium firmy Ciba w Bazylei (Szwajcaria). Zaś kluczowa rola enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) w obrębie układu RAA została opisana po raz pierwszy w 1956 roku przez L.T. Skeggsa *i wsp.* [178].

Pierwsze substancje blokujące układ RAA odkrył w 1965 roku uczeń odkrywcy bradykininy, profesora Rocha e Silva - Sergio Ferreira, pracując w Londynie w laboratorium Sir Johna Vane'a. Wyosobnił on czynnik zwany *bradykinin potentiating factor* (BPF). Była to grupa peptydów wyodrębnionych z jadu żmii brazylijskiej *Bothrops jararaca*, blokujących *in vitro* rozpad bradykininy, a równocześnie przekształcanie angiotensyny I do II dzięki zahamowaniu kininazy 2, zwanej obecnie konwertazą angiotensyny (*angiotensin converting enzyme* – ACE).

Era leków hamujących ACE zaczęła się w roku 1974, w którym zsyntetyzowano i po raz pierwszy zastosowano w leczeniu chorych z nadciśnieniem tętniczym, dożylny inhibitor ACE, nonapeptyd – teprotyd. Pierwszym doustnym lekiem z tej grupy był kaptopryl.

I.7 Najnowszy model eksperymentalny miażdżycy

Od roku 1992 mysz stała się znakomitym obiektem badań nad miażdżycą, zastępując dotychczasowe modele zwierzęce [42, 86, 122, 132, 133, 142, 149]. Wówczas to bowiem zostały stworzone, prawie równocześnie w dwóch laboratoriach w Stanach Zjednoczonych, myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E [*apolipoprotein E (apoE) – knockout*] [138, 140]. Myszy te zostały wkrótce określone jako „wiarygodny i użyteczny, najlepszy obecnie model zwierzęcy miażdżycy” [120].

„*Gene targeting*” (celowanie genowe) – technika, dzięki której powstały wyżej wymienione myszy - polega na homologicznej wymianie genów. W procesie tworzenia myszy *apoE knockout* (inne nazwy angielskie: *apoE null* lub *apoE deficient*), następuje zastąpienie prawidłowego genu kodującego apolipoproteinę E przez gen zmutowany, nie produkujący apolipoproteiny E. Taka mysz, w terminologii polskiej, posiada *znokautowany, wyłączony, zerowy* lub *zinaaktywowany* gen kodujący apolipoproteinę E. W dalszym części pracy będziemy posługiwać się dla ułatwienia najpopularniejszą nazwą: myszy *apoE-knockout* (apoE-KO).

Apolipoproteina E (apoE) jest ligandem, odpowiedzialnym za wychwytywanie z krążenia lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL – *very low density lipoproteins*), lipoprotein o pośredniej gęstości (IDL – *intermediate density lipoproteins*), lipoprotein o dużej gęstości (HDL - *high density lipoproteins*) oraz remnantów chylomikronów [14, 47, 115, 121, 187, 207]. ApoE jest syntetyzowana głównie w hepatocytach, ale jest również wytwarzana w innych komórkach – w tym w makrofagach, komórkach nerwowych i glejowych. Jest obecna w chylomikronach, IDL, VLDL i HDL i pośredniczy w wychwycie wymienionych lipoprotein w wątrobie, zarówno przez receptor LDL, jak i przez związane z nim białko LRP (*LDL receptor – related protein*).

Pierwszy model eksperymentalny miażdżycy: genetycznie zmieniony szczep myszy *apoE – knockout* stworzono w roku 1992, poprzez zastosowanie metody rekombinacji homologicznej w komórkach linii zarodkowej (*embryonic stem cells*) [138, 140, 213]. Tak zmienione komórki wszczepiano do blastocysty myszy szczepu C57BL/6J, którą zaimplantowano do macicy. Jako potomstwo uzyskano w ten sposób mysz “chimerę”, którą krzyżowano z myszą C57BL/6J (“wild type”), uzyskując w drugim pokoleniu homozygotyczne myszy *apoE – knockout* [22, 29, 67, 151].

Wyłączenie genu dla apoE spowodowało powstanie myszy o fenotypie o całkowitym braku ekspresji apoE, jednakże z zachowaniem płodności i żywotności [14].

Myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E, w przeciwieństwie do wszystkich innych modeli zwierzęcych, rozwijają miażdżycę spontanicznie, bez konieczności stosowania diety wysokocholesterolowej [74, 75, 81, 135]. Jednakże w przeciwieństwie do człowieka, najwcześniejsze i najbardziej zaawansowane zmiany występują w zatokach wieńcowych aorty, należących do tzw. „**korzenia aorty**” („*aortic root*”), czyli części aorty znajdującej się jeszcze w obrębie mięśnia serca.

Większość pozostałych modeli miażdżycy rozwija tylko morfologicznie wczesne zmiany [nacieki tłuszczowe ("*fatty streaks*"), bez złogów lipidowych pozakomórkowych]. Problem ten rozwiązało stworzenie modelu myszy apoE-*knockout*, które rozwijają zmiany miażdżycowe zarówno wczesne, jak i zaawansowane [4, 14, 57, 120, 130]. Wykazano podobieństwo morfologiczne zaawansowanych zmian miażdżycowych u myszy apoE-*knockout* do zmian u człowieka. Ponadto myszy te rozwijają nadciśnienie tętnicze [34, 46, 92, 141, 211].

Na diecie niskotłuszczowej i niskocholesterolowej u myszy tych surowiczy poziom cholesterolu wynosi około 494 mg/dl, w porównaniu z 60 mg/dl u myszy C57BL/6J. Już w wieku 10 tygodni u myszy apoE – *knockout* rozwijają się wczesne zmiany miażdżycowe w części aorty w pobliżu zastawek, mieszczącej się w obrębie mięśnia serca, których powierzchnia wynosi około $3157 \pm 437 \mu\text{m}^2$, w porównaniu z $0 \pm 0 \mu\text{m}^2$ u myszy C57BL/6J. W późniejszym wieku zmiany miażdżycowe są bardziej zaawansowane [140]. Po osiągnięciu 8-9 miesięcy następuje znamieny wzrost wielkości zmian, jak również ich komórkowej złożoności. W zależności od rodzaju eksperymentu autorzy wykorzystują myszy apoE – *knockout* w wieku od 16 do nawet 60 tygodnia życia (zwykle około 24 tygodni) [124, 150].

Stworzenie tego właśnie modelu zmieniło oblicze badań nad patogenezą miażdżycy, umożliwiło między innymi uformowanie nowej definicji miażdżycy jako przewlekłego procesu zapalnego i pozwoliło na przebadanie szeregu leków pod kątem ich ewentualnego działania przeciwmiażdżycowego [24, 55, 56, 88, 91, 131, 172, 189].

Ani hodowle komórkowe, ani badania kliniczne nie pozwalają dokonać wstępnych prób nowych możliwości terapeutycznych leków. Niedawno napisano, że stworzenie myszy z homologiczną wymianą genów („*gene-targeted*”) było prawdziwym przełomem w eksperymentalnych badaniach podstawowych nad leczeniem miażdżycy [172, 182].

II. CELE PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie na najnowszym modelu eksperymentalnym miażdżycy - myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E (apoE-*knockout* mice), pod kątem ewentualnego działania przeciwmiażdżycowego związku AVE 0991 – agonisty receptora *Mas* dla angiotensyny (1-7). W tym celu zgromadzono pięć grup (grupa kontrolna + 4 grupy z podawanymi lekami) myszy apoE-*knockout*, po 10 myszy w każdej.

Oprócz AVE 0991, pozostałym grupom myszy podawano: antagonistę receptora *Mas* – A-779, inhibitor konwertazy angiotensyny – peryndopryl oraz inhibitor obojętnej endopeptydazy – tiorfan, celem dokładniejszego zbadania wpływu AT-(1-7) na eksperymentalną miażdżycę.

Z osocza krwi mierzono poziom całkowitego cholesterolu i triglicerydów oraz cholesterolu frakcji LDL i HDL, celem stwierdzenia ewentualnego wpływu podawanych leków na profil lipidów.

Także z osocza mierzono poziom prozapalnych czynników: MCP-1, sVCAM-1, IL-6, IL-12 oraz SAA.

W grupie z podawanym AVE 0991 wykonano również pomiary rozkurczu ringów aortalnych, celem stwierdzenia wpływu leku na ewentualną dysfunkcję śródbłonna.

III. MATERIAŁ I METODY

III.1 Zwierzęta i leki

Pięćdziesiąt 8-tygodniowych samic myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (apoE – *knockout*), o podłożu genetycznym C57BL/6J [199], zakupiono w firmie Taconic (Ejby, Dania) [17, 18]. Zwierzęta te podzielono na pięć grup o liczebności n=10. Myszy były trzymane przez 16 tygodni w Zwierzętarni Katedry Immunologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UJ, w cyklu dobowym (12-h ciemności/12-h światła), w klimatyzowanym pomieszczeniu ($22.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, wilgotność $50 \pm 5\%$), przy dostępie do wody i pożywienia „chow diet” *ad libitum*.

Oprócz grupy kontrolnej, grupy eksperymentalne (w każdej n=10) otrzymywały tę samą dietę, zmieszaną z **AVE 0991** (dar z firmy Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt nad Menem, Niemcy) w dawce $0,58 \mu\text{mol}$ ($0,28 \text{ mg}$)/kg m.c./dzień, z **peryndoprylem** (Sigma-Aldrich Polska, Poznań) w dawce $0,4 \text{ mg/kg}$ m.c./dzień oraz z **tiorfanem** (Sigma-Aldrich Polska, Poznań) w dawce $2,5 \text{ mg/kg}$ m.c./dzień. Leki te zostały zmieszane z dietą “na zimno” fabrycznie przez firmę Ssniff (Soest, Niemcy) [89, 90]. Z kolei **A-779** [(D-Alanina⁷)-Angiotensyna (1-7)] (Bachem AG, Bubendorf, Szwajcaria) podawany był w dawce $3,3 \text{ mg/kg}$ m.c., 3 razy w tygodniu dootrzewnowo. Dawki leków zostały ustalone na podstawie piśmiennictwa.

Metody działania na myszach miażdżycowych apoE-knockout są, jak dotąd, prowadzone w Polsce wyłącznie w Katedrze Farmakologii Collegium Medicum UJ (i zaprzyjaźnionych jednostkach krakowskich), dzięki dwuletniemu pobytowi naukowemu dr hab. med. Jacka Jawienia w latach 2001-2003, w Karolinska Institutet w Sztokholmie, w Centrum Badań Sercowo-Naczyniowych, prowadzonym pod kierunkiem światowej sławy naukowca – Profesora Görana Hanssona (obecnego przewodniczącego Rady Noblowskiej z medycyny i fizjologii).

Wszystkie procedury z udziałem zwierząt zostały zaakceptowane przez Komitet Etyczny ds. Badań na Zwierzętach Uniwersytetu Jagiellońskiego (zgoda nr Zi/496/2009).

III.2 Pobieranie narządów

W wieku 6 miesięcy myszy zostały poddane następującej procedurze [87, 134]:

1. Oznaczenie myszy.
2. Zważenie myszy.
3. Wstrzyknięcie dootrzewnowe 1000 IU Fraxiparyny (Sanofi-Synthelabo, Santea, Francja) 10 minut przed znieczuleniem.
4. Eutanazja pod znieczuleniem dootrzewnowym 10 mg Tiopentalu (Sandoz, Wiedeń, Austria), przez dokonanie translokacji rdzenia kręgowego.
5. Rozłożenie za kończyny na deseczce.
6. Polanie 70% alkoholem.
7. Rozcięcie skóry od brzucha w górę i otwarcie otrzewnej.
8. Przecięcie opłucnej, okrojenie mostka z dwóch stron i odsunięcie go do góry przez spięcie klemem.
9. Pobranie krwi przez wkłucie do prawej komory serca.
10. Osocze było uzyskiwane przez wirowanie krwi z prędkością 1000×g w 4°C przez 10 minut. Następnie jest ono składowane w plastikowych eppendorfach w -80° C.
11. Nacięcie uszka prawego przedsionka. Następnie układ krążenia perfunduje się PBS-em, nakłuwając igłą strzykawki koniuszek lewej komory, utrzymując stałe ciśnienie 100 mm Hg, aż do „zblednięcia” wątroby.

12. Odcięcie mostka i odsłonięcie grasicy, obustronne przecięcie żeber w celu poszerzenia dojścia.
13. Dalsze czynności wykonywane są pod mikroskopem
14. Wycięcie grasicy, aż do odsłonięcia łuku aorty (ryc. 11) i oczyszczenia go *in situ*.



Ryc. 11. Odsłonięty łuk aorty (z widoczną białą zabarwioną miażdżycą) (powiększenie 3 ×).

15. Odsunięcie lewego płuca i serca na bok.
16. Odsłonięcie aorty piersiowej.
17. Odcięcie aorty piersiowej od kręgosłupa i oczyszczenie jej *in situ*.
18. Odsłonięcie nerek przez wycięcie jelit i wątroby.
19. Odsłonięcie aorty brzusznej aż do rozdwojenia biodrowego oraz oczyszczenie jej *in situ*.
20. Przecięcie przepony i połączenie aorty piersiowej i brzusznej w odcinku okołonerkowym.
21. Oczyszczenie aorty *in situ* przez oddzielenie tłuszczu i przydanki.
22. Odcięcie aorty tuż przy sercu od góry i za rozdwojeniem biodrowym od dołu.
23. Zanurzenie wypreparowanej aorty w 4% roztworze formaldehydu w PBS.
24. Rozcięcie wzdłużne aorty.
25. Rozpięcie aorty na płytce woskowej przy pomocy bardzo cienkich igiełek (ryc. 12).

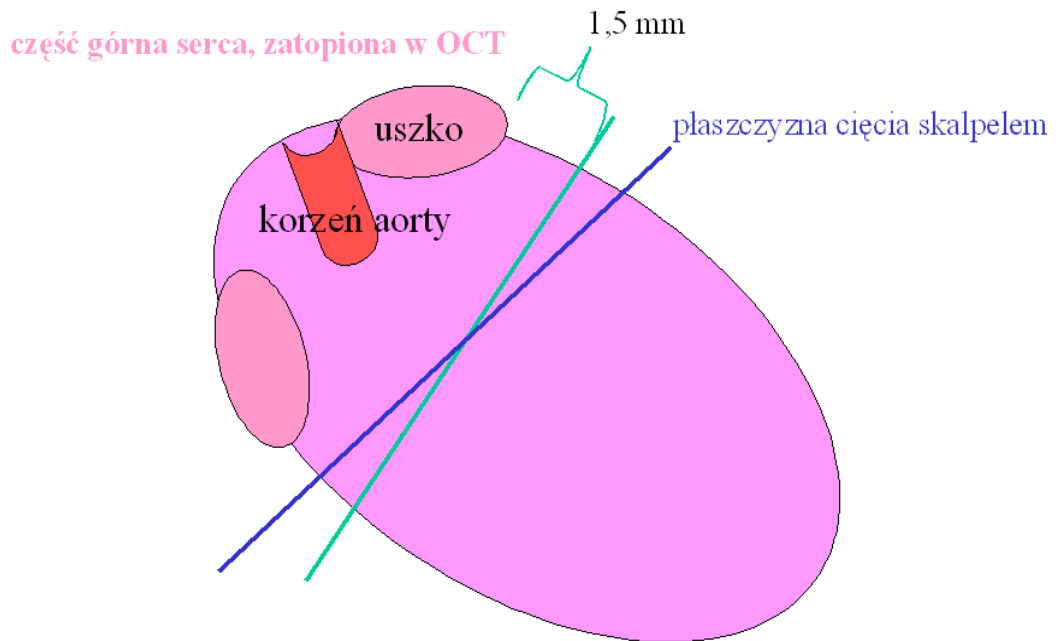


Ryc. 12. Aorta rozpięta na płytce woskowej, gotowa do barwienia.

26. Wycięcie serca, przekrojenie na pół i zanurzenie górnej części z „korzeniem aorty” w specjalnej miseczce plastikowej, wypełnionej żelem mroźeniowym (podstawą cięcia do dołu, górna część serca z „korzeniem aorty” w górze) (ryc. 13-15).



Ryc. 13. Krojenie poprzeczne serca skalpelem (powiększenie $\times 3$).

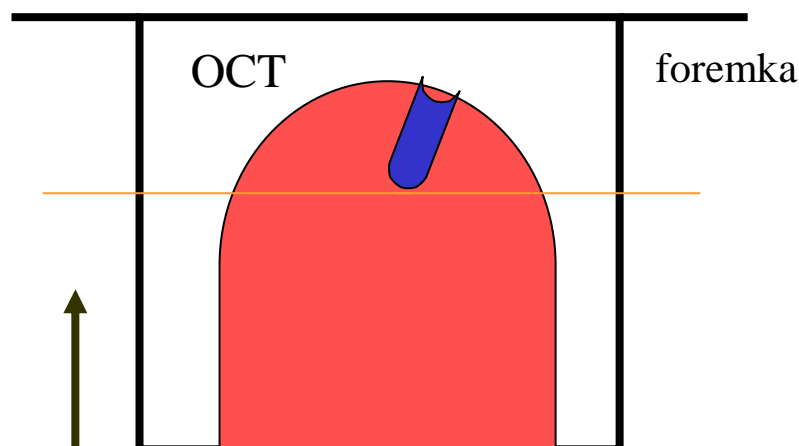


Ryc. 14. Schemat krojenia poprzecznego serca myszy skalpelem, przed zatopieniem w OCT (zmodyfikowane z [58]).

Płaszczyzna cięcia (niebieska linia) jest lekko przesunięta zgodnie z ruchem wskazówek zegara w stosunku do płaszczyzny, jaką wyznacza odległość 1.5 mm od dolnych krawędzi obu uszek (zielona linia). Jest to spowodowane dążeniem do ustawienia płaszczyzny cięcia jak najbardziej zbliżonej do prostopadłej w stosunku do „korzenia aorty”.



Ryc. 15. Przecięte serce, zanurzone w żelu OCT w plastikowej foremce.



Ryc. 16. Schemat cięcia bloczka OCT z zatopionym sercem myszy w kriostacie (zmodyfikowane z [58]).

Strzałka wskazuje kierunek cięcia ostrza kriostatu. Żółta linia wskazuje płaszczyznę dotknięcia pierwszej zastawki („*punkt zero*”). Na niebiesko zaznaczony jest „korzeń aorty”, czyli początkowa część aorty wstępującej, długości około 1 mm, znajdująca się całkowicie w obrębie mięśnia serca. [Proszę zwrócić uwagę, że „korzeń aorty” jest nachylony pod pewnym kątem do początkowej płaszczyzny cięcia. Aby móc kroić korzeń aorty *prostopadle* do jego przebiegu, w momencie osiągnięcia żółtej linii należy rozpocząć manipulacje trójwymiarowe ruchomą głowicą kriostatu].

III.3 Oznaczanie wielkości miażdżycy

A. METODA “CROSS-SECTION”

Przecięte poprzecznie serce i znajdujący się w obrębie mięśnia serca początkowy odcinek aorty wstępującej (“*korzeń aorty*”) zostały umieszczone w specjalnych plastikowych foremkach o wymiarach 15×15×5 mm (CryoMolds) (Tissue-Tek, USA), wypełnionych poprzednio po brzeg żelem mrozeniowym OCT (Optimal Cutting Temperature) (CellPath, Oxford, UK).

Foremki te natychmiast zamrożono do temperatury -80°C . Serca umieszczono w plastikowej foremce tak, aby płaszczyzna cięcia skalpelem dotykała podstawy foremki. Następnie po wyjęciu z zamrażarki, dziesięcio-mikrometrowej grubości skrawki były

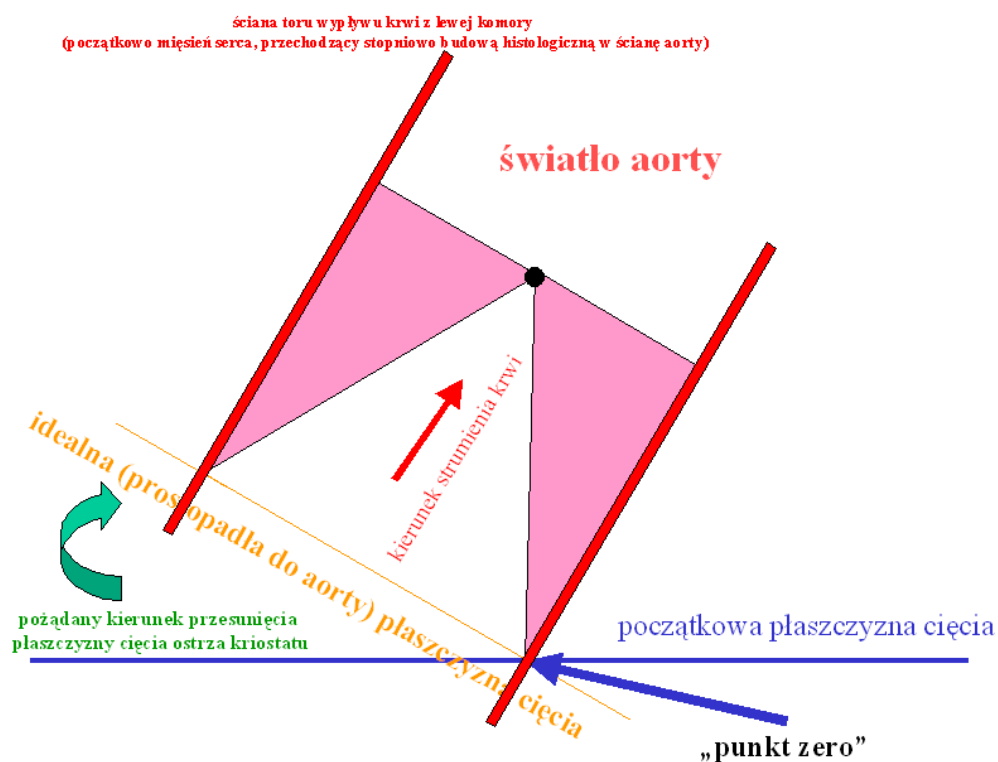
cięte w kriostacie, w temperaturze -20°C , przy użyciu standaryzowanego protokołu [89, 90] (ryc.16).

Seryjne skrawki z kriostatu (Leica, Jung CM1800, Niemcy), posiadającego tzw. „ruchomą głowicę” (niezbędną do uzyskania prawidłowego cięcia poprzecznego aorty pod kątem prostym) cięto z proksymalnego, około 1-milimetrowego odcinka aorty wstępującej, zwanej "korzeniem aorty".

Osiem skrawków zbierano w odstępach 100- μm , rozpoczynając od odległości 100- μm od pojawienia się wszystkich trzech płatków zastawki aortalnej według poniższego protokołu:

Sekcja początkowego odcinka aorty ("*aortic root*") myszy, idąc w górę, aż od poziomu dolnego brzegu zastawek. W momencie dojścia do poziomu początku pierwszej zastawki („punkt zero”), korzystając z ruchomej głowicy, bloczek należy ustawić przestrzennie tak, aby w skrawkach były widoczne równocześnie wszystkie trzy zastawki. Od tego momentu tnie się w górę co 100 μm skrawki o grubości 10 μm , aż do wysokości 800 μm powyżej pierwszej sekcji (ryc. 17-19).

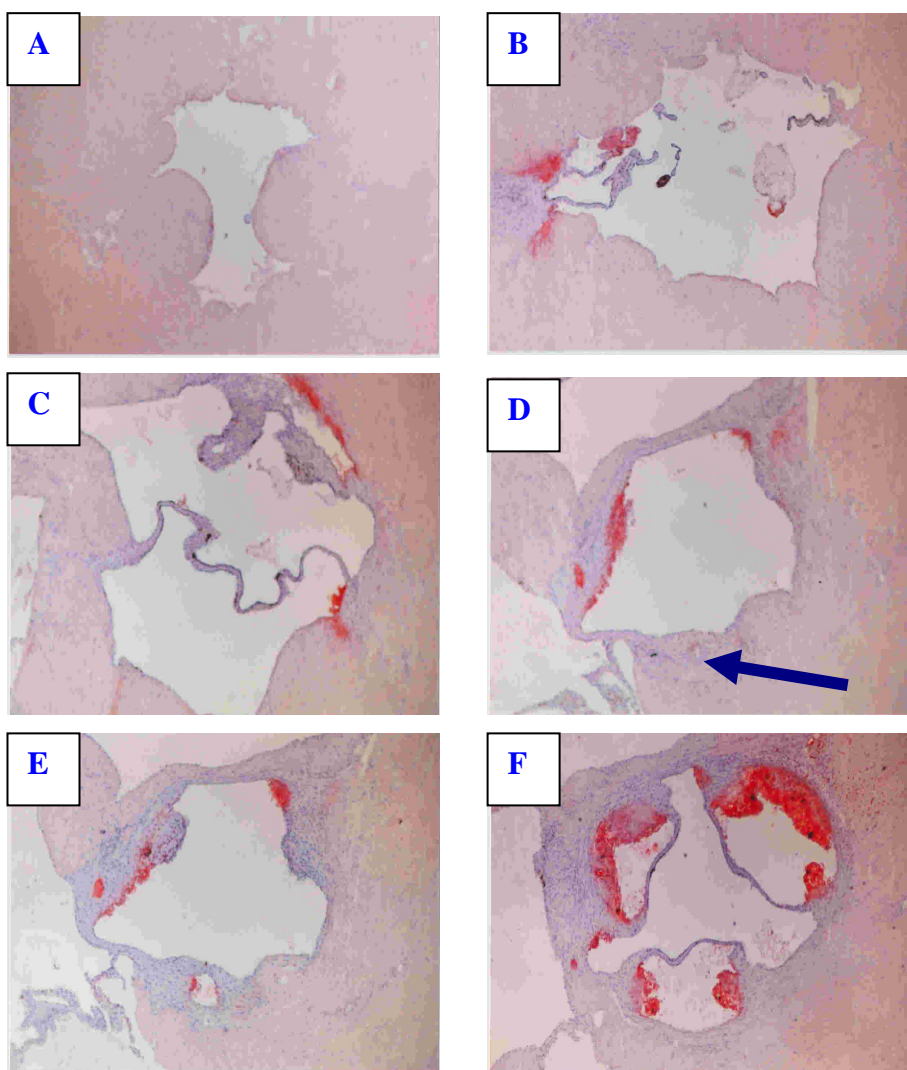
Sekcje te muszą być wykonane w kriostacie, ponieważ krojenie klasyczną metodą parafinową wypłukałoby lipidy, niezbędne do zobrazowania blaszki miażdżycowej [44].



Ryc. 17. Schemat obrazujący trudności związane z uzyskaniem w kriostacie cięcia poprzecznego, prostopadłego do osi aorty (zmodyfikowane z [58]).

Na różowo zaznaczone są płatki zastawki aortalnej w przekroju poprzecznym. „*Punkt zero*” oznacza moment, w którym podczas cięcia w kriostacie uwidacznia się początek pierwszego płatka (proszę porównać z ryc. 18 D).

Aby uzyskać cięcia prostopadłe do osi „korzenia aorty”, należy zmieniać (pod kontrolą skrawków oglądanych w mikroskopie) płaszczyznę cięcia ostrza kriostatu tak, aby stała się „idealną płaszczyzną cięcia” (żółta). Służy temu specjalna procedura („North South West East”) zmiany położenia ruchomej głowicy kriostatu, w zależności od ustawienia przestrzennego uzyskanego „punktu zero” (*nie przytaczana w niniejszej pracy dla uproszczenia*).



Ryc. 18. Krojenie mięśnia serca w kriostacie, idąc płaszczyzną ostrza kriostatu w górę, w kierunku „korzenia aorty” (zmodyfikowane z [58]).

A. Początek krojenia – na obrazie widoczny sam mięsień serca

(Proszę pamiętać, że w rzeczywistości podczas krojenia skrawków w kriostacie, pokazane poniżej obrazy widoczne pod mikroskopem są bezbarwne).

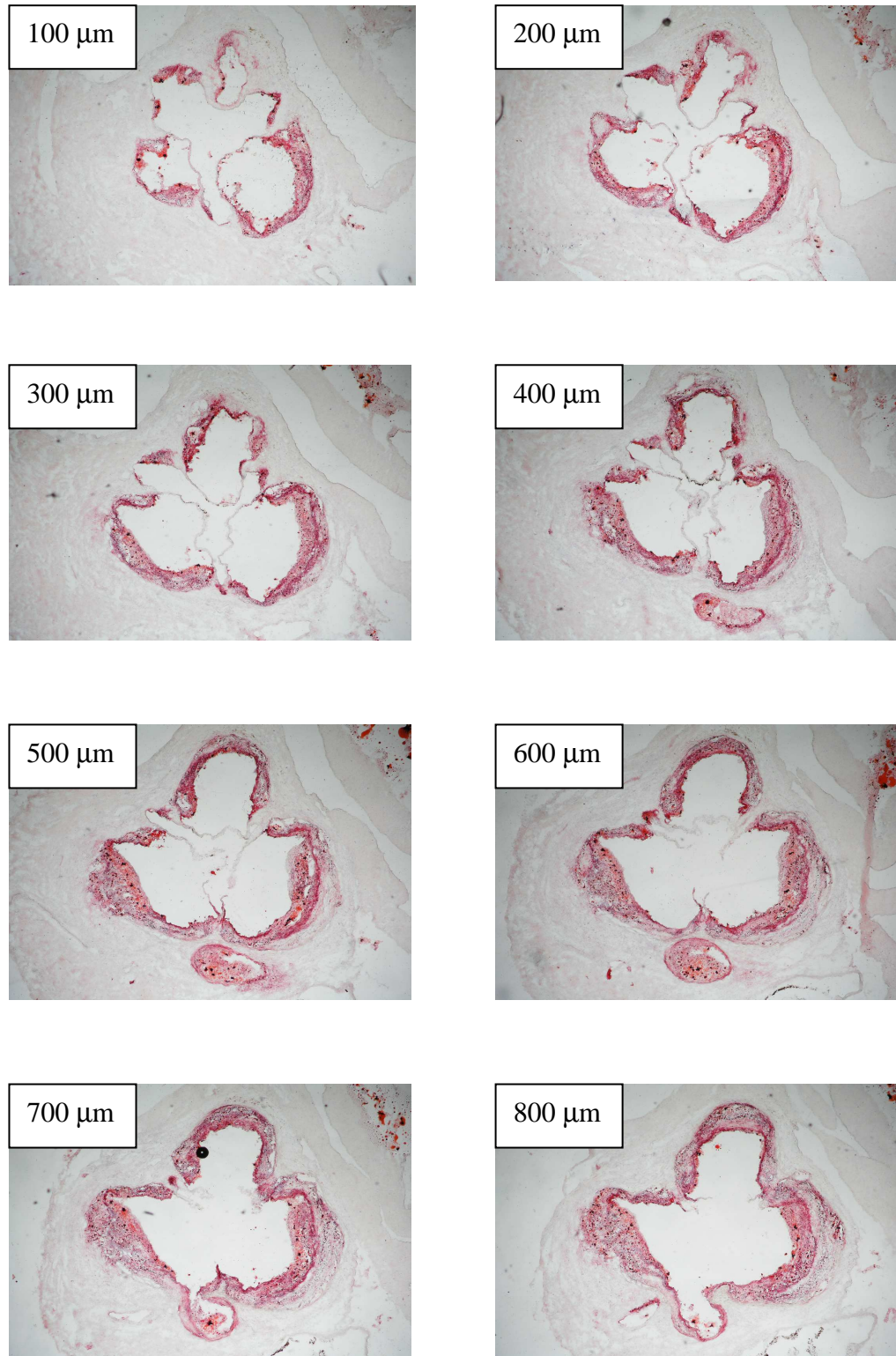
B. Dalsze krojenie – pojawiają się tzw. „robaczki” („worms”)

C. „Robaczki” zaczynają formować ściany naczyń – aorty i pnia płucnego

D. Aorta. Proszę zwrócić uwagę na (zaznaczony niebieską strzałką) pojawiający się tzw. „punkt zero” na płątku zastawki w dolnej części ryciny. Od tego momentu należy wykorzystać ruchomość głowicy kriostatu i tak nastawić przestrzennie bloczek, aby na przekroju były widoczne wszystkie trzy płątki (aby płaszczyzna cięcia była prostopadła do osi długiej „korzenia aorty”).

E. Pierwszy płatek jest wyraźnie widoczny, a pozostałe dwa zaczynają się tworzyć

F. Trzy płątki zastawki aortalnej w pełni widoczne



Ryc. 19. Obraz kolejnych sekcji poprzecznych „korzenia aorty” co 100 μm, licząc od „punktu zero”, w którym podczas cięcia pojawia się pierwszy płatek.

Po utrwaleniu w 4% paraformaldehydzie (pH 7.0), skrawki barwiono hematoksyliną Meyera oraz czerwieńią oleistą (oil red-O) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) według poniższego protokołu:

1. „*stock solution*”: 0.5-1g oil red - O (czerwień oleista) w 100 ml isopropanolu (propanol 2). Roztwór nasycony.
2. „roztwór roboczy”: 24 ml „*stock solution*” + 16 ml wody destylowanej. Pozostawić na 10-15 minut przed użyciem.
3. zamrożone sekcje utrwalić w 4% roztworze formaldehydu w PBS (10 minut)
4. przemyć wodą destylowaną
5. zanurzyć w 60% roztworze isopropanolu (1-2 minut)
6. zanurzyć w oil red - O (10-20 minut)
7. przemyć wodą (5 minut)
8. hematoksylina (15-30 sekund)
9. przemywać w ciepłej wodzie, aż jądra komórkowe staną się niebieskie
10. zamknąć preparat w rozpuszczalnym w wodzie medium

Skrawki zabarwione ORO były analizowane pod mikroskopem Olympus BX50 (Olympus, Tokio, Japonia) i użyte do oceny ilościowej. Obrazy z aorty zbierano przy użyciu aparatu cyfrowego Olympus Camedia 5050 i przechowywano jako pliki TIFF o rozdzielczości 1024×768 pikseli. Całkowita powierzchnia płytki miazdżycowej była mierzona półautomatycznie na każdym szkiełku, przy użyciu programu AnalySIS FIVE software (Soft Imaging System, Munster, Niemcy) (ryc. 29) [5, 31, 45, 125, 145, 180, 181, 188].

Dla każdej myszy średnią wielkość powierzchni miazdżycy obliczano **z ośmiu oddalonych od siebie o 100- μ m skrawków**, co w najdokładniejszy sposób odzwierciedlało powierzchnię przekroju poprzecznego („cross-section”) zajęta przez miazdżycę [127, 128, 132].



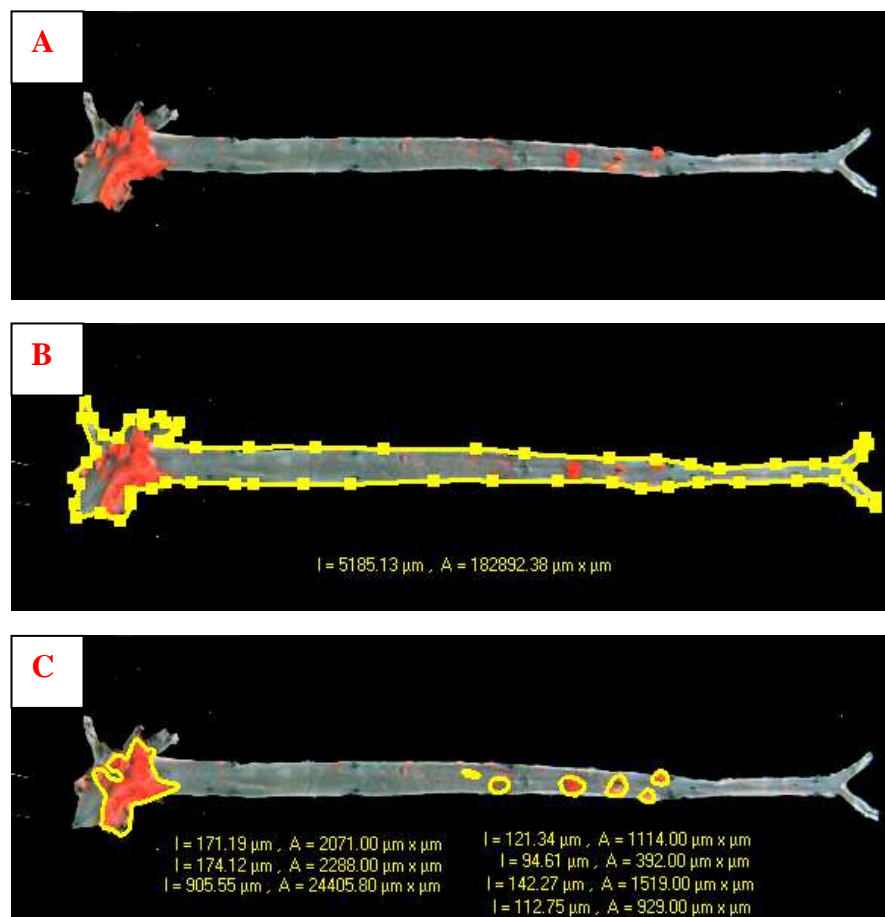
Ryc. 20. Komputerowa ocena wielkości miażdżycy w przekroju poprzecznym „korzenia aorty” (z [85]).

B. METODA „EN FACE“

Aorty od łuku do rozdwojenia biodrowego były utrwalane w 4% formaldehydzie, otwierane wzdłużnie, przypięte cienkimi igielkami do czarnych płytek woskowych i zabarwione Sudanem IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), według poniższego protokołu:

1. Rozpiąć aortę wyjętą z 4% formaldehydu na płytce przy pomocy bardzo cienkich igiełek (Fine Science Tools, Heidelberg, Niemcy).
2. Przepłukać w 70% etanolu przez 5 minut.
3. Barwić w roztworze roboczym Sudanu IV przez 6 minut.
4. Płukać dwukrotnie w 80% etanolu przez całkowity okres 3 minut.
5. Przechowywać w PBS-ie w lodówce (lub w formaldehydzie w przypadku dłuższego przechowywania).

Powierzchnia zmian miażdżycowych aorty i całkowita powierzchnia aorty były obliczane przy użyciu programu LSM Image Browser software (Zeiss, Jena, Germany) (ryc. 21).



Ryc. 21. Komputerowa ocena procentowej wielkości miażdżycy w przekroju wzdłużnym aorty. A – aorta barwiona Sudanem IV; B – całkowita powierzchnia aorty; C – powierzchnia zmian miażdżycowych (zmodyfikowane z [85]).

C. METODA „ŁUKU AORTY”

Łuk aorty ze starannie wypreparowanymi trzema odnogami zatapiano w parafinie. Przedtem podbarwiano go eozyną – w celu odnalezienia łuku w parafinie do cięcia kriostatowego. Przy użyciu pensety dociskano do podłoża. Kładziono bloczek na zimnej płytce. Następnie krojono go w kriostacie co 4 μm odstęp. Skrawki barwiono hematoksyliną – eozyną (ryc. 22) [113].

Po sfotografowaniu oceniano skrawki pod kątem:

- ilości blaszek miażdżycowych przypadających na skrawek
- stopnia zaawansowania blaszek (na zmiany wczesne i zaawansowane):

1. *zmiany wczesne*

- a) typ I – brak pokrywy włóknistej, tylko widoczne makrofagi
- b) typ II – obecna cienka pokrywa włóknista

2. *zmiany zaawansowane*

- c) typ III – jak w typie b + infiltracja medii przez komórki naciekowe
- d) typ IV – zniszczenie medii [180, 181]



Ryc. 22. Przykładowy łuk aorty z trzema odgałęzieniami wraz z blaszkami miażdżycowymi (barwiony hematoksyliną-eozyną).

pień r-g: pień ramiennie-główny

tsl: tętnica szyjna lewa

tpl: tętnica podobojczykowa lewa

III.4 Badania immunohistochemiczne

Do wykonania barwień immunohistochemicznych zostały wykorzystane skrawki aorty wstępującej utrwalone w acetonie i wysuszone. Skrawki te były preinkubowane w roztworze 5% nieimmunogennej surowicy koziej z dodatkiem 2% suchego odfluszczonego mleka w celu wyblokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał. Inkubacje z przeciwciałami pierwotnymi przeprowadzano przez noc w temperaturze pokojowej w komorach wilgotnych w następującej kombinacji surowic: skoniugowane z Cy3 przeciwciała mysie przeciwko α -aktynie mięśni gładkich (SMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [rozcieńczenie 1:600] oraz szczurze przeciwciała przeciwko mysiemu antygenowi CD68 (Serotec, Oxford, UK) [rozc. 1:800].

Po wypłukaniu w buforze PBS zastosowano przeciwciała drugiego rzędu: biotynylowaną kozią surowicę przeciwko szczurzym immunoglobulinom (Jackson IR, West Grove, PA, USA).

Po wypłukaniu, jako ostatni etap reakcji immunohistochemicznej, skrawki inkubowano ze streptawidyną skoniugowaną z fluoresceiną (DTAF) (Jackson IR) [rozc. 1:500]. Skrawki po ostatecznym wypłukaniu zamykano w glicerolu w PBS o pH 8.6 [110, 215].

Skrawki były oceniane przy użyciu epifluorescencyjnego mikroskopu Olympus BX50 (Olympus, Tokyo, Japan), wyposażonego w odpowiednie zestawy filtrów (U-MNG, U-MNIBA), aby uwidocznili odpowiednio czerwoną (Cy3) i zieloną (DTAF) fluorescencję. Obrazy były rejestrowane przy użyciu cyfrowej kamery CCD Olympus DP71.

W każdym skrawku, całkowita powierzchnia zajmowana przez CD68-immunopoztywne makrofagi oraz przez α -aktynę mięśni gładkich była mierzona przy użyciu oprogramowania AnalySIS FIVE (Olympus).

III.5 Badania biochemiczne

Osoczowy poziom rozpuszczalnej frakcji adhezyn komórek naczyń (*soluble vascular cell adhesion molecule-1*) sVCAM-1, interleukiny-6 (IL-6), interleukiny-12 (IL-12) oraz surowiczego amyloidu A (SAA) (wszystkie z R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [35, 148, 175] oraz białka chemotaktycznego dla makrofagów (*macrophage chemotactic protein-1*) MCP-1 (BioSource, Camarillo, CA, USA) [136] oznaczano testem immunoenzymatycznym (ELISA).

III.6 Lipidy osocza

Całkowity surowiczy poziom cholesterolu i trójglicerydów, a także frakcji LDL i HDL cholesterolu, był oznaczany przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu (Roche Molecular Biochemical, Alameda, CA, USA).

III.7 Badanie rozkurczu naczyń

Funkcja śródbłonna naczyniowego oceniana była drogą pomiaru biodostępności tlenku azotu (NO). Biodostępność NO określano przy pomocy analizy zależnych od NO rozkurczów naczyniowych w łaźni narządowej („*organ bath*”), stymulowanych podawaniem odpowiednich dawek acetylocholino [72]. Badanie odbywało się przy użyciu multimiografu (Multimyograph model 610 M, Dania). Reakcje naczyniowe rejestrowane były w sposób ciągły na komputerze, dzięki programowi Acqknowledge 3.7.2 (przy pomocy systemu przetwarzania danych BIOPAC Systems, USA).

Naczynia wyizolowane ze zwierząt zostały dokładnie oczyszczone z otaczających tkanek: tłuszczowej i mięśniowej. Następnie zostały podzielone na pierścienie o szerokości 2-3 mm i umieszczone w łaźniach wypełnionych buforem Krebsa - Henseleita (KHB) (120 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM

KH_2PO_4 ; 2,5 mM CaCl_2 ; 25 mM NaHCO_3 oraz 5,5 mM glukozy) o temperaturze 37°C. Krążki naczyniowe zostały rozpięte pomiędzy stalowymi czujnikami tensometrów (cztery 5 ml łaźnie naczyniowe wypełnione buforem KH) i poddane stabilizacji przez okres 50-60 min. Pomiary dokonywane były jednocześnie w czterech krążkach naczyniowych – po dwa od każdego zwierzęcia. Uzyskane wyniki były następnie uśredniane.

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone były w obecności indometacyny (10 μM). Miało to na celu wyeliminowanie potencjalnego wpływu prostaglandyn (w tym PGI_2) na rozkurcze w obrębie naczyń i dawało pewność, iż rozkurcze naczyń są efektem działania NO, a nie prostacykliny.

Po stabilizacji naczynia były pasywnie naprężane do napięcia podstawowego (7 mN dla tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA), pobranej od ludzi w trakcie zabiegów kardiochirurgicznych i 15 mN dla naczyń zwierzęcych) i kilkakrotnie przykurczane przez jednakowe stężenia KCl (90 mM), aż do uzyskania stabilnych odpowiedzi na KCl. Po kilkakrotnym wypłukaniu z KCl naczynia były przykurczane kumulatywnie wzrastającymi dawkami $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-9} M; 10^{-8} M; 10^{-7} M; 10^{-6} M; 10^{-5} M; 10^{-4} M). Właściwe doświadczenia odbywały się na naczyniach przykurczonych $\text{PGF}_{2\alpha}$, w stopniu odpowiadającym 70-80% max. skurczu na $\text{PGF}_{2\alpha}$. Na tak przykurczonych naczyniach testowane były odpowiedzi na acetylocholinę (Ach) stosowaną w kumulatywnie wzrastających dawkach.

III.8 Analiza statystyczna

Wyniki zostały wyrażone jako średnia arytmetyczna \pm SEM.

Ze względu na brak rozkładu normalnego większości parametrów miążdżycy, zostały użyte testy nieparametryczne. Najpierw test Kruskala-Wallisa został zastosowany do sprawdzenia istnienia różnic pomiędzy grupami. W przypadku stwierdzenia statystycznie znamiennej różnicy, nieparametryczny test Manna-Whitneya był używany do analizy danych.

W przypadkach występowania rozkładu normalnego parametrów, stosowano najpierw analizę wariancji ANOVA, a następnie test *post hoc* Duncana.

W obu sytuacjach $p < 0,05$ zostało uznane za statystycznie znamienne.

Obliczenia statystyczne zostały wykonane przy użyciu pakietu statystycznego Statistica 6 dla Windows (StatSoft, TX, USA).

IV. WYNIKI

IV.1 Lipidy

AVE 0991, A-779, peryndopryl oraz tiorfan nie zmieniły znamienne poziomu cholesterolu i trójglicerydów oraz profilu lipoproteinowego cholesterolu w osoczu badanych myszy (Tabela 1).

Tabela 1. Poziom całkowitego cholesterolu i triglicerydów w osoczu myszy.

lek	cholesterol całkowity (mmol/l) ± SEM	HDL-cholesterol (mmol/l) ± SEM	LDL-cholesterol (mmol/l) ± SEM	triglicerydy (mmol/l) ± SEM
kontrola	11,57 ± 0,3	2,5 ± 0,2	8,5 ± 0,3	1,2 ± 0,1
AVE 0991	12,1 ± 0,3 (NS)	2,6 ± 0,25 (NS)	8,8 ± 0,2 (NS)	1,3 ± 0,1 (NS)
A-779	11,3 ± 0,2 (NS)	2,4 ± 0,1 (NS)	8,75 ± 0,3 (NS)	1,1 ± 0,1 (NS)
peryndopryl	12,2 ± 0,2 (NS)	2,35 ± 0,3 (NS)	8,3 ± 0,2 (NS)	1,35 ± 0,2 (NS)
tiorfan	11,4 ± 0,3 (NS)	2,7 ± 0,3 (NS)	8,4 ± 0,3 (NS)	1,15 ± 0,2 (NS)

NS - brak znamienności statystycznej w porównaniu z kontrolą

IV.2 Masa myszy

Masa myszy nie różniła się pomiędzy grupami (Tabela 2).

Tabela 2. Masa myszy w badanych grupach.

lek	średnia masa ciała (g) ± SEM
kontrola	26,2 ± 0,3
AVE 0991	27,1 ± 0,3 (NS)
A-779	25,6 ± 0,2 (NS)
perindopryl	26,7 ± 0,3 (NS)
tiorfan	25,9 ± 0,2 (NS)

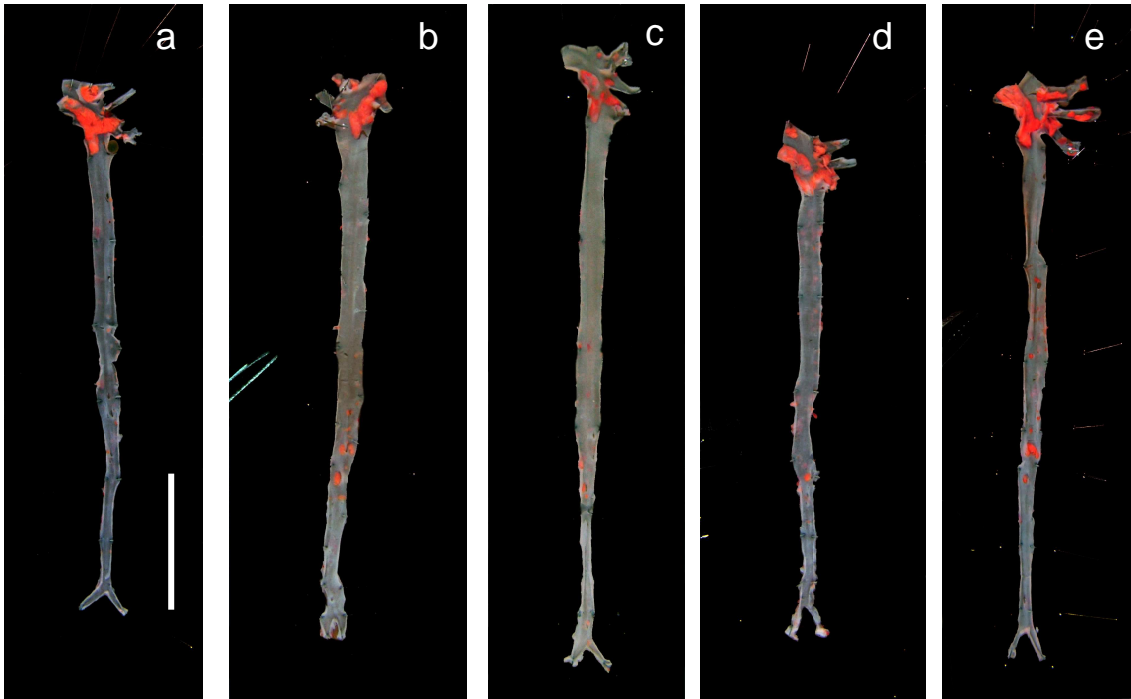
NS - brak znamienności statystycznej w porównaniu z kontrolą

IV.3 Wielkość miażdżycy

Aorty różniły się stopniem miażdżycy pomiędzy grupą kontrolną a grupami, którym podawano leki. Mierzony metodą „en face”, procent całkowitej powierzchni aorty zajętej przez barwione Sudanem IV zmiany wynosił: w grupie kontrolnej $14,6 \pm 2,1\%$, podczas gdy w grupie traktowanej AVE 0991 $7,63 \pm 1,6\%$, traktowanej peryndoprylem $2,6 \pm 0,5\%$, w grupie otrzymującej tiorfan $16,7 \pm 2,8\%$, zaś w grupie otrzymującej A-779: $19,2 \pm 2,4\%$ (Ryc. 23, 24). Z wyjątkiem tiorfanu, wszystkie te wartości osiągnęły znamienność statystyczna w stosunku do grupy kontrolnej (peryndopryl i AVE 0991 przy spadku, zaś A-779 przy wzroście powierzchni).

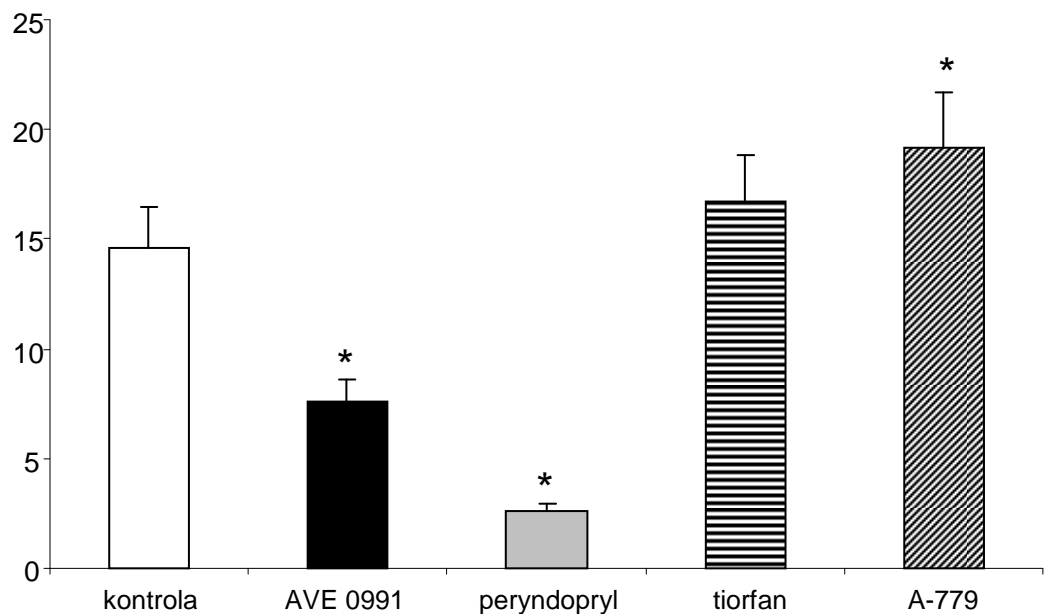
„Cross-section” korzeni aorty ujawnił również różnicę w powierzchni zmian miażdżycowych. Liczona w 8 kolejnych skrawkach średnia zmian \pm SEM, zajętych przez barwione ORO zmiany wynosiła: $91\,416 \pm 8\,357 \mu\text{m}^2$ w grupie kontrolnej przeciwko $47\,235 \pm 7\,546 \mu\text{m}^2$ w grupie z podawanym AVE 0991, $37\,107 \pm 2\,824 \mu\text{m}^2$ w grupie z podawanym peryndoprylem, $107\,599 \pm 9\,735 \mu\text{m}^2$ w grupie otrzymującej tiorfan, zaś $124\,201 \pm 10\,373 \mu\text{m}^2$ w grupie z podawanym A-779 (n=10) (ryc. 25, 26). Z wyjątkiem tiorfanu, wszystkie te wartości osiągnęły znamienność statystyczna w stosunku do grupy kontrolnej (peryndopryl i AVE 0991 przy spadku, zaś A-779 przy wzroście powierzchni).

Takie same rezultaty otrzymano metodą badania „łuku aorty” (tabela 3, ryc. 27).



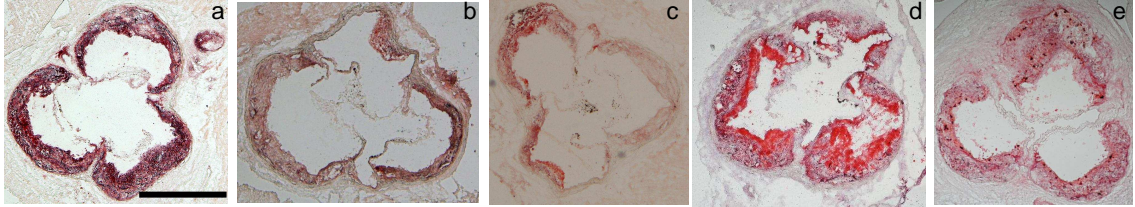
Ryc. 23. Barwione Sudanem IV aorty “en face” z grup: kontrolnej i traktowanych lekami myszy apoE - *knockout*.
a- kontrola, b- AVE 0991, c- peryndopryl, d- tiorfan, e- A-779
Linia na rysunku „a” obrazuje 1 cm.

% powierzchni



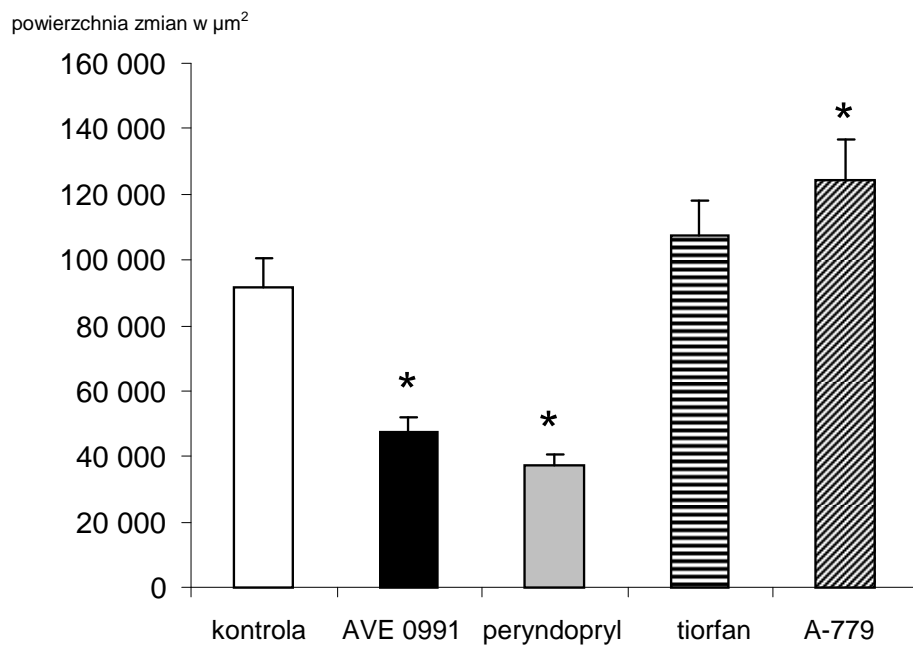
Ryc. 24. Powierzchnia zmian lipidowych w aorcie (wyrażona jako procent powierzchni całej aorty) u myszy apoE - *knockout* kontrolnych i leczonych (n=10 w każdej grupie).

Wyniki są przedstawione jako średnia \pm SEM. *p<0,05 w stosunku do grupy kontrolnej



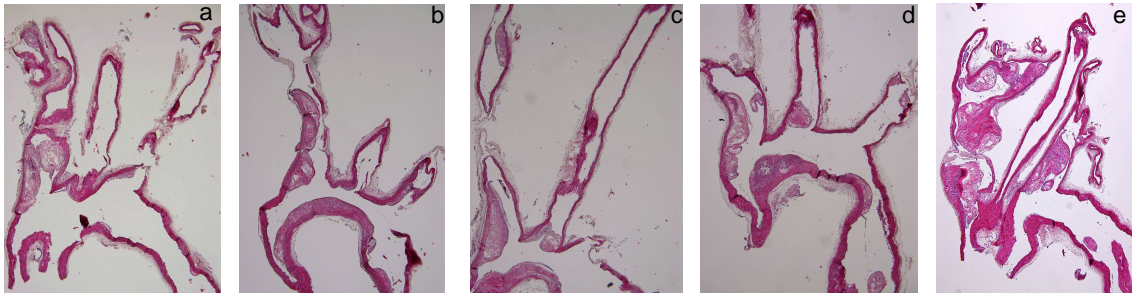
Ryc. 25. Reprezentatywne mikrofotografie, ukazujące barwienie czerwienią oleistą (*oil red-O*) zmiany miażdżycowe u myszy apoE - *knockout*, w grupie kontrolnej oraz grupach leczonych (powiększenie $\times 80$).

a- kontrola, b- AVE 0991, c- peryndopryl, d- tiorfan, e- A-779
Linia na rysunku „a” obrazuje $500 \mu\text{m}$.



Ryc. 26. Wielkość zmian w „korzeniu aorty”, wyrażona w μm^2 , u barwionych ORO 6-miesięcznych myszy apoE - *knockout* kontrolnych i leczonych (n=10 w każdej grupie).

Wyniki są przedstawione jako średnia \pm SEM. * $p < 0,05$ w stosunku do grupy kontrolnej



Ryc. 27. Reprezentatywne łuki aort z myszy apoE-knockout (barwienie HE).

a- grupa kontrolna, b- AVE 0991, c- peryndopryl, d- tiorfan, e- A-779

Tabela 3.

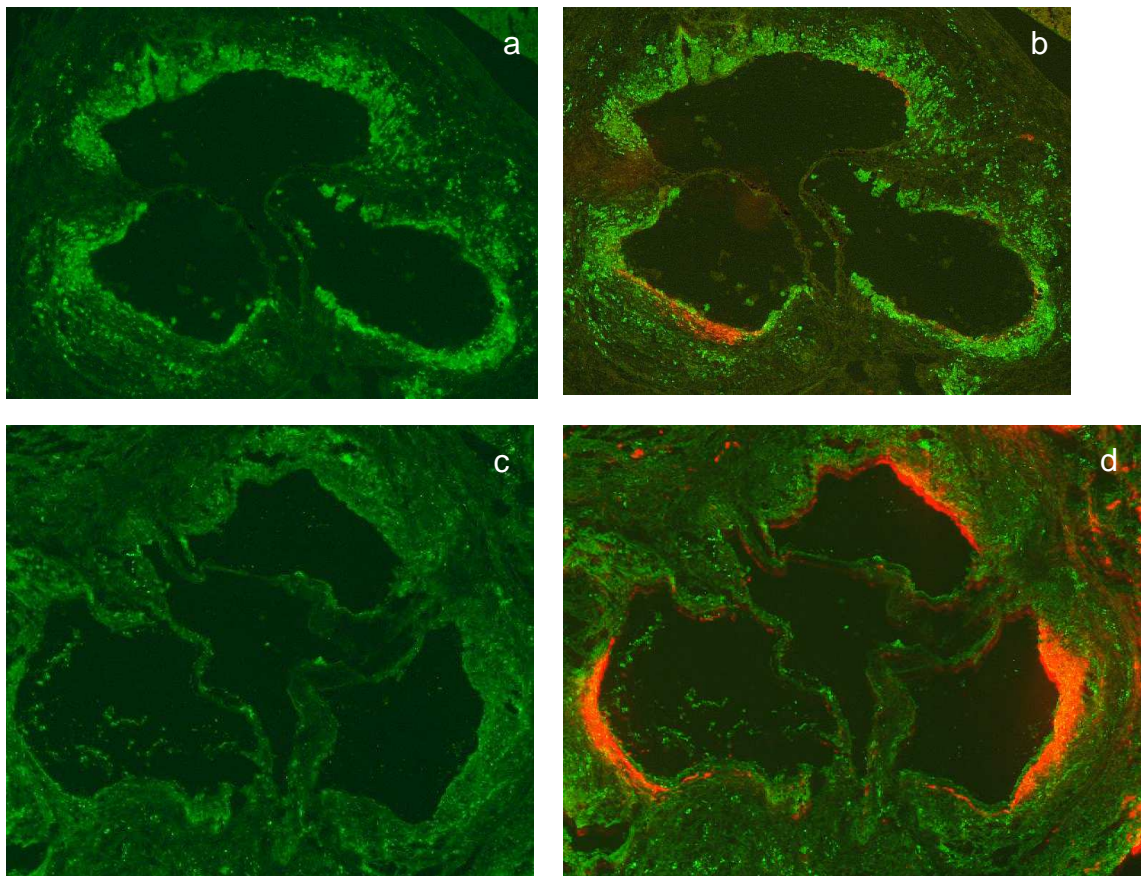
grupa (n=10)	średnia ilość blaszek / łuk ± SEM
kontrola	6 ± 1 (zmiany wczesne)
AVE 0991	4 ± 1 (zmiany wczesne) p<0,05
peryndopryl	3 ± 1 (zmiany wczesne) p<0,05
tiorfan	7 ± 1 (zmiany wczesne) (NS)
A-779	9 ± 2 (zmiany wczesne) p<0,05

IV.4 Struktura blaszki i jej stabilność

Badano także zawartość makrofagów, limfocytów T, jak również kolagenu i mięśniówki gładkiej w blaszkach miażdżycowych, jako wskaźniki stabilności blaszki. Stwierdzono, iż zawartość makrofagów (CD68) była obniżona w blaszkach, pochodzących od myszy leczonych AVE 0991 (61% vs. 25%; p<0,05), podczas gdy zawartość komórek mięśni gładkich (α -aktyny) (5% vs. 16%; p<0,05) była zwiększona u leczonych myszy w stosunku do grupy kontrolnej (n=10 w każdej grupie). Podsumowując, blaszki miażdżycowe u myszy traktowanych AVE 0991 były bardziej stabilne niż u myszy kontrolnych (tabela 4, ryc. 28).

Tabela 4. Skład blaszki miażdżycowej w grupie kontrolnej i leczonej AVE 0991.

grupa	CD68 ± SEM (% powierzchni)	α-aktyna ± SEM (% powierzchni)
kontrola	61 ± 6	5 ± 2
leczone AVE 0991	25 ± 4 (p<0,05)	16 ± 3 (p<0,05)

**Ryc. 28.** Skład blaszki miażdżycowej u 24-tygodniowych myszy, leczonych AVE 0991 (c i d), w porównaniu do grupy kontrolnej (a i b).

Reprezentatywne mikrofotografie ukazujące zmiany miażdżycowe u myszy apoE - *knockout*, w grupie kontrolnej oraz traktowanej AVE 0991.

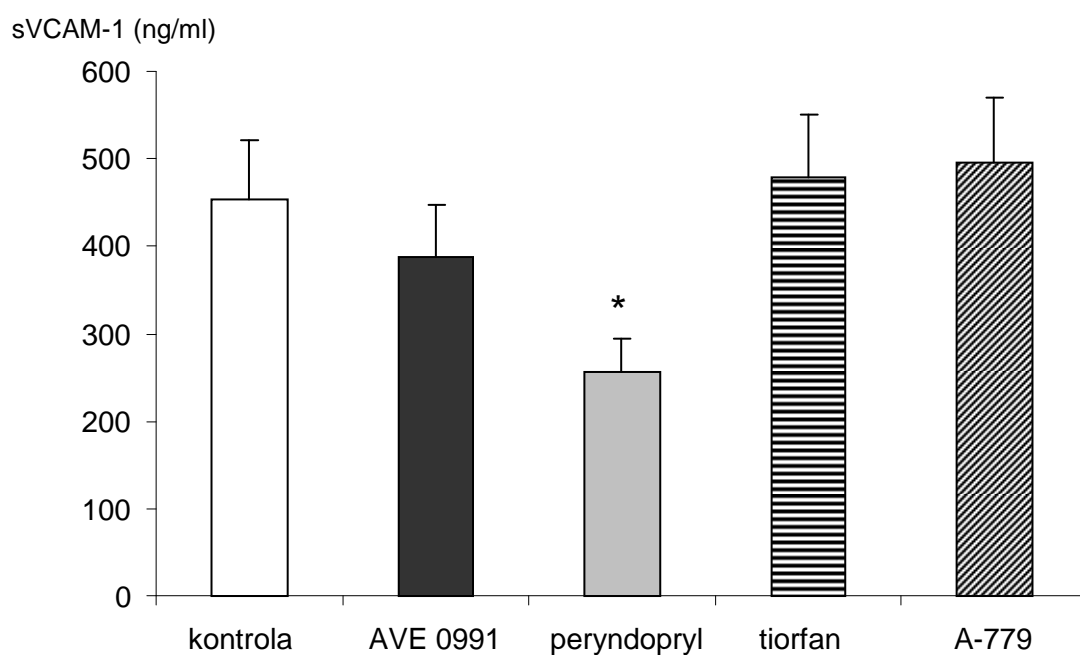
Immunohistochemiczne barwienie na α-aktynę mięśni gładkich (na pomarańczowo) oraz na marker makrofagów CD68 (na zielono) (wszystko w powiększeniu × 80).

a i c – barwienie na CD68

b i d – łączone barwienie na CD68 i α-aktynę

IV. 5 Osoczowe markery zapalenia

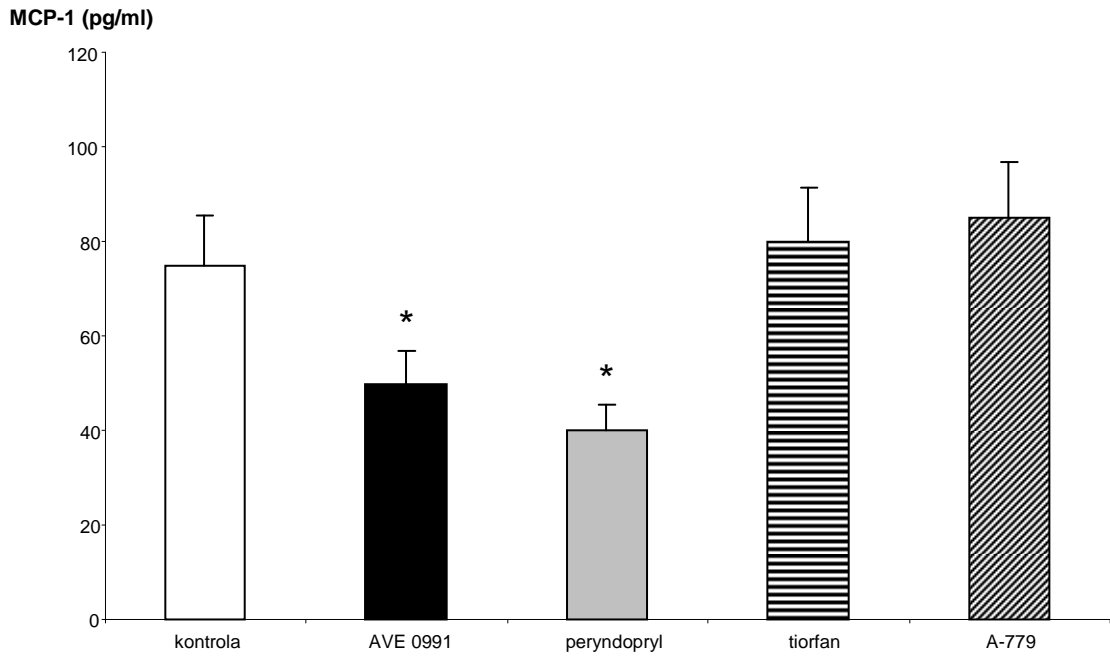
Jeśli chodzi o poziomy osoczowe sVCAM-1, to z wyjątkiem peryndoprylu, wartości w żadnej z badanych grup nie różniły się statystycznie znamienne od grupy kontrolnej (Ryc. 29).



Ryc. 29. Poziom sVCAM-1 w osoczu w badanych grupach.

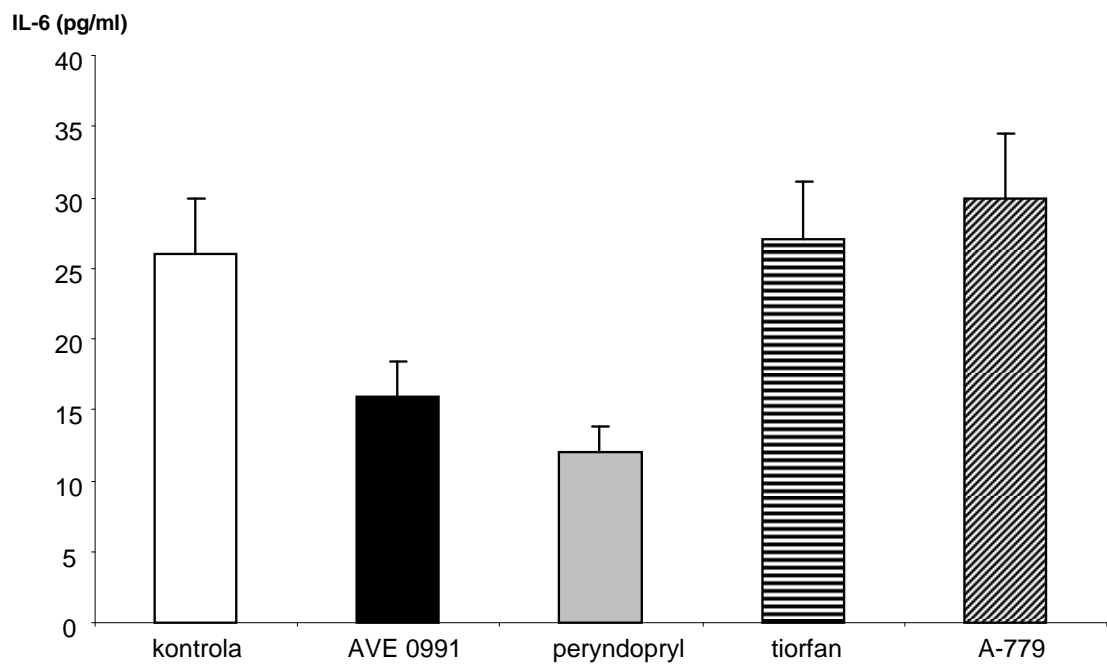
* $p < 0,05$ w stosunku do grupy kontrolnej

Z kolei poziomy osoczowe MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA, w grupach leczonych AVE 0991 i peryndoprylem były statystycznie znamienne niższe od grupy kontrolnej (ryc. 30-33).



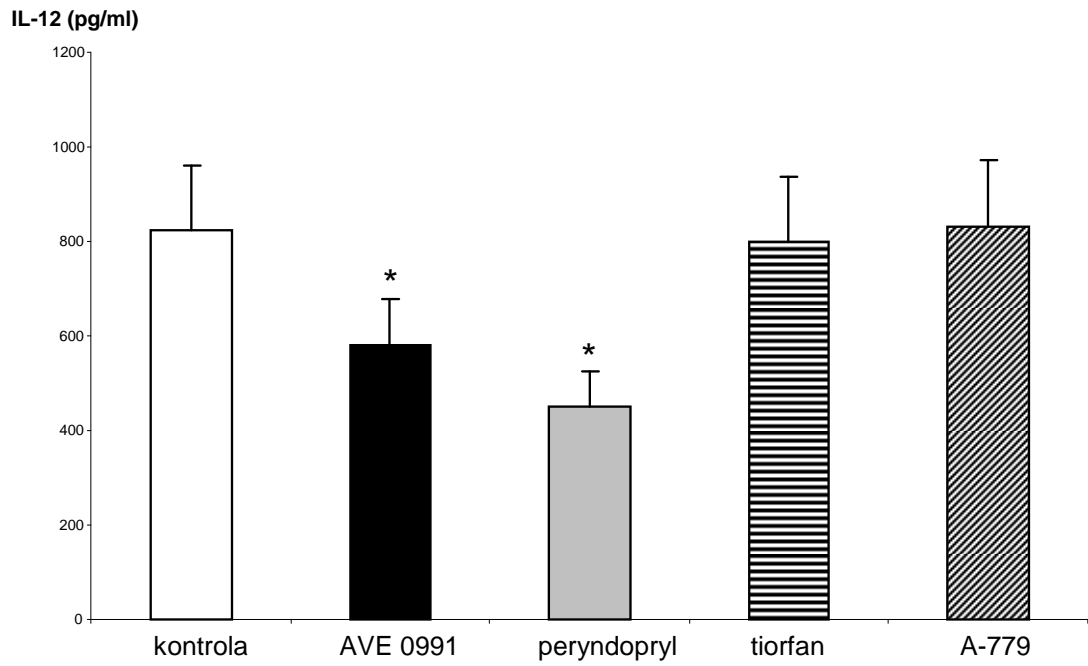
Ryc. 30. Poziom MCP-1 w osoczu w badanych grupach.

* $p < 0,05$ w stosunku do grupy kontrolnej



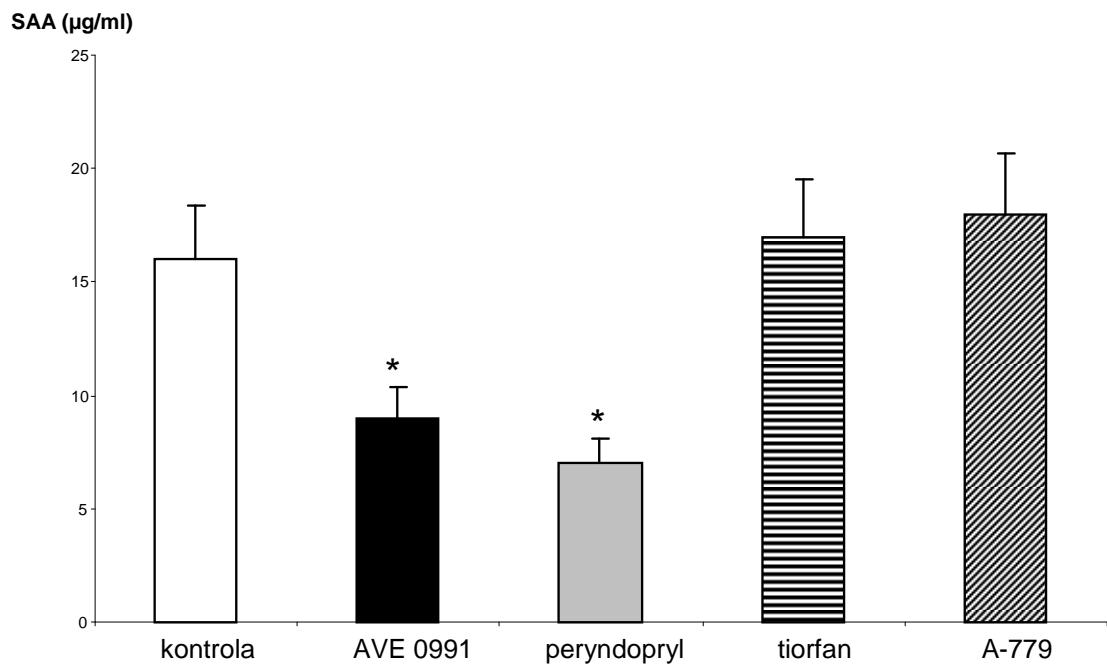
Ryc. 31. Poziom IL-6 w osoczu w badanych grupach.

* $p < 0,05$ w stosunku do grupy kontrolnej



Ryc. 32. Poziom IL-12 w osoczu w badanych grupach.

* $p < 0,05$ w stosunku do grupy kontrolnej

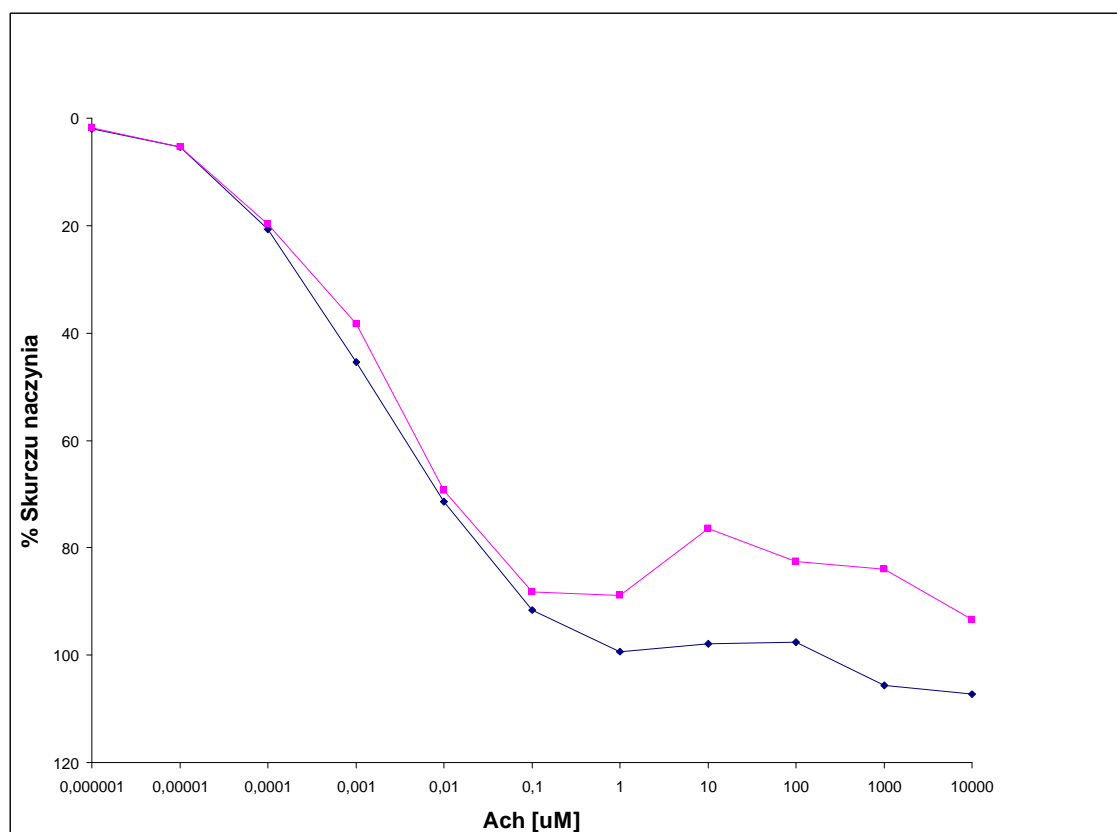


Ryc. 33. Poziom SAA w osoczu w badanych grupach.

* $p < 0,05$ w stosunku do grupy kontrolnej

IV.6 Rozkurcz naczyń

Badając rozkurcz naczyń zależny od tlenu azotu okazało się, że kontrola myszy *apoE-knockout* nie wykazywała cech dysfunkcji śródbłonna. Przebieg krzywej dla AVE 0991 był podobny i nie wykazał różnic statystycznie znamiennej od pierwszej krzywej (ryc. 34).



Ryc. 34. NO-zależne izometryczne rozkurcze pierścieni aortalnych myszy *apoE – knockout*, wstępnie przykurczanych $PGF_{2\alpha}$, jako reakcja na podanie wzrastających stężeń ACh (od 1×10^{-9} do 1×10^{-5} M).

Wykres czerwony prezentuje rozkurcze naczyń u myszy *apoE – knockout* leczonych AVE 0991 (n=6), wykres niebieski – rozkurcze u myszy *apoE – knockout* kontrolnych (n=6). Rozkurcze przedstawiono jako % wstępnego skurczu.

Poszczególne punkty wykresu stanowią średni rozkurcz dla danej dawki dla każdego naczynia.

V. DYSKUSJA

Na mysich modelach eksperymentalnych miażdżycy: apoE - *knockout* lub LDL receptor - *knockout* przebadano dotąd wpływ szeregu grup substancji na aterogenezę. Ważnych obserwacji dokonano na polu leków, związanych z osią renina-angiotensyna-aldosteron. Potwierdzono, że AT II ma działanie promiażdżycowe, częściowo poprzez aktywację NADPH oksydazy [6, 39-41, 118, 171, 192, 211, 213]. Wykazano także, że inhibitory konwertazy angiotensyny, jak i blokery receptora angiotensynowego hamują aterogenezę [3, 20, 21, 36, 48, 49, 77-79, 97, 98, 101, 109, 116, 117, 129, 143, 176, 193, 203].

W opisanym powyżej eksperymencie wykazano po raz pierwszy, że AVE 0991 hamuje rozwój miażdżycy [195]. Także peryndopryl, w jeszcze większym stopniu niż AVE 0991, hamował aterogenezę. Można to wyjaśnić faktem, że większy efekt daje bezpośrednio hamowanie AT II niż „pośrednie” przeciwdziałanie jej skutkom. Grupa przyjmująca peryndopryl pełniła rolę „kontroli pozytywnej”: niska dawka leku wykazuje bowiem działanie śródbłonkowe i przeciwmiażdżycowe, nie powodując równocześnie spadku ciśnienia krwi. Natomiast tiorfan wykazuje tendencję do zwiększenia miażdżycy, podczas gdy antagonistą AT-(1-7), A-779, statystycznie znacząco zwiększa ją. W przypadku AVE 0991 wykazano ponadto, że lek ten nasila stabilność blaszki miażdżycowej.

Ani poziom całkowity osoczowego cholesterolu i trójglicerydów, ani profil lipoproteinowy cholesterolu nie zmieniły się pod wpływem leków. Jest to cenna informacja, gdyż daje ona pewność, iż ewentualne działanie przeciwmiażdżycowe leku nie jest związane z obniżeniem poziomu cholesterolu i trójglicerydów, czy też ze zmianą profilu lipoproteinowego cholesterolu. Także masa myszy nie zmieniła się w

trakcie trwania eksperymentu.

Jeśli chodzi o osoczowe markery zapalenia, to sVCAM-1 było hamowane przez peryndopryl [35], zaś MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA były hamowane przez peryndopryl jak również AVE 0991 [1, 70]. Jest to zgodne z obserwacją, że AT II jest czynnikiem prozapalnym [60, 123]. Zatem hamowanie powstawania AT II (przez peryndopryl) lub biologiczne przeciwdziałanie efektom działania AT II (przez AVE 0991) zmniejsza odczyn zapalny [71, 80, 114].

Wyniki „organ bath” wykazały brak dysfunkcji śródbłonka u karmionych dietą *chow* myszy *apoE-knockout*. Zatem AVE 0991 nie mogło w tym wypadku poprawić działania endotelium. Wynik ten jednak rzuca nowe światło na niejednoznaczne w tej materii piśmiennictwo [66, 211]. Część doniesień bowiem potwierdza brak dysfunkcji śródbłonka u myszy *apoE-knockout* [12, 96, 201], szczególnie gdy nie są one karmione dietą wysokocholesterolową [46, 51, 52, 93, 106, 107, 184, 210].

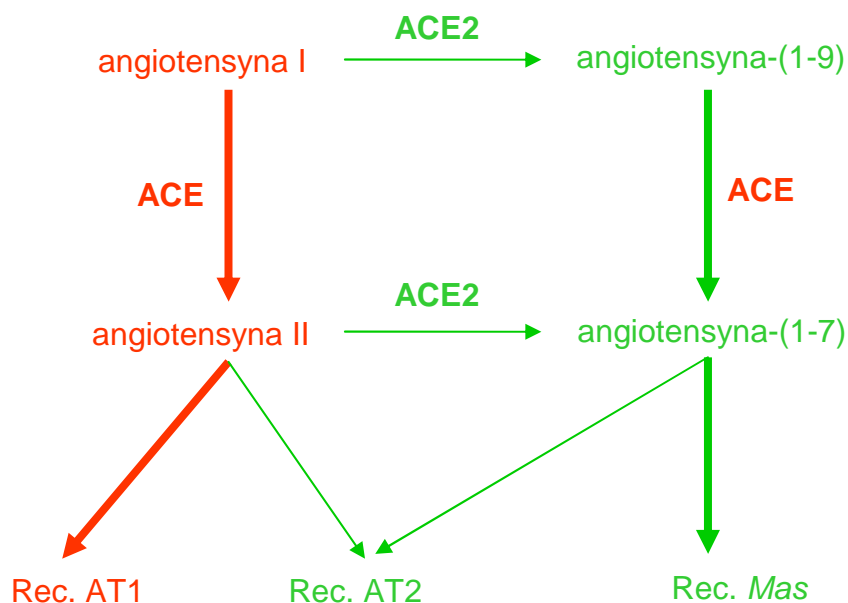
Niedawno stwierdzono bezpośrednie, przeciwmiażdżycowe i naczyńioprotekcyjne działanie AT-(1-7) na myszach *apoE-knockout* [190]. W przedstawionym w niniejszej pracy eksperymencie wykazano zaś po raz pierwszy, że niepeptydowy analog AT-(1-7) - AVE 0991, także hamuje aterogenezę na mysim modelu miażdżycy.

Ta obserwacja jest zgodna z generalnym postrzeganiem działania AT-(1-7) jako „anty-AT II” [10]. Ponieważ zaś AT II jest silnym czynnikiem promiażdżycowym, jej funkcjonalny antagonistą powinien hamować aterogenezę. Jednakże w tych doświadczeniach nie został dokładnie poznany mechanizm molekularny, poprzez który AVE 0991 działa na rozwój miażdżycy. To zagadnienie niewątpliwie wymagać będzie w przyszłości przeprowadzenia dalszych badań.

AT-(1-7) została odkryta w 1988 roku [159]. Przez długi czas była postrzegana jednak wyłącznie jako nieaktywny produkt osi RAA [68]. Brak zainteresowania AT-(1-7) wynikał też z początkowego braku swoistej dla niej ścieżki enzymatycznej. Wiele enzymów może generować AT-(1-7), zarówno z AT I jak i z AT II – w tym prolyloendopeptydaza [68], obojętna endopeptydaza [209], czy też prolylokarboksypeptydaza [204, 205]. Jednakże nieswoistość ich enzymatycznej aktywności nie podtrzymywała tezy o podstawowym znaczeniu AT-(1-7) w układzie RAA. Przełom nastąpił dopiero w 2000 roku, gdy dwie pracujące niezależnie od siebie grupy opisały istnienie homologu ACE, który nazwano ACE2 [16, 50, 194]. Najnowsze badania wskazują także, że AT-(1-7) działa poprzez onkogen *Mas* jako receptor metabotropowy, związany z białkiem G [2, 168, 170].

Postrzeganie AT-(1-7) zaczęło się zatem stopniowo zmieniać [8], prowadząc do nowego, obecnego spojrzenia na AT-(1-7) jako aktywnej, istotnej komponenty układu RAA [8, 27, 63, 82, 160-162, 169].

Biorąc pod uwagę obecność dwóch rodzajów ACE oraz dwóch głównych mediatorów: AT II oraz AT-(1-7), zaproponowano ostatnio zupełnie nowe spojrzenie na system RAA [58, 100, 168]. W tej koncepcji w układzie RAA wyodrębniamy dwa przeciwstawne sobie systemy funkcjonalne, zależne od równowagi ACE / ACE2: **ACE – AT II – receptor AT₁ vs ACE2 – AT-(1-7) – receptor *Mas*** (ryc. 35) [83].



Ryc. 35. Dwa „przeciwstawne” systemy w ramach układu RAA.

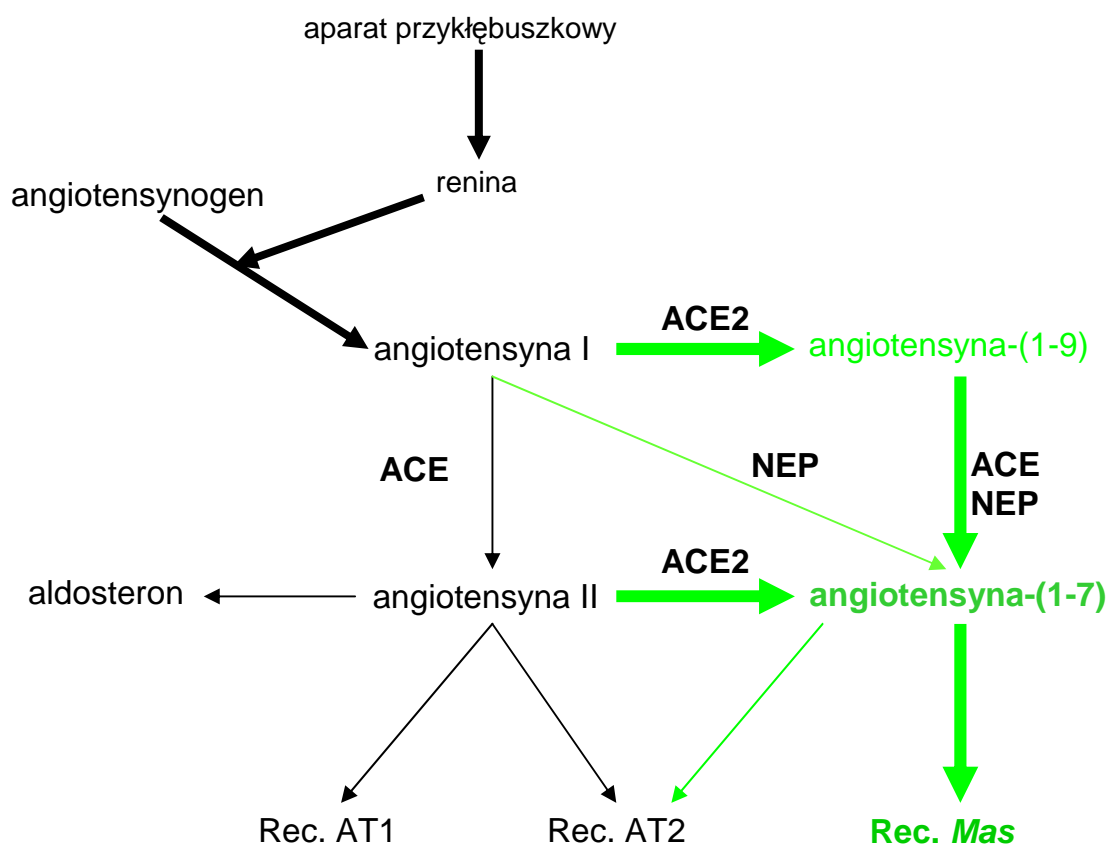
AT-(1-7) jest produkowana z AT I lub AT II poprzez ACE2. Ponieważ wydajność katalityczna ACE2 jest w przybliżeniu 400 razy większa z AT II jako substratem niż z AT I, jest to zatem świetny system przeciuregulacyjny przeciwko pobudzeniu osi ACE - AT II - receptor AT₁ [26, 201].

Podczas farmakologicznej blokady receptorów AT₁, zwiększona ilość AT II może mieć działanie korzystne dla organizmu : aktywując receptory typu AT₂ lub przekształcając się w AT-(1-7) [84].

Podawanie inhibitorów konwertazy angiotensyny zwiększa zaś 10-krotnie osoczowe stężenie AT-(1-7), co sugeruje, że część dobroczynnego działania tych leków może być mediowana przez AT-(1-7) [105, 111].

Z kolei ekspresja mRNA kodującego ACE2 wzrasta 5-krotnie przy zastosowaniu ACEI lub 3-krotnie przy zastosowaniu blokera receptora angiotensynowego [59]. Niedawno stwierdzono także, że blokada aldosteronu hamuje działanie ACE i aktywuje działanie ACE2 [99].

Zatem stosując dotychczasowe leki wpływające na oś RAA, nie tylko hamujemy produkcję i działanie AT II, ale także pobudzamy „alternatywną”, korzystną drogę (ryc. 36).

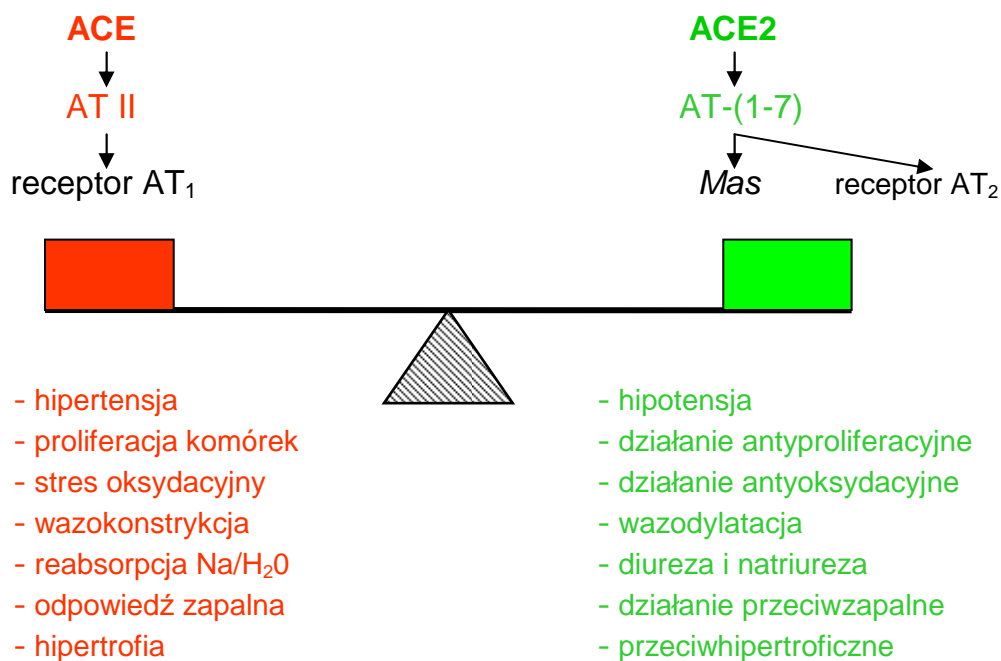


Ryc. 36. Korzystne „przekierowanie” terapeutyczne osi RAA.

Oś ACE2 - AT-(1-7) - receptor *Mas* może stać się w przyszłości ważnym celem terapeutycznym w chorobach układu sercowo-naczyniowego oraz w chorobach metabolicznych [30, 33, 37, 38, 61, 146, 147, 209]. Nowym wyzwaniem terapeutycznym dla farmakologii staje się zatem stworzenie leków „pobudzających” oś ACE2 - AT-(1-7) – receptor *Mas* (ryc. 30). Jednym z takich leków mógłby być badany w niniejszej pracy agonista receptora dla AT-(1-7): AVE 0991.

W dotychczasowych badaniach eksperymentalnych nad AVE 0991 stwierdzono,

że działa on kardioprotekcyjnie u szczurów cukrzycowych [54], korzystnie u szczurów w niewydolności serca wywołanej zawałem serca [62], zwiększa poziom bradykininy [25] oraz działa na śródbłonek myszy wywołując rozkurcz naczyń. Efekt ten jest z kolei zniesiony u myszy pozbawionych receptora *Mas* (*Mas-knockout*) [108].



Ryc. 37. Równowaga pomiędzy aktywnością ACE i ACE2 i jej wpływ na rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego (zmodyfikowane z [83]).

Z kolei w świetle przedstawionych powyżej badań eksperymentalnych, związek ten hamuje aterogenezę [195]. Daje to obiecujące perspektywy dla ewentualnych, przyszłych badań klinicznych nad tym lekiem.

Byłoby to bowiem działanie farmakologiczne w oparciu o nowy aksjomat, zgodnie z którym nowym celem terapeutycznym jest utrzymanie równowagi, zachwianej przez pobudzenie komponenty: ACE – AT II – receptor AT₁, poprzez działanie pobudzające na komponentę: ACE2 – AT-(1-7) – receptor *Mas* (ryc. 37).

VI. WNIOSKI

1. Na eksperymentalnym modelu miażdżycy: myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E (apoE-knockout), agonista angiotensyny (1-7) - AVE 0991 hamuje aterogenezę, nie zmieniając przy tym poziomu cholesterolu i triglicerydów oraz profilu lipoproteinowego cholesterolu w osoczu.
2. AVE 0991 zwiększa także stabilność blaszki miażdżycowej.
3. Inhibitor konwertazy angiotensyny – peryndopryl hamuje w jeszcze większym stopniu powstawanie miażdżycy u myszy apoE-knockout, podczas gdy antagonistą angiotensyny (1-7): A-779 nasila aterogenezę.
4. Inhibitor neutralnej endopeptydazy – tiorfan ma tendencję do nasilania aterogenezy, nie osiągając jednak znamienności statystycznej.
5. Wskaźniki zapalne: MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA są hamowane przez AVE 0991 jak i przez peryndopryl.
6. Pomimo, że myszy apoE-knockout karmione dietą niskocholesterolową nie wykazują dysfunkcji śródbłonna, stanowią jednak doskonały model eksperymentalny do badania wpływu leków na hamowanie miażdżycy.

VII. STRESZCZENIE

Ostatnie badania nad patogenezą miażdżycy wykazały kluczowe znaczenie osi renina-angiotensyna-aldosteron. Angiotensyna II poprzez szereg mechanizmów działa promiażdżycowo. Angiotensyna 1-7 z kolei działa przeciwnie do angiotensyny II, poprzez receptor metabotropowy *Mas*, związany z białkiem G.

Hipoteza robocza niniejszej pracy zakładała, że związek będący niepeptydowym agonistą angiotensyny 1-7 (AVE 0991) może hamować rozwój zmian miażdżycowych. Badania prowadzone były na najnowszym modelu zwierzęcym miażdżycy: myszach z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (myszy apoE- *knockout*).

Poddano badaniu pięćdziesiąt samic myszy apoE-*knockout* w wieku 8 tygodni (podzielonych na grupy o liczebności n=10), o podłożu genetycznym C57BL/6J. Oprócz grupy kontrolnej, grupy eksperymentalne (w każdej n=10) otrzymywały tę samą dietę, zmieszaną z AVE 0991 w dawce 0,58 μmol (0,28 mg)/kg m.c./dzień, z peryndoprylem w dawce 0,4 mg/kg m.c./dzień oraz z tiorfanem w dawce 2,5 mg/kg m.c./dzień. Z kolei A-779 [(D-Alanina)-Angiotensyna (1-7)] podawany był w dawce 3,3 mg/kg m.c., 3 razy w tygodniu dootrzewnowo.

W wieku 6 miesięcy wszystkie myszy poddano eutanazji i pobrano od nich osocze, serca i wypreparowane aorty.

Aorty różniły się stopniem miażdżycy pomiędzy grupą kontrolną a grupami, którym podawano leki. Mierzony metodą "en face", procent całkowitej powierzchni aorty zajętej przez barwione Sudanem IV zmiany wynosił: w grupie kontrolnej 14,6 \pm 2,1%, podczas gdy w grupie traktowanej AVE 0991 7,63 \pm 1,6%, traktowanej peryndoprylem 2,6 \pm 0,5%, w grupie otrzymującej tiorfan 16,7 \pm 2,8%, zaś w grupie otrzymującej A-779 19,2 \pm 2,4%. Z wyjątkiem tiorfanu, wszystkie te wartości osiągnęły znamienność statystyczną w stosunku do grupy kontrolnej (peryndopryl i AVE 0991

przy spadku, zaś A-779 przy wzroście powierzchni).

„Cross-section” korzeni aorty ujawnił również różnicę w powierzchni zmian miażdżycowych. Liczona w 8 kolejnych skrawkach średnia zmian \pm SEM, zajętych przez barwione ORO zmiany wynosiła: $91\,416 \pm 8\,357 \mu\text{m}^2$ w grupie kontrolnej przeciwko $47\,235 \pm 7\,546 \mu\text{m}^2$ w grupie z podawanym AVE 0991, $37\,107 \pm 2\,824 \mu\text{m}^2$ w grupie z podawanym peryndoprylem, $107\,599 \pm 9\,735 \mu\text{m}^2$ w grupie otrzymującej tiorfan, zaś $124\,201 \pm 10\,373 \mu\text{m}^2$ w grupie z podawanym A-779 (n=10).

Z wyjątkiem tiorfanu, wszystkie te wartości osiągnęły znamienność statystyczna w stosunku do grupy kontrolnej. Także metoda „łuku aorty” potwierdziła powyższe wyniki.

Podane związki nie zmieniły w sposób statystycznie znamienny profilu lipoproteinowego cholesterolu w osoczu oraz całkowitego poziomu cholesterolu i triglicerydów. Wykazano także, że AVE 0991 zwiększa stabilność płytki miażdżycowej, zmniejszając w niej zawartość makrofagów, a zwiększając zawartość komórek mięśni gładkich.

Wskaźniki zapalenia: MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA były zmniejszane przez AVE 0991 jak i przez peryndopryl.

Metodą „organ bath” nie wykazano dysfunkcji śródbłonna u badanych myszy.

Niniejsze badanie jest pierwszym na świecie doniesieniem, w którym wykazano na eksperymentalnym modelu zwierzęcym miażdżycy pozytywny efekt farmakologicznego stymulowania receptora dla AT 1-7, na proces aterogenezy.

VII. SUMMARY

In the light of recent findings, renin-angiotensin-aldosterone axis has an important role in atherogenesis. Angiotensin II (AT II) has several potential mechanisms that may increase the atherogenic process. Angiotensin (1-7) [AT-(1-7)] opposes AT II activities. Activities of Ang-(1-7) are mediated via *Mas*, G-coupled protein receptor.

The working hypothesis was: angiotensin (1-7) agonist, AVE 0991 could ameliorate the development of atherosclerotic lesions. As the experimental research model, genetically changed mice strain of apolipoprotein E (apoE) - *knockout mouse* (apoE - KO) was used.

50 female 8-week-old apoE-KO mice (in each group n=10) on background C57BL/6J were studied. Experimental groups received the same diet as control, mixed with: AVE 0991 in a dose of 0,58 μmol (0,28 mg)/kg b.w./day, perindopril in a dose of 0,4 mg/kg b.w./day and with tiorphan in a dose of 2,5 mg/kg b.w./day. A-779 [(D-Alanine)-Angiotensin (1-7)] was given in a dose of 3,3 mg/kg b.w, 3 times a week i.p. Cholesterol profile was not changed by the drugs.

Aortas differed in the degree of atherosclerosis between control group and experimental groups. Measured by “en face” method, the percentage of occupied by Sudan IV – stained surfaces were: 14.6 \pm 2.1% in control group, whereas in AVE 0991 treated group 7.63 \pm 1.6%, in perindopril group 2.6 \pm 0.5%, in tiorphan group 16.7 \pm 2.8%, and in A-779 group 19.2 \pm 0.6%. All the differences, except tiorphan were statistically significant.

„Cross-section” of aortic roots revealed the difference in atherosclerotic lesions. Measured in 8 consecutive sections mean surfaces \pm SEM, occupied by oil Red - O stained changes were: 91 416 \pm 8 357 μm^2 in control group versus 47 235 \pm 7 546 μm^2 in AVE 0991 – treated group, 37 107 \pm 2 824 μm^2 in perindopril group, 107 599 \pm 9 735

μm^2 in tiorphan group, and $124\,201 \pm 10\,373 \mu\text{m}^2$ in A-779 group. All the differences, except tiorphan were statistically significant. “Aortic arch” method also confirmed these results.

Finally, it was shown that AVE 0991 may increase plaque stability by decreasing number of macrophages and increasing smooth muscle cells plaque content.

Inflammatory indicators: MCP-1, IL-6, IL-12 and SAA were diminished by AVE 0991 as well as by perindopril.

Organ bath did not show any endothelial dysfunction in experimental mice.

To our knowledge, this is the first report that shows the effect of angiotensin (1-7) receptor agonist: AVE 0991, on atherogenesis in apoE-*knockout* mice.

VIII. PIŚMIENICTWO

1. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1518-1525.
2. Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol* 2008; 93: 528-537.
3. Arnal JF, Castano C, Maupas E, Mugniot A, Darblade B, Gourdy P, Michel JB, Bayard F. Omapatrilat, a dual angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitor, prevents fatty streak deposit in apolipoprotein E – deficient mice. *Atherosclerosis* 2001; 155: 291-295.
4. Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Haemost* 2001; 86: 356-365.
5. Baglione J, Smith JD. Quantitative assay for mouse atherosclerosis in the aortic root. *Methods Mol Med* 2006; 129: 83-95.
6. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 2001; 108: 1513-1522.
7. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2001; 38: 1246-1249.
8. Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H684-691.
9. Benter IF, Yousif MH, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H666-672.
10. Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Am J Nephrol* 2008; 28: 25-33.
11. Bernstein KE. Views of the renin-angiotensin system: brilling, mimsy, and slithy tove. *Hypertension* 2006; 47: 509-514.
12. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2333-2340.

13. Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 1998; 101: 2658-2664.
14. Breslow JL. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 8314.
15. Buczko W, Matys T, Kucharewicz I, Chabielska E. The role of endothelium in antithrombotic effect of the renin-angiotensin system blockade. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 499-507.
16. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 166-169.
17. Caligiuri G, Levy B, Pernow J, Thoren P, Hansson GK. Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6920-6924.
18. Caligiuri G, Nicoletti A, Zhou X, Tornberg I, Hansson GK. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999; 145: 301-308.
19. Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol* 1989; 257: H324-329.
20. Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Cao Z, Nesteroff SP, Burns WC, Twigg SM, Dilley RJ, Cooper ME, Allen TJ. Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin – converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E – deficient mice. *Circulation* 2002; 106: 246-253.
21. Candido R, Allen TJ, Lassila M, Cao Z, Thallas V, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: 1536-1542.
22. Capecchi MR. Generating mice with targeted mutations. *Nature Med* 2001; 7: 1086-1090.
23. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261-271.
24. Carmeliet P, Moons L, Collen D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 8-33.
25. Carvalho MB, Duarte FV, Faria-Silva R, Fauler B, da Mata Machado LT, de Paula RD, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats. *Hypertension* 2007; 50: 762-767.

26. Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* 2005; 46: 937-942.
27. Chappell MC. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension* 2007; 50: 596-599.
28. Chappell MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Angiotensin peptide research overlooked. *Clin Chem* 1996; 42: 1500-1501.
29. Chien KR. Genes and physiology: molecular physiology in genetically engineered animals. In: Perspectives series: molecular medicine in genetically engineered animals. *J Clin Invest* 1996; 97: 901-909.
30. Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2001; 37: 1141-1146.
31. Coleman R, Hayek T, Keidar S, Aviram M. A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. *Acta Histochem* 2006; 108: 415-424.
32. Corti R, Burnett JC Jr, Rouleau JL, Ruschitzka F, Lüscher TF. Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease? *Circulation* 2001; 104: 1856-1862.
33. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveiras-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417: 822-828.
34. Crauwels HM, Van Hove CE, Holvoet P, Herman AG, Bult H. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res* 2003;59: 189-199.
35. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-1262.
36. Da Cunha V, Tham DM, Martin-McNulty B, Deng G, Ho JJ, Wilson DW, Rutledge JC, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX. Enalapril attenuates angiotensin II – induced atherosclerosis and vascular inflammation. *Atherosclerosis* 2005; 178: 9-17.
37. Danilczyk U, Eriksson U, Crackower MA, Penninger JM. A story of two ACEs. *J Mol Med* 2003; 81: 227-234.
38. Dantas AP, Sandberg K. Regulation of ACE2 and ANG-(1-7) in the aorta: new insights into the renin-angiotensin system in the control of vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H980-981.

39. Daugherty A, Cassis L. Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor *-/-* mice. *Ann NY Acad Sci* 1999; 892: 108-118.
40. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 1605-1612.
41. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Antagonism of AT2 receptors augments angiotensin II – induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 865-870.
42. Daugherty A. Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 2002; 323: 3-10.
43. Daugherty A, Rateri DL. T lymphocytes in atherosclerosis. The Yin-Yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ Res* 2002; 90: 1039-1040.
44. Daugherty A, Rateri DL. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods* 2005; 36: 129-138.
45. Daugherty A, Whitman SC. Quantification of atherosclerosis in mice. *Methods Mol Biol* 2003; 209: 293-309.
46. Deckert V, Lizard G, Duverger N, Athias A, Palleau V, Emmanuel F, Moisan M, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in ApoE-deficient mice: toward normalization by human ApoA-I expression. *Circulation* 1999; 100: 1230-1235.
47. Dembińska-Kieć A, Kawecka-Jaszcz K, Kwaśniak M, Guevara I, Pankiewicz J, Malczewska-Malec M, Iwanejko J, Hartwich J, Zdzienicka A, Stochmal A, Leszczyńska-Gołabek I. Apo E isoforms, insulin output and plasma lipid levels in essential hypertension. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 95-99.
48. De Nigris F, D'Armiento FP, Somma P, Casini A, Andreini I, Sarlo F, Mansueto G, De Rosa G, Bonaduce D, Condorelli M, Napoli C. Chronic treatment with sulfhydryl angiotensin – converting enzyme inhibitors reduce susceptibility of plasma LDL to in vitro oxidation, formation of oxidation-specific epitopes in the arterial wall, and atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. *Int J Cardiol* 2001; 81: 107-115.
49. Dol F, Martin G, Staels B, Mares AM, Cazaubon C, Nisato D, Bidouard JP, Janiak P, Schaeffer P, Herbert JM. Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E – deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 395-405.
50. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87: E1-9.
51. d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS.

Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1017-1022.

52. d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. *Stroke* 2001; 32: 2658-2664.

53. Dziaman T, Huzarski T, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Szpila A, Guz J, Lubinski J, Olinski R. Elevated level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in leukocytes of BRCA1 mutation carriers compared to healthy controls. *Int J Cancer* 2009; 125: 2209-2213.

54. Ebermann L, Spillmann F, Sidiropoulos M, Escher F, Heringer-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Walther T. The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 590: 276-280.

55. Elhage R, Jawień J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, Bayard F, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E – knockout mice. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 234-240.

56. Elhage R, Gourdy P, Jawień J, Bouchet L, Castano C, Fievet C, Hansson GK, Arnal JF, Bayard F. The atheroprotective effect of 17 β -estradiol depends on complex interactions in adaptive immunity. *Am J Pathol* 2005; 167: 267-274.

57. Fazio S, Lee YL, Ji ZS, Rall SC Jr. Type III hyperlipoproteinemic phenotype in transgenic mice expressing dysfunctional apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1993; 92: 1497-1503.

58. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47: 515-521.

59. Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, Diz DI, Gallagher PE. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* 2005; 111: 2605-2610.

60. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98: 121-128.

61. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol* 2005; 289: H2281-H2290.

62. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP, Caliari MV, Santos RA. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1113-1119.

63. Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 499-507.

64. Fredrikson GN, Soderberg I, Lindholm M, Dimayuga P, Chyu KY, Shah PK, Nilsson J. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 879-884.
65. Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 103-112.
66. Gödecke A, Ziegler M, Ding Z, Schrader J. Endothelial dysfunction of coronary resistance vessels in apoE^{-/-} mice involves NO but not prostacyclin-dependent mechanisms. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 253-262.
67. Goldstein JL. Laskers for 2001: knockout mice and test-tube babies. *Nat Med* 2001; 7: 1079-1080.
68. Greene LJ, Spadaro AC, Martins AR, Perussi De Jesus WD, Camargo AC. Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension* 1982; 4: 178-184.
69. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK, Katovich MJ. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H736-742.
70. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998; 2: 275-281.
71. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 2007; 204: 2449-2460.
72. Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002; 39: 1088-1094.
73. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-1890.
74. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281-291.
75. Hansson GK. Vaccination against atherosclerosis: science or fiction ? *Circulation* 2002; 106: 1599-1601.
76. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.

77. Hayek T, Attias J, Smith J, Breslow JL, Keidar S. Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E – deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 540-544.
78. Hayek T, Attias J, Coleman R, Brodsky S, Smith J, Breslow JL, Keidar S. The angiotensin – converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res* 1999; 44: 579-587.
79. Hayek T, Kaplan M, Raz A, Keidar S, Coleman R, Aviram M. Ramipril administration to atherosclerotic mice reduces oxidized low-density lipoprotein uptake by their macrophages and blocks the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 65-74.
80. Hoch NE, Guzik TJ, Chen W, Deans T, Maalouf SA, Gratz P, Weyand C, Harrison DG. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: R208-216.
81. Ishibashi S, Bown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993; 92: 883-893.
82. Iusuf D, Henning RH, van Gilst WH, Roks AJ. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 303-312.
83. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* 2009; 32: 533-536.
84. Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 1998; 31: 356-361.
85. Jawień J. Badania nad wykorzystaniem myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E oraz receptora LDL jako modelu eksperymentalnego w hamowaniu procesie miażdżycowego. Rozprawa habilitacyjna. *Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego*. Kraków 2006.
86. Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 503-517.
87. Jawień J, Gajda M, Mateuszuk Ł, Olszanecki R, Jakubowski A, Szlachcic A, Korabiowska M, Korbut R. Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 483-9.
88. Jawień J, Gajda M, Rudling M, Mateuszuk Ł, Olszanecki R, Guzik T, Cichoński T, Chłopicki S, Korbut R. Inhibition of five lipoxygenase activating protein (FLAP) by MK-886 decreases atherosclerosis in apoE/LDLR – double knockout mice. *Eur J Clin Invest* 2006; 36 ; 141-146.

89. Jawień J, Csanyi G, Gajda M, Mateuszuk L, Łomnicka M, Korbut R, Chłopicki S. Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Eur J Pharmacol* 2007; 556: 129-135.
90. Jawień J, Gajda M, Olszanecki R, Korbut R. BAYx1005 attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 583-538.
91. Jawień J, Gajda M, Wolkow PP, Żurańska J, Olszanecki R, Korbut R. The effect of montelukast on atherogenesis in apoE/LDLR – double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 633-639.
92. Jiang J, Valen G, Tokuno S, Thoren P, Pernow J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 1255-1261.
93. Johansson ME, Hägg U, Wikström J, Wickman A, Bergström G, Gan LM. Haemodynamically significant plaque formation and regional endothelial dysfunction in cholesterol-fed ApoE^{-/-} mice. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108: 531-538.
94. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-138.
95. Joyner J, Neves L, Ferrario C, Brosnihan K. Administration of D-Alanine-[Ang-(1-7)] (A-779) Prior to Pregnancy in Sprague Dawley Rats Produces Antidiuresis in Late Gestation. *J Am Soc Hypertens* 2008; 2: 425-430.
96. Kauser K, da Cunha V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1679-1685.
97. Keidar S, Attias J, Smith J, Breslow JL, Hayek T. The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E – deficient mice. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 236: 622-625.
98. Keidar S, Attias J, Coleman R, Wirth K, Scholkens B, Hayek T. Attenuation of atherosclerosis in apolipoprotein E – deficient mice by ramipril is dissociated from its antihypertensive effect and from potentiation of bradykinin. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 64-72.
99. Keidar S, Gamliel-Lazarovich A, Kaplan M, Pavlotzky E, Hamoud S, Hayek T, Karry R, Abassi Z. Mineralocorticoid receptor blocker increases angiotensin-converting enzyme 2 activity in congestive heart failure patients. *Circ Res* 2005; 97: 946-953.
100. Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res* 2007; 73: 463-469.

101. Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-) apoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 2000; 105: 451-458.
102. Korbut R (red.) Farmakologia po prostu. Wydawnictwo UJ, Kraków 2009, wyd. II. *Układ renina – angiotensyna – aldosteron* str. 50-56.
103. Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczek W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 529-539.
104. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buczek W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 533-540.
105. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2002; 40: 774-779.
106. Lamping KG, Nuno DW, Chappell DA, Faraci FM. Agonist-specific impairment of coronary vascular function in genetically altered, hyperlipidemic mice. *Am J Physiol* 1999; 276: R1023-1029.
107. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103: 1282-1288.
108. Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 274-279.
109. Levy Z, Dvir A, Shaish A, Trestman S, Cohen H, Levkovietz H, Rhachmani R, Ravid M, Harats D. Omapatrilat, an angiotensin – converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitor, attenuates early atherosclerosis in diabetic and in nondiabetic low-density lipoprotein receptor – deficient mice. *Int J Exp Diabetes Res* 2003; 4: 59-64.
110. Litwin JA. Metody immunoenzymatyczne. W: *Immunocytochemia*. Pod redakcją Macieja Zabla. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa; 1990: 65-91.
111. Luque M, Martin P, Martell N, Fernandez C, Brosnihan KB, Ferrario CM. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens* 1996; 14: 799-805.
112. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241.
113. Lutgens E, Daemen M, Kockx M, Doevendans P, Hofker M, Havekes L, Wellens H, de Muinck ED. Atherosclerosis in APOE*3-Leiden transgenic mice: from proliferative to atheromatous stage. *Circulation* 1999; 99: 276-283.

114. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 2010; 55: 500-507.
115. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1998; 240: 622-630.
116. Makaritsis KP, Gavras H, Du Y, Chobanian AV, Brecher P. α_1 -adrenergic plus angiotensin receptor blockade reduces atherosclerosis in apolipoprotein E – deficient mice. *Hypertension* 1998; 32: 1044-1048.
117. Martin G, Dol F, Mares AM, Berezowski V, Staels B, Hum DW, Schaeffer P, Herbert JM. Lesion progression in apoE – deficient mice: implication of chemokines and effect of the AT1 angiotensin II receptor antagonist irbesartan. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 191- 199.
118. Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Gabbiani G, Hayoz D. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension* 2004; 44: 277-282.
119. Medja F, Lelièvre V, Fontaine RH, Lebas F, Leroux P, Ouimet T, Saria A, Rougeot C, Dournaud P, Gressens P. Thiorphan, a neutral endopeptidase inhibitor used for diarrhoea, is neuroprotective in newborn mice. *Brain* 2006; 129: 3209-3223.
120. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E – deficient mouse. A decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1006-1014.
121. Michajlik A, Bartniowska E. *Lipidy i lipoproteiny osocza*. Wydanie I, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa; 1999: 70-73.
122. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci* 2002; 70: 855-865.
123. Montecucco F, Pende A, Mach F. The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 753406.
124. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE – deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 133-140.
125. Napoli C, Palinski W, Di Minno G, D'Armiento FP. Determination of atherogenesis in apolipoprotein E – knockout mice. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000; 10: 209-215.
126. Naruszewicz M. Angiotensyna II jako czynnik ryzyka miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych. *Terapia* 2001; 1: 10-12.

127. Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G, Bariety J, Hansson GK. Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apoE knockout mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 910-918.
128. Nicoletti A, Paulsson G, Caligiuri G, Zhou X, Hansson GK. Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Mol Med* 2000; 6: 283-290.
129. Nussberger J, Aubert JF, Bouzourene K, Pellegrin M, Hayoz D, Mazzolai L. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. *Hypertension* 2008; 51: 1306-1311.
130. O'Neill TP. Apolipoprotein E-deficient mouse model of human atherosclerosis. *Toxicol Pathol* 1997; 25: 20-21.
131. Osada J, Joven J, Maeda N. The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 25-29.
132. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-40.
133. Paigen B, Plump AS, Rubin EM. The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 258-264.
134. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE – deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation – specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde – lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 605-616.
135. Paulsson G, Zhou X, Tornquist E, Hansson GK. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E – deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 10-17.
136. Peluzio MCG, Miguel E Jr, Drumond TC, Cesar GC, Santiago HC, Teixeira MM, Vieira EC, Arantes RME, Alvarez-Leite JI. Monocyte chemoattractant protein-1 involvement in the α -tocopherol-induced reduction of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Br J Nutr* 2003; 90: 3-11.
137. Pentikäinen MO, Öörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Modified LDL-trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med* 2000; 247: 359-370.
138. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 4471-4475.
139. Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA.

Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004; 44: 490-496.

140. Plump AS, Smith JD, Hayek T Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E – deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71: 343-353.

141. Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr* 1995; 15: 495-518.

142. Plump A. Atherosclerosis and the mouse: a decade of experience. *Ann Med* 1997; 29: 193-198

143. Pons S, Hagege A, Fornes P, Gervais M, Giudicelli JF, Richer C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade in apoE – deficient mice with post-ischemic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42: 17-23.

144. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1349-1357.

145. Purcell-Huynh DA, Farese RV Jr, Johnson DF, Flynn LM, Pierotti V, Newland DL, Linton MF, Sanan DA, Young SG. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high – fat diet. *J Clin Invest* 1995; 95: 2246-2257.

146. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008; 451: 904-913.

147. Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2: a new target for cardiovascular disease therapeutics. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50: 112-119.

148. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1 – dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E – deficient mice. *Circ Res* 1999; 84: 1237-1244.

149. Reardon CA, Getz GS. Mouse models of atherosclerosis. *Curr Opin Lipid* 2001; 12: 167-173.

150. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apoE. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 141-147.

151. Robbins J. Gene targeting. The precise manipulation of the mammalian genome. *Circ Res* 1993; 73: 3-9.

152. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976; 295: 369-377.
153. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977; 86: 675-84.
154. Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E. The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 1984; 70: 77-82.
155. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *New Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
156. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New Eng J Med* 1999; 340: 115-126.
157. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138: S419-S420.
158. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 2007; 49: 185-192.
159. Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension* 1988; 11(2 Pt 2): I 153-157.
160. Santos RA, Brosnihan KB, Jacobsen DW, DiCorleto PE, Ferrario CM. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension* 1992; 19 (2 Suppl): II 56-61.
161. Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 1033-1047.
162. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 2000; 91: 45-62.
163. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, Oliveira DR, Caligorne SM, Rodrigues AR, Gropen Júnior C. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994; 35: 293-298.
164. Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006; 47: 996-1002.
165. Santos RA, Ferreira AJ. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24: 239-246.

166. Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 122-128.
167. Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 1019-1031.
168. Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 2008; 93: 519-527.
169. Santos RA, Frézard F, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3: 383-391.
170. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8258-8263.
171. Saraff K, Babamusta F, Cassis LA, Daugherty A. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1621-1626.
172. Savla U. At the heart of atherosclerosis. *Nature Med* 2002; 8: 1209.
173. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-1389.
174. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4095-4098.
175. Schmidt A, Goepfert C, Feitsma K, Buddecke E. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF- α activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002; 164: 57-64.
176. Sharabi Y, Grossman E, Sherer Y, Shaish A, Levkovitz H, Bitzur R, Harats D. The effect of renin – angiotensin axis inhibition on early atherogenesis in LDL-receptor – deficient mice. *Pathobiology* 2000; 68: 270-274.
177. Shishehbor MH, Bhatt DL. Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 131-139.
178. Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 1956; 103: 295-299.
179. Stanton A. Potential of renin inhibition in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 4: 6-10.

180. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 840-856.

181. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1512-1531.

182. Stein Y, Stein O. Does therapeutic intervention achieve slowing of progression or bona fide regression of atherosclerotic lesions? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 183-188.

183. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8: 1211-1217.

184. Steioff K, Rütten H, Busch AE, Plettenburg O, Ivashchenko Y, Löhn M. Long term Rho-kinase inhibition ameliorates endothelial dysfunction in LDL-Receptor deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 512: 247-249.

185. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3893-3897.

186. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997; 386: 292-296.

187. Szafran H, Knapik-Czajka M. *Podstawy biochemiczne gospodarki lipidowej organizmu człowieka*. Collegium Medicum UJ, Kraków; 1994:23-24.

188. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor – deficient and apolipoprotein E – deficient mice. *J Lipid Res* 1995; 36: 2320-2328.

189. Tenger C, Sudenborg A, Jawień J, Zhou X. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 791-796.

190. Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1606-1613.

191. Thom DH, Wang SP, Grayston JT, Siscovick DS, Stewart DK, Kronmal RA, Weiss NS. Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 547-551.
192. Thomas M, Gavrilu D, McCormick ML, Miller FJ Jr, Daugherty A, Cassis LA, Dellsperger KC, Weintraub NL. Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2006; 114: 404-413.
193. Timmis AD, Pitt B. Effects of ACE inhibitors on coronary atherosclerosis and restenosis. *Br Heart J* 1994; 72(3 Suppl): S57-60.
194. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 33238-33243.
195. Totoń-Żurańska J, Gajda M, Pyka-Foćciak G, Kuś K, Pawłowska M, Niepsuj A, Wołkow P, Olszanecki R, Jawień J, Korbuc R. AVE 0991 – angiotensin-(1-7) receptor agonist, inhibits atherogenesis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 181-183.
196. Tudek B, Winczura A, Janik J, Siomek A, Foksinski M, Oliński R. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *Am J Transl Res* 2010; 2: 254-284.
197. Undas A, Szczeklik A. Miażdżycyca. W: *Kardiologia*. Pod redakcją A. Szczeklika i M. Tendery. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 2009, wyd. I, tom I, str. 321-328.
198. Vallon V, Heyne N, Richter K, Khosla MC, Fechter K. [7-D-ALA]-angiotensin 1-7 blocks renal actions of angiotensin 1-7 in the anesthetized rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 164-167.
199. van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, Wieringa B, Frants RR, Havekes LM, Hofker MH. Variability in cholesterol content in serum and aortic tissue in apolipoprotein E-deficient mice is comparable in inbred (129/Sv) and outbred (mixed 129/Sv and C57BL/6) mice. *Atherosclerosis* 1995; 118: 165-167.
200. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med* 2008; 86: 663-671.
201. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277: 14838-14843.
202. Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C, Petit C, Gosgnach W, Carpentier N, Vanhoutte P, Vilaine JP. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res* 2003; 40: 87-96.

203. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* 2004; 110: 3062-3067.
204. Welches WR, Santos RAS, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens* 1991; 9: 631-638.
205. Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM. A comparison of the properties, and enzymatic activity of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci* 1993; 52: 1461-1480.
206. Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension* 2002; 40: 847-852.
207. Wybrańska I, Kwaśniak M. Biochemia kliniczna i diagnostyka zaburzeń gospodarki lipidowej. W: *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*. Pod redakcją: Aldony Dembińskiej-Kieć i Jerzego W. Naskalskiego. Wydanie II, Wydawnictwo Urban & Partner, Wrocław; 2002: 329-387.
208. Yamamoto K, Chappell MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 19: 692-696.
209. Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, Ito N, Ikushima M, Kaibe M, Tatara Y, Shiota A, Sugano S, Takeda S, Rakugi H, Ogihara T. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension* 2006; 47: 718-726.
210. Yaghoubi M, Oliver-Krasinski J, Cayatte AJ, Cohen RA. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 751-757.
211. Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, Jin H. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2762-2768.
212. Zhang Y, Naggar JC, Welzig CM, Beasley D, Moulton KS, Park HJ, Galper JB. Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1764-1771.
213. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahitta A, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258: 468-471.

214. Zhou Y, Chen R, Catanzaro SE, Hu L, Dansky HM, Catanzaro DF. Differential effects of angiotensin II on atherogenesis at the aortic sinus and descending aorta of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Hypertens* 2005; 18(4 Pt 1): 486-492.
215. Żeromski J. Metody immunofluorescencyjne. W: *Immunocytochemia*. Pod redakcją Macieja Zabła. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa; 1990: 92-120.

X. SPIS TABEL

Tabela 1. Poziom całkowitego cholesterolu i triglicerydów w osoczu myszy.

Tabela 2. Masa myszy w badanych grupach.

Tabela 3. Zmiany w łukach aorty u myszy apoE-*knockout* kontrolnych i z podawanymi lekami.

Tabela 4. Skład blaszki miażdżycowej w grupie kontrolnej i leczonej AVE 0991.

XI. SPIS RYCIN

- Ryc. 1.** „Klasyczne” ujęcie systemu RAA
- Ryc. 2.** Angiotensyna I.
- Ryc. 3.** Angiotensyna II.
- Ryc. 4.** Budowa chemiczna peryndoprylu.
- Ryc. 5.** Nowe ujęcie osi renina – angiotensyna – aldosteron.
- Ryc. 6.** Budowa strukturalna AT-(1-7).
- Ryc. 7.** Działanie AT-(1-7) na narządy.
- Ryc. 8.** Budowa chemiczna AVE 0991.
- Ryc. 9.** Budowa chemiczna A-779.
- Ryc. 10.** Budowa chemiczna tiorfanu.
- Ryc. 11.** Odslonięty łuk aorty.
- Ryc. 12.** Aorta rozpięta na płytce woskowej, gotowa do barwienia.
- Ryc. 13.** Krojenie poprzeczne serca skalpelem (powiększenie × 3).
- Ryc. 14.** Schemat krojenia poprzecznego serca myszy skalpelem, przed zatopieniem w OCT
- Ryc. 15.** Przecięte serce, zanurzone w żelu OCT w plastikowej foremce.
- Ryc. 16.** Schemat cięcia bloczka OCT z zatopionym sercem myszy w kriostacie.
- Ryc. 17.** Schemat obrazujący trudności związane z uzyskaniem w kriostacie cięcia poprzecznego, prostopadłego do osi aorty.
- Ryc. 18.** Krojenie mięśnia serca w kriostacie, idąc płaszczyzną ostrza kriostatu w górę, w kierunku „korzenia aorty”.
- Ryc. 19.** Obraz kolejnych sekcji poprzecznych „korzenia aorty” co 100 μm, licząc od „punktu zero”, w którym podczas cięcia pojawia się pierwszy płatek.

Ryc. 20. Komputerowa ocena wielkości miażdżycy w przekroju poprzecznym „korzenia aorty”.

Ryc. 21. Komputerowa ocena procentowej wielkości miażdżycy w przekroju wzdłużnym aorty.

Ryc. 22. Przykładowy łuk aorty z trzema odgałęzieniami wraz z blaszkami miażdżycowymi.

Ryc. 23. Barwione Sudanem IV aorty “en face” z grup: kontrolnej i traktowanych lekami u myszy apoE - knockout.

Ryc. 24. Powierzchnia zmian lipidowych w aorcie (wyrażona jako procent powierzchni całej aorty) u myszy apoE - *knockout* kontrolnych i leczonych.

Ryc. 25. Reprezentatywne mikrofotografie, ukazujące barwione czerwienią oleistą (*oil red-O*) zmiany miażdżycowe u myszy apoE - *knockout*, w grupie kontrolnej oraz grupach leczonych.

Ryc. 26. Wielkość zmian w „korzeniu aorty”, wyrażona w μm^2 , u barwionych ORO 6-miesięcznych myszy apoE - *knockout* kontrolnych i leczonych.

Ryc. 27. Reprezentatywne łuki aort z myszy apoE-*knockout*.

Ryc. 28. Skład blaszki miażdżycowej u 24-tygodniowych myszy, leczonych AVE 0991, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Ryc. 29. Poziom sVCAM-1 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 30. Poziom MCP-1 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 31. Poziom IL-6 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 32. Poziom IL-12 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 33. Poziom SAA w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 34. NO-zależne izometryczne rozkurcze pierścieni aortalnych myszy apoE – *knockout*, wstępnie przykurczanych $\text{PGF}_{2\alpha}$, jako reakcja na podanie wzrastających

stężenia ACh.

Ryc. 35. Dwa „przeciwstawne” systemy w ramach układu RAA.

Ryc. 36. Korzystne „przekierowanie” terapeutyczne osi RAA.

Ryc. 37. Równowaga pomiędzy aktywnością ACE i ACE2 i jej wpływ na rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego.