Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum Wydział Lekarski

Mgr Anna Bar

Badanie czynności śródbłonka naczyniowego w mysich modelach chorób układu krążenia z wykorzystaniem obrazowania MR *in vivo*

MRI – based *in vivo* assessment of endothelial function in murine models of cardiovascular diseases

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Pracę wykonano w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Kraków, 2019

Pragnę podziękować Panu Profesorowi Stefanowi Chłopickiemu za opiekę naukową oraz pomoc w realizacji niniejszej pracy doktorskiej

oraz

wszystkim Współautorom publikacji za życzliwość, zaangażowanie i owocną współpracę.

Badania wykonano w ramach realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki: PRELUDIUM 2016/23/N/NZ5/00595 oraz częściowo w ramach projektów: Narodowego Centrum Nauki SYMFONIA 2015/16/W/NZ4/00070 Narodowego Centrum Badań i Rozwoju STRATEGMED1/233226/11/NCBR/2015

Spis treści

I.	Wstęp2
II.	Cel badań
III.	Streszczenie prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej9
1. ph	Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early ase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR ^{-/-} mice
2. coi	Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; mparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor
3. an	The deletion of endothelial sodium channel α (αENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation d endothelial barrier integrity in endotoxemia in vivo11
IV.	Dyskusja13
V.	Piśmiennictwo
VI.	Streszczenie rozprawy doktorskiej
VII.	Abstract of PhD thesis
VIII	. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej41
IX.	Oświadczenia współautorów

I. Wstęp

Rola śródbłonka w utrzymaniu homeostazy naczyniowej

który Śródbłonek naczyniowy, można uznać za największy narząd wewnątrzwydzielniczy człowieka, produkuje i uwalnia liczne substancje wpływające na przeciwstawne procesy, zapewniające utrzymanie homeostazy naczyniowej [1]. Prawidłowo funkcjonujący śródbłonek bierze udział w regulacji tonusu naczyń krwionośnych, przepuszczalności ściany naczynia, proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich, w procesach zapalnych i immunologicznych, jak również wpływa na krzepniecie i fibrynolize [2-5]. W przypadku dysfunkcji śródbłonka dochodzi do zaburzenia homeostazy ustroju, przejawiającej się upośledzeniem odpowiedzi rozkurczowej i zwiększoną przepuszczalnością naczynia, upośledzeniem właściwości naczynioprotekcyjnych oraz aktywacji procesów prozakrzepowych oraz pro-zapalnych śródbłonka [6-8]. Procesy związane z dysfunkcją śródbłonka są początkowym etapem wielu chorób, między innymi miażdżycy [9], nadciśnienia [10], niewydolności serca [11] i innych patologii bezpośrednio niezwiązanych z układem sercowo-naczyniowym, takich jak np. przerzutowość nowotworowa [12].

Śródbłonek naczyniowy uwalnia między innymi związki o działaniu relaksacyjnym na mięśniówkę naczyń oraz czynniki powodujące ich obkurczenie [13]. Jednym z podstawowych czynników rozkurczających naczynia krwionośne jest tlenek azotu (NO), powstający z L-argininy przy udziale śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) [14]. W odpowiedzi na siły ścinające działające na ścianę naczyń, powstające pod wpływem przepływającej krwi, uwolniony z komórek śródbłonka NO przenika do komórek mięśniówki naczyń, gdzie aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylową, katalizującą powstawanie 3'5' cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP) [15]. Ten z kolei warunkuje relaksację mięśniówki gładkiej na drodze zależnej od aktywności kinaz białkowych, fosforylacji transmembranowych białek transportowych oraz regulacji aktywności kinaz łańcuchów lekkich miozyny (MLCK) [6]. Ponadto NO hamuje adhezję leukocytów do śródbłonka [16], agregację i adhezję płytek krwi [17], migrację [18] i proliferację [19] komórek mięśni gładkich, jednocześnie stymulując też proliferację i podziały komórek śródbłonka, co jest istotne podczas odbudowy ściany uszkodzonego naczynia [13]. Kolejnym czynnikiem wazorelaksacyjnym jest śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF), powodujący między innymi otwarcie kanałów potasowych komórek mięśni gładkich, co prowadzi do zwiększonego wypływu jonów potasu i hiperpolaryzacji ich błony komórkowej [20]. Działanie NO jest wspomagane również przez produkowaną i uwalnianą ze śródbłonka prostacyklinę (PGI₂), aktywującą receptory IP na powierzchni komórek mięśni gładkich lub płytek krwi. Podobnie jak NO, PGI₂ może regulować relaksację naczyń krwionośnych, jednak działanie to jest drugorzędne w stosunku do jej silnego działania przeciwpłytkowego [13,21].

Związkiem działającym przeciwnie do PGI₂ jest tromboksan A₂ (TXA₂), produkowany głównie przez płytki krwi, powodujący silne obkurczenie naczyń, wzmożoną agregację płytek krwi oraz proliferację mięśniówki naczyń [22]. Do grupy śródbłonkowych związków obkurczających naczynia zalicza się również czynnik aktywujący płytki krwi (PAF) [23], angiotensynę II (Ang II) [24] oraz endotelinę 1 (ET-1) [25]. ET-1 oddziałuje z dwoma homologicznymi receptorami endotelin: A (ET_A), którego stymulacja przez szlak fosfolipazy C prowadzi do skurczu i proliferacji mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych oraz B (ET_B), którego pobudzenie sprzyja uwalnianiu NO i PGI₂ przez śródbłonek [25].

Śródbłonek naczyniowy jest również głównym regulatorem selektywnej wymiany substancji rozpuszczonych i komórek pomiędzy płynącą krwią a otaczającymi tkankami [26]. Transport małych cząsteczek przez warstwę śródbłonka zachodzi zgodnie z gradientem stężeń. Natomiast przejście większych cząsteczek i komórek może zachodzić jedynie poprzez pęcherzyki i receptory z udziałem prawidłowo funkcjonującego śródbłonka lub pomiędzy komórkami, gdy połączenia ścisłe śródbłonka ulegają upośledzeniu [27]. W warunkach patologicznych [28], a także pod wpływem starzenia [29], przepuszczalność śródbłonka wzrasta, przyczyniając się w szczególności do rozwoju blaszki miażdżycowej, której powstawanie jest silnie związane z transmigracją leukocytów oraz akumulacją lipoprotein niskiej gęstości w ścianie naczynia [30].

Metody oceny czynności śródbłonka naczyniowego u ludzi

Ocena fenotypu śródbłonka naczyniowego w warunkach klinicznych, najczęściej wykonywana jest na podstawie detekcji pro-zapalnych i pro-zakrzepowych markerów biochemicznych dysfunkcji śródbłonka w osoczu, takich jak na przykład: czynnik von Willebranda (vWf) [31], rozpuszczalna trombomodulina (sTM) [32], rozpuszczalna, naczyniowa cząsteczka adhezyjna (sVCAM-1) oraz międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (sICAM-1) lub rozpuszczalna E-selektyna [33]. Należy jednak podkreślić, iż upośledzony rozkurcz naczyń krwionośnych, zależny od NO, ma szczególne znaczenie w badaniach klinicznych, ze względu na wartość prognostyczną tej odpowiedzi, w przewidywaniu niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych [34,35]. Ocena śródbłonkowo-zależnego

rozkurczu u ludzi, opiera się na pomiarach zmian średnicy naczynia w odpowiedzi na stymulację farmakologiczną. W tym celu wykorzystuje się między innymi techniki angiograficzne [36] oraz dopplerowskie pomiaru przepływu krwi [37] w naczyniach wieńcowych lub obwodowych, w odpowiedzi na podanie agonistów zależnych (acetylocholina, bradykinina), bądź niezależnych od śródbłonka (nitroprusydek sodu). Ze względu na inwazyjny charakter, metody te nie znajdują jednak zastosowania w codziennej praktyce [38].

Wśród metod nieinwazyjnych oceny czynności śródbłonka wyróżnić można tonometrię aplanacyjną, umożliwiającą ocenę fali tętna (PWA) [39] oraz ocenę propagacji fali tętna (PWV) [40], dostarczających informacji na temat sztywności ściany naczynia [41], a także obwodową tonometrię tętniczą wykorzystującą zjawisko reaktywnej hiperemii (RH-PAT). Przeprowadzone badania wykazały zależność między upośledzeniem właściwości wazomotorycznych śródbłonka, a obniżoną wartością wskaźnika RH-PAT u pacjentów z wczesną miażdżycą tętnic wieńcowych [42] oraz u kobiet z chorobą niedokrwienną serca [43].

Pomimo kilku dostępnych metod opisanych powyżej, złotym standardem w diagnostyce dysfunkcji śródbłonka jest ocena śródbłonkowo-zależnego rozkurczu wywołanego nagłym wzrostem przepływu krwi (FMD), w następstwie krótkotrwałej okluzji tętnicy. Najczęściej pomiary FMD wykonywane są przy pomocy ultrasonografii (USG) w tętnicy ramiennej. Wykazano również korelację pomiędzy wynikami FMD uzyskanymi u zdrowych ochotników, przy użyciu standardowej techniki USG, a obrazowaniem magnetyczno-rezonansowym (MR) [44]. Podczas wzmożonego przepływu krwi, siły ścinające działające na ścianę naczynia, wyzwalają procesy na poziomie komórkowym, prowadzące do aktywacji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu, a tym samym do uwolnienia NO [45]. Wykazano, że ocena czynności śródbłonka za pomocą FMD ma wartość prognostyczną w przewidywaniu niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych [46].

Nieinwazyjna technika oparta na metodzie obrazowania MR wydaje się być odpowiednia nie tylko do oceny FMD [47], ale również oceny innych parametrów mogących pośrednio świadczyć o dysfunkcyjnym fenotypie śródbłonka naczyniowego, takich jak sztywność czy rozciągliwość aorty [48,49], a także PWV [50,51].

Technologia obrazowania MR umożliwia zatem ocenę fenotypu śródbłonka w warunkach klinicznych, niestety dostęp do tego typu aparatury jest wciąż ograniczony. W ostatnim czasie pojawiają się jednak publikacje pokazujące, że tego rodzaju ocena może być z powodzeniem prowadzona również w badaniach eksperymentalnych z udziałem zwierząt. Opracowana przez autorkę niniejszej pracy doktorskiej metodyka, wpisuje się w ten nowy nurt badań nad zastosowaniem obrazowania MR do oceny czynności śródbłonka u zwierząt doświadczalnych [8].

Metody oceny czynności śródbłonka naczyniowego w warunkach eksperymentalnych

Rozwój metod pozwalających na ocenę stanu śródbłonka in vivo w modelach zwierzecych jest kluczowy dla badań przedklinicznych, oceniających skuteczność farmakoterapii śródbłonka. Mysie modele chorób sercowo-naczyniowych są coraz częściej wykorzystywane w celu lepszego poznania mechanizmów patologii, a także opracowania nowych metod oceniających progresję tychże chorób. Jednak ocena podstawowych cech dysfunkcji śródbłonka w modelach mysich, głównie ze względu na rozmiar mysich naczyń krwionośnych [52], jest związana z wymogiem wysokiej rozdzielczości czasowoprzestrzennej, spełnionym przez nowoczesne, przedkliniczne systemy obrazowania MR. W szczególności, technika obrazowania MR może być wykorzystana do oceny czynności śródbłonka, nawet w naczyniach krwionośnych o niewielkiej średnicy, przy bardzo szybkiej częstości pracy serca myszy. Obrazowanie MR pozwala również na ocenę zmian przepuszczalności naczyń, ze względu na możliwość zastosowania gadolinowych środków kontrastowych, co stanowi istotne uzupełnienie wyników pomiaru czynności śródbłonka, uzyskanych na podstawie badań zależnego od śródbłonka rozkurczu naczyń krwionośnych. Dodatkową zaletą obrazowania MR w badaniach naczyniowych jest możliwość równoczesnego badania naczyń krwionośnych, zarówno centralnych, jak i obwodowych.

Jak dotąd opublikowano zaledwie kilka prac opisujących ocenę fenotypu śródbłonka naczyniowego u zwierząt eksperymentalnych, z użyciem technik obrazowania MR *in vivo*. Opublikowane prace opisują przede wszystkim możliwość zastosowania obrazowania MR do oceny czynności śródbłonka *in vivo*, w oparciu o analizę PWV i ocenę śródbłonkowozależnego rozkurczu naczyń. Wykazano, że obrazowanie MR nadaje się do oceny PWV i grubości ściany aorty u myszy ApoE^{-/-}, dostarczając wczesnych informacji na temat lokalnej progresji miażdżycy, tuż przed pojawieniem się dobrze rozwiniętej blaszki miażdżycowej [53]. Do oceny progresji morfologicznych i mechanicznych zmian, związanych z rozwojem miażdżycy, w mysich aortach przy pomocy obrazowania MR *in vivo* wykorzystać można również takie parametry jak prędkość przepływu krwi, powierzchnia przekroju ściany lub rozciągliwość naczynia [54]. Obrazowanie MR umożliwia ponadto ocenę śródbłonkowego naprężenia ścinającego (ESS), którego zmiany świadczą o początku aterogenezy [55]. Opartą na obrazowaniu MR ocenę ESS przeprowadzono również w mysim modelu stabilnej i niestabilnej blaszki miażdżycowej [56], pokazując że prędkość przepływu krwi i ścienne naprężenia ścinające mają różne wartości w zależności od miejsca w układzie naczyniowym, co dostarcza cennych informacji na temat zaburzeń przepływu laminarnego, tak istotnego w patogenezie miażdżycy.

Pomimo dostępności wielu różnych parametrów opisujących czynność śródbłonka naczyniowego *in vivo*, śródbłonkowo-zależny rozkurcz naczynia, wywołany acetylocholiną lub innymi związkami powodującymi wazodylatację, jest wciąż najczęściej używaną metodą służącą do wykrywania dysfunkcji śródbłonka w badaniach eksperymentalnych, zarówno *in vivo*, jak i w izolowanych naczyniach *ex vivo*. W wielu badaniach wykorzystujących różne podejścia oparte na obrazowaniu MR, oceniano zależny od śródbłonka rozkurcz, na przykład w naczyniach mózgowych u szczurów z nadciśnieniem tętniczym [57] oraz w pniu ramienno-głowowym i tętnicy szyjnej u myszy ApoE^{-/-} przebywających na diecie wysokotłuszczowej [58]. W zaawansowanym stadium rozwoju dysfunkcji śródbłonka, odpowiedź na acetylocholinę wywołuje paradoksalny skurcz naczyń, tak jak to również opisywano w badaniach u ludzi [36].

Biorąc pod uwagę, że wzrost przepuszczalności śródbłonka stanowi ważną cechę dysfunkcji śródbłonka, która w konsekwencji przyczynia się do rozwoju miażdżycy, wykazano, że metoda oparta na obrazowaniu MR *in vivo* z użyciem gadolinowych środków kontrastowych połączonych z albuminą, umożliwia ocenę zmian przepuszczalności śródbłonka w naczyniach krwionośnych świń [59]. Wykazano również, że w metodzie opartej na obrazowaniu MR *in vivo*, gadolinowe środki kontrastowe mogą być stosowane do wykrywania zmian miażdżycowych w ścianie naczyń krwionośnych królików [60]. Zgodnie z wiedzą autorki niniejszej pracy doktorskiej, istnieją jednak tylko trzy prace, pokazując możliwość oceny zmian przepuszczalności śródbłonka opartej na obrazowaniu MR *in vivo* u myszy. Wykazano w nich, że nieinwazyjna ocena przepuszczalności śródbłonka z użyciem gadolinowych środków kontrastowych połączonych z albuminą, może być z powodzeniem stosowana w celu wykrycia zwiększonej przepuszczalności u myszy ApoE^{-/-} przebywających na diecie wysokotłuszczowej [58], zwiększonej przepuszczalności po wywołanym chirurgicznie uszkodzeniu komórek śródbłonka u myszy ApoE^{-/-} [61], jak również zmniejszonej przepuszczalności śródbłonka u myszy ApoE^{-/-}

przebywających na diecie wysokotłuszczowej, leczonych jednocześnie Minocykliną i Ebselenem [62].

Nadal brakuje jednak kompleksowych metod opartych na obrazowaniu MR, pozwalających na szybką i jednoczesną ocenę głównych cech dysfunkcji śródbłonka, czyli upośledzonego rozkurczu zależnego od śródbłonka i wzrostu przepuszczalności, w modelach mysich *in vivo*. W konsekwencji brakuje prac, opisujących wczesne i późne etapy rozwoju cech dysfunkcji śródbłonka, w mysich modelach chorób układu sercowo-naczyniowego *in vivo*, co jest istotnym punktem wyjścia dla dalszych badań nad nowymi mechanizmami farmakoterapeutycznymi śródbłonka naczyniowego.

II. Cel badań

Celem badań było zastosowanie metodyki, umożliwiającej obrazowanie magnetycznorezonansowe (MR) dwóch głównych cech dysfunkcji śródbłonka *in vivo* u myszy [8], czyli upośledzonego zależnego od śródbłonka rozkurczu naczyń krwionośnych i zwiększonej przepuszczalności ściany naczynia, do 1) oceny progresji dysfunkcji śródbłonka, 2) monitorowania skutków farmakoterapii śródbłonka oraz 3) badania wpływu wprowadzonej modyfikacji genetycznej na fenotyp śródbłonka w modelach mysich *in vivo*.

W niniejszej pracy doktorskiej zastosowano metodykę oceny fenotypu śródbłonka, z wykorzystaniem techniki obrazowania MR, opisaną w pracy, która nie wchodzi w cykl prac stanowiących rozprawę doktorską:

Retrospectively gated MRI for in vivo assessment of endothelium-dependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. Bar A., Skorka T., Jasiński K., Sternak M., Bartel Ż., Tyrankiewicz U., Chlopicki S. *NMR Biomed.* 2016 Aug; 29(8):1088-97. doi: 10.1002/nbm.3567. (IF pięcioletni = 3,420; Punktacja MNiSW = 35).

Rozprawę doktorską natomiast stanowi cykl trzech, niżej wymienionych, opublikowanych prac naukowych:

- Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR^{-/-} mice. Bar A., Targosz-Korecka M., Suraj J., Proniewski B., Jasztal A., Marczyk B., Sternak M., Przybyło M., Kurpińska A., Walczak M., Kostogrys R.B., Szymonski M., Chlopicki S. *J Am Heart Assoc.* 2019, 19;8(6): e011171 doi: 10.1161/JAHA.118.011171. (IF pięcioletni = 5,096; Punktacja MNiSW = 40).
- Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; comparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor. Bar A., Olkowicz M., Tyrankiewicz U., Kus E., Jasinski K., Smolenski R.T., Skorka T., Chlopicki S. *Front Pharmacol.* 2017 Apr; 10; 8:183. doi: 10.3389/fphar.2017.00183. (IF pięcioletni = 4,439; Punktacja MNiSW = 40).
- The deletion of endothelial sodium channel α (αENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia *in vivo*. Sternak M., Bar A., Adamski M.G., Mohaissen T., Marczyk B., Kieronska A., Stojak M., Kus K., Tarjus A., Jaisser F., Chlopicki S. *Front Pharmacol*. 2018 Apr; 10;9:178. doi: 10.3389/fphar.2018.00178. (IF pięcioletni = 4,439; Punktacja MNiSW = 40).

III. Streszczenie prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

1. Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR^{-/-} mice

Bar A., Targosz-Korecka M., Suraj J., Proniewski B., Jasztal A., Marczyk B., Sternak M., Przybyło M., Kurpińska A., Walczak M., Kostogrys R.B., Szymonski M., Chlopicki S. *J Am Heart Assoc.* (Praca 1)

Cel: Ocena progresji dysfunkcji śródbłonka w mysim modelu miażdżycy (myszy ApoE/LDLR^{-/-}), przy użyciu metody obrazowania MR *in vivo*.

Metodologia: Badania prowadzone były z wykorzystaniem samic myszy ApoE/LDLR^{-/-} w wieku 4, 8 i 28 tygodni w porównaniu do 8-tygodniowych samic myszy kontrolnych (C57Bl/6). Myszy poddano obrazowaniu MR *in vivo*, w celu oceny śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi rozkurczowej na podanie acetylocholiny w pniu ramienno-głowowym (BCA) i aorcie brzusznej, oceny śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi rozkurczowej wywołanej nagłym wzrostem przepływu krwi (FMD) w tętnicy udowej oraz oceny zmian przepuszczalności śródbłonka w BCA z użyciem gadolinowego środka kontrastowego, umieszczonego w liposomie. W celu walidacji wyników *in vivo*, wykonano pomiary produkcji NO (EPR) oraz pokrycia i długości glikokaliksu (AFM) w aorcie *ex vivo*, a także stężenia biomarkerów dysfunkcji śródbłonka w osoczu (microLC/MS-MRM).

Wyniki: U 4-8-tygodniowych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, charakteryzujących się brakiem dobrze rozwiniętej blaszki miażdżycowej, zaobserwowano upośledzony, śródbłonkowo-zależny rozkurcz w aorcie, a także zwiększoną przepuszczalność śródbłonka w BCA, przy zachowanej odpowiedzi FMD w tętnicy udowej, w porównaniu do myszy C57Bl/6. Wczesnym zmianom czynności śródbłonka u myszy ApoE/LDLR^{-/-}, towarzyszyły również obniżona produkcja NO oraz redukcja powierzchni i długości glikokaliksu w aorcie *ex vivo*, a także wzrost stężenia biomarkerów dysfunkcji śródbłonka w osoczu (biomarkery: zwiększonej przepuszczalności śródbłonka – angiopoetyna 2 (Angpt-2); degradacji glikokaliksu - cząsteczka specyficzna dla komórek śródbłonka 1/endokan (ESM-1); zapalenia w śródbłonku - rozpuszczalna naczyniowa cząsteczka adhezyjna 1 (sVCAM-1); zaburzeń hemostazy - inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1) i tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA)). U 28-tygodniowych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, charakteryzujących się obecnością zaawansowanej blaszki miażdżycowej,

upośledzenie śródbłonkowo-zależnego rozkurczu w aorcie i BCA uległo dalszej progresji, obserwowanej jako paradoksalny skurcz naczyń, wraz z upośledzoną odpowiedzią FMD, wzrostem przepuszczalności śródbłonka, jak również dalszą redukcją długości i powierzchni glikokaliksu.

Wnioski: W ramach pracy wykazano, że na wczesnym etapie rozwoju miażdżycy, wyprzedzającym pojawienie się dobrze rozwiniętej blaszki miażdżycowej, dysfunkcja śródbłonka u myszy ApoE/LDLR^{-/-} jest wieloczynnikową odpowiedzią, obejmującą między innymi upośledzony, śródbłonkowo-zależny rozkurcz naczynia, zwiększoną przepuszczalność śródbłonka, zmniejszoną produkcję NO oraz redukcję powierzchni i długości glikokaliksu w aorcie, a także podwyższone stężenie wybranych biomarkerów dysfunkcji śródbłonka. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo* umożliwia ocenę głównych cech zaburzonej czynności śródbłonka, na wczesnych i późnych etapach rozwoju dysfunkcji śródbłonka u myszy ApoE/LDLR^{-/-} oraz że uzyskane wyniki *in vivo* są zgodne z wynikami otrzymanymi innymi metodami badania dysfunkcji śródbłonka *ex vivo* (EPR, AFM, microLC/MS-MRM).

2. Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; comparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensinconverting enzyme inhibitor

Bar A., Olkowicz M., Tyrankiewicz U., Kus E., Jasinski K., Smolenski R.T., Skorka T., Chlopicki S. *Front Pharmacol.* 2017 (**Praca 2**)

Cel: Ocena śródbłonkowego działania 1-metylonikotynamidu (MNA) w mysim modelu miażdżycy (ApoE/LDLR^{-/-}), w porównaniu do inhibitora konwertazy angiotensyny (Perindopril), przy użyciu metody obrazowania MR *in vivo*.

Metodologia: Efekty przeprowadzonej farmakoterapii, oceniane były na podstawie zmian czynności i przepuszczalność śródbłonka w pniu ramienno-głowowym (BCA), techniką obrazowania MR *in vivo* u 4-miesięcznych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, leczonych przez miesiąc lub dwa miesiące MNA (100 mg/kg/dzień), lub Perindoprilem (10 mg/kg/dzień), w porównaniu do nieleczonych myszy ApoE/LDLR^{-/-}. Ocena czynności śródbłonka prowadzona była w oparciu o zmianę objętości BCA, po dootrzewnowym podaniu acetylocholiny, natomiast zmiany przepuszczalności śródbłonka na podstawie mapowania czasu relaksacji T₁, po dożylnym podaniu gadolinowego środka kontrastowego, połączonego z albuminą.

Wyniki: U nieleczonych, 6-miesięcznych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, dootrzewnowe podanie acetylocholiny wywołało skurcz BCA wynoszący -7.2%. 2-miesięczne leczenie, zarówno MNA jak i Perindoprilem spowodowało przywrócenie prawidłowej, śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi rozkurczowej BCA (rozkurcz: 4.5% oraz 5.5%, odpowiednio) oraz zmniejszenie przepuszczalności śródbłonka (o ok. 60% w przypadku terapii MNA jak i Perindoprilem).

Wnioski: W przeprowadzonym badaniu wykazano, że 2-miesięczna terapia MNA (100 mg/kg/dzień) wykazuje podobny efekt ochronny naczyń jak 2-miesięczna terapia Perindoprilem (10 mg/kg/dzień), który można uznać jako referencyjny związek poprawiający czynność śródbłonka [63]. Podsumowując, zastosowanie opracowanej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo* umożliwia profilowanie śródbłonkowego działania związków, w celu wykazania ich korzystnego wpływu na fenotyp śródbłonka.

3. The deletion of endothelial sodium channel a (aENaC) impairs endotheliumdependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia in vivo

Sternak M., Bar A., Adamski M.G., Mohaissen T., Marczyk B., Kieronska A., Stojak M., Kus K., Tarjus A., Jaisser F., Chlopicki S. *Front Pharmacol.* 2018 (**Praca 3**)

Cel: Ocena wpływu zastosowanej modyfikacji genetycznej, prowadzącej do delecji śródbłonkowego kanału sodowego (αENaC), na NO-zależną odpowiedź rozkurczową naczynia i przepuszczalność śródbłonka, w warunkach fizjologicznych oraz w warunkach endotoksemii, u myszy z warunkową inaktywacją genu podjednostki αENaC (endo-αENaC^{KO}), przy użyciu metody obrazowania MR *in vivo*.

Metodologia: Ocena czynność śródbłonka prowadzona była u myszy endo-αENaC^{KO}, w porównaniu do myszy kontrolnych, w warunkach fizjologicznych lub endotoksemii wywołanej lipopolisacharydem (LPS, z *Salmonella typhosa*, 10 mg/kg, *i.p.*). Wszystkie grupy poddano obrazowaniu MR *in vivo*, w celu zbadania śródbłonkowo-zależnego rozkurczu naczyń krwionośnych, wywołanego przez acetylocholinę w aorcie, lub przez zwiększony przepływ krwi (FMD) w tętnicy udowej, a także zmian przepuszczalności śródbłonka w pniu ramienno-głowowym (BCA) przy użyciu gadolinowego środka kontrastowego połączonego z albuminą.

Wyniki: W warunkach podstawowych zaobserwowano upośledzenie śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi na podanie acetylocholiny w aorcie, a także odpowiedzi FMD w tętnicy udowej u myszy endo-αENaC^{KO} w porównaniu do myszy kontrolnych. Upośledzenie śródbłonkowo-

zależnej odpowiedzi, zarówno w aorcie jak i tętnicy udowej u myszy endo- α ENaC^{KO} w porównaniu do myszy kontrolnych, było bardziej zaawansowane w grupach traktowanych LPS. W warunkach endotoksemii, u myszy endo- α ENaC^{KO} obserwowano ponadto wzrost przepuszczalności śródbłonka, która nie ulegała zmianom u myszy endo- α ENaC^{KO} w warunkach fizjologicznych.

Wnioski: W przeprowadzonym badaniu wykazano, że w warunkach fizjologicznych αENaC bierze udział w regulacji śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi rozkurczowej naczyń, podczas gdy w warunkach patofizjologicznych przyczynia się do zachowania integralności bariery śródbłonka. Otrzymane wyniki sugerują, że aktywacja, a nie sugerowana wcześniej inhibicja αENaC, może być korzystna dla poprawy czynności śródbłonka. Podsumowując, zastosowanie opracowanej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo* umożliwia detekcję dysfunkcji śródbłonka, wywołaną przez endotoksemię i nadaje się również do fenotypowania czynności śródbłonka w mysich modelach z modyfikowanym genetycznie śródbłonkiem.

IV. Dyskusja

Dysfunkcja śródbłonka towarzyszy rozwojowi wielu chorób, nie tylko układu sercowonaczyniowego [9–12], a farmakoterapia ukierunkowana na leczenie dysfunkcji śródbłonka stanowi nowatorskie podejście w ich leczeniu [63]. Wciąż jednak brakuje metod pozwalających na szybką i wiarygodną ocenę fenotypu śródbłonka w modelach mysich *in vivo*, stanowiących podstawowy model w badaniach przedklinicznych w biomedycynie.

Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej opisują zastosowanie opracowanej metodyki obrazowania MR czynności śródbłonka u myszy *in vivo* [8], do oceny progresji dysfunkcji śródbłonka *in vivo* w mysim modelu miażdżycy (myszy ApoE/LDLR^{-/-}) (**Praca 1**), oceny skuteczności farmakoterapii dysfunkcji śródbłonka z użyciem MNA w porównaniu do referencyjnego leczenia Perindoprilem, w mysim modelu miażdżycy (myszy ApoE/LDLR^{-/-}) (**Praca 2**) oraz oceny wpływu wprowadzonej modyfikacji genetycznej prowadzącej do delecji śródbłonkowego kanału sodowego alfa (αENaC) na czynność śródbłonka, w warunkach fizjologicznych oraz w endotoksemii, u myszy z warunkową inaktywacją genu podjednostki αENaC (endo-αENaC^{KO}) w śródbłonku naczyniowym (**Praca 3**).

Wyniki tych prac pokazują, że metodologia obrazowania MR czynności śródbłonka *in vivo* pozwala na detekcję głównych cech zaburzonej czynności śródbłonka na wczesnych i późnych etapach rozwoju dysfunkcji śródbłonka w mysich modelach chorób układu krążenia. Jednocześnie wykazano, że zastosowanie opracowanej metodyki umożliwia profilowanie śródbłonkowego działania związków oraz detekcję upośledzenia czynności śródbłonka wywołaną modyfikacją genetyczną w śródbłonku, w warunkach doświadczalnych *in vivo*.

Metodologia

W niniejszej rozprawie doktorskiej, zastosowano metodykę obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo* [8], pozwalającą na kompleksową ocenę głównych cech dysfunkcji śródbłonka w modelach mysich *in vivo*, a w szczególności ocenę: śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi na podanie acetylocholiny w różnych naczyniach, w których obrazowanie MR było możliwe, śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi na wzrost przepływu krwi (FMD) w tętnicy udowej oraz zmian przepuszczalności śródbłonka ocenianych za pomocą gadolinowych środków kontrastowych połączonych z albuminą lub unikatowego preparatu gadolinu umieszczonego w liposomie (**Rycina 1**).



Rycina 1. Metodologia oceny czynności i przepuszczalności śródbłonka z użyciem obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MR) *in vivo*. Ocena śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi naczynia prowadzona jest w odpowiedzi na podanie acetylocholiny (16.6 mg/kg m.c., *i.p.*) w naczyniach wychodzących z łuku aorty (1) i w aorcie (2) lub w odpowiedzi na zwiększony przepływ krwi (FMD), wywołany chwilową okluzją naczynia, w tętnicy udowej (3), w oparciu o zmianę pola przekroju poprzecznego naczynia (1A) lub objętości (1,2,3). Okluzja naczynia używana w ocenie FMD, wykonywana jest przy pomocy opracowanego w ramach badań zacisku naczynia (3A, VO), składającego się z połączonych słomek (a) z plastikową osłoną (b), strzykawki (c) i żyłki wędkarskiej (d) połączonej z tłokiem strzykawki (e). Przepuszczalność śródbłonka oceniana jest na podstawia zmian czasu relaksacji T₁, po podaniu środka kontrastowego na bazie gadolinu (Galbumina, 25 mg/ml, 4.5 ml/kg, *i.v.*) lub gadolinu umieszczonego w liposomie (Gadodiamid , 287 mg/ml, 4.5 ml/kg, *i.v.*).

Opracowana metodologia obrazowania MR [8], opiera się na retrospektywnej sekwencji IntraGate[™] 3D FLASH. Niewątpliwie, ważną zaletą opracowanej metody, jest możliwość retrospektywnej rekonstrukcji obrazów z 3D zestawów danych, pozwalająca między innymi na zastąpienie stosowanej analizy 2D przekroju poprzecznego naczynia, analizą zmian objętości 3D. Stosowana sekwencja nie wymaga zewnętrznego bramkowania sygnału, przy pomocy dodatkowych urządzeń, gdyż wykorzystuje bramkowanie wewnętrzne, poprzez zastosowanie dodatkowej warstwy – nawigatora, umieszczonej w obszarze serca pozwalającego na śledzenie rytmu pracy serca [64]. Pomiar amplitudy sygnału z obszaru serca jest również podatny na ruchy związane z oddechem. Zaburzenia danych powodowane przez opisane procesy fizjologiczne można usunąć na etapie przetwarzania końcowego danych (retrospektywna rekonstrukcja danych), co minimalizuje ilość artefaktów pojawiających się na obrazie. Tego typu bramkowanie ma szczególne znaczenie przy pomiarach odpowiedzi naczyń na podanie związków (takich jak acetylocholina), powodujących zaburzenie pracy serca oraz oddechu myszy. Rekonstrukcja retrospektywna umożliwia również zmianę liczby klatek rejestrujących pracę serca (tryb cine), co zapewnia wysoką rozdzielczość czasową pomiarów.

W ramach cyklu prac stanowiących niniejszą rozprawę doktorską, ocena rozkurczu naczynia po podaniu acetylocholiny została wykonana w pniu ramienno-głowowym (BCA), lewej tętnicy szyjnej wspólnej oraz w aorcie. Wykazano, że badana odpowiedź naczynia na podanie acetylocholiny *in vivo* jest niezależna od wpływu acetylocholiny na częstość pracy serca myszy [8]. Standardowy protokół pomiarowy obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, opisany w pracy Bar i wsp. [8], został rozszerzony o ocenę śródbłonkowo-zależnego rozkurczu stymulowanego wzrostem przepływu krwi (FMD), stanowiący złoty standard w tego typu pomiarach u ludzi [65]. Zastosowanie tego typu techniki u myszy otwiera nowy teren dla badań translacyjnych.

Na uwagę zasługuje fakt, że jak dotąd niewiele doniesień opisuje ocenę FMD u małych zwierząt eksperymentalnych i stosuje w tym celu ultrasonografię [66,67] lub optyczną tomografię koherencyjną [68,69]. Opracowana w ramach niniejszej pracy doktorskiej ocena FMD, oparta na pomiarach obrazowania MR, nie wymaga operacyjnego odsłonięcia naczynia, co umożliwia nieinwazyjne obrazowanie tętnicy udowej u myszy. Ponadto ocena FMD może być przeprowadzona równocześnie z oceną odpowiedzi wywołanej przez acetylocholinę, co pozwala uzyskać funkcjonalną odpowiedź z dwóch różnych naczyń, w odpowiedzi na różne bodźce, podczas jednego, krótkiego zestawu pomiarów opartych na obrazowaniu MR. W ramach oceny FMD, w celu wywołania chwilowej okluzji naczynia, zastosowano specjalny zacisk, umożliwiający wykonanie okluzji naczynia u myszy przebywającej wewnątrz tomografu MR (**Rycina 1A**).

Oprócz oceny śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi rozkurczowej, opracowana metodologia obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, umożliwia ilościową ocenę przepuszczalności śródbłonka z użyciem mapowania czasu relaksacji T_1 i gadolinowych środków kontrastowych. Wraz ze wzrostem przepuszczalność naczynia, nieszczelne połączenia

międzykomórkowe śródbłonka umożliwiają akumulacje w ścianie naczynia cząsteczek lipoprotein o niskiej gęstości oraz transmigrację leukocytów, które są krytyczne w powstawaniu blaszki miażdżycowej [28]. Ten sam mechanizm rozszczelnienia dysfunkcyjnego śródbłonka, prowadzi do gromadzenia środków kontrastowych w ścianie uszkodzonego naczynia [59,60], a to skutkuje lokalnym skróceniem czasu relaksacji T₁, umożliwiając wykrycie zmian za pomocą obrazowania MR.

W ramach opracowanej metody pomiaru zmian przepuszczalności śródbłonka, zastosowano autorski parametr (Npx50) umożliwiający niezależną od operatora ocenę liczby pikseli (wokół ściany naczynia), dla których czas T₁ zmienił się o co najmniej 50% (przyjęty próg został oszacowany eksperymentalnie). Ponadto w przeprowadzonych badaniach, po raz pierwszy wykazano, że pomiary zmian przepuszczalności mogą być wykonywane również z użyciem gadolinu umieszczonego w liposomie [70] (**Praca 1**).

Większość gadolinowych środków kontrastowych MRI to małe, nieukierunkowane związki, które pasywnie przenikają do ściany naczynia z szeroką, nieswoistą biodystrybucją [71] lub gadolin kowalencyjnie związany z albuminą (GD-albumina). Takie podejście pozwala na zwiększone wzmocnienie kontrastowe ściany naczynia, ale nadal jest ono niewielkie [8,72]. Stosowane w **Pracy 1** liposomy o małych rozmiarach (110 nm), wypełnione gadolinem, stanowią alternatywę dla tego rodzaju środków kontrastowych, pozwalając na wykrywanie zmian przepuszczalności śródbłonka w oparciu o obrazowanie MR. Taki preparat kontrastowy powinien być mniej toksyczny, niż klasyczne środki kontrastowe oparte o gadolin, a w przyszłości poprzez modyfikację liposomu, może być również celowany do śródbłonka i ściany naczynia.

Progresja dysfunkcji śródbłonka w mysim modelu miażdżycy (myszy ApoE/LDLR^{-/-})

Upośledzenie śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi rozkurczowej naczynia oraz zwiększona przepuszczalność stanowią ważne dwie patofizjologiczne komponenty dysfunkcji śródbłonka. Celem **Pracy 1** była ocena zmian w czynności oraz przepuszczalności śródbłonka naczyniowego, przy użyciu metody obrazowania MR, we wczesnej fazie rozwoju miażdżycy (wyprzedzającej pojawienie się dobrze rozwiniętej blaszki miażdżycowej) w porównaniu do później fazy miażdżycy tętnic, charakteryzującej się obecnością zaawanasowanej blaszki miażdżycowej, odpowiednio u 4, 8 i 28-tygodniowych myszy ApoE/LDLR^{-/-}. Dodatkowo

wykonano pomiary produkcji NO (EPR) oraz pokrycia i długości glikokaliksu (AFM) w aorcie *ex vivo*, a także stężenia biomarkerów dysfunkcji śródbłonka w osoczu (microLC/MS-MRM).

Zastosowanie unikatowej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, wraz z innymi metodami oceny dysfunkcji śródbłonka *ex vivo*, po raz pierwszy pozwoliło wykazać w **Pracy 1**, że na wczesnym etapie rozwoju miażdżycy, dysfunkcja śródbłonka u 4-8-tygodniowych myszy ApoE/LDLR^{-/-} jest wieloczynnikową odpowiedzią, obejmującą między innymi upośledzony, śródbłonkowo-zależny rozkurcz naczynia, zwiększoną przepuszczalność śródbłonka, zmniejszoną produkcję NO oraz zmniejszoną powierzchnię i długość glikokaliksu w aorcie, a także podwyższone stężenie wybranych biomarkerów dysfunkcji śródbłonka.

W **Pracy 1** fenotyp śródbłonka myszy ApoE/LDLR^{-/-}, oceniany był na różnych etapach rozwoju miażdżycy, definiowanych na podstawie wielkości blaszki miażdżycowej. Przeprowadzona ocena wielkości blaszki, była zgodna z wynikami pracy Csanyi i wsp. [73] i wykazała, że u myszy ApoE/LDLR^{-/-}, karmionych standardową dietą, dobrze rozwinięta blaszka miażdżycowa wykrywana jest u myszy powyżej 8-10 tygodnia życia.

We wcześniejszych badaniach, ocena dysfunkcji śródbłonka była wielokrotnie przeprowadzana w mysich modelach miażdżycy [74–76], na podstawie NO-zależnej odpowiedzi rozkurczowej naczynia, w izolowanych naczyniach *ex vivo*. Najczęściej wykorzystywanym mysim szczepem w tych pracach, był szczep ApoE^{-/-} [77], w którym dysfunkcja śródbłonka wykrywana była często w późnym stadium rozwoju miażdżycy [75,78]. Upośledzenie NO-zależnej relaksacji, mierzone klasycznymi metodami w układzie izolowanej aorty *ex vivo*, zaobserwowano natomiast już u 8-tygodniowych myszy szczepu ApoE/LDLR^{-/-}, charakteryzujących się silną hipercholesterolemią, z podwyższonym poziomem całkowitego cholesterolu, LDL i HDL [73].

W Pracy 1 wykazano, że wieloczynnikowy charakter dysfunkcji śródbłonka, pojawia się już u 4-8-tygodniowych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, znacznie wcześniej przed rozwojem dobrze zdefiniowanej blaszki miażdżycowej. Wykrycie wczesnego upośledzenia funkcji śródbłonka, w modelu ApoE/LDLR^{-/-}, było możliwe ze względu na zastosowanie techniki obrazowania MR w różnych naczyniach, w których wykazano niejednorodny rozwój dysfunkcji. Najwcześniejsze zmiany w czynności śródbłonka obserwowano jako upośledzony śródbłonkowo-zależny rozkurcz, indukowany acetylocholiną u 4-tygodniowych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, w aorcie brzusznej. Pomimo pojawiającej się jedynie tendencji w spadku poziomu odpowiedzi rozkurczowej na podanie acetylocholiny w pniu ramienno-głowowym

(BCA) u 8-tygodniowych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, wzrost przepuszczalności BCA obserwowany był już w 4. tygodniu życia myszy. Z kolei opóźnienie upośledzenia odpowiedzi rozkurczowej w tętnicy udowej, obserwowane u 28-tygodniowych myszy, może wskazywać na inne mechanizmy zaangażowane w odpowiedź FMD u myszy ApoE/LDLR^{-/-} [79], w porównaniu do odpowiedzi wywołanej przez acetylocholinę w aorcie.

Pomiary in vivo obrazowania MR, wykazały wiec heterogenna odpowiedź śródbłonka naczyniowego, którą dobrze byłoby wykazać również w badaniach z użyciem izolowanych naczyń ex vivo. Nie można wykluczyć, że w odpowiedź FMD zaangażowane są inne mechanizmy rozkurczające naczynia. Oprócz dwóch głównych związków (NO, prostacyklina), relaksację naczynia powodować może grupa czynników określanych jako śródbłonkowe czynniki hiperpolaryzujący (EDHFs) [80,81]. EDHFs powodują relaksację naczynia poprzez aktywację kanałów potasowych komórek mięśni gładkich, co prowadzi do zwiększonego wypływu jonów potasu i hiperpolaryzacji ich błony komórkowej [20]. Relaksacja z udziałem EDHFs może zachodzić również poprzez aktywację kanałów potasowych komórek śródbłonka, za pośrednictwem połączeń mio-endotelialnych (połączenia szczelinowe, "gap junction") [82,83]. Chemiczne mediatory zależnej od EDHF relaksacji, różnią się w zależności od łożyska naczyniowego i badanego gatunku. Wykazano, że w tętnicach wieńcowych różnych gatunków, między innymi ludzi, rolę EDHFs pełnią między innymi kwasy epoksyeikozatrienowe (EET) [84,85]. Ponadto w relaksację, zależną od EDHF, szczurzych tętnic watrobowych zaangażowane są jony K^+ [86], natomiast w mysich i ludzkich tętnicach krezkowych, w odpowiedzi tej pośredniczy również H₂O₂ [87,88]. Potrzebne są jednak dalsze badania, aby wykazać, że odpowiedź FMD w tętnicy udowej, u myszy ApoE/LDLR^{-/-} jest niezależna od śródbłonkowego NO i dlatego odpowiedź FMD ulega upośledzeniu później, niż odpowiedź na acetylocholinę.

Dysfunkcyjny fenotyp śródbłonka u myszy ApoE/LDLR^{-/-}, pojawiający się na bardzo wczesnym etapie odpowiedzi na działanie hipercholesterolemiczne, charakteryzował się upośledzoną produkcją NO, mierzoną metodą EPR [89] oraz zmniejszoną powierzchnią i długością glikokaliksu, mierzonych metodą AFM [90] w aorcie *ex vivo*, a także zwiększonym stężeniem osoczowych biomarkerów dysfunkcji śródbłonka (biomarkery: zwiększonej przepuszczalności śródbłonka - Angpt-2; degradacji glikokaliksu - ESM-1; zapalenia w śródbłonku - sVCAM-1; zaburzeń hemostazy - PAI-1 i t-PA), ocenianych na podstawie pomiarów microLC/MS-MRM [91].

Na podstawie wyników otrzymanych w **Pracy 1**, podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy uszkodzenie glikokaliksu wyprzedza [92], czy raczej pokrywa się z pojawieniem innych cech dysfunkcji śródbłonka, zgodnie z wcześniej zgłoszoną koncepcją błędnego koła [93]. Na podstawie dostępnej literatury, w **Pracy 1** opisano liczne mechanizmy, pokazujące że uszkodzenie glikokaliksu może przyczyniać się do rozwoju dysfunkcji śródbłonka, a w konsekwencji miażdżycy, natomiast z drugiej strony, procesy te mogą wzajemnie sprzyjać uszkodzeniu glikokaliksu. W sumie uzyskane w **Pracy 1** wyniki oraz ostatnio przedstawiona hipoteza [93], sugerują, że degradacja glikokaliksu współistnieje, a nie wyprzedza występowanie innych cech dysfunkcji śródbłonka.

Z przeprowadzonych badań składających się na **Pracę 1**, wynikają dwa istotne wnioski dla diagnostyki i farmakoterapii śródbłonka.

Po pierwsze, tylko niektóre z cech dysfunkcji śródbłonka, obserwowane u myszy ApoE/LDLR^{-/-} mają charakter progresywny i mogą stanowić rzetelną formę diagnostyki progresji dysfunkcji śródbłonka (paradoksalny skurcz w aorcie, postępujący wzrost przepuszczalności w BCA oraz zmniejszenie długości i pokrycia glikokaliksem).

Po drugie, biorąc pod uwagę złożoną naturę wczesnej fazy rozwoju dysfunkcji śródbłonka w miażdżycy wydaje się, że korekcja pojedynczego mechanizmu byłaby niewystarczająca, do wyleczenia dysfunkcji śródbłonka.

Podsumowując, na podstawie otrzymanych wyników, z zastosowaniem unikatowej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, uzupełnionej o pomiary: produkcji NO (EPR) oraz powierzchni i długości glikokaliksu (AFM) w aorcie *ex vivo*; a także stężenia biomarkerów dysfunkcji śródbłonka w osoczu (microLC/MS-MRM), po raz pierwszy wykazano, że dysfunkcja śródbłonka w miażdżycy tętnic, nawet na bardzo wczesnym etapie rozwoju, jest wieloczynnikowym zjawiskiem, obejmującym miedzy innymi upośledzony, śródbłonkowo-zależny rozkurcz naczynia, zwiększoną przepuszczalność śródbłonka, zmniejszoną produkcję NO oraz zmniejszoną powierzchnię i długość glikokaliksu w aorcie, a także podwyższone stężenie biomarkerów dysfunkcji śródbłonka w osoczu.

Wpływ leczenia 1-metylonikotynamidem (MNA) na fenotyp śródbłonka *in vivo* w mysim modelu miażdżycy (myszy ApoE/LDLR^{-/-})

Liczne prace pokazują, że 1-metylonikotynamid (MNA) posiada aktywność terapeutyczną, po podaniu egzogennym, mimo że do niedawna uważany był za nieaktywny metabolit nikotynamidu [94]. W badaniach z użyciem izolowanych naczyń *ex vivo*, wykazano

również, że MNA charakteryzuje się aktywnością naczynioprotekcyjną u myszy [95,96], nie opisano jednak do tej pory wpływu MNA na fenotyp śródbłonka w badaniach *in vivo*. Biorąc pod uwagę, że ocena czynności śródbłonka *in vivo* w modelach mysich jest niezbędna do przedklinicznego profilowania związków naczynioprotekcyjnych, celem **Pracy 2** było zastosowanie opracowanej metody obrazowania MR do oceny skutków działania MNA na fenotyp śródbłonka *in vivo*, w mysim modelu miażdżycy (ApoE/LDLR^{-/-}), w porównaniu do inhibitora konwertazy angiotensyny (Perindopril), wykazującego istotne działanie naczynioprotekcyjne, w różnych modelach eksperymentalnych, w tym w miażdżycy [63]. Zastosowanie unikatowej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo* pozwoliło wykazać, że 2-miesięczna terapia MNA (100 mg/kg/dzień) wykazuje podobny efekt ochronny naczyń, jak 2-miesięczna terapia Perindoprilem (10 mg/kg/dzień), obserwowany jako odwrócenie indukowanego acetylocholiną skurczu naczynia w odpowiedź rozkurczową oraz zmniejszenie przepuszczalności śródbłonka.

W **Pracy 2** pokazano, że u nieleczonych, 6-miesięcznych myszy ApoE/LDLR^{-/-}, dootrzewnowe podanie acetylocholiny wywołuje skurcz BCA, co najprawdopodobniej mogło być spowodowane odpowiedzią zależną od muskarynowego receptora mięśni gładkich, tak jak to opisano w ludzkich naczyniach z dysfunkcją śródbłonka [36]. Zastosowanie MNA lub Perindoprilu, skutkowało poprawą czynności śródbłonka, obserwowaną jako odwrócenie nieprawidłowej odpowiedzi skurczowej BCA w odpowiedź rozkurczową naczynia, a także spadek przepuszczalności śródbłonka. Na podstawie porównania otrzymanych w **Pracy 2** wyników oceny rozkurczu BCA po podaniu acetylocholiny u myszy ApoE/LDLR^{-/-} po 2-miesięcznym leczeniu MNA (zmiana objętości BCA: 4.5%) lub Perindoprilem (zmiana objętości BCA: 5.5%), do oceny rozkurczu BCA u 5-miesięcznych myszy C57BL/6J (zmiana objętości BCA: 9.3%), przedstawionej w innej pracy [8], wydaje się że poprawa śródbłonkowo-zależnego rozkurczu w przypadku obu związków jest znacząca, lecz nie całkowita. Pomimo, że dwumiesięczna terapia MNA lub Perindoprilem skutkowała w poprawie czynności śródbłonka o podobnym nasileniu, miesięczny efekt stosowanych terapii był mniejszy w przypadku leczenia z użyciem MNA.

Ponadto w **Pracy 2** wykazano, że obserwowana za pomocą technik obrazowania fenotypu śródbłonka MR *in vivo*, poprawa czynności śródbłonka przez MNA i Perindopril, była w obydwu przypadkach związana z zahamowaniem klasycznej ścieżki układu renina-angiotensyna (RAS): konwertaza angiotensyny (ACE)/ angiotensyna II (AngII)/ receptor angiotensynowy typu 1 (AT1R) i jednoczesnej aktywacji przeciwstawnie działającej ścieżki

RAS: konwertaza angiotensyny 2 (ACE2)/ angiotensyna 1-7 (Ang(1-7))/ receptor Mas. Liczne badania pokazują, że układ RAS odgrywa kluczową rolę w inicjacji i progresji miażdżycy, której na wczesnych etapach towarzyszy rozwój dysfunkcji śródbłonka oraz że równowaga pomiędzy dwoma główmy osiami układu RAS (ACE/AngII i ACE2/Ang-(1-7)) jest ważnym wyznacznikiem szkodliwego lub korzystnego działania tego układu [97–99].

Wyniki przedstawione w Pracy 2, wskazujące na to, że śródbłonkowy profil działania MNA jest podobny do śródbłonkowego profilu działania Perindoprilu in vivo, pozwalają zrozumieć na nowo skuteczność terapeutyczną MNA opisaną wcześniej [104-113]. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że wywołane przez MNA przesunięcie równowagi między osiami układu RAS w kierunku osi wywołującej efekt naczynioochronny, przyczynia się do poprawy czynności śródbłonka lub alternatywnie może być jedynie ważną patofizjologiczną cechą poprawy czynności śródbłonka. W badaniach ex vivo w układzie izolowanych naczyń wykazano, że poprawa NO-zależnej czynności śródbłonka przez MNA, może być również związana z aktywacją funkcji zależnej od prostacykliny (PGI₂) [96]. Ponadto wykazano, że korzyści kliniczne przewlekłego hamowania ACE przez Perindopril, oprócz blokady systemowej i tkankowej formy Ang II, mogą wynikać częściowo z podwyższonego poziomu bradykininy, która prowadzi do zwiększonej biodostępności NO [100] i jest głównym mediatorem przeciwzakrzepowego działania ACE-I [63,101,102]. Nie można wykluczyć zatem, że za poprawę NO-zależnej czynności śródbłonka przez Perindopril, obserwowany w Pracy 2, są zaangażowane ścieżki zależne zarówno od Ang-II, jak i bradykininy. Potrzebne są jednak dalsze badania, aby zbadać czy te same mechanizmy zaangażowane są w działanie MNA.

W przeprowadzonym w **Pracy 2** badaniu, pokazano zatem, że terapia MNA i Perindoprilem osłabia różne powiązane ze sobą zmiany biochemiczne, które są ściśle związane z dysfunkcyjnym fenotypem śródbłonka, takie jak nadmierna aktywacja ACE lub podwyższony poziom ADMA i ten profil działania może przyczyniać się do naczynioprotekcyjnych efektów działania tych związków.

Podsumowując, zastosowanie unikatowej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, uzupełnionej o profilowanie biochemiczne szlaków ACE/ACE2 oraz L-Arginina/ADMA umożliwiło wykazanie w **Pracy 2**, że terapia MNA (100 mg/kg/dzień) skutkuje w odwróceniu indukowanego acetylocholiną skurczu naczynia w odpowiedź rozkurczową oraz w zmniejszeniu przepuszczalności śródbłonka, co po raz pierwszy zostało

wykazane w badaniu *in vivo*. Dodatkowo wykazano, że profil działania MNA (100 mg/kg/dzień) był podobny do śródbłonkowego profilu działania Perindoprilu (10 mg/kg/dzień).

Ocena wpływu delecji śródbłonkowego kanału sodowego alfa (αENaC) na fenotyp śródbłonka, u myszy z warunkową inaktywacją genu podjednostki αENaC (endoαENaC^{KO})

Dotychczas przeprowadzone badania sugerują, że aktywność śródbłonkowego kanału sodowego (α ENaC) przyczynia się do rozwoju sztywności śródbłonka [103], zaburzonej produkcji NO i wywołanej aldosteronem dysfunkcji śródbłonka w naczyniach przewodzących [104], a także zaburzenia funkcjonowania bariery komórek śródbłonka w mikrokrążeniu [105]. Rola α ENaC w regulacji czynności śródbłonka nie jest jednak jednoznaczna, co może być związane z heterogenicznością śródbłonka w makro- i mikro-naczyniach. Ponadto dotychczasowe badania nad regulacją czynności śródbłonka przez α ENaC, przeprowadzane były jedynie w warunkach *ex vivo* z użyciem izolowanych naczyń lub *in vitro* z użyciem hodowli komórkowych. Z tego względu, celem **Pracy 3** była ocena wpływu delecji śródbłonkowego kanału sodowego (α ENaC) na NO-zależną odpowiedź rozkurczową naczynia i przepuszczalności śródbłonka, w warunkach fizjologicznych oraz w warunkach endotoksemii, u myszy z warunkową inaktywacją genu podjednostki α ENaC w śródbłonku (endo- α ENaC^{KO}), przy użyciu metody obrazowania MR *in vivo*.

Zastosowanie unikatowej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo* pozwoliło wykazać, że w warunkach fizjologicznych delecja αENaC wpływa na zaburzenie śródbłonkowo-zależnego rozkurczu naczyń wywołanego przez acetylocholinę lub przez nagły wzrost przepływu krwi, natomiast w warunkach patofizjologicznych, aktywacja αENaC przyczynia się do zachowania integralności bariery śródbłonka.

Praca 3 po raz pierwszy wykazała, że śródbłonkowy α ENaC pełni ważną rolę w regulacji przepuszczalności śródbłonka *in vivo*. Przepuszczalność śródbłonka ma szczególne znaczenie w licznych warunkach patofizjologicznych, w tym w endotoksemii [1,5] i w utrzymywaniu homeostazy oraz integralności narządów w organizmie. Wyniki **Pracy 3**, dotyczące wpływu ENaC na przepuszczalność śródbłonka, pozostają zgodne z badaniem przeprowadzonym z użyciem komórek śródbłonka mikro-naczyń płucnych [105], wykazujących wcześniej nierozpoznaną rolę α ENaC, w utrzymywaniu prawidłowej funkcji kapilar płucnych.

Wyniki otrzymane w **Pracy 3**, wskazujące na to że delecja śródbłonkowego ENaC zaburza śródbłonkowo-zależne odpowiedzi rozkurczowe naczyń, są tylko częściowo zgodne z wynikami otrzymanymi wcześniej w pracy Tarjus i wsp. [106].

Używając ten sam model (endo-αENaC^{KO}), Tarjus i wsp. wykazał, że Benzamil (antagonista ENaC), obniża produkcję NO wywołany przez acetylocholinę i upośledza rozkurcz stymulowany przez wzrost przepływu krwi, przy jednocześnie zachowanym uwalnianiu NO pod wpływem acetylocholiny. Zatem, wyniki z pracy Tarjus i wsp. nie są zgodne z wynikami w **Pracy 3** w odniesieniu do oceny rozkurczu naczyń wywołanego przez acetylocholinę, ale pozostają zgodne, w odniesieniu do oceny rozkurczu naczyń wywołanego przez nagły wzrost przepływu krwi (FMD).

Należy jednak podkreślić, iż badania w **Pracy 3** zostały przeprowadzone przy użyciu obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo* w naczyniach przewodzących, podczas gdy badania z pracy Tarjus i wsp. w naczyniach oporowych (tętnica krezkowa), w warunkach izolowanych naczyń *ex vivo*. Zatem, rozbieżności między wynikami oceny śródbłonkowozależnej odpowiedzi rozkurczowej opisane powyżej, mogą wynikać po pierwsze z heterogenności śródbłonka w makro- i mikro-naczyniach, a po drugie z zastosowania różnych technik oceny czynności śródbłonka, stosowanych w obydwu badaniach.

Biorąc pod uwagę, że udział NO w śródbłonkowo-zależnym rozkurczu jest znaczniejszy w większych naczyniach [84], wpływ delecji αENaC na indukowany acetylocholiną rozkurcz w naczyniach przewodzących i oporowych, może wynikać z różnego udziału NO w śródbłonkowo-zależnym rozkurczu wywołanym przez acetylocholinę.

Pomimo tego, że badania w układach izolowanych naczyń krwionośnych *ex vivo* stanowią wciąż standardową technikę oceny śródbłonkowo-zależnego rozkurczu naczyń [73,95,107,108], wydaje się że obrazowanie MR *in vivo* może dostarczać bardziej fizjologicznej i kompleksowej oceny fenotypu śródbłonka. Klasyczne metody oceny czynności śródbłonka prowadzone są często z użyciem krążków naczyniowych umieszczanych na miografach drutowych (*ang. wire myograph*), co powoduje niefizjologiczne obciążenie i geometrię naczynia, a niekiedy powoduje również uszkodzenia śródbłonka [107,108]. Istnieją również techniki umożliwiające przeprowadzenie badań z użyciem większych fragmentów izolowanych naczyń, w warunkach fizjologicznego ciśnienia i przepływu z użyciem miografów ciśnieniowych (*ang. pressure myograph*) [109]. Pomimo proponowanych rozwiązań, są to nadal warunki jedynie zbliżone do warunków fizjologicznych, które nie zastąpią

fizjologicznego przepływu krwi i wpływu innych elementów pozanaczyniowych, obecnych w trakcie pomiarów *in vivo*.

Różnice w ocenie czynności śródbłonka za pomocą tych dwóch technik, mogą na przykład wynikać z pozbawienia izolowanych naczyń, stosowanych w klasycznych układach, okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej (PVAT), która ma znaczący wpływ na czynność śródbłonka [110]. Wspomniane różnice mogą być szczególnie widoczne w mysich modelach, gdzie dysfunkcja śródbłonka indukowana jest przez dietę wysokotłuszczową.

Kolejnym elementem pomijanym w badaniach śródbłonkowo-zależnej odpowiedzi rozkurczowej *ex vivo*, jest udział układu współczulnego w regulacji czynności śródbłonka. Układ współczulny jest zaangażowany w krótkoterminową regulacje napięcia naczyniowego i ciśnienia krwi, umożliwiając szybką adaptację do różnych warunków fizjologicznych za pomocą klasycznych odruchów autonomicznych, w celu utrzymania homeostazy sercowo-naczyniowej [111]. Istnieje wiele dowodów sugerujących, że aktywność układu sympatycznego i czynność naczyniowa, są ze sobą pośrednio i bezpośrednio powiązane [112,113]. Wpływ układu sympatycznego na czynność śródbłonka może mieć szczególne znaczenie w nadciśnieniu tętniczym lub w niewydolności serca.

Nie ma jednak jak dotąd prac, bezpośrednio porównujących klasyczną ocenę czynności śródbłonka w układzie izolowanych naczyń ex vivo z oceną obrazowania MR in vivo. Warto by tego typu badanie przeprowadzić, szczególnie w kontekście Pracy 3, bowiem wyniki przedstawione w **Pracy 3**, są sprzeczne z wynikami przedstawionymi w innych pracach w warunkach in vitro lub ex vivo [114-116], sugerującymi że stosowanie antagonistów ENaC (Amiloryd, Benzamil) zapobiega rozwojowi dysfunkcji śródbłonka. Należy jednak podkreślić, że Amyloryd i Benzamil charakteryzują się niespecyficznym działaniem wobec śródbłonkowego ENaC, co sprawia, że wyniki te budzą pewną wątpliwość [114]. Genetyczna delecja ENaC, została zastosowana jedynie w kilku publikacjach [103,105], a dopiero od niedawno opracowano model myszy endo- $\alpha ENaC^{KO}$ [106], wykorzystany w **Pracy 3**. Zatem podejście stosowane w Pracy 3, z zastosowaniem mysiego modelu endo- α ENaC^{KO}, stanowi selektywną i celowaną technikę inaktywacji ENaC w śródbłonku. Wyniki jednoznacznie sugerują, że aktywacja, a nie inhibicja aENaC może reprezentować nowe podejście, służące poprawie funkcji bariery śródbłonkowej naczyń włosowatych, nie tylko w zapaleniu płuc [105], ale także w endotoksemii. Wyciągnięcie takiego wniosku było możliwe nie tylko dzięki zastosowaniu unikatowego modelu mysiego (endo-αENaCKO), ale również badań obrazowania MR in vivo, które mogą dawać inne warunki niż badania in vitro lub ex vivo.

Podsumowując, zastosowanie unikatowej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, umożliwiło wykazanie, że w warunkach fizjologicznych αENaC bierze udział w regulacji śródbłonkowo-zależnego rozkurczu naczyń, podczas gdy w warunkach patofizjologicznych przyczynia się do zachowania prawidłowej bariery przepuszczalności śródbłonka. Otrzymane wyniki sugerują, że aktywacja, a nie jak sugerowano wcześniej – inhibicja αENaC, może być korzystna dla poprawy czynności śródbłonka.

Podsumowanie

Prace stanowiące rozprawę doktorską są spójne tematycznie i opisują możliwość zastosowania opracowanej metody obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, do oceny fenotypu śródbłonka w mysich modelach chorób układu krążenia. W szczególności wykazano, że zastosowana metoda obrazowania MR *in vivo*, uzupełniona o pomiary biochemiczne, pozwala zdefiniować wczesne i późne etapy rozwoju głównych cech dysfunkcji śródbłonka u myszy *in vivo*. Dodatkowo zastosowanie tego typu metodyki umożliwia detekcję korzystnego oraz szkodliwego działania na śródbłonek, wynikającego z zastosowanej farmakoterapii śródbłonka lub zastosowanej w śródbłonku modyfikacji genetycznej. Opracowana, wieloparametrowa metoda obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, może być zatem z powodzeniem stosowana w badaniach przedklinicznych z użyciem mysich modeli chorób sercowo-naczyniowych. Ocena obrazowania MR, w połączeniu z innymi metodami oceny biochemicznej fenotypu śródbłonka, pozwala na wgląd w mechanizmy dysfunkcji śródbłonka i ocenę skuteczności nowych terapii ukierunkowanych na poprawę czynności śródbłonka w warunkach doświadczalnych *in vivo*.

V. Piśmiennictwo

- Blann AD. Assessment of Endothelial Dysfunction: Focus on Atherothrombotic Disease.Pathophysiol Haemost Thromb 2004;33(5-6):256–61.
- [2] Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. J Cardiovasc Pharmacol 1993;22 Suppl 4:S1-14.
- [3] Wu, M.D KK, Thiagarajan, M.D P. Role Of Endothelium In Thrombosis And Hemostasis. Annu Rev Med 1996;47:315–31.
- [4] Chlopicki S. Perspectives in pharmacology of endothelium: From bench to bedside.Pharmacol Reports 2015;67:vi–ix.
- [5] Bar A, Skorka T, Jasinski K, Chlopicki S. MRI-based assessment of endothelial function in mice in vivo. Pharmacol Reports 2015;67:765–70.
- [6] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 2004;109:III27-32.
- [7] Sternak M, Bar A, Adamski MG, Mohaissen T, Marczyk B, Kieronska A, Stojak M, Kus K, Tarjus A, Jaisser F, Chlopicki S. The Deletion of Endothelial Sodium Channel α (αENaC) Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation and Endothelial Barrier Integrity in Endotoxemia in Vivo. Front Pharmacol 2018;9:178.
- [8] Bar A, Skorka T, Jasinski K, Sternak M, Bartel Ż, Tyrankiewicz U, Chlopicki S. Retrospectively-gated MRI for in vivo assessment of endothelium-dependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. NMR Biomed 2016;29(8):1088.
- [9] Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrange D, Creager M, Selwyn P, Ganz P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Am J Cardiol 1995;75:71B–74B.
- [10] Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. Curr Hypertens Rep 2010;12:448–55.
- [11] Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou V V, Quyyumi AA, Butler J. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. J Am Coll Cardiol 2012;60:1455–69.
- [12] Franses JW, Drosu NC, Gibson WJ, Chitalia VC, Edelman ER. Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. Int J Cancer 2013;133:1334–44.
- [13] Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS,

Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998;91:3527–61.

- [14] Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373–6.
- [15] Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. Hypertension 1991;17:187–93.
- [16] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:4651–5.
- [17] Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. J Biol Chem 1990;265:19028–34.
- [18] Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney JF, Welch GN, Loscalzo J, Loscalzo J. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. J Clin Invest 1995;96:2630–8.
- [19] Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 1989;83:1774–7.
- [20] Suzuki H, Chen G, Yamamoto Y. Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Jpn Circ J 1992;56:170–4.
- [21] Tanaka Y, Yamaki F, Koike K, Toro L. New insights into the intracellular mechanisms by which PGI2 analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gsprotein mediated-activation of MaxiK channel. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents 2004;2:257–65.
- [22] Ting HJ, Murad JP, Espinosa EVP, Khasawneh FT. Thromboxane A 2 Receptor. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2012;17:248–59.
- [23] Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol 2007;7:803–15.
- [24] Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. Am J Cardiol 2002;89:3A–9A; discussion 10A.
- [25] Jain A. Endothelin-1-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Disease. J Pharmacol Exp Ther 2013;346:163–72.
- [26] Mundi S, Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, van Hinsbergh VWM, Iruela-Arispe ML, De Caterina R. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk

factors—a review. Cardiovasc Res 2018;114:35–52.

- [27] Egawa G, Nakamizo S, Natsuaki Y, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. Sci Rep 2013;3:1932.
- [28] Kao CH, Chen JK, Kuo JS, Yang VC. Visualization of the transport pathways of low density lipoproteins across the endothelial cells in the branched regions of rat arteries. Atherosclerosis 1995;116:27–41.
- [29] Huynh J, Nishimura N, Rana K, Peloquin JM, Califano JP, Montague CR, King MR, Schaffer CB, Reinhart-King CA. Age-Related Intimal Stiffening Enhances Endothelial Permeability and Leukocyte Transmigration. Sci Transl Med 2011;3:112ra122-112ra122.
- [30] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. Acta Physiol 2009;196:193–222.
- [31] Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease.J Thromb Haemost 2006;4:1186–93.
- [32] John S, Drobnik W, Lackner K, Schmieder RE. Soluble thrombomodulin and endothelial dysfunction in early atherosclerosis. Lancet (London, England) 1999;354:1647.
- [33] Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. Circulation 1997;96:4219–25.
- [34] Halcox JPJ, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KRA, Quyyumi AA. Prognostic Value of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction. Circulation 2002;106:653–8.
- [35] Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. Circulation 2000;101:1899–906.
- [36] Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. N Engl J Med 1986;315:1046–51.
- [37] Dupouy P, Geschwind HJ, Pelle G, Gallot D, Dubois-Randé JL. Assessment of coronary vasomotion by intracoronary ultrasound. Am Heart J 1993;126:76–85.
- [38] Nadar S, Blann AD, Lip GY. Endothelial dysfunction: methods of assessment and application to hypertension. Curr Pharm Des 2004;10:3591–605.

- [39] Wilkinson IB, Hall IR, MacCallum H, Mackenzie IS, McEniery CM, van der Arend BJ, Shu Y-E, MacKay LS, Webb DJ, Cockcroft JR. Pulse-wave analysis: clinical evaluation of a noninvasive, widely applicable method for assessing endothelial function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:147–52.
- [40] Jadhav UM, Kadam NN. Non-invasive assessment of arterial stiffness by pulse-wave velocity correlates with endothelial dysfunction. Indian Heart J n.d.;57:226–32.
- [41] Lane HA, Smith JC, Davies JS. Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis. Vasc Health Risk Manag 2006;2:19–30.
- [42] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. J Am Coll Cardiol 2004;44:2137–41.
- [43] Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Matsubara J, Sumida H, Kaikita K, Kojima S, Nagayoshi Y, Yamamuro M, Izumiya Y, Iwashita S, Matsui K, Jinnouchi H, Kimura K, Umemura S, Ogawa H. Digital Assessment of Endothelial Function and Ischemic Heart Disease in Women. J Am Coll Cardiol 2010;55:1688–96.
- [44] Leeson CP, Robinson M, Francis JM, Robson MD, Channon KM, Neubauer S, Wiesmann F. Cardiovascular magnetic resonance imaging for non-invasive assessment of vascular function: validation against ultrasound. J Cardiovasc Magn Reson 2006;8:381–7.
- [45] Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilatation. Br J Clin Pharmacol 2000;50:397–404.
- [46] Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. Circulation 2002;105:1567–72.
- [47] Lee JMS, Shirodaria C, Jackson CE, Robson MD, Antoniades C, Francis JM, Wiesmann F, Channon KM, Neubauer S, Choudhury RP. Multi-modal magnetic resonance imaging quantifies atherosclerosis and vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. Diab Vasc Dis Res 2007;4:44–8.
- [48] Rider OJ, Holloway CJ, Emmanuel Y, Bloch E, Clarke K, Neubauer S. Increasing plasma free fatty acids in healthy subjects induces aortic distensibility changes seen in obesity. Circ Cardiovasc Imaging 2012;5:367–75.
- [49] Cavalcante JL, Lima JC, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic stiffness: current

understanding and future directions. J Am Coll Cardiol 2011;57:1511–22.

- [50] Shan Y, Lin J, Xu P, Zeng M, Lin H, Yan H. The combined effect of hypertension and type 2 diabetes mellitus on aortic stiffness and endothelial dysfunction: an integrated study with high-resolution MRI. Magn Reson Imaging 2014;32:211–6.
- [51] Teixido-Tura G, Redheuil A, Rodríguez-Palomares J, Gutiérrez L, Sánchez V, Forteza A, Lima J a C, García-Dorado D, Evangelista A. Aortic biomechanics by magnetic resonance: early markers of aortic disease in Marfan syndrome regardless of aortic dilatation? Int J Cardiol 2014;171:56–61.
- [52] Price AN, Cheung KK, Cleary JO, Campbell AE, Riegler J, Lythgoe MF. Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Experimental Models. Cardiovasc Med J 2010:278–92.
- [53] Gotschy A, Bauer E, Schrodt C, Lykowsky G, Ye Y-X, Rommel E, Jakob PM, Bauer WR, Herold V. Local arterial stiffening assessed by MRI precedes atherosclerotic plaque formation. Circ Cardiovasc Imaging 2013;6:916–23.
- [54] Herold V, Wellen J, Ziener CH, Weber T, Hiller K-H, Nordbeck P, Rommel E, Haase A, Bauer WR, Jakob PM, Sarkar SK. In vivo comparison of atherosclerotic plaque progression with vessel wall strain and blood flow velocity in apoE(-/-) mice with MR microscopy at 17.6 T. MAGMA 2009;22:159–66.
- [55] Phinikaridou A, Hua N, Pham T, Hamilton J. Regions of low endothelial shear stress colocalize with positive vascular remodeling and atherosclerotic plaque disruption: an in vivo magnetic resonance imaging study. Circ Cardiovasc Imaging 2013;6:302–10.
- [56] van Bochove GS, Straathof R, Krams R, Nicolay K, Strijkers GJ. MRI-determined carotid artery flow velocities and wall shear stress in a mouse model of vulnerable and stable atherosclerotic plaque. MAGMA 2010;23:77–84.
- [57] Agafonova IG, Kotel'nikov VN, Eichhoff U. Vasodilatation Function of Cerebral Vessels at Arterial Hypertension in OXYS Rats. Appl Magn Reson 2014;45:527–36.
- [58] Phinikaridou A, Andia ME, Protti A, Indermuehle A, Shah A, Smith A, Warley A, Botnar RM. Noninvasive Magnetic Resonance Imaging Evaluation of Endothelial Permeability in Murine Atherosclerosis Using an Albumin-Binding Contrast Agent. Circulation 2012;126:707–19.
- [59] Pedersen SF, Thrysøe S, Paaske WP, Thim T, Falk E, Ringgaard S, Kim WY. CMR assessment of endothelial damage and angiogenesis in porcine coronary arteries using gadofosveset. J Cardiovasc Magn Reson 2011;13:10.
- [60] Lobbes MBI, Miserus RJHM, Debernardi N. Atherosclerosis : Contrast- enhanced MR

Imaging of Vessel Wall in Rabbit Model — Comparison of Gadofosveset and Gadopentetate Dimeglumine. Radiology 2009;250.

- [61] Lavin B, Phinikaridou A, Lorrio S, Zaragoza C, Botnar RM. Monitoring vascular permeability and remodeling after endothelial injury in a murine model using a magnetic resonance albumin-binding contrast agent. Circ Cardiovasc Imaging 2015;8.
- [62] Phinikaridou A, Andia ME, Lacerda S, Lorrio S, Makowski MR, Botnar RM. Molecular MRI of atherosclerosis. Molecules 2013;18:14042–69.
- [63] Chłopicki S, Gryglewski RJ. Angiotensin converting enzyme (ACE) and HydroxyMethylGlutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors in the forefront of pharmacology of endothelium. Pharmacol Rep 2005;57 Suppl:86–96.
- [64] Hiba B, Richard N, Thibault H, Janier M. Cardiac and respiratory self-gated cine MRI in the mouse: Comparison between radial and rectilinear techniques at 7T. Magn Reson Med 2007;58:745–53.
- [65] Frolow M, Drozdz A, Kowalewska A, Nizankowski R, Chlopicki S. Comprehensive assessment of vascular health in patients; towards endothelium-guided therapy. Pharmacol Rep 2015;67:786–92.
- [66] Schuler D, Sansone R, Freudenberger T, Rodriguez-Mateos A, Weber G, Momma TY, Goy C, Altschmied J, Haendeler J, Fischer JW, Kelm M, Heiss C. Measurement of Endothelium-Dependent Vasodilation in Mice--Brief Report. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014;34:2651–7.
- [67] Machin DR, Leary ME, He Y, Shiu Y-T, Tanaka H, Donato AJ. Ultrasound Assessment of Flow-Mediated Dilation of the Brachial and Superficial Femoral Arteries in Rats. J Vis Exp 2016.
- [68] Langbein H, Brunssen C, Hofmann A, Cimalla P, Brux M, Bornstein SR, Deussen A, Koch E, Morawietz H. NADPH oxidase 4 protects against development of endothelial dysfunction and atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. Eur Heart J 2016;37:1753–61.
- [69] Song W, Zhou L, Kot KL, Fan H, Han J, Yi J. Measurement of Flow-Mediated Dilation of Mouse Femoral Artery *in vivo* by Optical Coherence Tomography. J Biophotonics 2018:e201800053.
- [70] Langner, M; Przybyło, M; Borowik T. High-efficiency encapsulation of hydrophilic compounds in unilamellar liposomes". International Patent Application No. PCT/EP2018/057400 International Publication No. WO 2018/172504 A1, 2018.

- [71] Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. Chem Rev 1999;99:2293–352.
- [72] Phinikaridou A, Andia ME, Protti A, Indermuehle A, Shah A, Smith A, Warley A, Botnar RM. Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. Circulation 2012;126:707–19.
- [73] Csányi G, Gajda M, Franczyk-Zarow M, Kostogrys R, Gwoźdź P, Mateuszuk L, Sternak M, Wojcik L, Zalewska T, Walski M, Chlopicki S. Functional alterations in endothelial NO, PGI2 and EDHF pathways in aorta in ApoE/LDLR-/- mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2012;98:107–15.
- [74] 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;17:2333–40.
- [75] 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;59:189–99.
- [76] 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;103:1282–8.
- [77] Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C, Petit C, Gosgnach W, Carpentier N, Vanhoutte P, Vilaine J-P. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. J Vasc Res 2003;40:87–96.
- [78] 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;19:2762–8.
- [79] Gauthier KM, Goldman DH, Aggarwal NT, Chawengsub Y, Falck JR, Campbell WB. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in acetylcholine-induced relaxations of mouse arteries. Am J Physiol Circ Physiol 2011;300:H725–35.
- [80] Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. Circulation 1995;92:3337–49.
- [81] Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing

factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:9265–9.

- [82] Dora KA, Sandow SL, Gallagher NT, Takano H, Rummery NM, Hill CE, Garland CJ. Myoendothelial Gap Junctions May Provide the Pathway for EDHF in Mouse Mesenteric Artery. J Vasc Res 2003;40:480–90.
- [83] Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. Physiology 2006;21:69–78.
- [84] Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. Circ Res 1996;78:415–23.
- [85] Larsen BT, Miura H, Hatoum OA, Campbell WB, Hammock BD, Zeldin DC, Falck JR, Gutterman DD. Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;290:H491-9.
- [86] Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K+ is an endotheliumderived hyperpolarizing factor in rat arteries. Nature 1998;396:269–72.
- [87] Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A. Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Mesenteric Arteries. Biochem Biophys Res Commun 2002;290:909–13.
- [88] Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. J Clin Invest 2000;106:1521–30.
- [89] Przyborowski K, Proniewski B, Czarny J, Smeda M, Sitek B, Zakrzewska A, Zoladz JA, Chlopicki S. Vascular Nitric Oxide–Superoxide Balance and Thrombus Formation after Acute Exercise. Med Sci Sport Exerc 2018:1.
- [90] Targosz-Korecka M, Jaglarz M, Malek-Zietek KE, Gregorius A, Zakrzewska A, Sitek B, Rajfur Z, Chlopicki S, Szymonski M. AFM-based detection of glycocalyx degradation and endothelial stiffening in the db/db mouse model of diabetes. Sci Rep 2017;7:15951.
- [91] Suraj J, Kurpińska A, Olkowicz M, Niedzielska–Andres E, Smolik M, Zakrzewska A, Jasztal A, Sitek B, Chlopicki S, Walczak M. Development, validation and application of a micro–liquid chromatography–tandem mass spectrometry based method for simultaneous quantification of selected protein biomarkers of endothelial dysfunction in
murine plasma. J Pharm Biomed Anal 2018;149:465-74.

- [92] Noble MIM, Drake-Holland AJ, Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. QJM 2008;101:513–8.
- [93] Zhang X, Sun D, Song JW, Zullo J, Lipphardt M, Coneh-Gould L, Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction and glycocalyx – A vicious circle. Matrix Biol 2018.
- [94] Aksoy S, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human liver nicotinamide Nmethyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. J Biol Chem 1994;269:14835–40.
- [95] Bartuś M, Łomnicka M, Kostogrys RB, Kaźmierczak P, Watała C, Słominska EM, Smoleński RT, Pisulewski PM, Adamus J, Gebicki J, Chlopicki S. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. Pharmacol Rep 2008;60:127–38.
- [96] Mateuszuk L, Jasztal A, Maslak E, Gasior-Glogowska M, Baranska M, Sitek B, Kostogrys R, Zakrzewska A, Kij A, Walczak M, Chlopicki S. Antiatherosclerotic Effects of 1-Methylnicotinamide in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice: A Comparison with Nicotinic Acid. J Pharmacol Exp Ther 2016;356:514–24.
- [97] Wang Y, Tikellis C, Thomas MC, Golledge J. Angiotensin converting enzyme 2 and atherosclerosis. Atherosclerosis 2013;226:3–8.
- [98] Olkowicz M, Chlopicki S, Smolenski RT. Perspectives for angiotensin profiling with liquid chromatography/mass spectrometry to evaluate ACE/ACE2 balance in endothelial dysfunction and vascular pathologies. Pharmacol Rep 2015;67:778–85.
- [99] Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium Gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis 2016;248:97–109.
- [100] Zhuo JL, Mendelsohn FAO, Ohishi M. Perindopril alters vascular angiotensinconverting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. Hypertens (Dallas, Tex 1979) 2002;39:634–8.
- [101] Gryglewski RJ, Swies J, Uracz W, Chłopicki S, Marcinkiewicz E. Mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor induced thrombolysis in Wistar rats. Thromb Res 2003;110:323–9.
- [102] Gryglewski RJ, Chlopicki S, Swies J. In vivo endothelial interaction between ACE and COX inhibitors. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids 2005;72:129–31.
- [103] Jeggle P, Callies C, Tarjus A, Fassot C, Fels J, Oberleithner H, Jaisser F, Kusche-Vihrog

K. Epithelial Sodium Channel Stiffens the Vascular Endothelium In Vitro and in Liddle Mice. Hypertension 2013;61:1053–9.

- [104] Kusche-Vihrog K, Callies C, Fels J, Oberleithner H. The epithelial sodium channel (ENaC): Mediator of the aldosterone response in the vascular endothelium? Steroids 2010;75:544–9.
- [105] Czikora I, Alli AA, Sridhar S, Matthay MA, Pillich H, Hudel M, Berisha B, Gorshkov B, Romero MJ, Gonzales J, Wu G, Huo Y, Su Y, Verin AD, Fulton D, Chakraborty T, Eaton DC, Lucas R. Epithelial Sodium Channel-α Mediates the Protective Effect of the TNF-Derived TIP Peptide in Pneumolysin-Induced Endothelial Barrier Dysfunction. Front Immunol 2017;8:842.
- [106] Tarjus A, Maase M, Jeggle P, Martinez-Martinez E, Fassot C, Loufrani L, Henrion D, Hansen PBL, Kusche-Vihrog K, Jaisser F. The endothelial αENaC contributes to vascular endothelial function in vivo. PLoS One 2017;12:e0185319.
- [107] Dunn WR, Wellman GC, Bevan JA. Enhanced resistance artery sensitivity to agonists under isobaric compared with isometric conditions. Am J Physiol Circ Physiol 1994;266:H147–55.
- [108] Falloon BJ, Stephens N, Tulip JR, Heagerty AM. Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. Am J Physiol Circ Physiol 1995;268:H670–8.
- [109] Coats P, Hillier C. Determination of an optimal axial-length tension for the study of isolated resistance arteries on a pressure myograph. Exp Physiol 1999;84:1085–94.
- [110] Gil-Ortega M, Somoza B, Huang Y, Gollasch M, Fernández-Alfonso MS. Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. Trends Endocrinol Metab 2015;26:367–75.
- [111] Wallin BG, Charkoudian N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: Insights from measurement of human sympathetic nerve activity. Muscle Nerve 2007;36:595–614.
- [112] Harris KF, Matthews KA. Interactions between autonomic nervous system activity and endothelial function: a model for the development of cardiovascular disease. Psychosom Med n.d.;66:153–64.
- [113] Bruno RM, Ghiadoni L, Seravalle G, Dell'oro R, Taddei S, Grassi G. Sympathetic regulation of vascular function in health and disease. Front Physiol 2012;3:284.
- [114] Jia G, Habibi J, Aroor AR, Martinez-Lemus LA, DeMarco VG, Ramirez-Perez FI, Sun

Z, Hayden MR, Meininger GA, Mueller KB, Jaffe IZ, Sowers JR. Endothelial Mineralocorticoid Receptor Mediates Diet-Induced Aortic Stiffness in Females. Circ Res 2016;118:935–43.

- [115] Liu H-B, Zhang J, Sun Y-Y, Li X-Y, Jiang S, Liu M-Y, Shi J, Song B-L, Zhao D, Ma H-P, Zhang Z-R. Dietary salt regulates epithelial sodium channels in rat endothelial cells: adaptation of vasculature to salt. Br J Pharmacol 2015;172:5634–46.
- [116] Jernigan NL, Drummond HA. Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction. Am J Physiol Physiol 2005;289:F891–901.

VI. Streszczenie rozprawy doktorskiej

Dysfunkcja śródbłonka towarzyszy rozwojowi wielu chorób, nie tylko układu sercowonaczyniowego i ma znaczenie patofizjologiczne, prognostyczne i terapeutyczne. Wciąż jednak, brakuje metod pozwalających na szybką i wiarygodną ocenę fenotypu śródbłonka w modelach mysich *in vivo*, stanowiących podstawowy model w badaniach przedklinicznych w biomedycynie.

Celem badań było zastosowanie metodyki obrazowania MR dwóch głównych cech dysfunkcji śródbłonka *in vivo*, czyli upośledzonego śródbłonkowo-zależnego rozkurczu i zwiększonej przepuszczalności naczynia, do 1) oceny progresji dysfunkcji śródbłonka, 2) monitorowania skutków farmakoterapii śródbłonka oraz 3) badania wpływu wprowadzonej modyfikacji genetycznej na fenotyp śródbłonka w modelach mysich *in vivo*.

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech opublikowanych prac naukowych:

W **Pracy 1** wykazano, że młode myszy ApoE/LDLR^{-/-}, charakteryzujące się brakiem dobrze rozwiniętej blaszki miażdżycowej, rozwijają wczesną dysfunkcję śródbłonka, będącą wieloczynnikową odpowiedzią, obejmującą między innymi upośledzony, śródbłonkowozależny rozkurcz naczynia, obniżoną produkcja NO oraz zmniejszoną powierzchnię i długość glikokaliksu w aorcie, zwiększoną przepuszczalność śródbłonka w pniu ramienno-głowowym, a także podwyższone stężenie wybranych biomarkerów dysfunkcji śródbłonka.

Na podstawie wyników **Pracy 2** stwierdzono, że 2-miesięczne leczenie MNA (100 mg/kg/dzień), skutkuje w poprawie upośledzonego, śródbłonkowo-zależnego rozkurczu naczynia, jak również obniżeniu przepuszczalności śródbłonka u myszy ApoE/LDLR^{-/-}, w porównaniu do nieleczonych myszy ApoE/LDLR^{-/-}. Ponadto wykazano, że MNA posiada podobną aktywność naczynioochronną do Perindoprilu (10 mg/kg/dzień), który można uznać jako referencyjny związek poprawiający czynność śródbłonka [63].

W **Pracy 3** wykazano, że delecja śródbłonkowego kanału sodowego (α ENaC), ma istotny wpływ na upośledzenie śródbłonkowo-zależnego rozkurczu naczynia u myszy endo- α ENaC^{KO} w warunkach fizjologicznych, ze znacznie silniejszym efektem w warunkach patofizjologicznych. Ponadto wykazano, że obecność α ENaC w śródbłonku przyczynia się do zachowania prawidłowej przepuszczalności śródbłonka w warunkach endotoksemii.

Prace stanowiące niniejszą rozprawę doktorską pokazują, że opracowana metodologia obrazowania MR czynności śródbłonka *in vivo*, jest metodą pozwalającą na wykrycie głównych

cech zaburzonej czynności śródbłonka, czyli upośledzonego zależnego od śródbłonka rozkurczu naczyń krwionośnych i zwiększonej przepuszczalności, na wczesnych i późnych etapach rozwoju dysfunkcji śródbłonka w mysich modelach chorób układu krążenia, co zostało potwierdzone przez inne metody oceny fenotypu śródbłonka *ex vivo*. Ponadto wykazano użyteczność opracowanej techniki w monitorowaniu skuteczność farmakoterapii śródbłonka, jak i badaniu wpływu wprowadzonych modyfikacji genetycznych na fenotyp śródbłonka. Opracowana metodyka obrazowania MR fenotypu śródbłonka *in vivo*, uzupełniona o pomiary biochemiczne, umożliwia rozwój badań nad rolą śródbłonka w progresji chorób oraz badań nad nowymi mechanizmami farmakoterapeutycznymi *in vivo*.

VII. Abstract of PhD thesis

Endothelial dysfunction accompanies development of many diseases, not exclusive to the cardiovascular system and has pathophysiological, prognostic and therapeutic significance. However, there are still no methods for fast and reliable evaluation of the endothelial phenotype in murine models *in vivo*, which are the basic model in preclinical studies in biomedicine.

The aim of the studies was to apply the method of magnetic resonance imaging (MRI) of two main features of endothelial dysfunction *in vivo*, including impaired, endothelium-dependent vasodilatation and increased vascular permeability, for 1) assessment of the progression of endothelial dysfunction, 2) monitoring the efficacy of endothelium-targeted therapy and 3) to the study of the effects of the introduced genetic modification on the endothelial phenotype.

PhD thesis consist of 3 published research papers:

Paper 1 shows, that in young ApoE/LDLR^{-/-} mice, endothelial dysfunction even at the very early stage (i.e. significantly prior to well-defined atherosclerotic plaque development), is a multifactorial response, involving impairment of endothelium-dependent vasodilation, diminished vascular NO production as well as glycocalyx coverage and length in the aorta, increased endothelial permeability in the brachiocephalic artery and increased plasma concentration of selected biomarkers of endothelial dysfunction.

Paper 2 demonstrates improvement of impaired endothelium-dependent vasodilatation as well as decrease in endothelial permeability in ApoE/LDLR^{-/-} mice, treated with MNA (100 mg/kg/day) for 2 months, in comparison to untreated ApoE/LDLR^{-/-} mice. Furthermore, it was demonstrated that 2-month treatment with MNA (100 mg/kg/day) displayed a similar profile of vasoprotective effect as 2-month treatment with Perindopril (10 mg/kg/day), which can be considered as a reference compound that improves endothelial function [63].

Paper 3 shows, that deletion of epithelial sodium channel (α ENaC) plays a crucial role in regulation of endothelium-dependent vasodilatation in endo- α ENaC^{KO} mice in physiological conditions, what is more pronounced in pathophysiological conditions. Moreover, it was demonstrated that presence of α ENaC in endothelium contributes to preservation of proper endothelial permeability during endotoxemia.

Papers included in the PhD dissertation show, that the developed MRI-based methodology for assessment of endothelial function *in vivo*, is a sensitive and reliable method,

which allow for detection of main features of endothelial dysfunction, including impaired endothelium-dependent vasodilatation and increased permeability, at an early and late stages of endothelial dysfunction in murine models of cardiovascular disease, as was confirmed by other methods for assessment of endothelial phenotype *ex vivo*. Moreover, it was demonstrated that the developed methodology allows for monitoring the efficacy of endothelium-targeted therapy as well as to study of the effects of introduced genetic modification on the endothelial phenotype. Therefore, the developed MRI-based methodology for assessment of endothelial function *in vivo*, complemented by biochemical measurements, is essential for better understanding of the role of endothelial cells in the progression of disease and on the efficacy of novel pharmacotherapeutic mechanisms in the treatment of endothelial dysfunction *in vivo*.

VIII. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej





Degradation of Glycocalyx and Multiple Manifestations of Endothelial Dysfunction Coincide in the Early Phase of Endothelial Dysfunction Before Atherosclerotic Plaque Development in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice

Anna Bar, MSc; Marta Targosz-Korecka, PhD; Joanna Suraj, MSc; Bartosz Proniewski, PhD; Agnieszka Jasztal, MSc; Brygida Marczyk, MSc; Magdalena Sternak, PhD; Magdalena Przybyło, PhD; Anna Kurpińska, PhD; Maria Walczak, PhD; Renata B. Kostogrys, PhD; Marek Szymonski, PhD; Stefan Chlopicki, MD, PhD

Background—The impairment of endothelium-dependent vasodilation, increased endothelial permeability, and glycocalyx degradation are all important pathophysiological components of endothelial dysfunction. However, it is still not clear whether in atherosclerosis, glycocalyx injury precedes other features of endothelial dysfunction or these events coincide.

Methods and Results—Herein, we demonstrate that in 4- to 8-week-old apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptordeficient mice, at the stage before development of atherosclerotic plaques, impaired acetylcholine-induced vasodilation, reduced NO production in aorta, and increased endothelial permeability were all observed; however, flow-mediated dilation in the femoral artery was fully preserved. In 4-week-old mice, glycocalyx coverage was reduced and endothelial stiffness was increased, whereas glycocalyx length was significantly decreased at 8 weeks of age. Early changes in endothelial function were also featured by increased plasma concentration of biomarkers of glycocalyx disruption (endocan), biomarkers of endothelial inflammation (soluble vascular cell adhesion molecule 1), increased vascular permeability (angiopoietin 2), and alterations in hemostasis (tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1). In 28-week-old mice, at the stage of advanced atherosclerotic plaque development, impaired NO production and nearly all other features of endothelial dysfunction were changed to a similar extent, compared with the preatherosclerotic plaque phase. The exceptions were the occurrence of acetylcholine-induced vasoconstriction in the aorta and brachiccephalic artery, impaired flow-mediated vasodilation in the femoral artery, and further reduction of glycocalyx length and coverage with a concomitant further increase in endothelial permeability.

Conclusions—In conclusion, even at the early stage before the development of atherosclerotic plaques, endothelial dysfunction is a complex multifactorial response that has not been previously appreciated. (*J Am Heart Assoc.* 2019;8:e011171. DOI: 10. 1161/JAHA.118.011171.)

Key Words: atherosclerosis • atomic force microscopy • endothelial function • glycocalyx • magnetic resonance imaging

 \mathbf{T} he maintenance of vascular homeostasis is accomplished through the vascular endothelium, which is responsible for regulation of many processes, including

vascular tone and permeability, smooth muscle cell proliferation and migration, thromboresistance, fibrinolysis, and inflammation.^{1,2} Endothelial dysfunction is a hallmark of various

Downloaded from http://ahajournals.org by on March 16, 2019

Received October 9, 2018; accepted January 31, 2019.

From the Jagiellonian University, Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (A.B., J.S., B.P., A.J., B.M., M. Sternak, A.K., M.W., S.C.) and Center for Nanometer-Scale Science and Advanced Materials, NANOSAM, Faculty of Physics, Astronomy and Applied Computer Science (M.T.-K., M. Szymonski), Krakow, Poland; Jagiellonian University Medical College, Faculty of Medicine, Chair of Pharmacology, (A.B., B.M., S.C.), and Faculty of Pharmacy, Chair and Department of Toxicology (J.S., M.W.), Krakow, Poland; Wroclaw University of Science and Technology, Opartment of Biomedical Engineering, Wroclaw, Poland (M.P.); and University of Agriculture H. Kollataja in Cracow, Department of Human Nutrition, Faculty of Food Technology, Krakow, Poland (R.B.K.).

Accompanying Figures S1 and S2 are available at https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/JAHA.118.011171

Correspondence to: Stefan Chlopicki, MD, PhD, Jagiellonian University, Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, ul Bobrzynskiego 14, 30-348 Krakow, Poland. E-mail: stefan.chlopicki@jcet.eu

^{© 2019} The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Clinical Perspective

What Is New?

- In the present study in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice, state-of-the-art in vivo magnetic resonance imaging-based methods and various ex vivo analytical techniques were used to characterize multiple manifestations of the early phase of endothelial dysfunction that emerged as a complex and multifactorial response, hitherto not appreciated.
- We demonstrated that glycocalyx injury coincided with the impairment of endothelium-dependent vasodilation and NOdependent function, with increased endothelial permeability and increased plasma concentration of biomarkers of glycocalyx disruption (endocan), endothelial inflammation (soluble vascular cell adhesion molecule 1), vascular permeability (angiopoietin 2), and hemostasis (tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1), in line with the concept of vicious circle relations between impaired endothelial glycocalyx and endothelial dysfunction.

What Are the Clinical Implications?

- Given the pattern of changes of early and late manifestations of endothelial dysfunction in atherosclerosis demonstrated herein, early diagnosis of endothelial dysfunction should be focused on the assessment of the features of the impaired endothelial phenotype that display the maximal response in the early stage, while monitoring of the endothelial dysfunction progression should be based on those manifestations of endothelial dysfunction that show progressive nature along the development of disease.
- Given the complex multiparametric nature of endothelial dysfunction, therapy of endothelial dysfunction should be targeted simultaneously to multiple features but not only to single characteristics of the phenotype of dysfunctional endothelium.

cardiovascular diseases; and it has therapeutic significance (eg, in atherosclerosis,³ hypertension,⁴ heart failure,⁵ and noncardiovascular diseases, such as cancer).⁶

Among various functional and biochemical features of endothelial dysfunction, impaired NO-dependent vasodilation is of particular importance in clinical studies because its measurement enables the diagnosis of malfunction of the endothelium⁷ and predicts adverse cardiovascular events.^{8,9} Assessment of NO-dependent vasodilation in humans is based on measurement of changes in vessel diameter in response to chemical or physical stimuli, with various detection techniques being used, including angiography,¹⁰ plethysmography,¹¹ tonometry,¹² and Doppler ultrasonography.¹³ In clinical settings, invasive methods are of limited use. Therefore, various noninvasive techniques for assessing endothelium-dependent artery dilation are currently used, including 2 major approaches: flow-mediated dilation (FMD) in the brachial artery,^{14,15} measured by ultrasonography, a method regarded as a gold standard; and reactive hyperemia (RH-PAT) in peripheral circulation, measured by tonometry of the finger.¹⁶

Magnetic resonance imaging (MRI) provides another approach for vascular wall imaging with high spatial and temporal resolution, useful for studying endothelium-dependent mechanisms of health and disease in the clinical setting.^{17,18} MRI in vivo also represents a state-of-the-art technique to measure endothelial function in experimental animals.^{19,20} Indeed, simultaneous assessment of endothelium-dependent vasodilation, together with quantification of endothelial permeability by MRI in vivo analysis, provides a unique insight into endothelial function in vivo.^{21,22}

In gene-targeted mouse models of atherogenesis, impaired NO-mediated relaxation in ex vivo vascular preparations was repeatedly demonstrated.²³⁻²⁵ It was, however, claimed that in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice with atherosclerosis, endothelial dysfunction occurs only at the late stage of the development of atherosclerotic plaques.24,26 Furthermore, some authors did not confirm the presence of endothelial dysfunction in ApoE^{-/-} mice.²⁷ In turn, we previously demonstrated that in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice (ApoE/LDLR^{-/-}) mice fed a chow diet, the impairment of NO-dependent relaxation in conduit vessels of ApoE/LDLR^{-/-} mice occurs before the development of atherosclerotic plaque, supporting the key role of dysfunctional endothelium in the initiation of atherogenesis in this mouse model of atherosclerosis as it is well accepted in atherosclerosis in humans.²⁸ However, the previous study was performed with the use of ex vivo assessment of endothelium-dependent vasodilation, not in vivo based on the MRI technique that has been recently adapted for measurement of endothelial function in vivo in mice.20,22

Apart from the impairment of NO-dependent function, the phenotype of dysfunctional endothelium involves a plethora of biochemical and functional changes that contribute to the pathophysiological characteristics of endothelial dysfunction, including proinflammatory mechanisms (eg adhesion molecules), prothrombotic mechanisms (eg von Willebrand factor and plasminogen activator inhibitor 1),29 glycocalyx injury,30 and endothelial stiffness.31 Damage in the glycocalyx, the brushlike surface layer composed of proteoglycans and glycoproteins lining the luminal surface of the endothelium, was suggested to favor or even to trigger the development of the endothelial dysfunction.³² In fact, release of NO is stimulated by mechanotransduction of laminar blood flowmediated shear stress, being a main regulator of endothelial function,³³ whereas the oscillating or turbulent flow results in the proinflammatory and proatherogenic phenotype of

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

endothelial cells.³⁴ Core proteins of glycocalyx may take part in the endothelial mechanotransduction.³⁵ The importance of this endothelial surface in the modulation of vascular permeability,³⁶ the regulation of hemostasis,³⁷ and the progression of atherosclerosis^{38–40} is also well documented.

Endothelial stiffness accompanies the loss of glycocalyx coverage and also represents an important nanomechanical feature of endothelial dysfunction,³¹ but whether it precedes or follows impairment of NO-dependent function is not clear.^{41–43}

To the best of our knowledge, there are no reports that have simultaneously and comprehensively analyzed the functional and biochemical phenotype of endothelium in vivo as well as the glycocalyx phenotype in an experimental murine model of atherosclerosis; and no reports have defined whether glycocalyx injury precedes the impairment of endothelium-dependent vasodilation and several other features of endothelial dysfunction or whether these events coincide. Accordingly, the aim of the present study was to characterize changes in endothelium-dependent vasodilation and endothelial permeability, NO production, various protein biomarkers of endothelial dysfunction, endothelium stiffness, and glycocalyx degradation in the early phase of atherosclerosis progression before the occurrence of atherosclerotic plaques (as verified by histological staining with Unna's orcein combined with Martius, Scarlet, and Blue trichrome [OMSB]) in comparison to the late phase of atherosclerosis with the presence of advanced plagues, in 4- to 8- and 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, respectively. The present study was performed using a 3-dimensional (3D) MRI-based method to assess endothelial function in vivo, 20,22 an atomic force microscope (AFM)-based method to detect glycocalyx degradation and endothelial stiffness,31 a micro-liquid chromatography (microLC)/mass spectrometry (MS)-multiple reaction monitoring (MRM)-based method to assess the biomarker profile of endothelial dysfunction,⁴⁴⁻⁴⁶ as well as an electron paramagnetic resonance (EPR)-based method to assess vascular NO production in the aorta ex vivo.47

Materials and Methods

The data, analytic methods, and study materials will be made available on request to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure.

Animals

Studies were performed in female ApoE/LDLR^{-/-} mice at the age of 4, 8, and 28 weeks, the model initially described by Ishibashi et al⁴⁸ and characterized by us in our previous studies.^{28,49-53} In ApoE/LDLR^{-/-} mice, spontaneous atherosclerosis develops without administration of an atherogenic

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

diet.52 Moreover, endothelial dysfunction in this model precedes the atherosclerotic plaque development, similarly as it occurs in humans,53 whereas the early development of endothelial dysfunction in single $ApoE^{-/-}$ mice was not univocally accepted.^{24,27} Because sex determination was based solely on external inspection, not internal anatomical features, in all mice, including the group of young mice (4-week-old), although unlikely, the number of female mice in this youngest experimental group could have been lower. Young (8-week-old) control (C57BL/6) female mice, without endothelial dysfunction, were used for comparison. To verify the progression of atherosclerosis in this model, a histological assessment of size and composition of atherosclerotic plaque was performed in 8-, 10-, 18-, and 28-week-old female ApoE/LDLR $^{-\prime-}$ mice. ApoE/ LDLR^{-/-} mice, bred in the Department of Human Nutrition, University of Agriculture (Krakow, Poland), and C57BL/6 mice, bred in the Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland), were transported to the animal house at the Institute of Nuclear Physics (Krakow, Poland) to assess endothelial phenotype in vivo. After in vivo measurements, mice were euthanized to collect blood and tissues for other measurements. The size of a given experimental group is reported in the legends of the corresponding graphs. All mice (body weight of 20-30 g) were bred in standard conditions (12 hr. light 12 hr. dark, humidity, 60%; temperature, 23°C) and housed in pathogen-free settings. All experiments were approved by the Ethics Local Committee of Jagiellonian University (Krakow, Poland) and were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Academy of Sciences (National Institutes of Health publication 85-23, revised 1996), as well as the Guidelines for Animal Care and Treatment of the European Community.

Magnetic Resonance Imaging

MRI experiments were performed using a 9.4 T scanner (BioSpec 94/20 USR; Bruker, Germany). During the experiment, mice were anaesthetized using isoflurane (Aerrane; Baxter Sp. z o. o., Poland; 1.5 volume percentage) in an oxygen/air (1:2) mixture. Heart function (rhythm and ECG), respiration, and body temperature (maintained at 37° C using circulating warm water) were monitored using a Monitoring and Gating System (SA Inc, Stony Brook, NY, USA). Mice were imaged in the supine position to test endothelial function and permeability in various vessels.

Assessment of Endothelium-Dependent Vasodilation in vivo by MRI

Endothelium-dependent vascular responses in vivo were assessed by 2 techniques, as described previously,^{20,22} measurements of endothelium-dependent response to acetylcholine

administration and FMD in response to reactive hyperemia, the latter considered to be a gold standard in studies on endothelial dysfunction in humans.^{14,15} Response to injection of acetyl-choline (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland; 50 µL, 16.6 mg/kg,

i.p.) was analyzed in the brachiocephalic artery (BCA) and the abdominal aorta (AA), whereas FMD after short-term (5-minute) occlusion was analyzed in the femoral artery (FA), induced by a homemade vessel occlusion, as described elsewhere.²² The



DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

dose of acetylcholine used to assess endothelium-dependent vasodilation in vivo in mice was based on a previous study.¹⁹ More important, endothelium-dependent response, induced by acetylcholine, as measured 25 minutes after injection, was independent of the effect of acetylcholine on the heart and respiration, as described previously.²⁰ Vasomotor responses were examined by comparing 2 time-resolved 3D images of the vessels before and 25 minutes after intraperitoneal acetylcholine administration or after 5 minutes of vessel occlusion. The optimal time to measure acetylcholine-induced vasorelaxation and the optimal time for vascular occlusion to measure FMD response were chosen on the basis of our previous work²⁰ and of other authors.54 As reported earlier, acetylcholineinduced response in the BCA was fully blocked by N-nitro Iarginine methyl ester (L-NAME), supporting the notion that this response represents NO-dependent vasodilation.²⁰ Similarly, acetylcholine-induced response in the aorta and FMD in the FA were also substantially impaired by L-NAME (A. Bar; 2018, unpublished data). Images were acquired using the cine IntraGate® FLASH 3D sequence, reconstructed with the IntraGate 1.2.b.2 macro (Bruker). End-diastolic volumes of vessels were analyzed using ImageJ software 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), and scripts were written in Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA). Imaging parameters included the following: repetition time, 6.4 ms; echo time, 1.4 ms; field of view, $30 \times 30 \times 5$ mm³; matrix size, 256×256×30; flip angle, 30°; and number of accumulations, 15 (reconstructed to 7 cardiac frames). Total scan time was 10 minutes.

Time-resolved 3D images of the aortic arch were analyzed to endothelial function assessment in BCA. Images were reconstructed to 7 cardiac frames and imported into ImageJ as a hyperstack (Figure 1A; matrix, 256×256 ; slices, 30; frames, 7). Further analysis was performed in the diastole of BCA, using a small hyperstack (Figure 1A, marked in red;

matrix, 256×256; slices, 5; frames, 1) starting at the base of the vessel and ending just before the branch. A detailed analysis was described in the Supplementary Material of our previous work.²⁰ 3D images of the AA were positioned on the sagittal view of the mice, \approx 5 mm under the heart (Figure 1B). Analysis was performed in the diastole of the AA in ImageJ using a small hyperstack (Figure 1B, marked in red; matrix, 256×256; slices, 10; frames, 1). 3D images of the FA were positioned on coronal view of the mice, on the right hind limb of the mouse. Analysis was performed in ImageJ using a small hyperstack (Figure 1D, marked in red; matrix, 256×256; slices, 7; frames, 1). All cross-sectional areas of vessels at each slice were obtained using thresholding segmentation and exported to Matlab, where vessel volumes were reconstructed and calculated.

Assessment of Endothelial Permeability in vivo by MRI

Measurements of endothelial permeability were performed using a unique formulation of gadolinium contained in the liposome (gadodiamide in the liposome, concentration of formulation: 287 mg/mL, 4.5 mL/kg, i.v.). The liposomal formulation of gadolinium was prepared according to the original method⁵⁵; in short, highly purified phosphatidylcholine (Lipoid, Germany), dissolved in propylene glycol, was mixed with buffered aqueous solution containing an appropriate amount of gadolinium and was followed by forcecontrolled extrusion, producing a uniform liposome suspension (medium size of 110 ± 6 nm; polydispersity index, 0.1). The proportion of liposome-forming components was 30:20:50 w/w/w of the lipid/glycol/aqueous phase. The size distribution of resulting liposomes was measured using the dynamic light scattering method (Zetasizer NanoZS, Malvern, UK). The concentration of gadolinium was

Figure 1. Method for magnetic resonance imaging (MRI)-based in vivo assessment of endothelial function and permeability (A through D) as well as method of analysis and classification of nanoindentation data (E through J). MRI-based assessment of endothelium-dependent response to acetylcholine administration, expressed as changes in vessel volume, was performed in the brachiocephalic artery (BCA) visible on the 3-dimensional (3D) image of the aortic arch (A) and in the abdominal aorta (AA) positioned on the sagittal view of the mouse (B). C, Endothelial permeability changes were assessed on the basis of number of pixels, for which relaxation time had changed >50% after contrast agent administration (Npx50); representative image of vessel cross-sections, with pixels taken for analysis, is marked in red. D, Flow-mediated endothelium-dependent dilation (FMD), also expressed as changes in the vessel volume, was assessed in the femoral artery (FA), visible on the 3D image of the right hind limb of the mouse. E, Atomic force microscope (AFM)-based raw indentation curve d(Z) is shown. The solid magenta line shows a curve fitted using the Hertz model in the region of maximum load for which one can assume that the brush is squeezed. From the Hertz fit, the values of endothelium elastic modulus (E_{ML}) were extracted. Brush length (L) was calculated from the exponential part of the force-separation curve F(h), according to the model of Alexander-de Gennes. F. The solid cvan line shows the fitted model in the region of lower indentations. G. An example of the apparent E_{ML} map created from a set of 20×20 indentation curves d(Z) is shown. H, A corresponding map, which shows the spatial distribution of L, is shown. I, Scatter plots representing values of apparent E_{ML} and L. Gaussian mixture distributions with 2 components were fitted to the data to differentiate areas with (red) and without (blue) glycocalyx coverage. J, Spatial maps of glycocalyx distribution. Data points shown using red crosses and blue circles are classified on the basis of an automatic clustering procedure and represent regions with and without glycocalyx, respectively.

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

determined by steady-state fluorescence of the compound at an emission wavelength of 310.5 nm after excitation at 275 nm (Fluoromax 4; TCSPC Horiba Jobin Yvon). The encapsulation efficiency of gadolinium after extrusion was 77 \pm 5%. The excess of the contrast agent in the final formulation was removed using the ultrafiltration method (Amicon Ultra, 10 kDa).

To assess permeability in the BCA, relaxation time (T_1) maps were measured before and 30 minutes after intravenous administration of gadolinium-rich liposome contrast agent (gadolinium-liposome) using the variable flip angle technique,^{56,57} by sampling the signal, using varying values of flip angles and then fitting the result to an expected T1dependent signal model, as described previously.^{20,58} 3D images of the aortic arch were acquired using the 3D IG-FLASH sequence, to obtain high transmit (B1) magnetic field profile uniformity within measured subslices. Imaging parameters included the following: repetition time, 10 ms; echo time, 1.1 ms; field of view, 30×30×4 mm³; matrix size, $192 \times 160 \times 8$; number of repetitions, 12; and cardiac frames, 1. Eight flip angles were used: 2°, 4°, 6°, 8°, 14°, 20°, 30°, and 50°. Flip angle values were set by changing the length of an radio frequency pulse, with constant amplifier power. The total scan time for all angles was 16 minutes.

Obtained images were used to calculate the T₁ around the BCA lumen before and after gadolinium-liposome administration. The signal model was fitted pixel by pixel using Matlab software, developed in house. Two T₁ maps (before and after contrast agent administration) were compared, using scripts written in Matlab, and pixels for which T₁ had changed significantly (by >50%) after gadolinium-liposome administration were marked in red (Figure 1C). The threshold value (50%) was determined experimentally. All red pixels were counted by the program as the number of pixels for which T₁ had changed by >50% (Npx50) after gadolinium-liposome administration.

Blood Sampling and Biochemical Analysis

After in vivo measurements, ApoE/LDLR^{-/-} mice were anesthetized (100 mg/kg ketamine+10 mg/kg xylazine, *i.p.*) and blood was drawn from the heart and collected in tubes containing EDTA (10% solution of dipotassium EDTA; Aqua-Med, Łodz, Poland; 1 μ L of EDTA/100 μ L of blood). Next, blood was mixed with MS-SAFE Protease and Phosphatase Inhibitor (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) in a ratio of 100:1. All samples were centrifuged at 664*g*, at a temperature of 4°C for 10 minutes to isolate plasma. Obtained plasma samples were deep frozen at -80°C for measurements of biomarkers of endothelial dysfunction (50 μ L). The Aorta and the BCA were collected for further ex vivo assessments, as described below.

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

Assessment of Glycocalyx Coverage and Length by AFM

The aorta samples were resected from the abdominal fragment of the aorta. To prepare en face samples of aortas, a protocol described by Targosz-Korecka et al³¹ was used. After harvesting and cleaning, the aorta was cut into small patches to expose the inner wall of the aorta. The patches of the aorta were gently transferred onto a glass coverslip coated with Cell-Tak (BD Biosciences, Bedford, MA USA). Each patch of the aorta was glued to the glass, leaving the endothelial surface facing upward. After preparation, the samples were placed in Hanks' balanced salt solution buffer, supplemented with 1% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 5 mmol/L glucose, and were left to equilibrate for 1 hour. The AFM nanoindentation experiment was performed within 2 to 3 hours after the isolation.

Acquisition of AFM Indentation Curves

AFM nanoindentation experiments were performed with a NanoWizard III system (JPK, Germany). All measurements were performed on unfixed aorta samples immersed in Hanks' balanced salt solution supplemented with 1% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 5 mmol/L glucose. A spherical colloidal probe with a nominal diameter of 4.5 μ m, attached to a cantilever (NovaScan, USA), with a spring constant of 0.01 N/m, was used in experiments. The indentation curves were recorded for a maximal loading force of 1 nN at a velocity of 1.5 μ m/s. For each aorta sample, spatial maps of indentation curves were recorded at many random positions of the sample. Typically, each region of interest comprised 10×10 curves that were recorded on a 20×20 μ m grid.

Analysis and Classification of Indentation Curves

Calculation of nanomechanical parameters of the endothelium from mouse AA was performed on the basis of the analysis and classification methods described previously by Targosz-Korecka et al.³¹ The mean nanomechanical parameters of glycocalyx (brush length [L] and glycocalyx coverage [N]) and endothelium (elastic modulus [E_{ML}]) were calculated in a 2-step procedure. In the first step, based on the method proposed by Sokolov et al,⁵⁹ the Hertz model was fitted to the indentation curves in the region of maximum load and the values of cell E_{ML} were extracted (Figure 1E). Next, for lower indentations, a force curve based on Alexander–de Gennes' theory of polymer brushes was fitted for description of glycocalyx properties (glycocalyx length; Figure 1F). Based on calculated parameters, the spatial maps were performed, as presented in Figure 1G and 1H. In the second step,

classification of curves based on the clustering methods was performed to distinguish between curves with and without the glycocalyx part. This procedure is based on a classification scheme that uses 2 independent parameters, E_{ML} and brush length, as proposed by Targosz-Korecka et al.31 Because of a large spread in the values, these parameters were transformed to a logarithmic $\mathsf{E}_{\mathsf{ML}}\text{-}\mathsf{brush}$ length scale and displayed on scatter plots. A bivariate gaussian mixture was fitted to the data points using Matlab. Next, a clustering procedure was used to assign data into the specific component of the gaussian mixture distribution with the criterion of the largest posterior probability for the observation, weighted by the component probability. As a result, all indentation curves were classified as recorded on regions without glycocalyx and regions with glycocalyx (Figure 11 and 1J).

Assessment of Endothelial NO Production in Aorta Using EPR

For measurements of endothelial NO synthase-dependent NO production, EPR spin trapping with diethyldithiocarbamic acid sodium salt was used ex vivo, as described previously,47 with minor modifications. Isolated aorta was cleared from surrounding tissue, opened longitudinally, and preincubated with 10 µmol/L N6-(1-iminoethyl)-lysine, hydrochloride in Krebs-HEPES buffer for 30 minutes at 37°C in a well of a 48-well plate. Addition of N6-(1-iminoethyl)-lysine, hydrochloride during the preincubation period allowed the direct measurements of NO produced by endothelial NO synthase without the signal from NO produced by inducible NO synthase, expressed by macrophages in atherosclerotic plaque. 60 Next, diethyldithiocarbamic acid sodium salt (3.6 mg) and FeS- $O_4 \cdot 7H_2O$ (2.25 mg) were separately dissolved under argon gas bubbling in two 10-mL volumes of ice-cold Krebs-HEPES buffer and were kept under gas flow on ice until used. After preincubation, a spin trap (125 µL of FeSO4.7H2O and 125 µL of diethyldithiocarbamic acid sodium salt; final concentration of the colloid, 285 µmol/L) and calcium ionophore A23187 (final concentration, 1 µmol/L) were added to the aorta. Subsequently, incubation for 90 minutes at 37°C was started. To detect NO release, calcium ionophore, but not acetylcholine, was used to provide receptor-independent, prolonged stimulation of NO production during incubation, as acetylcholine-induced receptordependent transient activation of NO release was insufficient for EPR-based detection. Finally, dried aorta was weighed and frozen in liquid nitrogen (suspended in fresh buffer) into the middle of a 400-µL column of Krebs-HEPES buffer and stored at -80°C until measured. EPR spectra were obtained using an X-band EPR spectrometer (EMX Plus; Bruker, Germany), equipped with a rectangular resonator cavity H102. Signals

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

were quantified by measuring the total amplitude of the Fe(II)-Diethyldithiocarbamate after correction of baseline. The quantitative results of NO production, assessed by EPR, were expressed in arbitrary units/mg of tissue.

Assessment of Biomarkers of Endothelial Dysfunction in Plasma by MicroLC/MS-MRM

Assessment of 10 protein biomarkers of endothelial dysfunction was performed using the microLC/MS-MRM method. The panel included biomarkers of various aspects of endothelial dysfunction, such as the following: glycocalyx disruption: syndecan-1 (SDC-1) and endocan (ESM-1); endothelial inflammation: soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1), the soluble form of E-selectin (sE-sel) and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1); endothelial permeability: angiopoietin 2 (Angpt-2) and the soluble form of fms-like tyrosine kinase (sFLT-1); and hemostasis: von Willebrand factor (vWF), tissue plasminogen activator (t-PA), and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1).

The Nexera ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) system (Shimadzu, Kyoto, Japan) connected with a highly sensitive mass spectrometer QTrap 5500 (Sciex, Framingham, MA, USA) were used. During sample preparation, the studied mouse material was subjected to proteolytic digestion using porcine trypsin to achieve unique and reproducible peptide sequences, applied as the surrogates of the proteins suitable for LC-MS/MS analyses. A detailed description of the targeted analysis focused on the panel of selected proteins was presented elsewhere.^{44–46}

Histological Assessment of Atherosclerotic Plaque

For determination of the atherosclerotic plaque area and composition, isolated BCA was dissected, fixed in 4% buffered formalin, and embedded in paraffin. Serial sections of the BCA (5-µm thick) were collected from the proximal to distal part of the artery. Our originally developed staining with OMSB, as described recently by us elsewhere,⁶¹ was applied on every tenth section of cross-sectional slices (50 µm interval between each section) for visualization of collagen, elastin, fibrin, red blood cells, and vascular smooth muscle cells within the atherosclerotic plaque. The areas of particular components of atherosclerotic plaque as well as artery lumen and vascular wall area were determined after Columbus-based software processing using an algorithm previously developed by our group.⁶¹ The parameters analyzed include vessel wall area, internal vessel area (IVA), plaque area (expressed as percentage of IVA: plaque/IVA). Jumen area (expressed as percentage of IVA: lumen/IVA), as well as areas of collagen and lipids in plaque (collagen/plaque and lipid/plaque, respectively).

Statistical Analysis

Obtained data are presented as mean and SD or, in case of the lack of normal distribution, as median and interquartile range. Statistical tests were performed using STATISTICA 10 (Stat Soft Inc, USA). Nonparametric (Kruskal-Wallis test) or parametric (1-way ANOVA with an honestly significant difference Tukey's test for unequal sample sizes) tests were performed. P=0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Changes in Acetylcholine-Induced Vasodilation and Flow-Mediated Vasodilation in vivo in ApoE/LDLR $^{-/-}\,$ Mice

In the AA (Figure 2A), even in 4-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, acetylcholine-induced vasodilation was impaired (volume changes, \approx 23%) compared with control mice (volume changes, \approx 33%); in 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice,



Figure 2. Progression of the impairment of endothelium-dependent vasodilation, vascular NO production, and increased endothelial permeability in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice (ApoE/LDLR^{-/-}) mice. Changes in end-diastolic volume of the abdominal aorta (AA-acetylcholine [ACH]; **A**) and the brachiocephalic artery (BCA-acetylcholine [ACH]; **C**) 25 minutes after acetylcholine administration; changes in NO production in the aorta, measured by spin trapping with diethyldithiocarbamic acid sodium salt (DETC) (AA-NO; **B**); changes in endothelial permeability described as Npx50 value, which represents the number of pixels around the BCA lumen, for which relaxation time had changed >50% (Npx50) after injection of gadolinium-rich liposome contrast agent (BCA-permeability [PER]; **D**); and changes in volume of the femoral artery (FA–flow-mediated dilation [FMD]; **E**) after 5-minute vessel occlusion in ApoE/LDLR^{-/-} mice (white columns) at the age of 4 (n=4 for **A**, **C**, and **D**; and n=7 for **B**), 8 (n=6 for **A**, **B**, **C**, and **E**; and n=5 for **D**), and 28 (n=4 for **A**, n=8 for **B**, n=7 for **C**, n=6 for **D**, and n=5 for **E**) weeks in comparison to 8-week-old control, C57BL/6 mice (n=4 for **A**, n=6 for **B**, n=7 for **C**, and n=5 for **D** and **E**; black columns). Statistics: boosterd estimate of 1-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test (**A**, **C**, and **D**), and **E**) (normality was assessed using Shapiro-Wilk test). **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

acetylcholine response was further impaired (volume changes, \approx 9%); while in 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, acetylcholine response changed to vasoconstriction (volume changes, \approx -23%). At the early stage of endothelial dysfunction in 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, stimulated NO production (Figure 2B) in the AA was reduced by \approx 41% and 73% in 4- and 8-week-old mice, respectively, compared with control mice. Interestingly, stimulated vascular NO production in the aorta was not further impaired in older animals, and was similar in 8- and 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice. In the BCA (Figure 2C), there was also a tendency for the early impairment of acetylcholine-induced vasodilation, but these changes were not significant in 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice (volume changes, \approx 10%). Similar to the AA, in the BCA, acetylcholine response also led to vasoconstriction (volume changes, $\approx -9\%$) in 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice. In contrast to acetylcholine-induced vasodilation, flow-mediated

vasodilation (Figure 2E) was fully preserved in the FA in 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice (volume changes, $\approx 30\%$) but was impaired in 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice (volume changes, $\approx 7\%$).

Changes in Endothelial Permeability in ApoE/LDLR $^{-/-}$ Mice in vivo

In 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, endothelial permeability was increased. As shown in Figure 2D, there was a significant increase in the Npx50 parameter of the T₁ signal around the BCA lumen (increase by $\approx 140\%$ and 148% for 4- and 8-week-old mice, respectively, in comparison to control) after intravenous injection of gadolinium-containing liposomes. In 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, the increase in endothelial permeability was more pronounced compared with 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice.



Figure 3. Distinction of nanoindentation data measured on glycocalyx (GIx) layer as well as endothelium stiffening and glycocalyx degradation in abdominal aorta from apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice (ApoE/LDLR^{-/-}). Total atomic force microscope nanoindentation data set and its classification shown in the form of scatter plot of the elastic modulus vs brush length (L). Data points shown in red (endothelium with glycocalyx) and blue (endothelium without glycocalyx) were classified using an automatic clustering procedure: C57BI/6 mice (A) and ApoE/LDLR^{-/-} mice at the ages of 4 (B), 8 (C), and 28 (D) weeks (n=4 for each group). **E**, Elastic modulus (E) of the endothelium (ECs elasticity indicates elasticity of endothelial cells). **F**, Glycocalyx length. **G**, Glycocalyx coverage. Statistical significance was tested by 1-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. **P*<0.05, ***P*<0.001.

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171



Downloaded from http://ahajournals.org by on March 16, 2019

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

Figure 4. Plasma concentration of protein biomarkers of endothelial dysfunction. Concentration of syndecan-1 (SDC-1; **A**), endocan (ESM-1; **B**), soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1; **C**), soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1; **D**), soluble form of E-selectin (sE-sel; **E**), soluble form of fms-like tyrosine kinase (sFLT-1; **F**), angiopoietin 2 (Angpt-2; **G**), yon Willebrand factor (vWF; **H**), tissue plasminogen activator (t-PA; **I**), and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1; **J**) in plasma, in apolipoprotein E-low-density lipoprotein receptor-deficient mice (ApoE/LDLR^{-/-}) mice (white columns), at the ages of 4 (n=7), 8 (n=5), and 28 (n=9) weeks in comparison to 8-week-old control, C57BL/6 mice (n=7; black columns). Statistics: 1-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test (**A**, **B**, **D**, and **F**-J), or the Kruskal-Wallis test, followed by Dun's post hoc test (**C** and **E**) (normality was assessed using the Shapiro-Wilk test). **P*<0.00, 1 ***P*<0.01.

Changes in Nanomechanical Properties of Glycocalyx and Endothelium in ex vivo Aorta in ApoE/LDLR^{-/-} Mice

In 4-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, the E_{ML} describing endothelial stiffness increased pprox3-fold and remained significantly elevated in 8- and 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice. Glycocalyx coverage, but not length, was significantly reduced in 4-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, whereas in 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, both parameters (glycocalyx coverage and length) were significantly reduced compared with control mice. In 28-weekold ApoE/LDLR^{-/-} mice, glycocalyx coverage was substantially decreased compared with 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, whereas glycocalyx length was only slightly reduced. Figure 3 shows the entire experimental data set in the form of scatter plots for the aorta taken from ApoE/LDLR^{-/-} mice at the age of 4 (Figure 3B), 8 (Figure 3C), and 28 (Figure 3D) weeks compared with control C57BL/6 mice (Figure 3A). The red data points correspond to the indentation curve classified as those measured on endothelium covered by glycocalyx, whereas the blue data points represent the indentation curve for endothelium without glycocalyx. Figure 3 presents the results for measurements of E_{ML} of the endothelium (Figure 3E), glycocalyx length (Figure 3F), and glycocalyx coverage (Figure 3G) for ApoE/ $LDLR^{-/-}$ mice at the ages of 4, 8, and 28 weeks compared with control mice. The mean values of the E_{ML} (Figure 3E) and the glycocalyx brush length (Figure 3F) were derived solely from indentation curves classified as "red" curves with a glycocalyx part. The glycocalyx coverage (Figure 3G) was calculated as the ratio of the number of red curves/the number of all curves measured for a given sample. The details of the AFM-based analysis are presented in Figure S1.

Changes in Plasma Concentration of Biomarkers of Glycocalyx Disruption (SDC-1 and ESM-1), Endothelial Inflammation (sVCAM-1, sICAM-1, and sE-sel), Endothelial Permeability (sFLT-1 and Angpt-2), and Hemostasis (vWF, tPA, and PAI-1) in ApoE/LDLR^{-/-} Mice

In 4-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, the plasma concentration of the number of biomarkers significantly increased, including

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

at least 1 biomarker from each category: glycocalyx injury (ESM-1, increased by $\approx\!38\%$ in comparison to control mice) (Figure 4B), endothelial permeability (Angpt-2, increased $\approx\!3$ -fold in comparison to control group) (Figure 4G), endothelial inflammation (sVCAM-1, increased by $\approx\!70\%$ in comparison to control mice) (Figure 4C), and hemostasis (t-PA [Figure 4I] and PAI-1 [Figure 4J], both increased by $\approx\!1.5$ -fold in comparison to control group). Most of them remained elevated in 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice. With the exception of SDC-1 (Figure 4A) and the sFLT-1 (Figure 4F), there was no substantial increase in plasma concentration of any of the selected biomarkers (Figure 4 D,E,H) in 28- versus 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice.

Progression of Atherosclerosis in ApoE/LDLR^{-/-} Mice

To confirm the absence of atherosclerotic plaques in young ApoE/LDLR^{-/-} mice and the presence of advanced atherosclerotic plaques in older ApoE/LDLR^{-/-} mice, OSMB histological staining was used (Figure 5A). As shown in Figure 5D-E, in 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, atherosclerotic plaques were not present. Furthermore, in 10-week-old ${\rm ApoE/LDLR^{-/-}}$ mice, plaques were virtually absent. In older mice, such as 18-week-old mice, advanced forms of atherosclerotic plaque were observed, with further progression for 28-week-old mice (plaque/IVA, \approx 30% and 55%, respectively). Other analyzed parameters also indicated significant progression of atherosclerosis from 18- to 28week-old mice, including lumen narrowing, IVA (Figure 5C), and collagen content (Figure 5F) but not lipid content (Figure 5G), which was similar in 18- and 28-week-old mice groups. Atherosclerotic plaque in 18-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice was characterized by high lipid content (lipid/plaque, \approx 25%) and an almost complete lack of collagen (collagen/ plaque, 0.32%), which significantly increased in 28-week-old mice (collagen/plaque, \approx 9%). Despite the fact that in 8-weekold ApoE/LDLR $^{-\prime-}$ mice, well-defined atherosclerotic plaques were absent, in 4 of 6 mice, the vessel wall (vessel wall area, VWA, Figure 5B) of the BCA was locally thickened (70.60 versus 49.61 $\mu\text{m})$ (Figure S2A through S2C) and displayed altered vascular smooth muscle morphological features (signs of hyperplasia, hypertrophy, and extracellular matrix deposition

Journal of the American Heart Association 11

Downloaded from http://ahajournals.org by on March 16, 2019



DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

Downloaded from http://ahajournals.org by on March 16, 2019

Figure 5. Atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice (ApoE/LDLR^{-/-}) mice. **A**, Representative images of brachiocephalic artery (BCA) cross-sections stained with Unna's orcein combined with Martius, Scarlet, and Blue trichrome (OMSB), with particular components of atherosclerotic plaque (P), including lipid core (Lc), collagen, artery lumen (L), and vessel wall area (VWA), that were quantitatively determined by Columbus-based software processing. Internal vessel area (IVA) was determined as the sum of both plaque and lumen areas. Changes in vessel wall area (VWA) (**B**), IVA (**C**), plaque area (expressed as percentage of IVA: plaque/IVA; **D**), lumen area (expressed as percentage of IVA: lumen/IVA; **E**), as well as areas of collagen and lipids in plaque (collagen/plaque [**F**] and lipid/plaque [**G**], respectively) in ApoE/LDLR^{-/-} mice at the ages of 8 (n=6), 10 (n=8), 18 (n=9), and 28 (n=8) weeks. The assessment was performed for divided vessel in proximal, middle, and distal parts. Statistics: Kruskal-Wallis 1-way ANOVA (normality was assessed using the Shapiro-Wilk test). **P*<0.05, ***P*<0.01.

of collagen and elastin [Figure S2E], as well as a proliferative phenotype featured by a pale staining). The distance between elastic laminae and the subendothelial layer was enlarged, with evidence of smooth muscle cells migrating into the intima (Figure S2B) and monocyte adhesion (Figure S2D) and migration into the subendothelial space.

Discussion

In the present work, we comprehensively assessed the endothelial phenotype in ApoE/LDLR^{-/-} mice and demonstrated that endothelial dysfunction, even at the early stage (ie prior to the development of well-defined atherosclerotic plaque), is a complex multifactorial response involving diminished glycocalyx coverage and lengths and endothelial stiffness. These factors coincide with the impairment of endothelium-dependent vasodilation, increased endothelial permeability, diminished vascular NO production, and increased plasma concentration of biomarkers of glycocalyx disruption (ESM-1), endothelial inflammation (sVCAM-1), vascular permeability (Angpt-2), and hemostasis (PAI-1 and t-PA). These results suggest that glycocalyx injury does not proceed other features of endothelial dysfunction,⁶² but rather coincides with these pathogenetic endothelial events, in line with the concept of vicious circle relations between impaired endothelial glycocalyx and endothelial dysfunction.63

In the present work, we adopted a panel of state-of-the-art, well-suited, sensitive, and validated previously developed methods to measure endothelial function in vivo (MRI),²⁰ glycocalyx coverage and length (AFM),³¹ concentration of multiple biomarkers of endothelial dysfunction in plasma (microLC/MS-MRM),⁴⁴⁻⁴⁶ and vascular NO production (EPR).⁴⁷

For the assessment of endothelial phenotype in mice in vivo, we used an MRI-based approach. Despite this method being associated with several technical challenges⁶⁴ (see review by Bar et al for details⁵⁸), it has been found to be well suited for detection and quantification, with good sensitivity and reproducibility, of NO-dependent artery dilation in healthy mice and impaired vasodilation or artery constriction in mice exposed to a proatherogenic stimulus (eg high-fat diet) or in

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

mice with atherosclerosis (eg ApoE/LDLR $^{-\prime-}$ mice). $^{19-22}$ Undoubtedly, the important advantage of our approach to MRI-based assessment of endothelial function is a retrospective reconstruction of images from 3D data sets, allowing for analysis of changes in vessel volume instead of changes in cross-sectional vessel area only, increasing measurement accuracy.²⁰ Furthermore, in the present work, MRI-based assessment of endothelium-dependent vasodilation was performed in 3 arteries: in the BCA and the AA in response to intraperitoneal administration of acetylcholine and in the FA in response to flow (FMD). Vasoactive responses to acetylcholine, given the low dose in vivo in mice, are independent of the effect of acetylcholine on the heart and respiration, as shown previously;²⁰ thus, they can be used to reliably assess endothelial status in vivo. In turn, FMD was a similar assay of endothelial function in vivo in mice as that used in humans in the brachial artery and was described in detail in supplementary material in our previous study.²² Noteworthy, to date, there are only a few reports describing evaluation of FMD using ultrasonography65,66 or optical tomography of the coherence^{54,67} in small experimental animals. In our hands, the MRI-based method of FMD assessment did not require vessel uncovering and was combined with evaluation of acetylcholine-induced response in one MRI protocol, which allowed attainment of functional responses from 2 different vessels in response to different stimuli during one, short MRIbased set of measurements.

In addition to the assessment of endothelium-dependent vasodilation, the MRI-based method was used for the quantification of endothelial permeability using an operatorindependent method to quantify results based on the Npx50 parameter, as described previously,²⁰ and a specially designed gadolinium-rich liposome preparation as contrast agents used herein for the first time. Most gadolinium-based MRI contrast agents, which can be used for detection of increased endothelial permeability, are small, nontargeted compounds that passively penetrate into the vascular wall with a broad nonspecific biodistribution⁶⁸ or gadolinium covalently bonded to albumin, allowing for higher, but still limited, vessel wall enhancement.^{19,20} Liposomes of small size (110 nm) loaded with gadolinium used in the present

Journal of the American Heart Association 13

Downloaded from http://ahajournals.org by on March 16, 2019

work allowed for good MRI-based detection of changes in endothelial permeability.⁵⁵ Altogether, simultaneous assessment of endothelium-dependent vasodilation in 3 arteries in response to acetylcholine or flow, together with quantification of endothelial permeability by MRI in vivo, an approach used in the present work, provided a unique insight into endothelial function in vivo in ApoE/LDLR^{-/-} mice.

To confirm that impairment of endothelial function, assessed by MRI in vivo, is linked to impaired NO-dependent function, NO production in aorta ex vivo was measured by EPR,⁴⁷ the only analytical method that detects endothelial NO production directly, not indirectly. In addition to providing a broader view on early pathophysiological characteristics of endothelial dysfunction in ApoE/LDLR^{-/-} mice, biomarkers of glycocalyx disruption (SDC-1 and ESM-1), endothelial inflammation (sVCAM-1, sICAM-1 and sE-sel), endothelial permeability (Angpt-2 and sFLT-1), and hemostasis (vWF, t-PA, and PAI-1) were simultaneously measured using the microLC/MS-MRM–based method, recently developed by our group.^{44–46}

Finally, nanomechanical properties of the endothelium in ex vivo aorta were examined using spectroscopy by nanoindentation with an AFM tip^{69–71} using a novel method of AFM nanoindentation-based detection of glycocalyx degradation and endothelial stiffness described previously by Targosz-Korecka et al.³¹

Such a multimodal approach for the comprehensive assessment of endothelial phenotype in vivo, supplemented by ex vivo analyses used in the present work, enabled an unprecedented insight into the temporal association of alterations in various aspects of endothelial phenotype, including glycocalyx integrity, endothelial stiffness, NO-dependent endothelial function, and other features of endothelial inflammation and dysfunction, usually analyzed separately, not simultaneously.^{24,25,30,72}

In the present work, we evaluated the endothelial phenotype, in 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, at the stage before occurrence of the well-defined atherosclerotic plaque compared with 28-week-old mice, and at the stage of advanced atherosclerotic plaque development. Although we identified early changes in smooth muscle cells and intima, we confirmed that atherosclerotic plaques were absent in the BCA up to the age of 10 weeks using scrupulous analysis of the proximal, middle, and distal parts of the BCA and originally developed staining with OMSB, providing reliable color contrast to distinguish numerous constituents of atherosclerotic plaque.⁶¹ These results are in accordance with the work of Csányi et al,²⁸ showing that well-defined atherosclerotic plaques in ApoE/LDLR^{-/-} mice fed a standard diet do not occur before the age of 12 weeks.

In previous studies, endothelial dysfunction, assessed as impaired NO-mediated relaxation in ex vivo vascular

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

preparations, was repeatedly demonstrated in murine models of atherosclerosis.^{23–25} However, it was not a universal finding in ApoE^{-/-} mice,²⁷ and some authors claimed that endothelial dysfunction occurs only at the late stage of the development of atherosclerotic plaques in this model.^{24,26} We previously demonstrated that the impairment of NO-dependent relaxation in the aorta, measured in a classic vascular preparation setup, was present in 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, a model characterized by a robust hypercholesterolemia with increased total, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein cholesterol levels.²⁸

In the present work, to our surprise, the complex multifactorial nature of endothelial dysfunction was revealed as early as in 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, significantly before the occurrence of the well-defined atherosclerotic plaque. At this early stage of endothelial response to hypercholesterolemic insult, the dysfunctional phenotype involved diminished glycocalyx coverage and lengths and endothelial stiffness. These factors coincided with the impairment of endothelium-dependent vasodilation and NO-dependent function, increased endothelial permeability, and increased plasma concentration of biomarkers of glycocalyx disruption (ESM-1), endothelial inflammation (sVCAM-1), vascular permeability (Angpt-2), and hemostasis (PAI-1 and t-PA). The multimodal approach adopted in the present work was useful to show that early impairment of endothelium-dependent vasodilation (by MRI) in the aorta was confirmed by impaired NO production in the aorta (by EPR), whereas glycocalyx injury in the aorta (by AFM) was supported by increased biomarkers of glycocalyx disruption (ESM-1). Increased endothelial permeability (by MRI) was confirmed by increased plasma concentration of Angpt-2. The evaluation of endothelial inflammation and hemostasis was based on biomarker analysis only (changes in sVCAM-1, t-PA, and PAI-1). Taken together, the results presented herein suggest that endothelial dysfunction in atherosclerosis, even at the early stage before the occurrence of the well-defined atherosclerotic plaque, is a complex multifactorial phenomenon that has not been previously appreciated.

The important question arises about whether these divergent manifestations of endothelial dysfunction, including glycocalyx disruption and various features of endothelial dysfunction, appear in sequence or more likely, their co-occurrence is rather indicative for vicious circle relations, as suggested recently for impaired endothelial glycocalyx, endothelial mechanotransduction, and NO-dependent function.⁶³ For example, silencing of glypican-1 or SDC-1 was shown to inhibit shear stress–induced activation of endothelial NO synthase,⁷³ while replenishment of glycocalyx improved mechanoactivation-induced NO generation.⁶³ Increased endothelial cortical stiffness may impair flowmediated NO production, and NO production seems to be regulated by cortical stiffness.^{73–77}

The reciprocal relation between impaired NO function and endothelial inflammation is rather well accepted because NO deficiency promoted increased expression of endothelial adhesion molecules, and vice versa.78,79 Deterioration of glycocalyx resulted in increased endothelial permeability^{36,80,81}; in turn, endothelial barrier disruption is also linked to increased Angpt-2, which mediates breakdown of glycocalyx.⁸² Glycocalyx damage also induces a proinflammatory endothelial response (eg after removal of the glycocalyx component SDC-1).75 Clearly, glycocalyx shedding facilitated monocyte adhesion and infiltration, which promoted vascular inflammation, lipid retention, and the development of atherosclerotic plaques.⁷⁶ Furthermore, inhibition of hyaluronan synthesis (by 4-methylumbelliferone) facilitated leukocyte adhesion, subsequent inflammation, and progression of atherosclerosis.40 In turn, leukocyte infiltration and subsequent vascular inflammation promoted extrinsic pathways of glycocalyx degradation by sheddases known to involve not only heparanase and hyaluronidase, but also matrix metalloproteinases activated in endothelial inflammation: thrombin, plasmin involved in thrombotic and fibrinolytic processes, elastase, and proteinase 3 released by endothelium-adherence leukocytes.83 Interestingly, biglycan, a constituent of the glycocalyx of capillaries, inhibited thrombin activity, platelet activation, and, finally, macrophage-mediated plaque inflammation.³⁹ On the other hand, impaired endothelial glycocalyx promoted platelet adhesion to endothelium.36

Altogether, numerous mechanisms were previously identified, by which glycocalyx injury may contribute to impairment of NO-dependent function, increased endothelial permeability, endothelial stiffness, vascular inflammation, thrombosis and fibrinolysis, and atherosclerosis development; and these processes may reciprocally promote glycocalyx injury. Our results do not support the notion that glycocalyx injury proceeded other manifestations of endothelial dysfunction because glycocalyx injury coincided with all manifestations of endothelial dysfunction and all of them were detected as early as in 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, as though at this early stage, there was a full-blown phenotype of endothelial dysfunction. We have no experimental data to exclude that high hypercholesterolemia of ApoE/LDLR^{-/-} mice induced some manifestations of endothelial dysfunction, including glycocalyx injury, before birth or within the first 4 weeks of maternal feeding; and then, others symptoms of endothelial dysfunction occurred progressively. However, given some feedback-forward reinforcement mechanisms between perturbed endothelial glycocalyx and progression of endothelial dysfunction that have been recently put forward,63 we are rather tempted to support the notion of the complex multifactorial nature of early endothelial dysfunction that, to our knowledge, has not been previously appreciated.

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

Accordingly, the loss of endothelial glycocalyx integrity seems to be an integral part, but not a separate event, of endothelial dysfunction, as also suggested when studying endothelial response to acute hyperglycemia.⁸⁴

Interestingly, in the present study, the earliest (in 4-week-old mice) changes in glycocalyx integrity were manifested as reduced glycocalyx coverage coexisting with increased endothelial stiffness, followed by reduction in the effective glycocalyx length (in 8-week-old mice). These results underscore a similar pattern of early changes in glycocalyx integrity in ApoE/LDLR^{-/-} mice as in the db/db mouse model of diabetes mellitus, in which stiffening of endothelial cells and diminished glycocalyx coverage occurred in early diabetes mellitus and were followed by the reduction of the glycocalyx length that correlated with diabetes mellitus progression.³¹ On the other hand, in ApoE/LDLR^{-/-} mice, it was the changes in the glycocalyx coverage, not length, that were most progressively impaired in old compared with young ApoE/LDLR^{-/-} mice. These differences may suggest that in atherosclerosis, intrinsic mechanisms of glycocalyx degradation linked to exocytosis of lysosome-related organelles and their cargo, with subsequent patchy loss of glycocalyx,85 play an important role.

Our results have diagnostic and therapeutic significance. For an endothelial dysfunction diagnosis, interestingly, nearly all major features of endothelial dysfunction detected early remained altered, to an approximately similar extent, in the atherosclerotic phase in 28-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice. The only exceptions were the occurrence of acetylcholine-induced vasoconstriction in the aorta and BCA, impaired flow-mediated vasodilation in the FA, and the progressive nature of reduction of glycocalyx length and coverage, with a concomitant further increase in endothelial permeability. Accordingly, only some of the features of endothelial permeability, have a progressive nature in atherosclerosis; and those features, not others, may constitute a reliable measure of the progression of endothelial dysfunction.³⁰

In terms of endothelium pharmacological characteristics, there are several drugs endowed with endothelial/vasoprotective activity that have been found to be important in the treatment of various diseases,^{86,87} and there is increasing awareness of the endothelium as a novel attractive target for pharmacotherapy.⁸⁸ Given the complex nature of the early phase of endothelial dysfunction reported herein in atherosclerosis, it seems unlikely that the correction of the function of a single endothelial mechanism will be effective, unless restoring the one well-designed component of dysfunctional endothelial machinery will improve all the others. To date, the drugs that possess a broader spectrum of endothelial activity constitute the forefront of pharmacological characteristics of the endothelium, whereas some of the single-mechanism-based approaches failed.⁸⁹ Further

proof-of-concept studies are required to point out the effective ways to therapeutically achieve a reversal of a complex, multifactorial early response of endothelium to hypercholesterolemia.

There are limitations of this study that need to be underlined. First, in the present study, only female mice were used, making it impossible to study the impact of sex on early endothelial phenotype in mice with atherosclerosis. We assume that the early phase of endothelial dysfunction is a complex multifactorial response regardless of sex of the animals, but obviously sexual dimorphism may pertain to differences in endothelial phenotype. There are several studies addressing the molecular mechanisms of differences in endothelial function in female sex compared with male sex, in particular as regard to microvascular and resistance vessel function.⁹⁰

Second, in the present study, the impairment of endothelium-dependent vasodilation was detected by MRI in vivo and was not compared with commonly performed assessment of endothelial dysfunction based on measurements of endothelial-dependent vasodilation in ex vivo isolated vessel preparation. To the best of our knowledge, there is no direct comparison of these 2 approaches to measure endothelialdependent vasodilation. Thus, it remains to be determined whether the progression of endothelial dysfunction assessed by MRI in vivo, compared with the ex vivo approach, would give fully concordant results.

Third, we reported that multiple manifestations of endothelial dysfunction occur simultaneously in 4-week-old ApoE/ LDLR^{-/-} mice. However, it cannot be excluded that high hypercholesterolemia of ApoE/LDLR^{-/-} mice induces some features of endothelial dysfunction before birth or within the first 4 weeks of maternal feeding, and there is a sequence of events that we could not determine, as in our study we characterized 4-week-old mice, but not younger mice.

Conclusion

Taking advantage of the unique and comprehensive armamentarium of in vivo and ex vivo methods, including functional 3D MRI-based assays of endothelial phenotype and AFMbased measurements of glycocalyx degradation and endothelial stiffening, we demonstrated herein, to our knowledge for the first time, that in 4- to 8-week-old ApoE/LDLR^{-/-} mice at the stage proceeding development of the well-defined atherosclerosis, the dysfunctional phenotype of endothelium involves diminished glycocalyx coverage and length. These factors coincide with but do not proceed the impairment of endothelium-dependent vasodilation and NO-dependent function, increased endothelial permeability, and increased plasma concentration of biomarkers of glycocalyx disruption (ESM-1), endothelial inflammation (sVCAM-1), vascular

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

permeability (Angpt-2), and hemostasis (PAI-1 and t-PA). These results underscore the fact that endothelial dysfunction, even at the early stage, is a complex multifactorial response. Our findings have pathophysiological as well as diagnostic and therapeutic significance.

Sources of Funding

This project was financed by the National Science Centre, SYMFONIA Grant DEC-2015/16/W/NZ4/00070, PRELU-DIUM Grant DEC-2016/23/N/NZ5/00595, and the Foundation for Polish Science from the resources of the TEAM TECH– Core Facility program (application 0016), financed by the European Regional Development Fund under the Intelligent Development Operational Program 2014-2020 (OP IR), Axis IV, Increasing the scientific and research potential, 4.4: Increasing the human resources potential of the R & D sector.

Disclosures

None.

References

- Blann AD. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. Pathophysiol Haemost Thromb. 2003;33:256–261.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. 2004;109:III27–III32.
- Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrange D, Creager M, Selwyn P, Ganz P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Am J Cardiol. 1995;75:71B–74B.
- Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12:448– 455.
- Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. J Am Coll Cardiol. 2012;60:1455–1469.
- Franses JW, Drosu NC, Gibson WJ, Chitalia VC, Edelman ER. Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. Int J Cancer. 2013;133:1334–1344.
- Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Lüscher TF, Shechter M, Taddei S, Vita JA, Lerman A. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126:753–767.
- Halcox JPJ, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KRA, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;106:653–658.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899–1906.
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315:1046–1051.
- Wilkinson IB, Webb DJ. Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. Br J Clin Pharmacol. 2001;52:631–646.
- Brant LC, Barreto SM, Passos VM, Ribeiro AL. Reproducibility of peripheral arterial tonometry for the assessment of endothelial function in adults. J Hypertens. 2013;31:1984–1990.
- Dupouy P, Geschwind HJ, Pelle G, Gallot D, Dubois-Randé JL. Assessment of coronary vasomotion by intracoronary ultrasound. *Am Heart J.* 1993;126:76– 85
- Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilatation. Br J Clin Pharmacol. 2000;50:397–404.

- Frolow M, Drozdz A, Kowalewska A, Nizankowski R, Chlopicki S. Comprehensive assessment of vascular health in patients: towards endothelium-guided therapy. *Pharmacol Rep.* 2015;67:786–792.
- Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. J Am Coll Cardiol. 2004;44:2137– 2141.
- Lee JMS, Shirodaria C, Jackson CE, Robson MD, Antoniades C, Francis JM, Wiesmann F, Channon KM, Neubauer S, Choudhury RP. Multi-modal magnetic resonance imaging quantifies atherosclerosis and vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2007;4:44–48.
- Leeson CP, Robinson M, Francis JM, Robson MD, Channon KM, Neubauer S, Wiesmann F. Cardiovascular magnetic resonance imaging for non-invasive assessment of vascular function: validation against ultrasound. J Cardiovasc Magn Reson. 2006;8:381–387.
- Phinikaridou A, Andia ME, Protti A, Indermuehle A, Shah A, Smith A, Warley A, Botnar RM. Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *Circulation*. 2012;126:707–719.
- Bar A, Skorka T, Jasinski K, Sternak M, Bartel Ž, Tyrankiewicz U, Chlopicki S. Retrospectively-gated MRI for in vivo assessment of endothelium-dependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. *NMR Biomed.* 2016;29:1088.
- Bar A, Olkowicz M, Tyrankiewicz U, Kus E, Jasinski K, Smolenski RT, Skorka T, Chlopicki S. Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction: comparison of effects of 1methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Front Pharmacol.* 2017;8:183.
- Sternak M, Bar A, Adamski MG, Mohaissen T, Marczyk B, Kieronska A, Stojak M, Kus K, Tarjus A, Jaisser F, Chlopicki S. The deletion of endothelial sodium channel x (xENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia in vivo. *Front Pharmacol.* 2018;9:178.
- 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.
- Crauwels HM, Van Hove CE, Holvoet P, Herman AG, Bult H. Plaqueassociated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet: effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res.* 2003;59:189–199.
- 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.
- 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.
- Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C, Petit C, Gosgnach W, Carpentier N, Vanhoutte P, Vilaine J-P. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-Edeficient mice. J Vasc Res. 2003;40:87–96.
- Csányi G, Gajda M, Franczyk-Zarow M, Kostogrys R, Gwoźdź P, Mateuszuk L, Sternak M, Wojcik L, Zalewska T, Walski M, Chlopicki S. Functional alterations in endothelial NO, PGI2 and EDHF pathways in aorta in ApoE/LDLR^{-/-} mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012;98:107–115.
- Walczak M, Suraj J, Kus K, Kij A, Zakrzewska A, Chlopicki S. Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endothelium-guided pharmacotherapy. *Pharmacol Rep.* 2015;67:771–777.
- Mitra R, O'Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in atherosclerosis-relevant endothelium function and as a therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19:63.
- Targosz-Korecka M, Jaglarz M, Malek-Zietek KE, Gregorius A, Zakrzewska A, Sitek B, Rajfur Z, Chlopicki S, Szymonski M. AFM-based detection of glycocalyx degradation and endothelial stiffening in the db/db mouse model of diabetes. Sci Rep. 2017;7:15951.
- Sieve I, Münster-Kühnel AK, Hilfiker-Kleiner D. Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018;100:26–33.
- Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 1995;75:519–560.
- Hsieh H-J, Liu C-A, Huang B, Tseng AH, Wang D. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci.* 2014;21:3.

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171

Downloaded from http://ahajournals.org by

on March 16,

2019

- Manchanda K, Kolarova H, Kerkenpaß C, Mollenhauer M, Vitecek J, Rudolph V, Kubala L, Baldus S, Adam M, Klinke A. MPO (myeloperoxidase) reduces endothelial glycocalyk thickness dependent on its cationic charge. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:1859–1867.
- Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. Ann Biomed Eng. 2012;40:828–839.
- Schött U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2016;24:48.
- Reitsma S, Oude Egbrink M, Heijnen V, Megens R, Engels W, Vink H, Slaaf DW, van Zandvoort M. Endothelial glycocalyx thickness and platelet-vessel wall interactions during atherogenesis. *Thromb Haemost*. 2011;106:939–946.
- Strandoch M, Kohlmorgen C, Melchior-Becker A, Feldmann K, Homann S, Müller J, Kiene L-S, Zeng-Brouwers J, Schmitz F, Nagy N, Polzin A, Gowert NS, Elvers M, Skroblin P, Yin X, Mayr M, Schaefer L, Tannock LR, Fischer JW. Loss of biglycan enhances thrombin generation in apolipoprotein E-deficient mice: implications for inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:e41–e50.
- Nagy N, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Rock K, ter Braak M, Jastrow H, Kinzig M, Lucke S, Suvorava T, Kojda G, Weber AA, Sorgel F, Levkau B, Ergun S, Fischer JW. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. *Circulation*. 2010;122:2313–2322.
- Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. J Intern Med. 2006;259:339–350.
- Oberleithner H, Peters W, Kusche-Vihrog K, Korte S, Schillers H, Kliche K, Oberleithner K. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflügers Arch.* 2011;462:519–528.
- Givens C, Tzima E. Endothelial mechanosignaling: does one sensor fit all? *Antioxid Redox Signal*. 2016;25:373–388.
- 44. Suraj J, Kurpińska A, Olkowicz M, Niedzielska-Andres E, Smolik M, Zakrzewska A, Jasztal A, Sitek B, Chlopicki S, Walczak M. Development, validation and application of a micro-ilquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for simultaneous quantification of selected protein biomarkers of endothelial dysfunction in murine plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;149:465–474.
- 45. Suraj J, Kurpińska A, Sternak M, Smolik M, Niedzielska-Andres E, Zakrzewska A, Sacha T, Kania A, Chlopicki S, Walczak M. Quantitative measurement of selected protein biomarkers of endothelial dysfunction in plasma by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on stable isotope diultion method. *Talanta*. 2019;194:1005–1016.
- 46. Suraj J, Kurpińska A, Zakrzewska A, Sternak M, Stojak M, Jasztal A, Walczak M, Chlopicki S. Early and late endothelial response in breast cancer metastasis in mice: simultaneous quantification of endothelial biomarkers using mass spectrometry-based method. *Dis Model Mech.* 2019; Jan 25. pii: dmm.036269.
- Przyborowski K, Proniewski B, Czarny J, Smeda M, Sitek B, Zakrzewska A, Zoladz JA, Chlopicki S. Vascular nitric oxide-superoxide balance and thrombus formation after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2018;50:1405-1412.
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein J, Brown M. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;10:4431–4435.
- 49. Kostogrys RB, Franczyk-Zarow M, Gasior-Glogowska M, Kus E, Jasztal A, Wrobel TP, Baranska M, Czyzynska-Cichon I, Drahun A, Manterys A, Chlopicki S. Anti-atherosclerotic effects of pravastatin in brachiocephalic artery in comparison with en face aorta and aortic roots in ApoE/LDLR^{-/-} mice. *Pharmacol Rep.* 2017;69:112–118.
- Tyrankiewicz U, Skorka T, Orzylowska A, Jablonska M, Jasinski K, Jasztal A, Bar A, Kostogrys R, Chlopicki S. Comprehensive MRI for the detection of subtle alterations in diastolic cardiac function in apoE/LDLR^{-/-} mice with advanced atherosclerosis. *NMR Biomed.* 2016;29:833–840.
- Mateuszuk L, Jaształ A, Maslak E, Gasior-Glogowska M, Baranska M, Sitek B, Kostogrys R, Zakrzewska A, Kij A, Walczak M, Chlopicki S. Antiatherosclerotic effects of 1-methylnicotinamide in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice: a comparison with nicotinic acid. J Pharmacol Exp Ther. 2016;356:514–524.
- Wrobel TP, Marzec KM, Chlopicki S, Maślak E, Jasztal A, Franczyk-Żarów M, Czyżyńska-Cichoń I, Moszkowski T, Kostogrys RB, Baranska M. Effects of low carbohydrate high protein (LCHP) diet on atherosclerotic plaque phenotype in ApoE/LDLR^{-/-} mice: FT-IR and Raman imaging. *Sci Rep.* 2015;5:14002.
- 53. Kostogrys RB, Franczyk-Żarów M, Maślak E, Gajda M, Mateuszuk Ł, Jackson CL, Chłopicki S. Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR^{-/-}). Atherosclerosis. 2012;223:327–331.

- Langbein H, Brunssen C, Hofmann A, Cimalla P, Brux M, Bornstein SR, Deussen A, Koch E, Morawietz H. NADPH oxidase 4 protects against development of endothelial dysfunction and atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur Heart J.* 2016;37:1753–1761.
- Przybyło M, Langner M, Borowik T. High-efficiency encapsulation of hydrophilic compounds in unilamellar liposomes. International Patent Application PCT/ EP2018/057400. International Publication W0 2018/172504 A1. 2018 LIPID SYSTEMS SP. Z.O.O. [PL/PL]; ul. Krzemieniecka 48C 54-613 Wroclaw, PL.
- Cheng HL, Wright GA. Rapid high-resolution T1 mapping by variable flip angles: accurate and precise measurements in the presence of radiofrequency field inhomogeneity. *Magn Reson Med.* 2006;55:566–574.
- Wang J, Oiu M, Kim H, Constable RT. T1 measurements incorporating flip angle calibration and correction in vivo. J Magn Reson. 2006;182:283–292.
- Bar A, Skorka T, Jasinski K, Chlopicki S. MRI-based assessment of endothelial function in mice in vivo. *Pharmacol Rep.* 2015;67:765–770.
- Sokolov I, Dokukin ME, Guz NV. Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in AFM indentation experiments. *Methods*. 2013;60:202–213.
- Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanoverschelde JL, Wijns W. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res.* 1999;41:465–472.
- 61. Gajda M, Jasztal A, Banasik T, Jasek-Gajda E, Chlopicki S. Combined orcein and martius scarlet blue (DMSB) staining for qualitative and quantitative analyses of atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries in apoE/LDLR^{-/-} mice. *Histochem Cell Biol.* 2017;147:671–681.
- Noble MIM, Drake-Holland AJ, Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. Q/M. 2008;101:513–518.
- Zhang X, Sun D, Song JW, Zullo J, Lipphardt M, Coneh-Gould L, Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction and glycocalyx—a vicious circle. *Matrix Biol.* 2018;71–72:421–431.
- Price AN, Cheung KK, Cleary JO, Campbell AE, Riegler J, Lythgoe MF. Cardiovascular magnetic resonance imaging in experimental models. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:278–292.
- 65. Schuler D, Sansone R, Freudenberger T, Rodriguez-Mateos A, Weber G, Momma TY, Goy C, Altschmied J, Haendeler J, Fischer JW, Kelm M, Heiss C. Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice: brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:2651–2657.
- Machin DR, Leary ME, He Y, Shiu Y-T, Tanaka H, Donato AJ. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation of the brachial and superficial femoral arteries in rats. J Vis Exp. 2016; Nov 3;(117).
- Song W, Zhou L, Kot KL, Fan H, Han J, Yi J. Measurement of flow-mediated dilation of mouse femoral artery in vivo by optical coherence tomography. J Biophotonics. 2018;11:e201800053.
- Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev.* 1999;99:2293–2352.
- Szczygiel AM, Brzezinka G, Targosz-Korecka M, Chlopicki S, Szymonski M. Elasticity changes anti-correlate with NO production for human endothelial cells stimulated with TNF-x. *Pflugers Arch.* 2012;463:487–496.
- Bai K, Wang W. Spatio-temporal development of the endothelial glycocalyx layer and its mechanical property in vitro. J R Soc Interface. 2012;9:2290– 2298.
- Hayashi K, Higaki M. Stiffness of intact endothelial cells from fresh aortic bifurcations of atherosclerotic rabbits: atomic force microscopic study. J Cell Physiol. 2017;232:7–13.
- Dinh QN, Chrissobolis S, Diep H, Chan CT, Ferens D, Drummond GR, Sobey CG. Advanced atherosclerosis is associated with inflammation, vascular dysfunction and oxidative stress, but not hypertension. *Pharmacol Res.* 2017;116:70–76.

- Ebong EE, Lopez-Quintero SV, Rizzo V, Spray DC, Tarbell JM. Shear-induced endothelial NOS activation and remodeling via heparan sulfate, glypican-1, and syndecan-1. *Integr Biol (Camb)*. 2014;6:338–347.
- 74. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*. 2005;437:426–431.
- Voyvodic PL, Min D, Liu R, Williams E, Chitalia V, Dunn AK, Baker AB. Loss of syndecan-1 induces a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells with a dysregulated response to atheroprotective flow. *J Biol Chem.* 2014;289:9547– 9559.
- Kusche-Vihrog K, Callies C, Fels J, Oberleithner H. The epithelial sodium channel (ENaC): mediator of the aldosterone response in the vascular endothelium? *Steroids*. 2010;75:544–549.
- Warnock DG, Kusche-Vihrog K, Tarjus A, Sheng S, Oberleithner H, Kleyman TR, Jaisser F. Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:146–157.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. J Clin Invest. 1995; 96:60–68.
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redoxsensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9114–9119.
- Rahbar E, Cardenas JC, Baimukanova G, Usadi B, Bruhn R, Pati S, Ostrowski SR, Johansson PI, Holcomb JB, Wade CE. Endothelial glycocalyx shedding and vascular permeability in severely injured trauma patients. *J Transl Med*. 2015;13:117.
- Becker BF, Chappell D, Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:687–701.
- Lukasz A, Hillgruber C, Oberleithner H, Kusche-Vihrog K, Pavenstädt H, Rovas A, Hesse B, Goerge T, Kümpers P. Endothelial glycocalyx breakdown is mediated by angiopoietin-2. *Cardiovasc Res.* 2017;113:671–680.
- Dogné S, Flamion B, Caron N. Endothelial glycocalyx as a shield against diabetic vascular complications: involvement of hyaluronan and hyaluronidases. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018;38:1427–1439.
- Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JAE, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JBL, Kastelein JJP, Stroes ESG, Vink H. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. Diabetes. 2006;55:1127–1132.
- Zullo JA, Fan J, Azar TT, Yen W, Zeng M, Chen J, Ratliff BB, Song J, Tarbell JM, Goligorsky MS, Fu BM. Exocytosis of endothelial lysosome-related organelles hair-triggers a patchy loss of glycocalyx at the onset of sepsis. *Am J Pathol.* 2016;186:248–258.
- Daiber A, Di Lisa F, Ferdinandy P. Pharmacology of oxidative stress: translational opportunities. Br J Pharmacol. 2017;174:1511–1513.
- Gryglewski RJ. Pharmacology of vascular endothelium. FEBS J. 2005;272: 2956–2967.
- Kiseleva RY, Glassman PM, Greineder CF, Hood ED, Shuvaev VV, Muzykantov VR. Targeting therapeutics to endothelium: are we there yet? *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8:883–902.
- Chłopicki S, Gryglewski RJ. Angiotensin converting enzyme (ACE) and Hydroxy/MethylGlutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors in the forefront of pharmacology of endothelium. *Pharmacol Rep.* 2005;57(suppl):86– 96.
- Davel AP, Lu Q, Moss ME, Rao S, Anwar JJ, DuPont JJ, Jaffe IZ. Sex-specific mechanisms of resistance vessel endothelial dysfunction induced by cardiometabolic risk factors. *J Am Heart Assoc.* 2018;7:e007675. DOI: 10.1161/ JAHA.117.007675.

ORIGINAL

RESEARCH

Downloaded from http://ahajournals.org by

on March

16, 2019

DOI: 10.1161/JAHA.118.011171





Functional and Biochemical Endothelial Profiling *In Vivo* in a Murine Model of Endothelial Dysfunction; Comparison of Effects of 1-Methylnicotinamide and Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor

OPEN ACCESS

Edited by:

Xinkang Wang, Agennix, USA

Reviewed by:

Beat M. Jucker, GlaxoSmithKline, England Xiaoqiang Yao, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong Andreas Daiber, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany

*Correspondence:

Stefan Chlopicki stefan.chlopicki@jcet.eu

Specialty section:

This article was submitted to Cardiovascular and Smooth Muscle Pharmacology, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

> Received: 28 January 2017 Accepted: 21 March 2017 Published: 10 April 2017

Citation:

Bar A, Olkowicz M, Tyrankiewicz U, Kus E, Jasinski K, Smolenski RT, Skorka T and Chlopicki S (2017) Functional and Biochemical Endothelial Profiling In Vivo in a Muine Model of Endothelial Dysfunction; Comparison of Effects of 1-Methylnicotinamide and Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor. Front. Pharmacol. 8:183. doi: 10.3389/fbhar.2017.00183 Anna Bar^{1,2}, Mariola Olkowicz^{3,4}, Urszula Tyrankiewicz¹, Edyta Kus¹, Krzysztof Jasinski⁵, Ryszard T. Smolenski³, Tomasz Skorka⁵ and Stefan Chlopicki^{1,2*}

¹ Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Jagiellonian University, Krakow, Poland, ² Chair of Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland, ³ Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland, ⁴ Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland, ⁶ Department of Magnetic Resonance Imaging, Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland

Although it is known that 1-methylnicotinamide (MNA) displays vasoprotective activity in mice, as yet the effect of MNA on endothelial function has not been demonstrated in vivo. Here, using magnetic resonance imaging (MRI) we profile the effects of MNA on endothelial phenotype in mice with atherosclerosis (ApoE/LDLR^{-/-}) in vivo, in comparison to angiotensin (Ang) -converting enzyme (ACE) inhibitor (perindopril), with known vasoprotective activity. On a biochemical level, we analyzed whether MNA- or perindopril-induced improvement in endothelial function results in changes in ACE/Ang II-ACE2/Ang-(1-7) balance, and L-arginine/asymmetric dimethylarginine (ADMA) ratio. Endothelial function and permeability were evaluated in the brachiocephalic artery (BCA) in 4-month-old ApoE/LDLR-/- mice that were non-treated or treated for 1 month or 2 months with either MNA (100 mg/kg/day) or perindopril (10 mg/kg/day). The 3D IntraGate®FLASH sequence was used for evaluation of BCA volume changes following acetylcholine (Ach) administration, and for relaxation time (T1) mapping around BCA to assess endothelial permeability using an intravascular contrast agent. Activity of ACE/Ang II and ACE2/Ang-(1-7) pathways as well as metabolites of L-arginine/ADMA pathway were measured using liquid chromatography/mass spectrometry-based methods. In non-treated 6-month-old ApoE/LDLR^{-/-} mice, Ach induced a vasoconstriction in BCA that amounted to -7.2%. 2-month treatment with either MNA or perindopril resulted in the reversal of impaired Ach-induced response to vasodilatation (4.5 and 5.5%, respectively) and a decrease in endothelial permeability (by about 60% for MNA-, as well as perindopril-treated mice). Improvement of endothelial function by MNA and perindopril was in both cases associated with the activation of ACE2/Ang-(1-7) and the inhibition of ACE/Ang II axes as evidenced by an approximately twofold increase in Ang-(1-9) and Ang-(1-7) and a proportional decrease in Ang II and

1

its active metabolites. Finally, MNA and perindopril treatment resulted in an increase in L-arginine/ADMA ratio by 107% (MNA) and 140% (perindopril), as compared to nontreated mice. Functional and biochemical endothelial profiling in ApoE/LDLR^{-/-} mice *in vivo* revealed that 2-month treatment with MNA (100 mg/kg/day) displayed a similar profile of vasoprotective effect as 2-month treatment with perindopril (10 mg/kg/day): i.e., the improvement in endothelial function that was associated with the beneficial changes in ACE/Ang II-ACE2/Ang (1–7) balance and in L-arginine/ADMA ratio in plasma.

Keywords: endothelial function, atherosclerosis, MRI, 1-methylnicotinamide, perindopril, plasma angiotensin profile, L-Arg/ADMA ratio

INTRODUCTION

1-Methylnicotinamide (MNA), the major metabolite of NA synthesized in the liver in the reaction involving NNMT, when given exogenously has distinct therapeutic activity, despite the fact, that it has long been considered inactive (Aksoy et al., 1994). Indeed, topical MNA alleviates the inflammatory responses in skin diseases such as acne, contact dermatitis or rosacea (Gebicki et al., 2003; Wozniacka et al., 2005). In turn, systemic administration of MNA exerts anti-thrombotic (Chlopicki et al., 2007), anti-inflammatory (Bryniarski et al., 2008), and gastroprotective (Brzozowski et al., 2008) properties mediated by the activation of COX-2 and PGI2 pathways. Furthermore, MNA can improve endurance exercise capacity in mice with diabetes, and may decrease the cardiovascular risk of exercise (Przyborowski et al., 2015). MNA was demonstrated to have hepatoprotective activity against concanavalin A-induced liver injury through the downregulation of IL-4 and TNF-a signaling (Sternak et al., 2010; Jakubowski et al., 2016), and to inhibit metastasis formation in a murine model of metastatic mammary gland cancer (4T1) in BALB/c mice (Blazejczyk et al., 2016). Interestingly, 1-MNA has also been shown to restore endothelial function in diabetic hypertriglycemic rats (Bartuś et al., 2008) analyzed ex vivo in isolated aorta, suggesting that the improvement in endothelial function may represent an important target of MNA activity and may explain therapeutic efficacy of MNA in various diseases including diabetes (Watała et al., 2009) and atherosclerosis (Mateuszuk et al., 2016). Indeed, in our recent study anti-atherosclerotic effects of MNA in ApoE/LDLR^{-/-} mice, including the inhibition

of inflammatory burden in plaques, diminished systemic inflammation, diminished platelet activation that were associated with an improvement in PGI₂ and NO-dependent endothelial function. These results support the notion that pronounced effects of MNA on endothelial function could contribute to therapeutic efficacy of MNA (Mateuszuk et al., 2016). However, in none of the previous experimental studies of MNA was endothelial function assessed *in vivo*, but only *in ex vivo* vascular preparation (Bartuś et al., 2008; Mateuszuk et al., 2016).

Endothelial dysfunction, being a consequence of vascular homeostatic imbalance is a hallmark of various cardiovascular diseases including atherosclerosis (Anderson et al., 1995), hypertension (Dharmashankar and Widlansky, 2010), heart failure (Marti et al., 2012), as well as non-cardiovascular diseases such as cancer (Franses et al., 2013). Vascular dysfunction is associated with activation of pro-inflammatory signaling molecules including adhesion molecules, chemokines and cytokines (Karbach et al., 2014; Steven et al., 2015). There is also evidence that ROS play an important role in vascular inflammation (Zhou et al., 2011) and tissue damage (Mittal et al., 2014). There are number of enzymatic sources of endothelial ROS, including eNOS uncoupling, converting beneficial NO synthase into a detrimental superoxide-producing enzyme (Karbach et al., 2014; Schulz et al., 2014).

Currently, many biochemical assays and functional tests are used for the evaluation of impaired NO-dependent function, oxidant stress and pro-inflammatory phenotype of endothelial dysfunction in humans. Prognostic value of biochemical measurements of endothelial biomarkers is still not widely accepted (Walczak et al., 2015). However, endothelial function measurements based on the assessment of impairment of NO-dependent vasodilatation in the coronary and peripheral circulation have prognostic importance in predicting adverse cardiovascular events (Schächinger et al., 2000; Halcox et al., 2002). In particular, a non-invasive endothelial function assessment, based on monitoring the brachial artery diameter with a two-dimensional ultrasound, before and after artery occlusion is considered a gold-standard method (Frolow et al., 2015). MRI has also successfully been used for non-invasive measurement of FMD in humans (Lee et al., 2007; Canton et al., 2012; Redheuil, 2014; Teixido-Tura et al., 2014), but studies of endothelial functional phenotype in mice in vivo are associated with greater technical challenges (Botnar and Makowski, 2012). Given high spatio-temporal resolution of MRI, it seems to be the method of choice to assess endothelium-dependent response in

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; ACE-I, angiotensinconverting enzyme inhibitor; Ach, acetylcholine; ACN, acetonitrile; ADMA, asymmetric dimethylarginine; Ang, angiotensin; ApoE/LDLR^{-/-}, atherosclerotic mice; Arg, arginine; BCA, brachiocephalic artery; CA, contrast agent; COX-2, cyclooxygenase 2; CS, calibration standards; DDAH, dimethylarginine dimethylaminohydrolase; ECS, endothelial cells; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FA, formic acid; Hcy, homocrysteine; HFD, high-fat diet; IL-4, interleukin-4; IS, internal standard; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Met, L-methionine; MNA, 1-methylnicotinamide; MRI, magnetic resonance imaging; MRM, multiple reaction monitoring mode; NA, nicotinamide; NFPA, nonafluoropentanoic acid; NNMT, nicotinamide N-methyltransferase; NO, nitric oxide; Npx50, number of pixels, for which T₁ had changed more than 50% after contrast agent administration; PGI₂, prostacyclin; QC, quality control samples; RAS, renin-angiotensin system; ROI, region of interest; ROS, reactive oxygen species; RS, real samples; SDMA, symmetric dimethylarginine; VFA, Variable Flip Angle technique; VSMCs, vascular smooth muscle cells, T₁, relaxation time; TNF-a, tumor necrosis factor-a.

mice. Indeed, MRI-based tests could provide an excellent tool to gain better insight into endothelium-dependent mechanisms in experimental studies in mice (Gotschv et al., 2013; Herold et al., 2009). Phinikaridou et al. (2012) were the first to describe an MRI-based method for the noninvasive assessment of endothelial-dependent vasodilatation and permeability in vivo in mice, with the use of an albumin-binding magnetic resonance CA. In our recent studies, we developed a 3D MRI-based assessment of endothelium-dependent vasodilatation induced by acetylcholine (Ach) and endothelial permeability fully based on the use of retrospectively self-gated 3D gradient-echo sequence (Bar et al., 2016). The developed approach has been validated in two distinct murine models of endothelial dysfunction, including atherosclerotic (ApoE/LDLR^{-/-} mice) and HFD-fed mice, showing that our approach allows for a reliable detection of the impairment of NO-dependent vasodilatation and changes in endothelial permeability.

Genetically modified mice without apolipoprotein E and receptor for low density lipoprotein (mouse apolipoprotein E-deficient and Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Double Knockout, ApoE/LDLR^{-/-}), constitute reliable mouse model of endothelial dysfunction linked to atherosclerosis. In this strain of mice, spontaneously atherosclerosis develops without administration of atherogenic diet (Kostogrys et al., 2012), and endothelial dysfunction precedes the atherosclerotic plaque development (Csányi et al., 2012), similarly as it occurs in humans. In turn, the early development of endothelial dysfunction in single ApoE^{-/-} mice was not univocally accepted (Crauwels et al., 2003; Villeneuve et al., 2003).

Given that the assessment of the endothelial phenotype *in vivo* in a reliable mouse model of endothelial dysfunction is essential for the preclinical profiling of vasoprotective compounds, the aim of the present study was to take advantage of the 3D MRI-based method to profile effects of MNA on functional phenotype of endothelium in ApoE/LDLR^{-/-} mice *in vivo*, in comparison to standard vasoprotective treatment such as ACE-I (perindopril), that is known to display significant vasoprotective effect in various experimental models including atherosclerosis (Chłopicki and Gryglewski, 2005). We also analyzed whether MNA- or perindopril-induced improvement in endothelial function is associated with biochemical changes in plasma in ACE/Ang-II-ACE2/Ang-(1–7) balance and L-Arg/ADMA ratio.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In this study, 4-month-old ApoE/LDLR^{-/-} mice (body weight of 20–30 g), bred in the Department of Human Nutrition, University of Agriculture (Krakow, Poland), were transported to the animal house at Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University (Krakow, Poland) and were treated for 1 or 2 months with MNA (syntethized by dr Jan Adamus, Technical University in Lodz, Poland: 100 mg/kg/day in diet) or perindopril (a gift from Servier, Warszawa Poland: 10 mg/kg/day in drinking water). Doses of

compounds used in this study were based on our previous published (Chlopicki et al., 2007; Mateuszuk et al., 2016) and unpublished studies, for MNA and perindopril, respectively. Two groups of 4-month-old ApoE/LDLR^{-/-} mice were left untreated (as control groups) for 1 and 2 months, respectively. The sizes and names of the experimental groups are reported in the legends of the corresponding graphs. All mice were bred in standard conditions (LD: 12/12, humidity: 60%, temperature: 23°C), and housed in pathogen-free conditions. Prior to the MRI experiment, the animals were transported to the animal house at the Institute of Nuclear Physics (Krakow, Poland) to assess endothelial phenotype in vivo. After in vivo measurements, mice were sacrificed in order to collect blood. The experimental design is illustrated in Supplementary Figure S1. All experiments were approved by the Ethics Local Committee of Jagiellonian University (Krakow, Poland) and were compliant with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Academy of Sciences (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

In Vivo Assessment of NO-dependent Endothelial Response to Ach and Endothelial Permeability by MRI

MRI experiments were performed using a 9.4T scanner (BioSpec 94/20 USR, Bruker, BioSpin GmbH, Germany), as described previously (Bar et al., 2016). Mice were anaesthetized using isoflurane (Aerrane, Baxter Sp. z o. o., Warszawa, Poland, 1.7 vol. %) in an oxygen and air (1:2) mixture. Body temperature was maintained at 37°C using circulating warm water. ECG, respiration and body temperature were monitored using a Model 1025 Monitoring and Gating System (SA Inc., Stony Brook, NY, USA). Mice were imaged in the supine position to test the vasomotor response of the vessel. 3D images of the aortic arch prior to and 25 min after intraperitoneal Ach administration (Sigma-Aldrich, Poznan Poland: 50 µl, 16.6 mg/kg) were acquired using the cine IntraGateTM FLASH 3D sequence and reconstructed with the IntraGate 1.2.b.2 macro (Bruker, BioSpin GmbH, Germany). T1 maps were measured before and 30 min after intravenous administration of albumin-binding gadolinium CA (Galbumin, BioPal, Worcester, MA, USA - 25 mg/ml, 4.5 ml/kg) using the VFA technique (Cheng and Wright, 2006; Wang et al., 2006), by sampling the signal, using varying values of flip angles and then fitting the result to an expected T1dependent signal model. Imaging parameters for endothelial function assessment included the following: repetition time (TR) – 6.4 ms, echo time (TE) – 1.4 ms, field of view (FOV) – 30 mm \times 30 mm \times 5 mm, matrix size – 256 \times 256 \times 30, flip angle (FA) - 30°, and number of accumulations (NA) -15, reconstructed to seven cardiac frames. Total scan time was 10 min. Imaging parameters for endothelial permeability assessment included the following: TR - 10 ms, TE - 1.1 ms, FOV – 30 mm \times 30 mm \times 4 mm, matrix size – 192 \times 160 \times 8, number of repetitions - 12, and reconstructed to one cardiac frame. Eight FA were used: 2°, 4°, 6°, 8°, 14°, 20°, 30°, 50°. FA values were set by changing the length of a radiofrequency pulse, with constant amplifier power. Total scan time for all angles was



16 min. The experimental design is illustrated in Supplementary Figure S1.

MRI Data Analysis

Time-resolved 3D images of the aortic arch (Figure 1A) were analyzed to endothelial function assessment in BCA, using ImageJ software 1.46r (NIH Bethesda, MD, USA) and scripts written in Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA). Images were reconstructed to seven cardiac frames and imported into ImageJ as a hyperstack (Figure 1B matrix: 256 × 256, slices: 30, frames: 7). Further analysis was performed in diastole of BCA, using small hyperstack (Figure 1B marked in red color matrix: 256 × 256, slices: 5, frames: 1) starting at the base of the vessel and ending just before the branch. Crosssectional areas of BCA at each slices were obtained using thresholding segmentation and exported to Matlab, where BCA volumes were reconstructed and calculated. Detailed analysis was described in Supplementary Material of our previous work (Bar et al., 2016). In order to endothelial permeability assessment, obtained images were used to calculate the T1 around the BCA lumen before and after CA administration. The signal model was fitted pixel by pixel using Matlab software developed in house. Two T1 maps (before and after CA administration) were compared, using scripts written in Matlab, and pixels for which T_1 had changed significantly (by more than 50%) after CA administration were marked in red (Figure 1C). The threshold value (50%) was determined experimentally. All red pixels were counted by program as number of pixels, for which T1 had changed more than 50% after CA administration (Npx50).

Measurement of Ang Profile in Plasma

The blood was drawn from the heart, collected in tubes containing heparin (20 units/ml) and immediately mixed with protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich, Poznan, Poland) in a ratio of 19:1 (v/v), and centrifuged at 1,000 \times g for

April 2017 | Volume 8 | Article 183

10 min to isolate plasma. Afterward, the resulting plasma was transferred into Protein LoBind tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany), split into aliquots and stored frozen at -80° C until analysis.

Protein precipitation with ACN was used as the sample pre-treatment method to remove high molecular plasma compounds. CS, QC samples, and RS were created by spiking 25 μ l (pooled blank – CS, QC) plasma with 20 μ l appropriate working standard solution or water (RS) and 5 μ l IS – [Asn¹, Val⁵]-Ang II (2,500 pg/ml). Calibration curve standards were made at: 10; 50; 100; 250; 300; 400; 500 pg/ml (IS – 250 pg/ml) concentrations, respectively. CS at seven different concentration levels or adequate QC and RS were deproteinized with ACN (in 4:1 (v/v) proportion to the samples used) and assayed.

The LC-MS/MS analyses of plasma samples were performed on an UltiMate 3000 Rapid Separation nano-LC system (Dionex, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) interfaced via a $\mathsf{ChipMate}^{\mathsf{TM}}$ nanoelectrospray ion source (Advion, USA) to a TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific). The samples were injected in 5 µl aliquots onto a trapping column for desalting and concentrating of the analytes which in the next step was switched in-line with the separation C18 column to elute the peptides at a flow rate of 300 nl/min with an increasing percentage of the organic solvent. Separation was accomplished using a gradient of phase A (acetic acid (1%, v/v) in H₂O) and phase B (acetic acid (1%, v/v) in ACN) as follows: 2% B for 5 min, 2-98% B for 15 min, and 98% B for 5 min. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode and the detection of Ang peptides in MRM mode was performed. The two most sensitive/specific ion transitions were measured for each of the 9 Ang peptides determined [Ang I, II, III, IV, (1-7), (1-9), Ang A, alamandine and Ang-(1-12)]. Analytical method details as well as the MS/MS transitions monitored in the protocol are described elsewhere (Olkowicz et al., 2016). Instrument control, data collection, and analysis were achieved with the Thermo Xcalibur (version 2.1) software.

Measurement of Flux Through L-Arg Metabolic Pathways

Plasma amino acid concentrations were determined using a Surveyor HPLC system (Thermo Scientific) coupled to a TSQ Vantage Triple-Stage Quadrupole mass spectrometer, as described recently (Smolenska et al., 2016). Briefly, an aliquot of plasma (50 μ l) was deproteinized with 100 μ l of ACN maintained in ice. The tubes were then centrifuged at 4°C, 16,000 \times g for 10 min and the resultant supernatant was collected and subjected to freeze-drying. The residue was next reconstituted with 50 μ l of H₂O acidified with 0.1% (v/v) FA and analyzed using an LC/MS system as detailed below.

Chromatographic separation was achieved using a Synergi Hydro-RP column (50 mm × 2.0 mm i.d., 2.5 µm) fitted with a security guard (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of a mixture of phase A (5 mM NFPA in water) and phase B (0.1% (v/v) FA in ACN), that was delivered at 0.2 ml/min in a gradient from 0 to 45% B in 5.5 min. The effluent of the HPLC column was directed to the electrospray Ion-Max source of the mass spectrometer that was operated in MRM mode. The settings of the ion source were as follows: needle voltage, +4.5 kV; sheath gas pressure, 30 (arbitrary units); auxiliary gas pressure, 3 (arbitrary units), and capillary temperature, 250°C. Additionally, to overcome the possible reduction of the signal intensity due to perfluorinated carboxylic acid use, we added 0.05% (v/v) FA in methanol at 0.2 ml/min as the post-column sheet flow. The LC/MS system, data acquisition and processing were managed by the Xcalibur software (v. 2.1, Thermo Scientific).

Statistical Analysis

All of the data obtained are presented as mean and standard error of the mean (SEM) or in case of the lack of normal distribution as median and range. Statistical tests were done using STATISTICA 10 (Stat Soft Inc., USA) or GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) software. Non-parametric test (Kruskal–Wallis test) or parametric test (one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test) were performed. Pearson or Spearman correlation coefficient tests were used to assess dependence between two parameters. Statistical significance was defined as p < 0.05.

RESULTS

Effects of MNA and Perindopril Treatment on Endothelium-dependent Vasomotor Response and Changes in Endothelial Permeability in ApoE/LDLR^{-/-} Mice *In Vivo*

In non-treated ApoE/LDLR^{-/-} mice, injection of Ach (16.6 mg/kg given i.p. in the volume of 50 $\mu l)$ resulted in vasoconstriction of BCA. Endothelium-dependent response of BCA after Ach administration amounted to -2.39 and -7.18% for 5-month-old and 6-month-old ApoE/LDLR-/mice, respectively. In mice treated with MNA or perindopril for a 1-month period (Figure 2A), endothelium-dependent response improved and an increase in volume of BCA after Ach injection was observed (by about 9 and 3%, respectively). Treatment of ApoE/LDLR^{-/-} mice for 2 months with MNA or perindopril further improved endothelium-dependent vasodilation as well as decreased endothelial permeability (Figure 2B). The number of pixels around BCA, for which T₁ had changed more than 50% after CA administration (Npx50) was smaller in mice treated with MNA and perindopril than in non-treated ApoE/LDLR^{-/-} mice (Npx50 was 6.0, 6.0, and 15.0, respectively, Figure 2B). Interestingly, there was a significant correlation between endothelium-dependent response of BCA and Npx50 (Table 1).



Bar et al.

TABLE 1 | Correlation between parameters of functional and biochemical endothelial profiling *in vivo*.

The pair of parameters	R Spearman	p
BCA volume changes and Npx50	-0,668739	0,000668
BCA volume changes and L-arginine/ADMA ratio	0,765473	0,000000
BCA volume changes and Ang-(1–7)/Ang II ratio	0,710365	0,000001
Npx50 and L-arginine/ADMA ratio	-0,770589	0,000070
Npx50 and Ang-(1–7)/Ang II ratio	-0,639038	0,002420

Effects of MNA and Perindopril Treatment on Plasma Ang Profile

The pattern of changes in plasma Ang profile of ApoE/LDLR^{-/-} mice treated for one month with MNA was largely convergent with those observed in plasma of mice treated with perindopril (as compared to non-treated animals), and involved an increase in concentration of Ang-(1-7) [by 36% (MNA), 95% (perindopril)], alamandine [by 18% (MNA), 47% (perindopril)], and Ang-(1-9) [by 72% (MNA), 173% (perindopril)] in comparison to untreated ApoE/LDLR^{-/-} mice (Figure 3A). At the same time, the level of Ang II and other pathological effectors of the RAS (Ang III, IV, A) significantly decreased. The most pronounced differences were observed in the content of Ang II and its N-terminally truncated metabolite - Ang III, the level of which nearly halved as compared to the control, untreated animals [from 119.8 \pm 11.3 to 85.5 \pm 5.4 (MNA) and to 50.2 \pm 4.1 (perindopril) fmol/ml for Ang II, from 206.2 \pm 15.5 to 130.4 \pm 10.0 (MNA), and to 96.2 \pm 8.7 (perindopril) fmol/ml for Ang III, respectively]. These changes were accompanied by a slight increase in the content of precursor peptides: Ang I [by 21% (MNA) and 34% (perindopril) versus non-treated mice] and Ang-(1-12) [by 18% (MNA) and 43% (perindopril) as compared to control animals]. Activation of counter-regulatory ACE2/Ang-(1-7)/Ang-(1-9) axis with concomitant inhibition of ACE/Ang II pathway was further highlighted after two months of treatment with MNA or perindopril whereby the beneficial effect of MNA treatment was even more similar to that exerted by perindopril (Figure 3B). Interestingly, there was a significant correlation between Ang-(1-7)/Ang II ratio and endothelium-dependent response of BCA or Npx50 (Table 1).

Effects of MNA and Perindopril Treatment on L-Arg/ADMA Ratio in Plasma

Endothelial function is critically dependent on eNOS activity and consequently adequate NO bioavailability. Treatment with both MNA and perindopril was associated with alterations in amino acid metabolism engaged in NO generation. Plasma concentration of L-Arg that serves as a substrate for the formation of NO by the NOS enzymes was elevated after just one month of treatment with both MNA (by 25%) and perindopril (21%) as compared to untreated ApoE/LDLR^{-/-} mice (Figure 4A). Furthermore, the plasma concentration of precursors of L-Arg (L-citrulline and L-ornithine) was increased in parallel. These changes were accompanied by a decrease in methylated Arg concentration. After 1 month of treatment, ADMA that is perceived as an endogenous inhibitor of all NOS enzymes (including eNOS) was diminished by 10% (MNA) and 17% (perindopril), respectively (in comparison to non-treated animals). Two months of pharmacotherapy led to a further decline in the plasma concentration of ADMA [by 15% (MNA) and by 20% (perindopril), respectively] (Figure 4B). Plasma concentration of SDMA, recognized as a competitive inhibitor of cellular L-Arg transport was also decreased after 1 and 2 months of treatment with MNA or perindopril, but these changes did not reach statistical significance. Moreover, reduced concentration of methylated Arg was associated with an increase in the content of Met and concomitant decrease in the level of Hcy. Consequently, plasma L-Arg/ADMA ratio reflecting NO bioavailability was clearly elevated after 1 month of treatment with both MNA (by 34%) and perindopril (by 46%), and this effect was further maintained after 2 months of treatment. Interestingly, there was a significant correlation between L-arginine/ADMA ratio and endothelium-dependent response of BCA or Npx50 (Table 1).

DISCUSSION

In the present work, we profiled endothelial activity of MNA in comparison with perindopril (ACE-I) using functional 3D MRI-based in vivo assays of endothelial function in parallel to biochemical measurements of ACE/Ang II-ACE2/Ang-(1-7) balance, and L-Arg/ADMA ratio in plasma. We demonstrated in vivo in ApoE/LDLR^{-/-} mice, that treatment with MNA or perindopril resulted in the reversal of Ach-induced vasoconstriction response to vasodilatation and a concomitant decrease in endothelial permeability. Functional improvement of endothelial function by MNA or perindopril treatment was in both cases associated with the inhibition of ACE/Ang II axis and parallel activation of ACE2/Ang-(1-7) axis as evidenced by a fall in plasma concentration of Ang II, and its N-terminally truncated metabolites (Ang III and IV) and an increase in Ang-(1-9) and Ang-(1-7) plasma concentration. Furthermore, MNA and perindopril treatment resulted in an increase in L-arginine/ADMA ratio compatible with improvement of NO-dependent endothelial function. Altogether, our results suggest that MNA displayed a similar pattern of vasoprotective activity as perindopril, a representative of ACE-Is, and both compounds affected ACE/Ang II-ACE2/Ang-(1-7) balance and L-Arg/ADMA ratio that could contribute to their vasoprotective effects. Given that correction of endothelial function by ACE-Is contributes significantly to their clinical benefits and their antiinflammatory, anti-thrombotic, anti-diabetic, and vasoprotective actions reported in numerous experimental and clinical papers (Chłopicki and Gryglewski, 2005), the findings of endothelial profile of MNA being similar to perindopril in in vivo settings bring important novel perspectives to understanding the therapeutic efficacy of MNA reported previously (Gebicki et al., 2003; Wozniacka et al., 2005; Chlopicki et al., 2007; Bartuś et al., 2008; Bryniarski et al., 2008; Brzozowski et al., 2008; Watała et al., 2009; Sternak et al., 2010; Przyborowski et al., 2015; Blazejczyk et al., 2016; Jakubowski et al., 2016; Mateuszuk et al., 2016).



In this study, endothelial function *in vivo* assessment was performed in BCA, in response to intraperitoneal administration of Ach. Importantly, endothelium-dependent response was independent of the effect of Ach on the heart and respiration (Bar et al., 2016). Undoubtedly, the important advantage of the use of MRI-based method is a retrospective reconstruction of images from 3D data sets, which allows for assessment of response of the entire vessel instead of only one fragment of the vessel. Moreover, the method provides the possibility of

accurate positioning after experiment, whereby the effects of endothelial pharmacotherapy can be assessed, even in small vessels such as BCA, across various cross-sections to be located in planes perpendicular to the vessel. The 3D gradient echo sequence allows the avoidance of precise slice positioning during measurements, as arbitrary re-slicing during post-processing is possible with shorter time of the measurements. Importantly, in the present work an MRI-based method to assess endothelial permeability changes was also employed. We assessed the



number of pixels (around the BCA) for which T1 had changed more than 50% (Npx50), as described previously (Bar et al., 2016). Npx50 parameter allows avoiding precise determination of ROI, what is difficult to establish objectively. Finding the pixels for which T1 had changed more than 50%, allows for operatorindependent assessment of the ROI around the vessel. Analysis of changes in endothelial permeability represents an important feature of endothelial dysfunction, and its measurements seem a valuable test to analyze endothelial state in vivo. When endothelial permeability increases, leaky intercellular junctions of endothelium allow access to low-density lipoprotein particles and transmigration of leukocytes that are critical in atherosclerotic plaque formation (Kao et al., 1995). Moreover, albumin-binding CA can also accumulate in vessel walls (Lobbes et al., 2009; Pedersen et al., 2011), and this results in shortening of the T₁ in the vessel wall enabling MRI-based detection, and Npx50-based operator-independent assessment of endothelial permeability (Bar et al., 2016). Importantly, in the present work, analysis of endothelial-dependent response by Ach as well as endothelial permeability based on Npx50 displayed significant negative correlation and gave concordant results showing improvement after MNA and perindopril treatment. Experiments carried out in this paper support the notion that MRI-based technique based on the retrospectively self-gated 3D IntraGate® FLASH sequence (Bar et al., 2016) is useful for monitoring the efficacy of endothelium-targeted therapy in murine models of diseases in vivo and seems far superior to ultrasound (Cavalcante et al., 2011).

In non-treated ApoE/LDLR^{-/-} mice, injection of Ach resulted in paradoxical vasoconstriction, what was most likely due to a smooth muscle muscarinic receptor-dependent response, as also shown for human arteries with endothelial dysfunction (Ludmer et al., 1986). Treatment with MNA or perindopril resulted in shifting the Ach response to a vasodilatation, which indicates improvement in endothelial function. Comparing results of changes in BCA volume after acetylcholine administration in 5-month-old C57BL/6J mice (9.3%) published in our previous paper (Bar et al., 2016), to ApoE/LDLR-/- mice after two-month treatment with MNA (4.5%) or perindopril (5.5%) performed in present study, it seems that either treatment considerably improved the impaired endothelium-dependent response. It is worth noting that, after one-month treatment effects of perindopril seemed to be more pronounced as compared with the effect of MNA, but this difference disappeared after two months of treatment. Improvement in endothelial permeability was also similar in magnitude for MNA and perindopril after two months of treatment, supporting the similar pattern of endothelial response to MNA given in a dose of 100 mg/kg b.w./day in comparison to perindopril given in a dose of 10 mg/kg b.w./day.

An important finding of the present study was the demonstration that improvement of endothelial function by MNA and perindopril treatment, evidenced by MRI-based assays, was in both cases associated with the inhibition of the classical RAS pathway – ACE/Ang II/AT₁R and concomitant activation of counter-regulatory RAS pathway – ACE/Ang-(1-7)/Mas. Numerous previous studies clearly indicate that the

RAS plays a critical role in the initiation and progression of atherosclerosis with endothelial dysfunction as its early event, and that the balance between two major axes of RAS, i.e., ACE/Ang II and ACE2/Ang-(1-7), is a key determinant of RAS beneficial vs. detrimental effects (Wang et al., 2013; Olkowicz et al., 2015; Cahill and Redmond, 2016). Ang II is considered as a pro-atherosclerotic mediator which causes vasoconstriction, regulates adhesion molecule (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin) expression as well as chemokine, cytokine, and growth factor secretion within the arterial wall (Jiang et al., 2014). On the other hand, ACE2, through its product Ang-(1-7) displays anti-atherosclerotic properties in vivo, including decreasing inflammation and oxidative stress, and inhibiting inflammatory cell infiltration. The protective effect of ACE2, mainly distributed in ECs, VSMCs, and macrophages, was repeatedly demonstrated. Overexpression of ACE2 by gene transfer attenuated the progression of atherosclerotic lesions when the ACE2 gene was transferred 4 weeks after injury in a rabbit model of atherosclerosis (Dong et al., 2008). Similarly, overexpression of ACE2 in ApoE-deficient mice decreased atherosclerotic lesion size within the aortic sinus as compared to control mice (Lovren et al., 2008). In contrast, ACE2-deficiency in $LDLR^{-/-}$ as well as ApoE^{-/-} genetic background mice increased the development of atherosclerosis (Thomas et al., 2010; Thatcher et al., 2011).

Our results not only confirmed that perindopril-induced a vasoprotective shift in the balance of ACE/Ang II and ACE2/Ang-(1-7), but also underscored that the profile of MNA is similar to that exerted by perindopril. Zhuo et al. (2002) have recently demonstrated that the clinical benefits of chronic ACE inhibition with perindopril, in addition to the blockade of systemic and tissue Ang II formation, may be in part due to elevated bradykinin levels, which in turn lead to increased NO bioavailability. Bradykinin was shown to be the major mediator of ACE-I-induced anti-thrombotic effects (Gryglewski et al., 2003, 2005; Chłopicki and Gryglewski, 2005). We did not study here the relative contribution of Ang II-dependent and bradykinin-dependent pathway to perindopril-induced improvement in NO-dependent function, but obviously it cannot be excluded that both pathways may be involved in perindopril-induced improvement in endothelial function. Whether the same mechanisms contribute to MNAinduced effects remains to be established. Interestingly, in our previous studies describing anti-atherosclerotic effects of MNA, an improvement in NO-dependent endothelial function, observed in ex vivo vascular preparations was also associated with activation of PGI2-dependent function (Mateuszuk et al., 2016). Altogether, the results presented here suggest that MNA- induced shift in the balance of ACE/Ang II and ACE2/Ang-(1-7) toward the vasoprotective axis may contribute to the improvement of endothelial function by MNA or alternatively may constitute an important pathophysiological sign of improved endothelial function.

We also demonstrated that MNA and perindopril treatment resulted in an increase in L-arginine/ADMA ratio that was compatible with improvement of NO-dependent endothelial function. Given the fact, that circulating level of ADMA adds independent prognostic information with regard to cardiovascular risk beyond that obtained from classical risk factors and novel biomarkers (Schnabel et al., 2005) this finding is of importance. In fact, plasma concentrations of ADMA have been found to be significantly elevated in patients with arteriosclerosis, as well as in those with coronary risk factors, such as hypertension or hypercholesterolemia, and marked increase in ADMA level has been associated with impaired endothelium-dependent NO-mediated vasodilatation (Böger et al., 1997, 1998; Surdacki et al., 1999; Böger, 2003) that may be linked to decreased activity of y+LAT as the major export pathway for the ADMA (Closs et al., 2012). Interestingly, Suda et al. (2004) have recently reported that the long-term vascular effects of ADMA are not solely mediated by inhibition of endothelial NO synthesis but also can lead to direct upregulation of ACE expression and increased oxidative stress through AT1 receptor activation. Moreover, they have proposed that inhibition of NO synthesis appears primarily as a result of short-term action of ADMA; as long as metabolites of ADMA accumulate at higher concentrations in blood vessels, eNOS-independent mechanisms predominate. Involvement of multiple mechanisms in vascular effects of ADMA, other than simple inhibition of endothelial NO synthesis, including also upregulation of ACE, remains to be clarified. In a recent work of Jiang et al. (2016) it was reported that MNA attenuated atherogenesis via modulation of the ADMA-DDAH pathway in ApoE-deficient mice. The beneficial effect of MNA treatment was associated with the upregulation of the DDAH2 enzyme activity in endothelium via the mitigation of hypermethylation in the promoter region of the enzyme. These results seem consistent with our observations showing the reduction in plasma ADMA concentration as well as Hcy concentration that was linked to an improved endothelium-dependent vascular relaxation after MNA. Interestingly, Huang et al. (2015) showed that Hcy synthesized in endothelium (after Met administration) affected activity of ACE by direct homocysteinylation of its amino- and/or sulfhydryl- moieties. This modification enhanced ACE reactivity toward Ang II and consequently led to NADPH oxidase-superoxide-dependent endothelial dysfunction. In that context, treatment with MNA and perindopril attenuates various apparently interlinked biochemical changes closely associated with functional phenotype of endothelial dysfunction such as excessive activation of ACE, elevation of ADMA and Hcy that can all contribute to vasoprotective action of these compounds resulting in the improvement of endothelial function reported here in vivo using functional and biochemical measurements.

Indeed, there was a significant positive correlation between endothelium-dependent response of BCA after acetylcholine administration and the two major biochemical parameters measured here [L-arginine/ADMA ratio and Ang-(1–7)/Ang II]. In turn, since the improvement of endothelial dysfunction was associated with a decrease in endothelial permeability, correlation between Npx50 and biochemical parameters [L-arginine/ADMA ratio and Ang-(1–7)/Ang II] had negative character. Similar correlations between ADMA concentration and Ach- or flowinduced vasodilatation have also been demonstrated previously in monkeys with hypercholesterolemia, using endotheliumdependent vascular function *ex vivo* assessment (Böger et al., 2000) as well as in humans with hypercholesterolemia using ultrasonography ($\rm B\ddot{o}ger$ et al., 1998).

Effects of treatment with MNA and perindopril on atherosclerotic plaque burden were not assessed in this study, but it was reported previously that perindopril treatment inhibited the development of atherosclerotic lesions in diabetic ApoEdeficient mice (Candido et al., 2002), while anti-atherosclerotic effect of MNA was described in apolipoprotein E (ApoE)/lowdensity lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice (Mateuszuk et al., 2016). Given the pathophysiological role of endothelial dysfunction in atherogenesis, effects of MNA or perindopril on endothelial function could contribute to the anti-atherosclerotic action of these compounds.

CONCLUSION

Using functional 3D MRI-based assays of endothelial function and biochemical measurements of ACE/Ang II, ACE2/Ang-(1-7) balance and L-Arg/ADMA ratio in plasma, we demonstrated significant vasoprotective effects of MNA (100 mg/kg b.w./day), which were comparable with that afforded by perindopril (10 mg/kg b.w./day), a well-known ACE inhibitor. Although effects of MNA were less pronounced as compared with perindopril after 1-month treatment, after 2-month treatment, either treatment modality resulted in a comparable effect including reversal of Ach-induced vasoconstriction response to vasodilatation and a concomitant decrease in endothelial permeability. Furthermore, functional improvement of endothelial function by MNA or perindopril treatment was in both cases associated with the inhibition of ACE/Ang II axis, the parallel activation of ACE2/Ang-(1-7) axis, and an increase in L-Arg/ADMA ratio in plasma. Given that improvement in endothelial function by ACE-Is contributes to their therapeutic efficacy (Chłopicki and Gryglewski, 2005), presented in the current study findings of endothelial profile of MNA being similar to ACE-I (perindopril) in in vivo settings bring important novel perspectives to understand therapeutic efficacy of MNA (Gebicki et al., 2003; Wozniacka et al., 2005; Chlopicki et al., 2007; Bartuś et al., 2008; Bryniarski et al., 2008; Brzozowski et al., 2008: Watała et al., 2009: Sternak et al., 2010: Przyborowski et al., 2015; Blazejczyk et al., 2016; Jakubowski et al., 2016; Mateuszuk et al., 2016). Moreover, our approach for the in vivo assessment of endothelial phenotype based on a retrospectively self-gated 3D gradient-echo sequence, MRI-based technique, concomitant with the biochemical assays of two important systems of endothelial regulation, ACE/Ang-II-ACE2/Ang-(1-7) and L-Arg/ADMA, proves to be a useful tool for the in vivo endothelial profiling of compounds to demonstrate convincingly their beneficial effects on endothelial function.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the study: AB and SC. Performed the study: AB, MO, UT, EK, and KJ. Analyzed the data: AB and MO. Provided the analytical tools: RS, TS. Drafted the manuscript: AB,

Bar et al.

MO, and SC. All authors have corrected or have approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Science Centre, grant Symfonia no. DEC-2015/16/W/NZ4/00070 and partially by the European Union from the resources of the European Regional Development Fund under the Innovative Economy Programme

REFERENCES

- Aksoy, S., Szumlanski, C. L., and Weinshilboum, R. M. (1994). Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. J. Biol. Chem. 269, 14835–14840.
- Anderson, T. J., Gerhard, M. D., Meredith, I. T., Charbonneau, F., Delagrange, D., Creager, M. A., et al. (1995). Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 75, 71B–74B. doi: 10.1016/0002-9149(95) 80017-M
- Bar, A., Skorka, T., Jasinski, K., Sternak, M., Bartel, Ż., Tyrankiewicz, U., et al. (2016). Retrospectively-gated MRI for in vivo assessment of endotheliumdependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. NMR Biomed. 29, 1088–1097. doi: 10.1002/nbm. 3567
- Bartuś, M., Łomnicka, M., Kostogrys, R., Kaźmierczak, P., Watała, C., Słominska, E. M., et al. (2008). 1-methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharm. Rep.* 60, 127–138.
- Blazejczyk, A., Switalska, M., Chlopicki, S., Marcinek, A., Gebicki, J., Nowak, M., et al. (2016). 1-Methylnicotinamide and its structural analog 1,4-dimethylpyridine for the prevention of cancer metastasis. J. Exp. Clin. Cancer Res. 35:110. doi: 10.1186/s13046-016-0389-9
- Böger, R. H. (2003). The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Res.* 59, 824–833. doi: 10.1016/S0008-6363(03)00500-5
- Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Sydow, K., Heistad, D. D., and Lentz, S. R. (2000). Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1557–1564. doi: 10.1161/01.ATV.20.6.1557
- Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Szuba, A., Tsao, P. S., Chan, J. R., Tangphao, O., et al. (1998). Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role hypercholesterolemia. *Circulation* 98, 1842–1847. doi: 10.1161/01.CIR.98.18.1842
- Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Thiele, W., Junker, W., Alexander, K., and Frölich, J. C. (1997). Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95, 2068–2074. doi: 10.1161/01.CIR.95.8.2068
- Botnar, R. M., and Makowski, M. R. (2012). Cardiovascular magnetic resonance imaging in small animals. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 105, 227–261. doi: 10.1016/B978-0-12-394596-9.00008-1
- Bryniarski, K., Biedron, R., Jakubowski, A., Chlopicki, S., and Marcinkiewicz, J. (2008). Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin. *Eur. J. Pharmacol.* 578, 332–338. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.09.011
- Brzozowski, T., Konturek, P. S., Chlopicki, S., Sliwowski, Z., Pawlik, M., Ptak-Belowska, A., et al. (2008). Therapeutic potential of 1-methylnicotinamide against acute gastric lesions induced by stress: role of endogenous prostacyclin and sensory nerves. J. Pharmacol. Exp. Ther. 326, 105–116. doi: 10.1124/jpet. 108.136457
- Cahill, P. A., and Redmond, E. M. (2016). Vascular endothelium gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis 248, 97–109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016. 03.007

(grant coordinated by JCET-UJ, No POIG. 01.01.02-00-069/09). We would like to thank Renata Kostogrys for support and assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar. 2017.00183/full#supplementary-material

- Candido, R., Jandeleit-Dahm, K. A., Cao, Z., Nesteroff, S. P., Burns, W. C., Twigg, S. M., et al. (2002). Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensinconverting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106, 246–253. doi: 10.1161/01.CIR.0000021122.63813.32
- Canton, G., Hippe, D. S., Sun, J., Underhill, H. R., Kerwin, W. S., Tang, D., et al. (2012). Characterization of distensibility, plaque burden, and composition of the atherosclerotic carotid artery using magnetic resonance imaging. *Med. Phys.* 39, 6247–6253. doi: 10.1118/1.4754302
- Cavalcante, J. L., Lima, J. A., Redheuil, A., and Al-Mallah, M. H. (2011). Aortic stiffness: current understanding and future directions. J. Am. Coll. Cardiol. 57, 1511–1522. doi: 10.1016/j.jacc.2010.12.017
- Cheng, H. L., and Wright, G. A. (2006). Rapid high-rsolution T1 mapping by variable flip angles: accurate and precise measurements in the presence of radiofrequency field inhomogeneity. *Magn. Reson. Med.* 55, 566–574. doi: 10.1002/mrm.20791
- Chłopicki, S., and Gryglewski, R. J. (2005). Angiotensin converting enzyme (ACE) and Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors in the forefront of pharmacology of endothelium. *Pharm. Rep.* 57(Suppl.), 86–96.
- Chlopicki, S., Swies, J., Mogielnicki, A., Buczko, W., Bartus, M., Lomnicka, M., et al. (2007). 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. Br. J. Pharmacol. 152, 230–239. doi: 10.1038/sj.bjp.0707383
- Closs, E. I., Ostad, M. A., Simon, A., Warnholtz, A., Jabs, A., Habermeier, A., et al. (2012). Impairment of the extrusion transporter for asymmetric dimethyl-I-arginine: a novel mechanism underlying vasospastic angina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 218–223. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.044
- Crauwels, H. M., Van Hove, C. E., Holvoet, P., Herman, A. G., and Bult, H. (2003). Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc. Res.* 59, 189–199. doi: 10.1016/S0008-6363(03)00353-5
- Csányi, G., Gajda, M., Franczyk-Zarow, M., Kostogrys, R., Gwoźdź, P., Mateuszuk, L., et al. (2012). Functional alterations in endothelial NO, PGI2 and EDHF pathways in aorta in ApoE/LDLR-/- mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 98, 107–115. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2012.02.002
- Dharmashankar, K., and Widlansky, M. E. (2010). Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Curr. Hypertens. Rep.* 12, 448–455. doi: 10.1007/s11906-010-0150-2
- Dong, B., Zhang, C., Feng, J. B., Zhao, Y. X., Li, S. Y., Yang, Y. P., et al. (2008). Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28, 1270–1276. doi: 10.1161/ ATVBAHA.108.164715
- Franses, J. W., Drosu, N. C., Gibson, W. J., Chitalia, V. C., and Edelman, E. R. (2013). Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *Int. J. Cancer* 133, 1334–1344. doi: 10.1002/ijc.28146
- Frolow, M., Drozdz, A., Kowalewska, A., Nizankowski, R., and Chlopicki, S. (2015). Comprehensive assessment of vascular health in patients; towards endothelium-guided therapy. *Pharm. Rep.* 67, 786–792. doi: 10.1016/j.pharep. 2015.05.010
- Gebicki, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Adamus, J., Woźniacka, A., Rybak, M., and Zielonka, J. (2003). 1-methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin. *Pol. J. Pharm.* 55, 109–112.
- Gotschy, A., Bauer, E., Schrodt, C., Lykowsky, G., Ye, Y. X., Rommel, E., et al. (2013). Local arterial stiffening assessed by MRI precedes atherosclerotic plaque formation. *Circulation* 6, 916–923. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.113.000611
- Gryglewski, R. J., Chlopicki, S., and Swies, J. (2005). In vivo endothelial interaction between ACE and COX inhibitors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 72, 129–131. doi: 10.1016/j.plefa.2004.10.010
- Gryglewski, R. J., Swies, J., Uracz, W., Chłopicki, S., and Marcinkiewicz, E. (2003). Mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor induced thrombolysis in wistar rats. *Thromb. Res.* 110, 323–329. doi: 10.1016/j.thromres.2003.08.005
- Halcox, J. P., Schenke, W. H., Zalos, G., Mincemoyer, R., Prasad, A., Waclawiw, M. A., et al. (2002). Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 106, 653–658. doi: 10.1161/01.CIR.0000025404. 78001.D8
- Herold, V., Wellen, J., Ziener, C. H., Weber, T., Hiller, K. H., Nordbeck, P., et al. (2009). In vivo comparison of atherosclerotic plaque progression with vessel wall strain and blood flow velocity in apoE(-/-) mice with MR microscopy at 17.6 T. MAGMA 22, 159–166. doi: 10.1007/s10334-008-0160-0
- Huang, A., Pinto, J. T., Froogh, G., Kandhi, S., Qin, J., Wolin, M. S., et al. (2015). Role of homocysteinylation of ACE in endothelial dysfunction of arteries. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 308, H92–H100. doi: 10.1152/ajpheart.00577.2014
- Jakubowski, A., Sternak, M., Jablonski, K., Ciszek-Lenda, M., Marcinkiewicz, J., and Chlopicki, S. (2016). 1-methylnicotinamide protects against liver injury induced by concanavalin A via a prostacyclin-dependent mechanism: a possible involvement of IL-4 and TNF-α. Int. Immunopharmacol. 31, 98–104. doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.032
- Jiang, F., Yang, J., Zhang, Y., Dong, M., Wang, S., Zhang, Q., et al. (2014). Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1–7: novel therapeutic targets. Nat. Rev. Cardiol. 11, 413–426. doi: 10.1038/nrcardio.2014.59
- Jiang, N., Wang, M., Song, J., Liu, Y., Chen, H., Mu, D., et al. (2016). N-methylnicotinamide protects against endothelial dysfunction and attenuates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 1625–1636. doi: 10.1002/mnfr.201400013.This
- Kao, C. H., Chen, J. K., Kuo, J. S., and Yang, V. C. (1995). Visualization of the transport pathways of low density lipoproteins across the endothelial cells in the branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis* 116, 27–41. doi: 10.1016/ 0021-9150(95)05519-3
- Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., Munzel, T., and Daiber, A. (2014). eNOS uncoupling in cardiovascular diseases-the role of oxidative stress and inflammation. *Curr. Pharm. Des.* 20, 3579–3594. doi: 10.2174/13816128113196660748
- Kostogrys, R. B., Franczyk-Żarów, M., Maślak, E., Gajda, M., Mateuszuk, L., Jackson, C. L., et al. (2012). Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR(-/-)). Atherosclerosis 223, 327–331. doi: 10.1016/ i.atherosclerosis.2012.05.024
- Lee, J. M., Shirodaria, C., Jackson, C. E., Robson, M. D., Antoniades, C., Francis, J. M., et al. (2007). Multi-modal magnetic resonance imaging quantifies atherosclerosis and vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 4, 44–48. doi: 10.3132/dvdr.2007.005
- Lobbes, M. B., Miserus, R. J., Heeneman, S., Passos, V. L., Mutsaers, P. H., Debernardi, N., et al. (2009). Atherosclerosis: contrast- enhanced mr imaging of vessel wall in rabbit model — comparison of gadofosveset and gadopentetate dimeglumine. *Radiology* 250, 682–691. doi: 10.1148/radiol.250 3080875
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Teoh, H., Wang, G., Shukla, P. C., et al. (2008). Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 295, H1377-H1384. doi: 10.1152/ajpheart.00331.2008
- Ludmer, P. L., Selwyn, A. P., Shook, T. L., Wayne, R. R., Mudge, G. H., Alexander, R. W., et al. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. N. Engl. J. Med. 315, 1046–1051. doi: 10.1056/ NEJM198610233151702
- Marti, C. N., Gheorghiade, M., Kalogeropoulos, A. P., Georgiopoulou, V. V., Quyyumi, A. A., and Butler, J. (2012). Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. J. Am. Coll. Cardiol. 60, 1455–1469. doi: 10.1016/j.jacc.2011. 11.082
- Mateuszuk, L., Jasztal, A., Maslak, E., Gasior-Glogowska, M., Baranska, M., Sitek, B., et al. (2016). Antiatherosclerotic effects of 1-methylnicotinamide in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice: a comparison with nicotinic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 356, 514–524. doi: 10.1124/jpet.115.228643

- Olkowicz, M., Chlopicki, S., and Smolenski, R. T. (2015). Perspectives for angiotensin profiling with liquid chromatography/mass spectrometry to evaluate ACE/ACE2 balance in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacol. Rep.* 67, 778–785. doi: 10.1016/j.pharep.2015. 03.017
- Ołkowicz, M., Chlopicki, S., and Smolenski, R. T. (2016). A primer to angiotensin peptide isolation, stability, and analysis by nano-liquid chromatography with mass detection, in Thatcher SE. *Methods Mol. Biol.* (in press).
- Pedersen, S. F., Thrysoe, S. A., Paaske, W. P., Thim, T., Falk, E., Ringgaard, S., et al. (2011). CMR assessment of endothelial damage and angiogenesis in porcine coronary arteries using gadofosveset. *J. Cardiovasc. Magn. Reson*.13:10. doi: 10.1186/1532-429X-13-10
- Phinikaridou, A., Andia, M. E., Protti, A., Indermuehle, A., Shah, A., Smith, A., et al. (2012). Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *Circulation* 126, 707–719. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112. 092098
- Przyborowski, K., Wojewoda, M., Sitek, B., Zakrzewska, A., Kij, A., Wandzel, K., et al. (2015). Effects of 1-methylnicotinamide (MNA) on exercise capacity and endothelial response in diabetic mice. *PLoS ONE* 10:e0130908. doi: 10.1371/ journal.pone.0130908
- Redheuil, A. (2014). Cardiovascular aging: insights from local and regional measures of aortic stiffness using magnetic resonance imaging. *Artery Res.* 8, 66–72. doi: 10.1016/j.artres.2014.01.005
- Schächinger, V., Britten, M. B., and Zeiher, A. M. (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101, 1899–1906. doi: 10.1161/01.CIR.101.16.1899
- Schnabel, R., Blankenberg, S., Lubos, E., Lackner, K. J., Rupprecht, H. J., Espinola-Klein, C., et al. (2005). Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the atherogene study. *Circ. Res.* 97, e53–e59. doi: 10.1161/01.RES. 0000181286.44222.61
- Schulz, E., Wenzel, P., Münzel, T., and Daiber, A. (2014). Mitochondrial redox signaling: interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 308–324. doi: 10.1089/ ars.2012.4609
- Smolenska, Z., Smolenski, R. T., and Zdrojewski, Z. (2016). Plasma concentrations of amino acid and nicotinamide metabolites in rheumatoid arthritis – potential biomarkers of disease activity and drug treatment. *Biomarkers* 21, 218–224. doi: 10.3109/1354750X.2015.1130746
- Sternak, M., Khomich, T. I., Jakubowski, A., Szafarz, M., Szczepañski, W., Białas, M., et al. (2010). Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) and 1methylnicotinamide (MNA) in experimental hepatiitis induced by concanavalin A in the mouse. *Pharmacol. Rep.* 62, 483–493. doi: 10.1016/S1734-1140(10) 70304-2
- Steven, S., Münzel, T., and Daiber, A. (2015). Exploiting the pleiotropic antioxidant effects of established drugs in cardiovascular disease. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 18185–18223. doi: 10.3390/ijms160818185
- Suda, O., Tsutsui, M., Morishita, T., Tasaki, H., Ueno, S., Nakata, S., et al. (2004). Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 1682–1688. doi: 10.1161/ 01.ATV.0000136656.26019.6e
- Surdacki, A., Nowicki, M., Sandmann, J., Tsikas, D., Boeger, R. H., Bode-Boeger, S. M., et al. (1999). Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. J. Cardiovasc. Pharmacol. 33, 652–658. doi: 10.1097/00005344-199904000-00020
- Teixido-Tura, G., Redheuil, A., Rodríguez-Palomares, J., Gutiérrez, L., Sánchez, V., and Forteza, A., et al. (2014). "Aortic biomechanics by magnetic resonance: early markers of aortic disease in marfan syndrome regardless of aortic dilatation?" *Int. J. Cardiol.* 171, 56–61. doi: 10.1016/j.ijcard.2013. 11.044
- Thatcher, S. E., Zhang, X., Howatt, D. A., Lu, H., Gurley, S. B., Daugherty, A., et al. (2011). Angiotensin-converting enzyme 2 deficiency in whole body or

bone marrow-derived cells increases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-/- mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31, 758–765. doi: 10.1161/ ATVBAHA.110.221614

- Thomas, M. C., Pickering, R. J., Tsorotes, D., Koitka, A., Sheehy, K., Bernardi, S., et al. (2010). Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. *Circ. Res.* 107, 888–897. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219279
- Villeneuve, N., Fortuno, A., Sauvage, M., Fournier, N., Breugnot, C., Jacquemin, C., et al. (2003). Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. J. Vasc. Res. 40, 87–96. doi: 10.1159/000070705
- Walczak, M., Suraj, J., Kus, K., Kij, A., Zakrzewska, A., and Chlopicki, S. (2015). Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endotheliumguided pharmacotherapy. *Pharmacol. Rep.* 67, 771–777. doi: 10.1016/j.pharep. 2015.06.008
- Wang, J., Qiu, M., Kim, H., and Constable, R. T. (2006). T1 measurements incorporating flip angle calibration and correction in vivo. J. Magn. Reson. 182, 283–292. doi: 10.1016/j.jmr.2006.07.005
- Wang, Y., Tikellis, C., Thomas, M. C., and Golledge, J. (2013). Angiotensin converting enzyme 2 and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 226, 3–8. doi: 10.1016/ j.atherosclerosis.2012.08.018
- Watała, C., Kaźmierczak, P., Dobaczewski, M., Przygodzki, T., Bartuś, M., Łomnicka, M., et al. (2009). Anti-diabetic effects of 1-methylnicotinamide (MNA) in streptozocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol. Rep.* 61, 86–98. doi: 10.1016/S1734-1140(09)70010-6

- Wozniacka, A., Wieczorkowska, M., Gebicki, J., and Sysa-Jedrzejowska, A. (2005). Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot tudy. *Clin. Exp. Dermeted* 30, 632–635. doi:10.1111/j.1365.2230.2005.01908 x
- study. Clin. Exp. Dermatol. 30, 632–635. doi: 10.1111/j.1365-2230.2005.01908.x Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature 469, 221–225. doi: 10.1038/ nature09663
- Zhuo, J. L., Mendelsohn, F. A., and Ohishi, M. (2002). Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension* 39 (2 Pt 2), 634–638. doi: 10.1161/hy0202.103417

Conflict of Interest Statement: SC is a coinventor of the patent on the use of quaternary pyridinium salts as vasoprotective agents.

The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Bar, Olkowicz, Tyrankiewicz, Kus, Jasinski, Smolenski, Skorka and Chlopicki. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





The Deletion of Endothelial Sodium Channel α (αENaC) Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation and Endothelial Barrier Integrity in Endotoxemia *in Vivo*

Magdalena Sternak¹, Anna Bar^{1,2}, Mateusz G. Adamski¹, Tasnim Mohaissen^{1,3}, Brygida Marczyk¹, Anna Kieronska^{1,2}, Marta Stojak¹, Kamil Kus¹, Antoine Tarjus⁴, Frederic Jaisser^{4,5} and Stefan Chlopicki^{1,2*}

¹ Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Jagiellonian University, Kraków, Poland, ² Chair of Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland, ³ Chair and Department of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland, ⁴ INSERM UMRS1138, Centre de Recherche des Cordellers, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, ⁵ INSERM, Clinical Investigation Centre 1433, Vandœuvre-lès-Nancy, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Frederic Becq, University of Poitiers, France

Reviewed by:

Madeline Nieves-Cintron, University of California, Davis, United States Heike Wulff, University of California, Davis, United States

*Correspondence:

Stefan Chlopicki stefan.chlopicki@jcet.eu

Specialty section:

This article was submitted to Pharmacology of Ion Channels and Channelopathies, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

Received: 07 December 2017 Accepted: 16 February 2018 Published: 10 April 2018

Citation:

Sternak M, Bar A, Adamski MG, Mohaissen T, Marczyk B, Kieronska A, Stojak M, Kus K, Tarjus A, Jaisser F and Chlopicki S (2018) The Deletion of Endothelial Sodium Channel α (αENaC) Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation and Endothelial Barrier Integrity in Endotoxemia in Vivo. Front. Pharmacol. 9:178. doi: 10.3389/fphar.2018.00178 The role of epithelial sodium channel (ENaC) activity in the regulation of endothelial function is not clear. Here, we analyze the role of ENaC in the regulation of endotheliumdependent vasodilation and endothelial permeability in vivo in mice with conditional αENaC subunit gene inactivation in the endothelium (endo-αENaC^{KO} mice) using unique MRI-based analysis of acetylcholine-, flow-mediated dilation and vascular permeability. Mice were challenged or not with lipopolysaccharide (LPS, from Salmonella typhosa, 10 mg/kg, i.p.). In addition, changes in vascular permeability in ex vivo organs were analyzed by Evans Blue assay, while changes in vascular permeability in perfused mesenteric artery were determined by a FITC-dextran-based assay. In basal conditions, Ach-induced response was completely lost, flow-induced vasodilation was inhibited approximately by half but endothelial permeability was not changed in endo- α ENaC^{KO} vs. control mice. In LPS-treated mice, both Ach- and flow-induced vasodilation was more severely impaired in $endo-\alpha ENaC^{KO}$ vs. control mice. There was also a dramatic increase in permeability in lungs, brain and isolated vessels as evidenced by in vivo and ex vivo analysis in endotoxemic endo-aENaCKO vs. control mice. The impaired endothelial function in endotoxemia in endo- α ENaC^{KO} was associated with a decrease of lectin and CD31 endothelial staining in the lung as compared with control mice. In conclusion, the activity of endothelial ENaC in vivo contributes to endothelial-dependent vasodilation in the physiological conditions and the preservation of endothelial barrier integrity in endotoxemia.

Keywords: «ENaC, endothelium, LPS, endothelial-induced vasodilation, endothelial barrier integrity

Abbreviations: α ENaC, endothelial sodium channel α ; Ach, acetylcholine; BCA, brachiocephalic artery; EB, Evans Blue; FA, femoral artery; FMD, flow-mediated dilatation; LCA, left carotid artery; LOX-1 receptor, lectin-like α -LDL receptor-1; LPS, lipopolysaccharide; NADPH oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; NCX, Na⁺/Ca²⁺ exchanger; OX-LDL, oxidized low-density lipoprotein; PLY, pneumolysin; TA, thoracic aorta; TCA, trichloroacetic acid.

INTRODUCTION

The epithelial sodium channel (ENaC), composed of three subunits (aENaC, BENaC, and yENaC), is a member of the ENaC/degenerin superfamily of cation-selective ion channels (Canessa et al., 1994; Kosari et al., 1998; Alvarez De La Rosa et al., 2000; Warnock et al., 2014). ENaC is present in the renal epithelium, where it plays an important role in the regulation of renal sodium homeostasis. The expression of ENaC has also been described in the vascular smooth muscle and endothelium, pointing to its possible role in the regulation of vascular function. Indeed, expression of ENaC was reported in cultured human endothelial cells, such as HMEC (Pérez et al., 2009; Wang et al., 2009; Guo et al., 2016), the ECV 304 cell line (Golestaneh et al., 2001) and HUVEC (Kusche-Vihrog et al., 2008) as well as in the endothelium of intact vessels (Pérez et al., 2009; Liu et al., 2015). All three subunits of ENaC are present in endothelium (Pérez et al., 2009), and the aENaC was shown to be involved in the regulation of endothelial cortical stiffness (Jeggle et al., 2013).

In the last decade, a number of reports have described the functional role of endothelial aENaC not only in the control of endothelial nanomechanics, but also vascular resistance and development of endothelial dysfunction. Jeggle et al. (2013) claimed a direct correlation between ENaC surface expression and the formation of cortical stiffness in endothelial cells. The absence of aENaC in endothelial cells led to lower cortical stiffness, while increased aENaC expression induced elevated cortical stiffness. Furthermore, in a mouse model of Liddle syndrome, an inherited form of hypertension caused by gain-of-function mutations in the epithelial Na(+) channel (ENaC), enhanced ENaC expression and increased cortical stiffness were observed in vascular endothelial cells in situ, suggesting that ENaC in the vascular endothelium determines endothelial mechanics and vascular function.

The ENaC expression in endothelium is regulated by aldosterone, as in the renal collecting duct cells (Kusche-Vihrog et al., 2010). The aENaC subunit is involved in aldosterone-modulated endothelial stiffness (Jeggle et al., 2013). Aldosterone also increased the amount of ENaC, while blocking the ENaC or aldosterone by amiloride and spironolactone, respectively, led to the disappearance of ENaC channel expression from the cell surface and intracellular pools, reducing cellular content of ENaC protein (Kusche-Vihrog et al., 2008). It was postulated that the inhibition of ENaC channels increased NO production and flow-mediated vasodilation and contributed to improved nanomechanical properties of endothelium (Kusche-Vihrog et al., 2010). In turn, aldosterone may promote endothelial dysfunction by modulating ENaC expression and activity (Pérez et al., 2009). Aldosterone-dependent activation of ENaC in endothelial cells was proposed to be responsible for high salt-induced loss of vasorelaxation in Dahl salt-sensitive (SS) rats (Wang et al., 2017). Not only aldosterone, but also Ox-LDL (oxidized low-density lipoprotein) has been found to stimulate ENaC activity in endothelial cells. This mechanism involves LOX-1 receptor (lectin-like ox-LDL receptor-1)-mediated activation of NADPH oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) and the inhibition of ENAC protects the endothelium from ox-LDL-induced dysfunction (Liang et al., 2017). Interestingly, ENaCs are sensitive to stretch pressure and shear stress and responded to shear stress by increasing the Na (+) influx that could also contribute to endothelium dysfunction (Guo et al., 2016). On the other hand, the work of Liu et al. (2015) showed that reduced ENaC activity was associated with augmented endothelium-dependent relaxation in mesenteric artery in Sprague-Dawley rats challenged with high-salt.

In Na⁺-transporting epithelia, the α subunit of the ENaC is crucial for promoting Na⁺ reabsorption. In a recent study, the endothelial cell barrier protective effect of ENaC- α was demonstrated in pulmonary microvasculature (Czikora et al., 2017). TNF-derived TIP peptide, directly binding to ENaC- α increased both expression and open probability of ENaC in the presence of pore-forming toxin, PLY, which is a major virulence factor and a cause of acute lung injury in *Streptococcus pneumoniae* infection.

Altogether, the activity of ENaC was suggested to contribute to endothelial stiffness, impaired NO production and aldosteroneinduced endothelial dysfunction in the endothelium of conduit vessels, but also in the regulation of the integrity of the capillary barrier in the microvascular endothelium. Some discrepancies about the role of ENaC in the regulation of endothelial function may have been related to the heterogeneity of endothelium in macro and microvasculature (Pérez et al., 2009; Jeggle et al., 2013; Guo et al., 2016; Czikora et al., 2017). However, it is important to emphasize that, to our knowledge, none of previous experimental studies analyzing the role of ENaC in the regulation of endothelial function were performed with in vivo measurements, but only in ex vivo vascular preparations or in vitro experiments in cultured endothelial cells. Furthermore, pharmacological tools (such as amiloride or benzamil) were often used to inhibit ENaC, and these drugs may be non-specific for ENaC, particularly at high concentrations (Jia et al., 2016). Genetic deletion of ENaC was used only in some reports (Jeggle et al., 2013; Czikora et al., 2017) and only recently, endo- α ENaC^{KO} mice have been generated (Tarjus et al., 2017).

In the present study, we analyzed the role of endothelial $\alpha ENaC$ in the regulation of endothelial-dependent vasodilation and vascular permeability in an *in vivo* setting using a unique MRI-based analysis of endothelial function *in vivo* (Bar et al., 2016). Ach-, flow-induced dilation and vascular permeability were assessed in a murine model with targeted inactivation of $\alpha ENaC$ in the endothelium (endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice) (Tarjus et al., 2017) and control littermates that were challenged or not with LPS (from Salmonella enterica serotype abortus equi, 10 mg/kg, i.p.). In addition, changes in vascular permeability were analyzed by EB assay *ex vivo*, while changes in vascular permeability were determined by a FITC-dextranbased assay in isolated, cannulated, and perfused mesenteric artery.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Protocol

Endo- α ENaC^{KO} mice and their control littermates were generated at the Cordelier Research Centre in Paris, France as recently described (Tarjus et al., 2017). α ENaC knockout mice were obtained crossing α ENaCf/f floxed mice, kindly provided by Bernard Rossier in Lausanne (Switzerland) with transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of Tie2 promoter on a C57Bl/6 genetic background (The Jackson Laboratory, United States). α ENaCf/f littermates lacking the Tie2-Cre transgene were used as controls.

Endo- α ENaC^{KO} and control mice were kept under controlled conditions (22–24°C, 55% humidity, 12 h day/night rhythm with free access to food and water until the day of experiment). The animal procedures described in the present study were approved by the local Jagiellonian University Ethical Committee on Animal Experiments, in accordance with the Guidelines for Animal Care and Treatment of the European Community.

To induce endotoxemia, LPS (from *Salmonella typhosa*, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, United States) was injected intraperitoneally (10 mg/kg).

The endothelial function, permeability changes and other final surgical procedures (collection of blood and tissues for Western Blot or histological examinations) were taken 12 h after LPS administration after anesthetization of mice with ketamine and xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, i.p. Pfizer, New York, NY, United States). Control animals were always treated with intraperitoneal injections of adequate volumes of saline.

MRI Protocol for the Assessment of Endothelial Function *in Vivo*

MRI experiments were performed using a 9.4T scanner (BioSpec 94/20 USR, Bruker, BioSpin GmbH, Germany), as described previously (Bar et al., 2016). Mice were anesthetized using isoflurane (Aerrane, Baxter Sp. z o. o., Warszawa, Poland, 1.7 vol. %) in an oxygen and air (1:2) mixture. Body temperature was maintained at 37°C using circulating warm water. ECG, respiration and body temperature were monitored using a Model 1025 Monitoring and Gating System (SA Inc., Stony Brook, NY, United States).

Endothelium-dependent vascular responses *in vivo* were assessed using two techniques: endothelium-dependent response to Ach administration, as described previously (Bar et al., 2015, 2016) and FMD in response to reactive hyperemia, considered as a gold standard for clinical studies of endothelial dysfunction (Raitakari and Celermajer, 2000; Frolow et al., 2015). Response to injection of Ach (Sigma–Aldrich, Poznañ, Poland: 50 μ l, 16.6 mg/kg, i.p.), was analyzed in the lower part of the TA, whereas FMD after short-term occlusion (homemade vessel occluder – description in Supplementary Materials) was determined in the FA. Vasomotor response was examined by comparing two, time-resolved 3D images of the vessels prior to and 25 min after intraperitoneal Ach administration

(time was determined experimentally in our previous study (Bar et al., 2016) or after vessel occlusion had lasted 5 min. The plasma level of Ach achieved with intraperitoneally injection was determined using LC/MS/MS technique based on previous report (Kirsch et al., 2010), with minor modifications The plasma concentration of Ach was increased already after 10 min and maintained elevated 25 min after administration as compared to the control: $(0.07 \pm 0.13 \text{ nM}; 2.08 \pm 1.97 \text{ nM}, 0.58 \pm 0.78)$ nM, before, 10 and 25 min after Ach, respectively). Images were acquired using the cine IntraGateTM FLASH 3D sequence, reconstructed with the IntraGate 1.2.b.2 macro (Bruker). Enddiastolic volumes of vessels were analyzed using ImageJ software 1.46r (NIH, Bethesda, MD, United States) and scripts written in Matlab (MathWorks, Natick, MA, United States). Imaging parameters included the following: repetition time (TR) 6.4 ms, echo time (TE) - 1.4 ms, field of view (FOV) -30 mm \times 30 mm \times 5 mm, matrix size – 256 \times 256 \times 30, flip angle (FA) - 30°, and number of accumulations (NA) -15, reconstructed to seven cardiac frames. Total scan time was 10 min.

Data analysis: 3D images of TA were positioned on sagittal view of the mice, about 5 mm under the heart. 3D images of FA were positioned on the coronal view of the mice, on the left hind limb of the mouse. All cross-sectional areas of vessels at each slice were obtained using thresholding segmentation in ImageJ and exported to Matlab, where vessel volumes were reconstructed and calculated.

MRI – In Vivo Assessment of Vascular Permeability

Mice were imaged in the supine position to assess endothelial permeability. Relaxation time (T1) maps were measured using the cine IntraGateTM FLASH 3D sequence and the variable flip angle (VFA) technique. Obtained T1 maps, before and 30 mins after intravenous administration of albumin-binding gadolinium contrast agent (CA: Galbumin, BioPal, Worcester, MA - 25 mg/ml, 4.5 ml/kg) were compared pixel by pixel, using scripts written in Matlab (MathWorks, Natick, MA, United States). As a result of this comparison, the number of pixels for which T1 had changed more than 50% after contrast agent administration (Npx50) was calculated. Npx50 was proposed as an alternative method for the assignment of the changes in the endothelial permeability. Indeed, the size of the region of interest (ROI) was difficult to establish objectively, and the idea of finding the pixels for which T1 had changed by more than 50% allows for operator-independent assessment of the ROI around the vessel (Bar et al., 2016), NMR in biomed. Increased value of the Npx50 is associated with increased endothelial permeability. Imaging parameters for endothelial permeability assessment included the following: TR -10 ms, TE - 1.1 ms, FOV - 30 mm × 30 mm × 4 mm, matrix size - 192 \times 160 \times 8, number of repetitions -12, and reconstructed to one cardiac frame. Eight FA were used: 2°, 4°, 6°, 8°, 14°, 20°, 30°, and 50°. FA values were set by changing the length of a radiofrequency pulse, with constant amplifier power. Total scan time for all angles was 16 min.



BBB – In Vivo Assessment of Vascular Permeability

Subsequent to anesthesia (100 mg/kg ketamine + 10 mg/kg xylazine, i.p.), mice were injected (femoral vein) with a solution of EB (Sigma-Aldrich) at a dose of 4 ml/kg. Dye solution comprised 2% EB in 0.9% saline. Dyes were left to circulate for 10 min, then the mice chest was surgically opened to simultaneously perfuse left (systemic circulation) and right ventricle (pulmonary circulation) with PBS for 15 min. Lungs and brain were isolated and brain was separated to cerebral cortex, hippocampus, cerebellum and brainstem. Isolated brain structures and lungs were dry-weighted and homogenized in 200 µl of 50% TCA (dissolved in distilled water). Homogenate was frozen and kept at -20°C for dye concentration measurement. Subsequent to thawing, homogenates were centrifuged (at 12,000 rpm for 12 min at 4°C) and the supernatant was collected and diluted with 1:3 volumes of 95% ethanol prior to photospectrometric (Synergy 4, Bio-Tek) determination of EB concentration (fluorescence: excitation at 590 nm, emission at 645 nm; absorbance at 620 nm). Results were normalized to the tissue weight.

Ex Vivo Assessment of Vascular Permeability

In order to assess vascular permeability *ex vivo*, the first branch mesenteric artery was gently isolated and freed from adhering tissue in PSS NaCl 130 mM; NaHCO₃ 15 mM; KCl 3.7 mM; NaHCO₃ 15 mM; MgSO₄ 1.2 mM; glucose 11 mM; CaCl₂ 1.6 mM and HEPES 5 mM) under a dissecting microscope. Then, the mesenteric artery was mounted on a pressure myograph (DMT, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark), pressurized under no flow at 60 mmHg

4

and incubated for an additional half an hour at 37°C. The PSS solution was continuously aerated with gas (containing 74% N₂, 5% CO₂, and 21% O₂), resulting in a pH of 7.4. Diameters were recorded simultaneously with light emitted by arteries at 510 nm with an excitation wavelength of 340 and 380 nm (Ionoptix Corporation, Westwood, MA, United States).

Subsequently, the artery was perfused with dextran-binding fluorescein isothiocyanate (FITC-dextran 150 kDa, Sigma-Aldrich: 50 μ g/ml) for 90 mins under flow conditions close to the physiological state (flow \sim 150–160 μ l/min). Fluid from the chamber in which the vessel was submerged was sampled every 15 min for 90 min. The FITC-dextran concentration was assessed in the samples using fluorescence intensity measurements.

Immunofluorescence and Immunohistochemical Determination of Lectin and CD31 in the Lungs

After anesthesia (100 mg/kg ketamine + 10 mg/kg xylazine, i.p.), small fragments of lung tissue were collected, washed in PBS solution, and then placed in 4% buffered formalin. Tissues were then rinsed, embedded in paraffin in 5 μ m sections and placed on poly-L-lysine-covered microscopic slides (Metzel Glaser Super Frost). For immunofluorescence staining, collected slides were stained using lectin (Vector Laboratories) followed by Cy3-conjugated streptavidin (Jackson Immuno Research). Subsequently, 10 randomly chosen eyefields near the regions of microcirculation were photographed for each mouse and subjected to acquisition using an AxioCam MRc5 digital camera and an AxioObserver D1 inverted fluorescent microscope (Zeiss), stored as tiff files and analyzed automatically using





Columbus software (version 2.4.2, Perkin Elmer). The automatic thresholding of microscope image was used to extract the signal area from the background. Then, the fluorescent signal was calculated from the extracted area. The results were presented as the relative lectin I immunopositive area to the all tissue area.

For CD31 immunohistochemical staining, collected slides were stained with rabbit anti-mouse CD31 (Abcam), followed by goat-anti-rabbit secondary antibody (Jackson Immuno Research).

Subsequently, the total area of lung was scanned with a BX51 microscope equipped with the virtual microscopy system dotSlide (Olympus, Japan) and subjected to segmentation in Ilastik software to assess the relative CD31 immunopositive area to the all-tissue area. Image segmentation was performed in Ilastik (developed by the Ilastik team, with partial financial support by the Heidelberg Collaboratory for Image Processing, HHMI Janelia Farm Research Campus and CellNetworks Excellence Cluster) and calculated by Image J program.

Statistical Analysis

All of the data obtained are presented as mean and standard error of the mean (SEM) or in case of the lack of normal distribution as median with interquartile range. Statistical tests were done using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, United States) software. Non-parametric test (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test) or parametric test (one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test) were performed. Statistical significance was defined as p < 0.05.

RESULTS

Acetylcholine- and Flow-Induced Vasodilatation in Endo-αENaC^{KO} and Control Mice in Basal Conditions and in Endotoxemia Assessed *in Vivo* by MRI

Intraperitoneal injection of Ach in control mice resulted in vasodilatation with the peak response occurring 25 min following Ach administration. In endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice, Ach-induced response was totally lost, while flow-induced vasodilation was inhibited approximately by half as compared with control mice. In the endotoxemia setting (i.e., after LPS injection), both Ach- and flow-induced vasodilation were more severely impaired in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice as compared with control mice (**Figures 1A,B**).

Endothelial Permeability in Endo-αENaC^{KO} and Control Mice in Basal Conditions and in Endotoxemia Assessed *in Vivo* by MRI and T₁ Mapping of Gd-Albumin Contrast Agent Accumulation in the Vessel Wall

In basal conditions, the endothelial barrier integrity was preserved both in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ and control mice. However, in endotoxemia, permeability was increased in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice as compared with control mice 12 h after LPS injection, as evidenced by an increased Npx50 parameter as defined in our previous work (Bar et al., 2016). Permeability of the endothelium differed in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice as compared



Frontiers in Pharmacology | www.frontiersin.org

6

April 2018 | Volume 9 | Article 178



with controls along the whole length of the BCA and LCA (Figures 2A,B).

Endothelial Permeability in the Perfused Lungs, Liver, and Blood–Brain Barrier (BBB) in Endo-αENaC^{KO} and Control Mice in Basal Conditions and in Endotoxemia Assessed *ex Vivo* by Evans Blue

As shown in **Figures 3A–F**, the barrier integrity was not changed in the microcirculation of lungs, liver and brain in both endo- $\alpha ENaC^{KO}$ and control mice in basal conditions. On the contrary, in endotoxemia, BBB with the exception of cerebral cortex, was significantly impaired in the hippocampus, brainstem and cerebellum of endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice as compared with control mice. After LPS, the lung permeability was also significantly increased in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice as compared with control mice. Of note, the barrier integrity of liver was not changed both in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ and control mice after LPS administration.

Endothelial Permeability in the Isolated, Cannulated Vascular Preparation in Endo-αENaC^{KO} and Control Mice in Basal Conditions and in Endotoxemia Assessed *ex Vivo* by FITC-dextran

In basal conditions, the permeability of perfused mesenteric artery was not changed both in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ and control mice. In contrast, in endotoxemia, permeability of perfused artery in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice was increased as compared with controls. The increased permeability, measured as the change in extravascular FITC-dextran concentration in the vessel incubation chamber, increased significantly during 90 min of perfusion (**Figure 4**).

Expression of Lectin I, CD31, in the Lung of Endo- α ENaC^{KO} and Control Mice in Basal Conditions and in Endotoxemia

In basal conditions, the immunofluorescent (IF) and immunohistochemical (IHC) staining of lung microcirculation did not show significant changes in expression of lectin I (IF) and CD31 (IHC) both in endo- α ENaC^{KO} and control mice. In contrast, in endotoxemia, the down-regulation of lectin I and CD31 was observed in lungs of endo- α ENaC^{KO} as compared with control mice (**Figures 5, 6**).

DISCUSSION

Using a cell-specific knockout mouse model with deletion of the αENaC subunit in the endothelial cells, we demonstrated in vivo that genetic deletion of the aENaC subunit in the endothelium resulted in blunted Ach- and flow-induced vasodilation in the aorta and FA, respectively, without a major effect on endothelial permeability. In endotoxemia (induced by LPS, 10 mg/kg), the absence of endothelial ENaC resulted in a more severe impairment of Ach- and flow-induced vasodilation in conduit vessels, as well as pronounced endothelial barrier dysfunction in conduit and peripheral vessel as well as in the lung and brain microcirculation in comparison with mice with preserved endothelial ENaC expression. This dysregulation of the endothelial barrier was associated with altered glycocalyx in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice as evidenced by the lower expression of lectin and CD31 in lungs Altogether, our comprehensive study using various methods to detect endothelial function and permeability changes in various vascular beds allows us to suggest that endothelial ENaC contributes to endothelialdependent regulation of vascular tone in conduit vessels and to the preservation of the endothelial barrier function in endotoxemia both in conduit vessels, in the peripheral



circulation as well as in the microcirculation of the lung and brain.

The use of a cell-specific knockout mouse model - endoaENaCKO mice - allowed us to describe for the first time the involvement of endothelial aENaC in the regulation of endothelial function in vivo. In the present work, we used an MRI-based method to measure endothelium-dependent vasodilation and endothelial permeability in vivo as described previously (Bar et al., 2016). We assessed endothelial function in vivo in the aorta, in response to administration of Ach, and in the FA in response to flow (flow-mediated vasodilation, FMD). MRI-based assessment of endothelial permeability changes was performed for BCA and LCA, where the leakage through intercellular junctions of endothelium was evidenced by accumulation of albumin-binding contrast agent in vessel walls (Lobbes et al., 2009; Pedersen et al., 2011) and analyzed as shortening of the T1 in the vessel and Npx50-based operatorindependent assessment of endothelial permeability (Bar et al., 2016).

Our results indicating that endothelial deletion of ENaC impaired endothelium-dependent responses are only partially compatible with the work of Tarjus et al. (2017). By using the same cell-specific knockout mouse model, Tarjus et al. (2017) showed that acute treatment with benzamil, a pharmacological antagonist of ENaC, decreased Ach-mediated NO production. However in endo- α ENaC^{KO} mice Ach-induced NO release was preserved while flow-mediated dilation was impaired. Results of Tarjus et al. (2017) are not in line with our results as regards Ach-induced vasodilation but concordant with our results as regards flow-induced vasodilation. Heterogeneity of endothelium in macro and microvasculature may explain the apparent discrepancy between our result (showing impaired

agonist and flow-mediated dilation in endo- $\alpha ENaC^{KO}$ mice) and previous results from Tarjus et al. (2017) (showing only the impairment in flow-mediated dilation). Our study was performed using *in vivo* studies in conduit vessels, while those of Tarjus et al. (2017) were done in resistance mesenteric arteries. Given the facts that contribution of NO to endotheliumdependent vasodilation is greater in larger vessels (Campbell et al., 1996), different effects of endothelial $\alpha ENaC$ knock out on Ach-induced vasodilation in conduit and resistance artery may related to various contributions of NO to endotheliumdependent vasodilation induced by Ach. Of note, deletion of $\alpha ENaC$ did not affect the basal diameter of the artery. The basal volume of aorta measured by MRI before adding Ach was similar in all four experimental groups of mice.

Our results are in contrast with the studies of Liu et al. (2015) showing increased Ach-mediated vasodilation after amiloride pre-treatment, or Jernigan and Drummond (2005) reporting no effect of benzamil on phenylephrine-induced contraction in mouse interlobar arteries. Jia et al. (2016) and Knoepp et al. (unpublished) demonstrated that amiloride improved flow-induced dilatation, suggesting that ENaC antagonist prevents endothelial dysfunction. However, amiloride and benzamil can affect other targets apart from the endothelial ENaC, which makes these results questionable. In contrast, our study took advantage of endo- α ENaC^{KO} mice that represent a more selective approach to inactivate ENaC in the endothelium.

Given the important role of Na^+/Ca^{2+} exchanger in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation (Schneider et al., 2002; Bondarenko et al., 2017), we propose that impairment of endotheliumdependent vasodilation in the absence of ENaC may be mechanistically linked to the function of Na^+/Ca^{2+}



exchanger. This hypothesis, however, remains to be verified.

It is important to highlight that we have demonstrated for the first time an important role of endothelial aENaC in the regulation of endothelial permeability in vivo. Among different features of the endothelial dysfunction, increased endothelial permeability is of special importance in various pathophysiological conditions including endotoxemia (Blann, 2003; Davignon and Ganz, 2004; Bar et al., 2015). Since it is well known that the vascular endothelial barrier function plays the crucial role in the maintenance of homeostasis and the integrity of organs in the body (Wiesinger et al., 2013) it is necessary to understand the regulation of this barrier to prevent organ injury. Our results agree with a recent study performed in cultured microvascular pulmonary endothelial cells which demonstrate a previously unrecognized role for aENaC in supporting capillary barrier function that may apply to the human lung (Czikora et al., 2017).

We consider two possibilities to explain the relation between endothelial permeability and glycocalyx disruption. On one hand, ENaC may be directly involved in the regulation of glycocalyx integrity, while on the other hand glycocalyx injury is the consequence of endothelial barrier injury resulting from the loss of ENaC-dependent regulation of endothelial cell permeability. We provide evidence that in the absence of ENaC, LPS challenge resulted in lower expression of lectin I (a specific marker for glycocalyx) and CD31 in lungs from endo- α ENaC^{KO} mice as compared to control mice. Interestingly, platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31) has a lectin-like activity toward α 2,6-sialic acid critical for homophilic interactions and endothelial viability (Kitazume et al., 2014). Thus, loss of CD31 could contribute to endothelial barrier disruption in endo- α ENaC^{KO} mice. Given the fact that tight junction rather than adherens junction determine the endothelial permeability we suspect that α ENaC activity may be more linked with the regulation of tight junction paracellular permeability rather than adherens junctions (Fernández-Martín et al., 2012; Hu et al., 2013; Ren et al., 2015). Obviously, several signaling pathways not studied here such as Rho/ROCK, PKCs, MAPK or Rho/Rac activity could be involved in regulation of barrier integrity by α ENaC (Birukova et al., 2013; Hu et al., 2013; Mammoto et al., 2013; Han et al., 2016; Radeva and Waschke, 2017).

In summary, even though a number of mechanisms could be involved in the α ENaC-dependent regulation of barrier function that have been not fully defined here our results univocally suggest that strategies aiming to activate α ENaC may represent a novel approach to improve barrier function in the capillary endothelium, not only during pneumonia as suggested previously (Czikora et al., 2017), but also in endotoxemia.

Numerous reports have shown that increased ENaC activity tends to stiffen the endothelium followed by reduced NO release and vasoconstriction (Jeggle et al., 2013; Kusche-Vihrog et al., 2014). Even though under *in vitro* conditions, endothelial cortical stiffness is inversely correlated with NO production (Kusche-Vihrog et al., 2010; Warnock et al., 2014), the fact that endo- α ENaC^{KO} mice display a softer cortical layer of endothelium in *ex vivo* aorta (Tarjus et al., 2017) suggests that cortical endothelial stiffness represents a pathophysiological phenomenon not directly linked to endothelial-dependent vasodilation *in vivo*. On the other hand, given the detrimental role of aldosterone on endothelial function in cardiovascular disease and the beneficial effect of aldosterone in endotoxemia (Fadel et al., 2017), our results may underline the differential role of the aldosterone/ENaC pathway in healthy and disease conditions.

CONCLUSION

We have demonstrated in this study that endothelial α ENaC plays a crucial role in vascular physiology and pathophysiology. In physiological conditions, endothelial α ENaC regulates Achand flow-induced vasodilation, while in pathophysiological conditions α ENaC contributes to the preservation of the endothelial barrier function. Accordingly, our results suggest that it is not the inhibition – as previously suggested – but the stimulation of endothelial α ENaC which may be beneficial for improved endothelial function.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the study: MgS and SC. Performed the study: MgS, AB, MA, TM, BM, AK, AT, MtS, and KK. Analyzed the data: MgS, AB, and MA. Provided the analytical tools: AT and FJ. Drafted the manuscript: MgS and SC. Revised the draft

REFERENCES

- Alvarez De La Rosa, D., Canessa, C. M., Fyfe, G. K., and Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride- sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 573–594. doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.573
- Bar, A., Skorka, T., Jasinski, K., and Chlopicki, S. (2015). MRI-based assessment of endothelial function in mice *in vivo*. *Pharmacol. Rep.* 67, 765–770. doi:10.1016/j.pharep.2015.05.007
- Bar, A., Skórka, T., Jasiñski, K., Sternak, M., Bartel, Z., Tyrankiewicz, U., et al. (2016). Retrospectively gated MRI for *in vivo* assessment of endotheliumdependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. *NMR Biomed.* 29, 1088–1097. doi: 10.1002/nbm. 3567
- Birukova, A. A., Tian, X., Cokic, I., Beckham, Y., Gardel, M. L., and Birukov, K. G. (2013). Endothelial barrier disruption and recovery is controlled by substrate stiffness. *Microvasc. Res.* 87, 50–57. doi: 10.1016/j.mvr.2012.12.006
- Blann, A. D. (2003). Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 256–261. doi:10.1159/000083811
- Bondarenko, A. I., Montecucco, F., Panasiuk, O., Sagach, V., Sidoryak, N., Brandt, K. J., et al. (2017). GPR55 agonist lysophosphatidylinositol and lysophosphatidylcholine inhibit endothelial cell hyperpolarization via GPRindependent suppression of Na⁺-Ca²⁺ exchanger and endoplasmic reticulum Ca²⁺ refiling. Vascul. Pharmacol. 89, 39–48. doi: 10.1016/j.vph.2017. 01.002
- Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., and Harder, D. R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. Circ. Res. 78, 415–423.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., et al. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463–467. doi: 10.1038/3674 63a0

of manuscript: FJ. All authors corrected and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This project was financed by the National Centre for Research and Development, Grant No. STRATEGMED1/2332 26/11/NCBR/2015, partially by PRELUDIUM Grant No. DEC-2016/23/N/NZ5/00595, SYMFONIA Grant No. DEC-2015/16/W/NZ4/00070, and by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Centre de Recherche Industrielle et Technique. AT was recipient of a Ph.D. grant from the Ministére de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to COST Action BM1301 for supporting networking activities and Perlan Technologies Polska for providing Agilent mass spectrometer.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar. 2018.00178/full#supplementary-material

- Czikora, I., Alli, A. A., Sridhar, S., Matthay, M. A., Pillich, H., Hudel, M., et al. (2017). Epithelial sodium channel-α mediates the protective effect of the TNF-derived TIP peptide in pneumolysin-induced endothelial barrier dysfunction. *Front. Immunol.* 8:842. doi: 10.3389/fimmu.2017. 00842
- Davignon, J., and Ganz, P. (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109(23 Suppl. 1), III27–III32.
- Fadel, F., André-Grégoire, G., Gravez, B., Bauvois, B., Bouchet, S., Sierra-Ramos, C., et al. (2017). Aldosterone and vascular mineralocorticoid receptors in murine endotoxic and human septic shock. *Crit. Care Med.* 45, e954–e962. doi: 10.1097/CCM.000000000002462
- Fernández-Martín, L., Marcos-Ramiro, B., Bigarella, C. L., Graupera, M., Cain, R. J., Reglero-Real, N., et al. (2012). Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32, e90–e102. doi: 10.1161/ ATVBAHA.112.252080
- Frolow, M., Drozdz, A., Kowalewska, A., Nizankowski, R., and Chlopicki, S. (2015). Pharmacological reports comprehensive assessment of vascular health in patients; towards endothelium-guided therapy. *Pharmacol. Rep.* 67, 786–792. doi: 10.1016/j.pharep.2015.05.010
- Golestaneh, N., Klein, C., Valamanesh, F., Suarez, G., Agarwal, M. K., and Mirshahi, M. (2001). Mineralocorticoid receptor-mediated signaling regulates the Ion gated sodium channel in vascular endothelial cells and requires an intact cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1300–1306. doi: 10.1006/ bbrc.2001.4275
- Guo, D., Liang, S., Wang, S., Tang, C., Yao, B., Wan, W., et al. (2016). Role of epithelial Na+ channels in endothelial function. J. Cell Sci. 129, 290–297. doi: 10.1242/jcs.168831
- Han, J., Weisbrod, R. M., Shao, D., Watanabe, Y., Yin, X., Bachschmid, M. M., et al. (2016). The redox mechanism for vascular barrier dysfunction associated with metabolic disorders: glutathionylation of rac1 in endothelial cells. *Redox Biol.* 9, 306–319. doi: 10.1016/j.redox.2016.09.003

- Hu, Y. J., Wang, Y. D., and Tan, F. Q. (2013). Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Mol. Biol. Rep.* 40, 6123–6142. doi: 10.1007/s11033-013-2724-y
- Jeggle, P., Callies, C., Tarjus, A., Fassot, C., Fels, J., Oberleithner, H., et al. (2013). Epithelial sodium channel stiffens the vascular endothelium in vitro and in liddle mice. *Hypertension* 61, 1053–1059. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA. 111.199455
- Jernigan, N. L., and Drummond, H. A. (2005). Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 289, F891–F901. doi: 10.1152/ajprenal.00019.2005
- Jia, G., Habibi, J., Aroor, A. R., Martinez-Lemus, L. A., Demarco, V. G., Ramirez-Perez, F. I., et al. (2016). Endothelial mineralocorticoid receptor mediates diet-induced aortic stiffness in females. *Circ. Res.* 118, 935–943. doi: 10.1161/ CIRCRESAHA.115.308269
- Kirsch, S. H., Herrmann, W., Rabagny, Y., and Obeid, R. (2010). Quantification of acetylcholine, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatographytandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 878, 3338–3344. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.10.016
- Kitazume, S., Imamaki, R., Kurimoto, A., Ogawa, K., Kato, M., Yamaguchi, Y., et al. (2014). Interaction of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) with 2,6-sialylated glycan regulates its cell surface residency and anti-apoptotic role. J. Biol. Chem. 289, 27604–27613. doi: 10.1074/jbc.M114.563585
- Kosari, F., Sheng, S., Li, J., Mak, D. O., Foskett, J. K., and Kleyman, T. R. (1998). Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. J. Biol. Chem. 273, 13469–13474. doi: 10.1074/ibc.273.22.13469
- Kusche-Vihrog, K., Callies, C., Fels, J., and Oberleithner, H. (2010). The epithelial sodium channel (ENaC): mediator of the aldosterone response in the vascular endothelium? *Steroids* 75, 544–549. doi: 10.1016/j.steroids.2009. 09.003
- Kusche-Vihrog, K., Jeggle, P., and Oberleithner, H. (2014). The role of ENaC in vascular endothelium. *Pflugers Arch.* 466, 851–859. doi: 10.1007/s00424-013-1356-3
- Kusche-Vihrog, K., Sobczak, K., Bangel, N., Wilhelmi, M., Nechyporuk-Zloy, V., Schwab, A., et al. (2008). Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Pflugers Arch.* 455, 849–857. doi: 10.1007/s00424-007-0341-0
- Liang, C., Wang, Q. S., Yang, X., Niu, N., Hu, Q. Q., Zhang, B. L., et al. (2017). Oxidized low-density lipoprotein stimulates epithelial sodium channels in endothelial cells of mouse thoracic aorta. Br. J. Pharmacol. doi: 10.1111/bph. 13853 [Epub ahead of print].
- Liu, H. B., Zhang, J., Sun, Y. Y., Li, X. Y., Jiang, S., Liu, M. Y., et al. (2015). Dietary salt regulates epithelial sodium channels in rat endothelial cells: adaptation of vasculature to salt. Br. J. Pharmacol. 172, 5634–5646. doi: 10.1111/bph.13185
- Lobbes, M. B., Miserus, R. J., Heeneman, S., Passos, V. L., Mutsaers, P. H., Debernardi, N., et al. (2009). Atherosclerosis: contrast-enhanced MR imaging of vessel wall in rabbit model–comparison of gadofosveset and gadopentetate dimeglumine. *Radiology* 250, 682–691. doi: 10.1148/radiol.2503080875
- Mammoto, A., Mammoto, T., Kanapathipillai, M., Yung, C. W., Jiang, E., Jiang, A., et al. (2013). Control of lung vascular permeability and endotoxininduced pulmonary oedema by changes in extracellular matrix mechanics. *Nat. Commun.* 4:1759. doi: 10.1038/ncomms2774

- Pedersen, S. F., Thrysøe, S. A., Paaske, W. P., Thim, T., Falk, E., Ringgaard, S., et al. (2011). CMR assessment of endothelial damage and angiogenesis in porcine coronary arteries using gadofosveset. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 13:10. doi: 10.1186/1532-429X-13-10
- Pérez, F. R., Venegas, F., González, M., Andrés, S., Vallejos, C., Riquelme, G., et al. (2009). Endothelial epithelial sodium channel inhibition activates endothelial nitric oxide synthase via phosphoinositide 3-Kinase/akt in smalldiameter mesenteric arteries. *Hypertension* 53, 1000–1007. doi: 10.1161/ HYPERTENSIONAHA.108.128520
- Radeva, M. Y., and Waschke, J. (2017). Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. Acta Physiol. 222:e12860. doi: 10.1111/apha.12860
- Raitakari, O. T., and Celermajer, D. S. (2000). Flow-mediated dilatation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 50, 397–404. doi: 10.1046/j.1365-2125.2000.00277.x
- Ren, Q., Ren, L., Ren, C., Liu, X., Dong, C., and Zhang, X. (2015). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) plays a critical role in the maintenance of human vascular endothelial barrier function. *Cell Biochem. Funct* 33, 560–565. doi: 10.1002/cbf.3155
- Schneider, J. C., El Kebir, D., Chéreau, C., Mercier, J. C., Dall'Ava-Santucci, J., and Dinh-Xuan, A. T. (2002). Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 283, H837–H844.
- Tarjus, A., Maase, M., Jeggle, P., Martinez-Martinez, E., Fassot, C., Loufrani, L., et al. (2017). The endothelial αENaC contributes to vascular endothelial function *in vivo*. *PLoS One* 12:e0185319. doi: 10.1371/journal.pone. 0185319
- Wang, S., Meng, F., Mohan, S., Champaneri, B., and Gu, Y. (2009). Functional ENAC channels expressed in endothelial cells: a new candidate for mediating shear force. *Microcirculation* 16, 276–287. doi: 10.1080/1073968080265 3150
- Wang, Z. R., Liu, H. B., Sun, Y. Y., Hu, Q. Q., Li, Y. X., Zheng, W. W., et al. (2017). Dietary salt blunts vasodilation by stimulating epithelial sodium channels in endothelial cells from salt-sensitive Dahl rats. *Br. J. Pharmacol.* doi: 10.1111/ bph.13817 [Epub ahead of print].
- Warnock, D. G., Kusche-Vihrog, K., Tarjus, A., Sheng, S., Oberleithner, H., Kleyman, T. R., et al. (2014). Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nat. Rev. Nephrol.* 10, 146–157. doi: 10.1038/nrneph.2013.275
- Wiesinger, A., Peters, W., Chappell, D., Kentrup, D., Reuter, S., Pavenstädt, H., et al. (2013). Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. *PLoS One* 8:e80905. doi: 10.1371/journal.pone.0080905

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Sternak, Bar, Adamski, Mohaissen, Marczyk, Kieronska, Stojak, Kus, Tarjus, Jaisser and Chlopicki. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IX. Oświadczenia współautorów

Mgr Anna Bar

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako autor pracy pt. Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR^{-/-} mice oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: główny udział w planowaniu, przygotowaniu i wykonaniu eksperymentów; przeprowadzenie eksperymentów obrazowania magnetycznorezonansowego (MRI) fenotypu śródbłonka in vivo, w tym pomiary śródbłonkowo-zależnego rozkurczu i zmian przepuszczalności naczynia; pobranie materiału do badań, główny udział w opracowaniu i analizie statystyczna otrzymanych wyników; główny udział w przygotowaniu draftu manuskryptu oraz ostatecznej formy rycin; główny udział w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów; a także przygotowanie wniosku do Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje mój indywidualny wkład przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

(podpis współautora)

Kraków, dnia......26.02.2019......

Dr Marta Targosz-Korecka

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR^{-/-} mice oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przygotowanie i wykonanie pomiarów oraz opracowanie i analiza statystyczna wyników dotyczących oceny pokrycia i długości glikokaliksu jak również sztywności śródbłonka, za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM); pomoc w przygotowaniu draftu manuskryptu oraz ostatecznej formy wybranych rycin.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Marke Vayan - Koralie

⁽podpis współautora)

Mgr Joanna Suraj

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR^{-/-} mice oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przygotowanie i wykonanie pomiarów stężenia biomarkerów dysfunkcji śródbłonka w osoczu metodą microLC/MS-MRM oraz pomoc w przygotowaniu wybranych odpowiedzi do recenzentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

(podpis współautora)

Dr Bartosz Proniewski

..... (tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR-/- mice oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przygotowanie i wykonanie pomiarów produkcji tlenku azotu w aorcie ex vivo metodą EPR; pomoc przy pobieraniu materiału do badań oraz pomoc w przygotowaniu wybranych odpowiedzi do recenzentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w przez pracy mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Bortong Procula (podpis współautora)

Kraków, dnia. 26-02.2019

Mgr Agnieszka Jasztal

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction prior to atherosclerotic plaque development in ApoE/LDLR^{-/-} mice oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: ocena histologiczna wielkości i składu blaszki miażdżycowej w pniu ramienno-głowowym.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Alf. fr. (podpis współautora)

Mgr Anna Bar

..... (tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako autor pracy pt. Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; comparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: główny udział w planowaniu, przygotowaniu i wykonaniu eksperymentów; przeprowadzenie eksperymentów obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MRI) fenotypu śródbłonka in vivo, w tym pomiary śródbłonkowo-zależnego rozkurczu i zmian przepuszczalności naczynia; opracowanie i analiza statystyczna otrzymanych wyników MRI; główny udział w przygotowaniu draftu manuskryptu oraz ostatecznej formy rycin; główny udział w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów; a także przygotowanie wniosku do Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje mój indywidualny wkład przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

(podpis współautora)

Kraków, dnia. 19/02/2019

Dr Mariola Olkowicz

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; comparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przygotowanie i wykonanie pomiarów oraz opracowanie i analiza statystyczna wyników dotyczących oceny aktywności ścieżek ACE/Ang II i ACE2/Ang-(1-7), jak również zmian w równowadze L-arginina/ADMA w osoczu; pomoc w przygotowaniu draftu manuskryptu, wybranych odpowiedzi do recenzentów oraz ostatecznej formy wybranych rycin.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Olkomiz Mariola

(podpis współautora)

Kraków, dnia. 2019-02-12

Dr Urszula Tyrankiewicz

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; comparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w pomiarach MRI, jak również pobranie i zabezpieczenie materiału do badań oceny aktywności ścieżek ACE/Ang II i ACE2/Ang-(1-7).

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Ursuch Tyrom Lievin

(podpis współautora)

Kraków, dnia... 25.02.2019

Dr Edyta Kuś

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; comparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w pobieraniu materiału do badań, współudział w redagowaniu treści manuskryptu i odpowiedzi do recenzentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Edyte Kus

(podpis współautora)

Kraków, dnia 12.0.2.2019

Dr Krzysztof Jasiński

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Functional and biochemical endothelial profiling in vivo in a murine model of endothelial dysfunction; comparison of effects of 1-Methylnicotinamide and angiotensin-converting enzyme inhibitor oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w przeprowadzeniu eksperymentów obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MR) fenotypu śródbłonka *in vivo* (pomiary śródbłonkowo-zależnego rozkurczu i zmian przepuszczalności naczynia).

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

AN. INS. (podpis współautora)

profiles forder

Kraków, dnia.....26.02.2019r.....

Dr Magdalena Sternak

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako autor pracy pt. The deletion of endothelial sodium channel α (αENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia *in vivo* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

główny udział w planowaniu, przygotowaniu i wykonaniu eksperymentów (badanie zmian przepuszczalności perfundowanych narządów (płuco, wątroba) oraz bariery krew-mózg, badanie zmian przepuszczalności naczyń *ex vivo*, pobieranie materiału do badań), pomoc w przeprowadzeniu eksperymentów obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MRI) fenotypu śródbłonka *in vivo*, współudział w przeprowadzeniu barwień immunohistochemicznych oraz immunofluorescencyjnych. Główny udział w opracowaniu i analizie statystycznej otrzymanych wyników, napisanie draftu manuskryptu oraz przygotowanie ostatecznej formy rycin, a także główny udział w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz przygotowanie wniosku do Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Magdalena Sternak

(podpis współautora)

Kraków, dnia. 16.02.2019

Mgr Anna Bar

..... (tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. The deletion of endothelial sodium channel a (aENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia in vivo oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przygotowanie i wykonanie eksperymentów obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MRI) fenotypu śródbłonka in vivo (pomiary śródbłonkowo-zależnego rozkurczu i zmian przepuszczalności naczynia); współudział w opracowaniu i analizie statystycznej otrzymanych wyników MRI; pomoc przy przygotowaniu wybranych odpowiedzi do recenzentów oraz ostatecznej formy wybranych rycin.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części mój eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

(podpis współautora)

Dr n. med. Mateusz Adamski

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. The deletion of endothelial sodium channel a (aENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia *in vivo* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w przeprowadzeniu eksperymentów dotyczących badania zmian przepuszczalności perfundowanych narządów (płuco, wątroba) oraz bariery krew-mózg przy wykorzystaniu znacznika fluorescencyjnego Evans Blue; pomoc w opracowaniu otrzymanych wyników w w/w badaniu zmian przepuszczalności.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Matun Adamshi

(podpis współautora)

Kraków, dnia 28. p2/2019

Mgr farm. Tasnim Mohaissen

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. The deletion of endothelial sodium channel a (aENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia *in vivo* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w przeprowadzeniu eksperymentów dotyczących badania zmian przepuszczalności perfundowanych narządów (płuco, wątroba) oraz bariery krew-mózg przy wykorzystaniu znacznika fluorescencyjnego Evans Blue.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

(podpis współautora)

1021 Kraków, dnia.

Mgr Brygida Marczyk

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. The deletion of endothelial sodium channel α (α ENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia *in vivo* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w przeprowadzeniu eksperymentów obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MR) fenotypu śródbłonka *in vivo* (pomiary śródbłonkowo-zależnego rozkurczu i zmian przepuszczalności naczynia).

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Annę Bar jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Bar przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

U (podpis współautora)