

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Paweł Gwóźdź

**Zmiany czynności wydzielniczej śródbłonna w
krążeniu wieńcowym w toku rozwoju miażdżycy u
myszy apoE/LDLR^{-/-}**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Pracę wykonano w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej
Katedry Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Ryszard Korbut

Praca finansowana przez MNiI

Projekt promotorski nr K/PBP/000165

Kraków 2009

*Składam serdeczne podziękowania
Profesorowi Stefanowi Chłopickiemu
za ogromną życzliwość i pomoc
w trakcie prowadzenia badań
i pisania tej pracy.*

SPIS TREŚCI.....	3
WSTĘP.....	7
Hipercholesterolemia jako inicjator zapalenia prowadzący do rozwoju miażdżycy.....	7
Prozapalne i aterogenne działanie krążących płytek krwi w hipercholesterolemii.....	9
Zwierzęce modele hipercholesterolemii i miażdżycy.....	13
CEL PRACY.....	16
MATERIAŁY I METODY.....	17
Zwierzęta.....	17
Mikroskopowa ocena miażdżycy w naczyniach wieńcowych.....	17
Badania w modelu izolowanego serca myszy.....	17
Aparat Langendorffa.....	17
Metoda izolacji serca.....	18
Rejestracja czynności izolowanego serca.....	19
Badanie odpowiedzi naczyniorozszerzających krążenia wieńcowego izolowanego serca myszy.....	19
Badania biochemiczne efluentu sercowego.....	20
Badanie poziomu PGI ₂ w efluencie sercowym.....	20
Badanie poziomu AMP, adenozyiny i inozyiny w efluencie sercowym.....	20
Badania biochemiczne osocza.....	21
Badanie stężenia sCD40L.....	21
Badanie stężenia SAA.....	21
Badanie stężenia 6-keto-PGF _{1α} oraz próba wysiłkowa.....	21
Badanie poziomu nitrozyhemoglobiny (HbNO) w erytrocytach.....	22
Badanie ekspresji białek błonowych krążących płytek krwi.....	22
Oznaczanie stężenia cholesterolu i trójglicerydów w osoczu.....	23
Odczynniki.....	23
Analiza statystyczna.....	24
WYNIKI.....	25
Rozwój hipercholesterolemii u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	25
Rozwój miażdżycy u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	26
Charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających w modelu	

izolowanego serca myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+}	27
Podstawowy przepływ wieńcowy.....	27
Reaktywna hiperemia.....	27
Charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od śródbłonkowego NO oraz wywołanych przez donory NO.....	28
Czynnościowa i biochemiczna charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez acetylocholinę	28
Charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez adenozyne, AMP, ADP i ATP.....	31
Podsumowanie charakterystyki odpowiedzi naczyniorozszerzających w izolowanym sercu myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+}	33
Czynnościowa i biochemiczna charakterystyka czynności śródbłonka wieńcowego w hipercholesterolemii i miażdżycy u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	33
Rezerwa krążenia wieńcowego.....	33
Reaktywna hiperemia.....	33
Charakterystyka czynności śródbłonka wieńcowego zależnej od NO.....	34
Podstawowy przepływ wieńcowy.....	34
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Bk.....	36
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNP.....	39
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNAP.....	39
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez DEA/NO.....	39
Charakterystyka czynności śródbłonka wieńcowego zależnej od PGI ₂	43
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Ach.....	43
Podstawowe i stymulowane przez podanie Ach wytwarzanie 6-keto-PGF _{1α} w krążeniu wieńcowym.....	44
Charakterystyka czynności śródbłonka wieńcowego zależnej od od autakoidów purynowych i ich wewnątrznaczyniowych przemian.....	46
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez adenozyne.....	46
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez AMP.....	46
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ADP.....	49
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ATP.....	49
Poziom adenozyne, inozyny i AMP w efluencie wieńcowym.....	52
Ocena systemowego wytwarzania śródbłonkowego NO i PGI ₂ w hipercholesterolemii i miażdżycy u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	55

Poziom nitrozyhemoglobiny (HbNO) w erytrocytach.....	55
Stężenie 6-keto-PGF _{1α} w osoczu w warunkach podstawowych i po wysiłku fizycznym.....	56
Ocena aktywacji krążących płytek krwi oraz osoczowych parametrów zapalnych w hipercholesterolemii i miażdżycy u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	57
Aktywacja krążących płytek krwi.....	57
Błonowa ekspresja selektyny P, CD40L oraz aktywowanej GPIIB-IIIa krążących płytek krwi.....	57
Stężenie sCD40L w osoczu.....	59
Odpowiedź ostrej fazy.....	60
Stężenie SAA w osoczu.....	60
Podsumowanie wyników.....	61
Układowa dysfunkcja śródbłonna, aktywacja krążących płytek krwi oraz rozwój miażdżycy i odpowiedzi ostrej fazy u myszy apoE/LDLR ^{-/-} ...	61
Czynność śródbłonna wieńcowego u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	61
Wydolność wysiłkowa myszy apoE/LDLR ^{-/-}	62
DYSKUSJA.....	64
Zaburzenia lipidowe i rozwój miażdżycy u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	64
Czynność śródbłonna wieńcowego u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+}	65
Podstawowy przepływ wieńcowy.....	65
Reaktywna hiperemia.....	65
Odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowego NO.....	66
Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez donory NO.....	66
Odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowej PGI ₂	66
Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyne, AMP, ADP i ATP.....	67
Zmiany aktywności śródbłonkowego NO w hipercholesterolemii i miażdżycy.....	67
Zmiany wytwarzania śródbłonkowej PGI ₂ w hipercholesterolemii i miażdżycy.....	71
Zmiany czynności śródbłonna wieńcowego zależnej od autakoidów purynowych i ich wewnątrznaczyniowych przemian w hipercholesterolemii i miażdżycy..	75
Aktywacja krążących płytek krwi w hipercholesterolemii i miażdżycy.....	80
Odpowiedź ostrej fazy w hipercholesterolemii i miażdżycy.....	84
Wydolność wysiłkowa w hipercholesterolemii i miażdżycy.....	87

WNIOSKI.....	87
STRESZCZENIE.....	98
SUMMARY.....	90
SPIS RYCIN.....	92
WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	94
PIŚMIENNICTWO.....	96

WSTĘP

Hipercholesterolemia jako inicjator zapalenia prowadzący do rozwoju miażdżycy.

Miażdżyca jest przewlekłą chorobą zapalną tętnic dużego i średniego kalibru, w której leukocyty, głównie monocyty i limfocyty T, transmigrują przez strukturalnie prawidłowy, ale dysfunkcyjny śródbłonek tętnic i kumulują się w przestrzeni subendotelialnej [Ross, 99]. Najważniejszym czynnikiem inicjującym i podtrzymującym rozwój miażdżycy jest podniesione stężenie cholesterolu w osoczu [Wilson, 98; Stamler, 86; Law, 94]. Potencjał aterogenetyczny cholesterolu, a szczególnie frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) i ich utlenionych pochodnych (oxLDL), wynika z ich silnego i wielokierunkowego działania prozapalnego. oxLDL działają prozapalnie na poziomie lokalnym, wywołując ogniskowe zapalenie śródbłonna tętnic, oraz na poziomie układowym, wywołując uogólnioną aktywację zapalną krążących płytek krwi i śródbłonna mikrokrążenia [Steinberg, 02; Stokes, 02]

Złożony i wieloetapowy proces rozwoju blaszek miażdżycowych rozpoczyna proporcjonalna do stężenia LDL w osoczu retencja LDL w przestrzeni podśródbłonkowej tętnic [Smith, 90]. Retencja cholesterolu w ścianie tętnic jest skutkiem łączenia się cząsteczek LDL z proteoglikanami ściany tętnicy, co upośledza zwrotny transport lipoprotein do osocza [Camejo, 98]. W świetle naczyń lub w przestrzeni podśródbłonkowej LDL są modyfikowane chemicznie, w efekcie czego powstają cząsteczki o znacznie silniejszym działaniu prozapalnym niż natywne LDL, z których najważniejsze to oxLDL [Yla-Herttuala, 89]. Miejscowe działanie oxLDL inicjuje zapalenie ściany tętnicy w miejscach, gdzie w przyszłości rozwiną się blaszki miażdżycowe [Schwenke, 89]. OxLDL, działając poprzez specyficzne receptory śródbłonkowe, aktywują śródbłonek do produkcji prozapalnych cytokin, chemokin i ekspresji białek adhezyjnych [Li, 03; Cushing, 90]. Jednym z pierwszych zjawisk obserwowanych *in vivo* w modelach hipercholesterolemii jest selektywny wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych (VCAM-1) i produkcji chemokin przez śródbłonek tętnicy miejscach retencji LDL i przyszłego rozwoju miażdżycy [Li, 93]. W kolejnym etapie dochodzi do zwiększonej adhezji leukocytów do aktywowanego śródbłonna, ich transmigracji i kumulacji w warstwie podśródbłonkowej tętnicy [Poole, 58]. OxLDL działa chemotaktycznie i aktywująco również na główne komórki zapalne wczesnych zmian miażdżycowych, monocyty i limfocyty T [Quinn, 87; McMurray, 93]. Aktywowane leukocyty w ścianie tętnicy z kolei produkują reaktywne formy tlenu, co nasila utlenianie retencyjnego LDL. W ten sposób dochodzi do swoistego błędnego koła aktywacji komórek

zapalnych przez oxLDL i zwrotnego nasilania potencjału prozapalnego LDL przez komórki zapalne w ścianie tętnicy, co w efekcie prowadzi do rozwoju i dojrzewania zmian miażdżycowych. Makrofagi fagocytują retencyjne lipoproteiny i przekształcają się w komórki piankowate, charakterystyczne dla miażdżycy [Steinberg, 89]. Aktywowane przez oxLDL komórki zapalne w ścianie tętnicy wydzielają cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu, co prowadzi do dalszej rekrutacji leukocytów, migracji i proliferacji miocytów i w efekcie progresji wczesnych zmian do stadium złożonych płytek miażdżycowych i ich komplikacji [Ross, 99; Libby, 02].

Tak więc, miażdżycy jest przewlekłą chorobą zapalną tętnic wynikającą z kumulacji cholesterolu w ich ścianie i lokalnej aktywacji zapalnej śródbłonna, umożliwiającej napływ leukocytów do ściany tętnicy [Ross, 99].

Drugim kluczowym proaterogennym efektem hipercholesterolemii, obok lokalnego działania na śródbłonek tętnic, jest uogólniona zapalna aktywacja śródbłonna naczyniowego i krążących płytki krwi. Hipercholesterolemia wywołuje uogólnioną dysfunkcję i zapalenie śródbłonna, charakteryzujące się upośledzoną biodostępnością śródbłonkowego tlenu azotu (NO) oraz nasilonymi interakcjami krążących płytek krwi i leukocytów ze śródbłonkiem naczyniowym na poziomie mikrokrążenia. NO jest głównym śródbłonkowym mediatorem chroniącym przed patologią naczyń, w tym miażdżycą [Cooke, 94]. NO, produkowany przez śródbłonkową formę syntazy tlenu azotu (eNOS), działa naczyniorozszerzająco, przeciwpłytkowo, przeciwzapalnie (przez hamowanie śródbłonkowej ekspresji cząstek adhezyjnych i chemokin oraz interakcji śródbłonna z leukocytami), antyproliferacyjnie i antimigracyjnie na mięśniówkę oraz stymuluje regenerację śródbłonna [Gauthier, 95; Radomski, 93; Schwarz, 01; Garg, 89; Li, 00; Murohara, 98]. Dodatkowo, NO hamuje utlenianie LDL i zmniejsza przepuszczalność naczyń dla LDL [Cardona-Sanclemente, 95].

Główną metodą oceny aktywności biologicznej NO, zarówno w klinice, jak i w laboratorium, jest badanie czynności rozkurczowej tętnic zależnej od NO [Deanfield, 07]. U pacjentów z hipercholesterolemią upośledzenie czynności rozkurczowej zależnej od NO ma uogólniony charakter i zostało stwierdzone w tętnicach nasierdziowych [Quyyumi, 95], w mikrokrążeniu wieńcowym [Drexler, 91b; Drexler, 91a; Zeiher, 91; Egashira, 93], w tętnicach ramiennych [Vladimirova-Kitova, 09; Garcia, 95], udowych [Sorensen, 94; Celermajer, 94], oporowych ręki [Creager, 90; Gilligan, 94] oraz w tętniczkach tkanki tłuszczowej [Paniagua, 01]. Pomimo tego, że obecność dysfunkcji śródbłonna stwierdza się badając tylko pojedynczy aspekt fizjologii śródbłonna, upośledzeniu rozkurczu tętnic w hipercholesterolemii zawsze towarzyszy upośledzenie pozostałych funkcji NO, przeciwzapalnej [Scalia, 01],

przeciwpłytkowej [Broeders, 02], przeciwproliferacyjnej [Busnelli, 09; Matter, 06] czy regeneracyjnej [Jang, 00; Rivard, 99]. Co ciekawe, dysfunkcja śródbłonna występuje już przy wartościach stężenia całkowitego cholesterolu uznawanych za górną granicę normy u ludzi [Steinberg, 97] i wyprzedza powstawanie zmian miażdżycowych [Celermajer, 92]. Tak więc, upośledzenie ochronnego wpływu NO na naczynia w hipercholesterolemii ma znaczny udział w rozwoju miażdżycy [Matter, 06; Naruse, 94; Cooke, 92; Candipan, 96; Kauser, 00], a dysfunkcja śródbłonna jest ważnym czynnikiem rokowniczym wystąpienia powikłań *atherothrombosis* [Deanfield, 07].

Dysfunkcja śródbłonna w hipercholesterolemii wynika zarówno z upośledzonego wytwarzania, jak i przyspieszonego rozkładu NO. Pomimo tego, że śródbłonkowa ekspresja eNOS może być wzmożona [Godecke, 02; d'Uscio, 01; Rossi, 05], w hipercholesterolemii syntetyzowany jest endogeny inhibitor eNOS, ADMA, hamujący wytwarzanie NO przez eNOS [Vladimirova-Kitova, 09; Boger, 98; Boger, 00; Ito, 99]. Również oxLDL hamuje wytwarzanie NO, gdyż stymuluje zmianę lokalizacji eNOS w błonie komórkowej, co nasila interakcje enzymu z białkiem hamującym, kaweoliną [Feron, 99; Blair, 99; Uittenbogaard, 00]. Dodatkowo, na skutek zwiększonego utleniania koenzymu eNOS, tetrahydrobiopteryny (BH₄), dochodzi do niedoboru TH₄ i rozprzęgania podjednostek eNOS z upośledzeniem wytwarzania NO [Munzel, 05]. Co więcej, rozprzęgnięta eNOS wytwarza anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻), co nasila utlenienie NO i TH₄ i potęguje dysfunkcję śródbłonna [Alp, 04]. Zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu, a szczególnie O₂⁻, jest uważane za główny czynnik upośledzający biodostępność śródbłonkowego NO w hipercholesterolemii, gdyż wytwarzony w nadmiarze O₂⁻ natychmiast reaguje z NO, utleniając go do nadtlenozaotynu [Reilly, 98; Martino, 07; Davi, 97; Lehr, 92; Pritchard, Jr., 95]. Poza eNOS, postuluje się również inne enzymatyczne źródła O₂⁻ w śródbłonnku: NAD(P)H oksydazę, oksydazę ksantynową, oksydazy mitochondrialne [Lubos, 08]. Również elementy morfotyczne krwi, płytki i neutrofile, są istotnymi źródłami reaktywnych form tlenu w hipercholesterolemii, znacząco przyczyniając się do upośledzenia biodostępności śródbłonkowego NO [Stokes, 01; Krotz, 04].

Prozapalne i aterogenne działanie krążących płytek krwi w hipercholesterolemii

Innym charakterystycznym skutkiem hipercholesterolemii towarzyszącym dysfunkcji śródbłonna u pacjentów jest aktywacja krążących płytek krwi. W hipercholesterolemii produkcja tromboksanu A₂ (TXA₂) oraz nerkowe wydzielanie jego metabolitów są zwiększone [FitzGerald, 84; Belton, 00; Broijersen, 98a; Davi, 92]. TXA₂ jest produkowany

głównie przez aktywowane płytki krwi, a jego zwiększone wytwarzanie świadczy o aktywacji płytek *in vivo* [FitzGerald, 83]. Krążące płytki krwi pacjentów z hipercholesterolemią wykazują zwiększoną błonową ekspresję białek prozapalnych, selektyny P [Broijersen, 98b] i CD40L [Sanguigni, 05] oraz aktywowanej GpIIb-IIIa [Labios, 05]. Również osoczowe stężenie rozpuszczalnych form płytkowych białek prozapalnych, rozpuszczalnej selektyny P [Davi, 98; Ferroni, 99] i sCD40L [Cipollone, 02; Garlichs, 01b; Martino, 07] są zwiększone w hipercholesterolemii. Dodatkowo, u pacjentów stwierdza się obecność krążących agregatów płytkowo-leukocytarnych, powstałych na skutek interakcji aktywowanych płytek krwi z krążącymi leukocytami [Klinkhardt, 02].

Aktywacja krążących płytek krwi wynika nie tylko z bezpośredniego aktywującego wpływu LDL i oxLDL, ale również z upośledzenia przeciwpłytkowych mechanizmów śródbłonkowych [Chen, 96; Lehr, 95; Hein, 00; Ardlie, 89; Hassall, 83; Vink, 00]. Śródbłonek wywiera toniczny wpływ na krążące płytki krwi, hamując ich aktywację i prozapalne funkcje dzięki działaniu 3 głównych mediatorów: NO, prostacykliny (PGI₂) i adenozyiny [Schwarz, 01]. NO, PGI₂ i adenozyina, powstająca wewnątrznaczyniowo dzięki stałej ekspresji i aktywności śródbłonkowych ektoenzymów CD39 i CD73 [Kawashima, 00], działają na płytki synergistycznie i w sposób uzupełniający się. NO działa poprzez aktywację cytoplazmatycznej formy cyklazy guanylowej (sGC) i wzrost wewnątrzpłytkowego stężenia cGMP. PGI₂ i adenozyina natomiast aktywują płytkowe błonowe receptory i wtórnie do nich cyklazę adenylową, co prowadzi do wzrostu cytoplazmatycznego stężenia cAMP. cGMP i cAMP aktywują odpowiednie kinazy białkowe, które poprzez fosforylację różnorodnych białek kaskad sygnałowych aktywacji, hamują prozapalne i prozakrzepowe funkcje płytek krwi, w tym adhezję, agregację, degranulację i ekspresję prozapalnych białek błonowych [Schwarz, 01]. Ponieważ w warunkach hipercholesterolemii biodostępność NO jest upośledzona, toniczna aktywność zależnych od cGMP wewnątrzpłytkowych szlaków transukcji sygnału również jest upośledzona. O dużej roli NO w hamowaniu prozapalnych funkcji płytek krwi świadczy fakt, że interwencje farmakologiczne zwiększające aktywność NO ograniczają aktywację płytek krwi w hipercholesterolemii [Bode-Boger, 98; Wolf, 97; Broeders, 02]. Płytkowy niedobór cGMP jest kompensowany zwiększonym śródbłonkowym wytwarzaniem PGI₂, uruchamiającym wewnątrzpłytkowe kaskady sygnałowe zależne od cAMP [FitzGerald, 84], natomiast wpływ hipercholesterolemii na wewnątrznaczyniowe wytwarzanie adenozyiny nie jest znany.

Aktywacja krążących płytek krwi nie jest jedynie markerem dysfunkcji śródbłonka i upośledzenia biodostępności NO w hipercholesterolemii, lecz jednym z najważniejszych

patomechanizmów rozwoju miażdżycy. Płytki krwi biorą czynny udział w inicjacji i progresji *atherothrombosis* i jej powikłań. Już w latach sześćdziesiątych XX wieku stwierdzono, że trombocytopenia redukuje [Moore, 76; Cohen, 68], a trombocytoza nasila [Cohen, 67] rozwój miażdżycy w modelach zwierzęcych. Od tego czasu wielokrotnie dowodzono, że hamowanie prozapalnej aktywności płytek krwi poprzez modyfikacje genetyczne lub interwencje farmakologiczne powodujące upośledzenie syntezy TXA₂ [Belton, 03; Cyrus, 02; Paul, 00], blokadę receptora dla TXA₂ [Cayatte, 00], receptora dla ADP [Jawien, 07] czy czynnika von Willebrandta [Fuster, 78; Methia, 01] zmniejsza nasilenie miażdżycy w modelach doświadczalnych. Co więcej, podawanie aktywowanych płytek krwi do krążenia myszy z hipercholesterolemią, nasila i przyspiesza rozwój miażdżycy [Huo, 03]. Również badania u pacjentów świadczą o patofizjologicznej roli płytek krwi w rozwoju miażdżycy, gdyż stwierdzona ultrasonograficznie obecność miażdżycy w tętnicach szyjnych pozytywnie koreluje z aktywacją krążących płytek krwi [Koyama, 03; Fateh-Moghadam, 05].

Płytki krwi odgrywają niezwykle ważną rolę w inicjacji i utrzymywaniu każdego lokalnego zapalenia, gdyż ułatwiają czy wręcz umożliwiają rekrutację leukocytów do tkanek [May, 08]. Podanie autologicznych aktywowanych płytek do krążenia zdrowych myszy powoduje przejściowe tworzenie krążących kompleksów płytkowo-leukocytarnych oraz interakcje krążących płytek i agregatów płytkowo-leukocytów ze śródbłonkiem, co jest pierwszym etapem procesu transmigracji leukocytów [Dole, 05; Ludwig, 04]. W warunkach hipercholesterolemii, na skutek aktywacji krążących płytek krwi, analogiczna gotowość prozapalna leukocytów i śródbłonka obecna jest stale. U myszy już po 2 tygodniach diety aterogennej stwierdza się toczenie, adhezję do śródbłonka *venul* oraz transmigrację leukocytów do tkanek w tak różnych narządach jak jelita, mózg, mięśnie szkieletowe i krezka [Stokes, 01; Tailor, 03; Gauthier, 95; Johnson, 97]. Ten uogólniony fenotyp prozapalny leukocytów i śródbłonka w hipercholesterolemii, podtrzymywany przez stale aktywowane płytki krwi, skutkuje nie tylko zwiększonym lokalnym zapaleniem i martwicą w odpowiedzi na czynniki uszkodzające tkanki [Scalia, 01], ale również, poprzez endogenne mechanizmy zależne od płytek i leukocytów, przyczynia się do rozwoju miażdżycy w tętnicach [Stokes, 05].

W hipercholesterolemii stymulowane przez aktywowane płytki krwi interakcje leukocytów ze śródbłonkiem naczyń zachodzą nie tylko w mikrokrążeniu, ale, co jest kluczowe dla powstawania miażdżycy, dodatkowo również w tętnicach w miejscu rozwoju przyszlých zmian miażdżycowych [Nakashima, 94]. Co więcej, adhezja płytek krwi do śródbłonka tętniczego wyprzedza adhezję leukocytów [Eriksson, 01; Theilmeier, 02;

Massberg, 02], a podanie aktywowanych płytek krwi do krążenia myszy z hipercholesterolemią nasila adhezję leukocytów do śródbłonka w tętnicach [Huo, 03]. Dodatkowo, hamowanie interakcji płytek krwi z leukocytami i śródbłonkiem poprzez blokadę selektyny P zmniejsza akumulację leukocytów w ścianie tętnic i hamuje rozwój miażdżycy [Massberg 02; Massberg, 05]. Tak więc, aktywowane płytki krwi odgrywają kluczową rolę w inicjacji i rozwoju zmian miażdżycowych w hipercholesterolemii poprzez ułatwianie interakcji leukocytów ze śródbłonkiem naczyniowym i ich rekrutacji do ściany tętnic. Dzieje się tak, gdyż płytki krwi, przy użyciu szerokiej gamy mediatorów prozapalnych, aktywują prozapalnie zarówno śródbłonek, jak i krążące leukocyty. Jednym z głównych płytkowych mediatorów zapalnych jest cytokina $IL-1\beta$, która stymuluje śródbłonek do wydzielania chemokin ($IL-8$ i $MCP-1$), cytokin ($IL-6$) i ekspresji cząstek adhezyjnych ($ICAM-1$) [Gawaz, 00; Kaplanski, 94; Lindemann, 01]. Podobne działanie wykazuje $CD40L$, którego zwiększona błonowa ekspresja na aktywowanych płytkach stymuluje śródbłonek, poprzez wiązanie receptora $CD40$, do produkcji chemokin ($IL-8$ i $MCP-1$) i błonowej ekspresji cząstek adhezyjnych (selektyny E, $VCAM-1$ i $ICAM-1$) [Henn, 98]. Analogiczny prozapalny wpływ na śródbłonek wykazuje niedawno odkryty inny płytkowy mediator, LIGHT [Celik, 07; Otterdal, 06]. Przylegające do śródbłonka płytki wydzielają również mediatory działające bezpośrednio na leukocyty, jak chemokina RANTES. RANTES jest uwalniana przez płytki, oddziałuje z zapalnie zmienionym śródbłonkiem, działa chemotaktycznie na monocyty oraz nasila ich adhezję do ściany naczynia [von Hundelshausen, 01]. Inną płytkową chemokiną jest PF4, który stymuluje różnicowanie monocytów w makrofagi [Scheuerer, 00] oraz wykazuje dodatkowo specyficzne działanie aterogenne poprzez ułatwianie retencji LDL na błonach komórkowych [Sachais, 02] i wychwyt oxLDL przez makrofagi [Nassar, 03].

Aktywowane krążące płytki krwi, oprócz prozapalnego działania na śródbłonek, agregują również z krążącymi leukocytami przy udziale selektyny P i aktywują je prozapalnie. W ten sposób płytki krwi stymulują krążące monocyty do syntezy prozapalnych cytokin ($IL-1\beta$) i chemokin ($IL-8$, $MCP-1$) w mechanizmie zależnym również od RANTES [Weyrich, 96; Neumann, 97]. Po agregacji z neutrofilami natomiast, płytki krwi są fagocytowane, co wywołuje egzocytozę ziarnistości neutrofilii i śródnaczyniowe uwalnianie mieloperoksydazy (MPO), nasila stres oksydacyjny i pogłębia wewnątrznaczyniowy niedobór NO [Valles, 93; Maugeri, 09].

Kluczowy udział płytkowych mechanizmów prozapalnych w rozwoju miażdżycy jest podkreślany przez wyniki licznych badań, w których blokada selektyny P, $CD40L$, $IL-1$,

RANTES czy PF4 prowadziła hamowała rozwój miażdżycy [Koenen, 09; Sachais, 07; Mach, 98; Johnson, 97; Kirii, 03].

Tak więc, w hipercholesterolemii stwierdza się zarówno lokalne zapalenie w ścianie naczyń tętniczych, jak również uogólniony prozapalny fenotyp śródbłonna oraz krążących płytek krwi i leukocytów. Dodatkowo, wątrobowa synteza białek ostrej fazy, jak CRP czy SAA, jest zwiększona w zwierzęcych modelach hipercholesterolemii i u pacjentów [Jousilahti, 01; Mezaki, 03; Lewis, 04; Van Lenten, 07]. Centralną rolę w rozwoju zapalenia w hipercholesterolemii odgrywają aktywowane płytki krwi i upośledzenie przeciwplatekcyjnych mechanizmów śródbłonna, przede wszystkim niedobór NO.

Zwierzęce modele hipercholesterolemii i miażdżycy

Rozwój zwierzęcych modeli hipercholesterolemii i miażdżycy w znacznym stopniu przyczynił się do poznania mechanizmów rozwoju miażdżycy. Do czasu opracowania genetycznego modelu hipercholesterolemii u myszy, badania nad eksperymentalną miażdżycą były prowadzone głównie w modelach hipercholesterolemii wywołanej dietą u gatunków podatnych na rozwój miażdżycy, głównie świń, królików i małp [Jawien, 04]. Myszy są gatunkiem opornym na rozwój miażdżycy, a jedynym szczepem, u którego silnie modyfikowana bogatotłuszczowa dieta wywołuje zmiany miażdżycowe, są myszy C57Bl/6 [Paigen, 85]. Oporność myszy na miażdżycę może wynikać ze specyficznej gospodarki lipidowej, gdyż w przeciwieństwie do ludzi, cholesterol u myszy jest transportowany głównie w formie HDL, czyli lipoproteiny o właściwościach ateroprotekcyjnych. Wydaje się, że podatność na rozwój miażdżycy może również zależeć od wrażliwości śródbłonna na aktywację zapalną wywołaną hipercholesterolemią [Pei, 06]. U myszy miażdżycoopornego szczepu C3H, modyfikowane LDL pozostają bez wpływu na fenotyp śródbłonna, natomiast u podatnych na miażdżycę myszy szczepu C57Bl/6, modyfikowane LDL wywołują zapalenie śródbłonna [Shi, 00]. Jednak zmiany patologiczne wywołane dietą aterogenną u myszy C57Bl/6 w niewielkim stopniu przypominają ludzką miażdżycę: są niewielkie, rozwijają się tylko do stadium nacieku tłuszczowego i pojawiają się głównie w korzeniu aorty.

W 1992 roku opracowano model genetycznej hipercholesterolemii u myszy, który zrewolucjonizował badania nad miażdżycą. Niezależnie od siebie, 2 grupy badawcze wyhodowały myszy pozbawione genu dla apolipoproteiny E (myszy apoE^{-/-}), które w krótkim czasie stały się standardowym modelem eksperymentalnej miażdżycy [Piedrahita, 92; Plump, 92]. Apolipoproteina E (apoE), wchodzi w skład wszystkich lipoprotein oprócz LDL i jest ligandem receptorów dla lipoprotein. Obecność apoE jest warunkiem prawidłowej gospodarki

lipidowej, gdyż apoE umożliwia wychwyt cząstek lipoprotein przez komórki [Zhang, 92]. Myszy apoE^{-/-} mają kilkakrotnie zwiększony poziom cholesterolu, głównie frakcji VLDL, oraz trójglicerydów [Kobayashi, 04]. U myszy apoE^{-/-} miażdżycy rozwija się spontanicznie i w wielu aspektach przypomina miażdżycę ludzką: zmiany miażdżycowe znajdują się w dużych i średnich tętnicach, zwłaszcza w miejscach rozgałęzień, a ich morfologiczny rozwój zachodzi w dobrze udokumentowanej sekwencji [Nakashima, 94]. Początkowo, w wieku 6 tygodni, obserwuje się adhezję monocytów do śródbłonna aorty i ich transmigrację do ściany aorty. Przed ukończeniem 10 tygodnia życia, rozwijają się zmiany typu pasma tłuszczowego, złożone z komórek piankowatych. Następnie rozwijają się zmiany typu pośredniego oraz zaawansowane, z typowym lipidowym rdzeniem oraz pokrywą z białek macierzy zewnątrzkomórkowej i proliferujących miocytów. Dodatkowo, myszy apoE^{-/-} są podatne na dietę aterogenną i pod wpływem karmienia dietą zbliżoną składem do ludzkiej diety typu zachodniego, miażdżycy rozwija się szybciej, a zmiany są większe [Nakashima, 94]. Jedyną istotną różnicą pomiędzy miażdżycą u myszy apoE^{-/-} a miażdżycą ludzką jest brak epizodów zakrzepowych związanych z blaszkami miażdżycowymi u myszy, co zresztą jest cechą wszystkich modeli doświadczalnych miażdżycy.

Innym rozpowszechnionym modelem hipercholesterolemii i miażdżycy są myszy pozbawione receptora dla LDL (myszy LDLR^{-/-}) [Nakashima, 94]. Receptor dla LDL (LDLR) jest receptorem błonowym wiążącym apolipoproteiny apoE i apoB-100, co jest niezbędne dla prawidłowego wychwytu lipoprotein przez komórki, głównie hepatocyty. U myszy LDLR^{-/-} hipercholesterolemia jest stosunkowo niewielka (stężenie cholesterolu całkowitego wynosi ok. 250 mg/dl) i dotyczy głównie frakcji LDL. Zmiany miażdżycowe nie rozwijają się spontanicznie, jednak myszy te są bardzo podatne na dietę aterogenną, przy stosowaniu której szybko powstają blaszki miażdżycowe.

Najbardziej zbliżonym do ludzkiej hipercholesterolemii i miażdżycy jest model myszy pozbawionych genów zarówno dla apoE, jak i LDLR (myszy apoE/LDLR^{-/-}) [Ishibashi, 94; Bonthu, 97]. U myszy tych stężenie całkowitego cholesterolu kilkakrotnie przekracza wartości fizjologiczne oraz, w odróżnieniu od myszy apoE^{-/-}, główną frakcją lipoprotein jest LDL, a poziom trójglicerydów w osoczu nie jest zwiększony. Zaawansowane zmiany miażdżycowe rozwijają się spontanicznie i szybciej niż w innych modelach hipercholesterolemii [Witting, 99]. Tak więc, jest to najbardziej zbliżony do warunków ludzkich model czystej hipercholesterolemii i miażdżycy u myszy.

W licznych modelach hipercholesterolemii wywołanej dietą: u naczelnych [Freiman, 86; Sellke, 90; Quillen, 91], świń [Kuo, 92], królików [Bossaller, 87b; Bossaller, 87a; Habib,

86; Yamamoto, 88; Girerd, 90; Scalia, 98], szczurów [Kim, 06] i myszy [Stokes, 09b; Kim, 07], jak również u pacjentów z hipercholesterolemią, jednoznacznie wykazano upośledzenie biologicznej aktywności NO wyprzedzające rozwój miażdżycy. Jednak w genetycznych modelach mysiej hipercholesterolemii wciąż pozostają kontrowersje co do rozwoju dysfunkcji śródbłonna oraz udziału śródbłonkowego NO w rozwoju miażdżycy: część badaczy potwierdza niedobór NO w tych modelach [Godecke, 02; d'Uscio, 01; Laursen, 01; Yang, 99; Jiang, 00; Jiang, 01; Yaghoubi, 00], inni natomiast postulują prawidłową biodostępność NO [Kauser, 00; Villeneuve, 03]. Co więcej, wyniki niektórych badań sugerują, że dysfunkcyjny jest tylko śródbłonek w sąsiedztwie płytek miażdżycowych lub przy obecności zaawansowanych zmian zapalnych w tętnicach, a więc dysfunkcja śródbłonna jest wywołana lokalnie obecnością miażdżycy [Bonthu, 97; Crauwels, 03; Wang, 00]. Również aktywacja prozapalna krążących płytek krwi, przede wszystkim ekspresja błonowych białek zapalnych, nie jest tak jednomyślnie udokumentowana w genetycznej mysiej hipercholesterolemii [Kobayashi, 04; Li, 08; Wilson, 07] jak u pacjentów czy w modelach hipercholesterolemii wywołanej dietą [Tailor, 03]. Tak więc, obecność elementarnych patofizjologicznych efektów ludzkiej hipercholesterolemii, dysfunkcji śródbłonna i prozapalnej aktywacji krążących płytek krwi, a także ich rola w rozwoju miażdżycy w mysich modelach genetycznej hipercholesterolemii, nie jest jak dotąd jednoznacznie ustalona. Podobnie, pomimo wielu prac wykorzystujących genetyczne modele hipercholesterolemii do badania mechanizmów molekularnych miażdżycy, wciąż nie opisano szczegółowo przebiegu zmian czynności śródbłonkowej PGI₂ i adenozyliny, które towarzyszą zmianom aktywności NO w toku rozwoju miażdżycy w tych modelach [Pratico, 00; Belton, 00]. Ponadto, większość prac dotyczących dysfunkcji śródbłonna u myszy z miażdżycą dotyczy aorty lub innych naczyń typu przewodzącego (np. tętnicy szyjnej) i niewiele jest prac, które analizują rozwój dysfunkcji śródbłonna w krążeniu wieńcowym [Godecke, 02; Lamping, 99], która jest kluczowa dla rozwoju objawów niedokrwiennej choroby serca.

CEL PRACY

Dysfunkcja śródbłonna, upośledzenie czynności biologicznej NO i aktywacja płytek krwi są uważane za kluczowe elementy patomechanizmu zapalenia ściany naczynia i rozwoju blaszki miażdżycowej w hipercholesterolemii. Zmiany czynności śródbłonna w toku rozwoju miażdżycowej dysfunkcji śródbłonna w krążeniu wieńcowym nie polegają jedynie na upośledzeniu czynności biologicznej NO i aktywacji prozakrzepowych i prozapalnych mechanizmów śródbłonna. W odpowiedzi na czynniki uszkodzające śródbłonek może również uruchamiać mechanizmy kompensacyjne i przeciwmiażdżycowe.

NO, PGI₂ i adenozyne to trzy najważniejsze przekąźniki śródbłonne o działaniu przeciwplatekowym i ich łączna aktywność biologiczna reguluje czynność krążenia wieńcowego oraz powstrzymuje prozapalną i prozakrzepową aktywność krążących płytek krwi.

Celem tej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie zmian aktywności biologicznej tych trzech głównych przeciwplatekowych mechanizmów śródbłonna wieńcowego w mysim modelu hipercholesterolemii i miażdżycy (myszy apoE/LDLR^{-/-}), poszukując zmian adaptacyjnych i kompensacyjnych w aktywności tych przekąźników, wyprzedzających lub towarzyszących rozwojowi blaszek miażdżycowych oraz zmian o charakterze niewydolnościowym, które przyczyniają się do aktywacji płytek krwi, rozwoju zapalenia ściany naczynia i powstawania blaszek miażdżycowych.

Aktywność biologiczna przekąźników śródbłonna w krążeniu wieńcowym (NO, PGI₂ oraz adenozyne) była badana w modelu izolowanego serca myszy w oparciu o analizę wielkości odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od NO, PGI₂ lub adenozyne i uzupełniona była o pomiary biochemiczne (stężenia metabolitów PGI₂ i adenozyne w efluencie z krążenia wieńcowego). Punktem odniesienia dla oceny zmian czynności wydzielniczej śródbłonna naczyń wieńcowych była z jednej strony ocena aktywności płytek krwi, nasilenia odpowiedzi ostrej fazy oraz dysfunkcji śródbłonna w krążeniu systemowym na podstawie spoziom nitrozylohemoglobiny w erytrocytach (HbNO), a z drugiej ocena progresji zmian miażdżycowych w naczyniach krążenia wieńcowego.

Ważnym uzupełnieniem przedstawionej pracy była pośrednia ocena wydolności śródbłonnek mechanizmów regulacji krążenia wieńcowego, która polegała na zbadaniu wydolności wysiłkowej myszy ApoE/LDLR^{-/-}.

MATERIAŁY i METODY

ZWIERZĘTA

Badania przeprowadzono u myszy szczepu C57Bl/6 pozbawionych genów dla apolipoproteiny E oraz receptora dla LDL (myszy apoE/LDLR^{-/-}) obu płci w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy. Jako zwierzęta kontrolne służyły myszy C57Bl/6 w podobnym wieku (myszy apoE/LDLR^{+/+}). Zwierzęta karmiono standardową dietą laboratoryjną i pojocono wodą *ad libitum*.

MIKROSKOPOWA OCENA MIAŻDŻYCY W NACZYNIACH WIEŃCOWYCH

W celu uwidocznienia blaszek miażdżycowych w proksymalnej aorticie i pniach tętnic wieńcowych przekroje proksymalnej aorty z ujściami tętnic wieńcowych barwiono histologicznie w Katedrze Histologii CM UJ. Serca z aortą wstępującą były wycinane i zamrażane. Przekroje (grubości 10 µm) proksymalnego 1 mm aorty z ujściami tętnic wieńcowych był seryjnie wycinane i utrwalane w 4% formaldehydzie, a następnie barwione hematoksyliną i oil red-O (Sigma Aldrich, USA). Preparaty oceniano w mikroskopie Olympus BX50. Zdjęcia preparatów wykonano aparatem cyfrowym Camedia 5050.

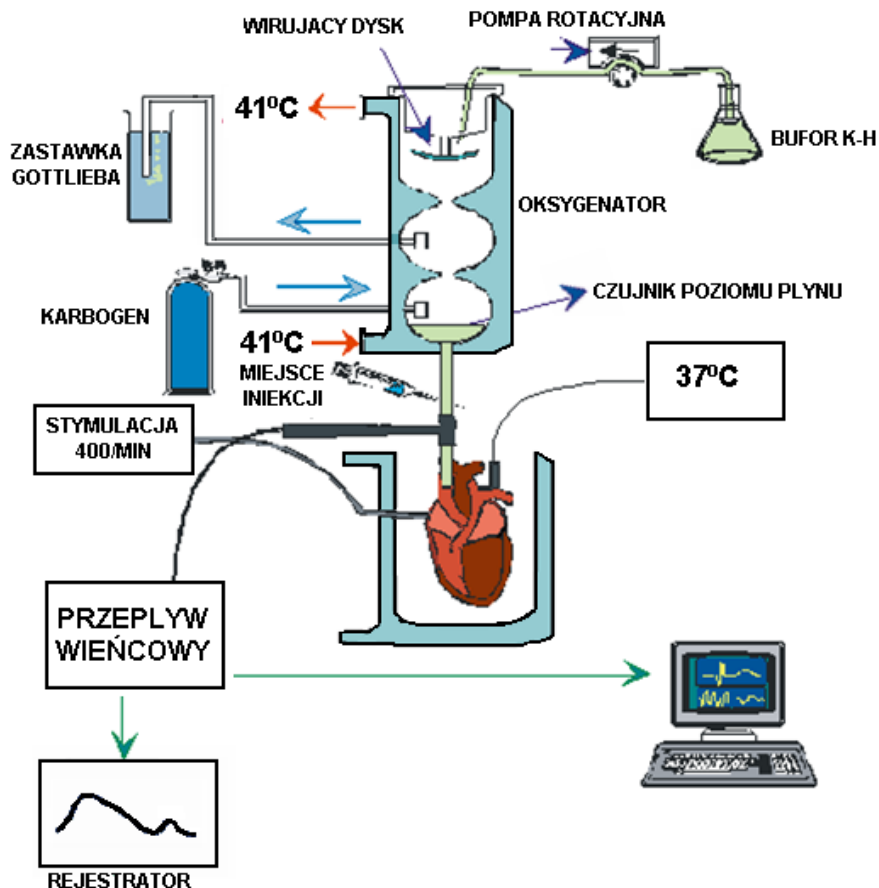
BADANIA W MODELU IZOLOWANEGO SERCA MYSZY

Czynność naczyń wieńcowych oceniano w modelu izolowanego serca myszy perfundowanego wstecznie przez aortę wg Langendorffa.

Aparat Langendorffa

Schemat aparatu Langendorffa (Hugo Sachs Elektronik, HSE) przedstawiono na **ryc. 1**. Do perfuzji izolowanego serca używano zmodyfikowanego buforu Krebsa-Henseleita o składzie (w mM): NaCl 118.0, CaCl₂ 2.52, KCl 4.7, MgSO₄ 1.64, NaHCO₃ 24.88, KH₂PO₄ 1.18, glukoza 10.0, pirogronian sodu 2.0, EDTA 0.5, natlenowanego w oksygenatorze aparatu Langendorffa gazem o składzie: 5% CO₂ i 95% O₂ (karbogen). Ciśnienie karbogenu w oksygenatorze było regulowane zastawką Gottlieba. Mikropompa (precision microgear pump MP-11) tłoczyła bufor Krebsa-Henseleita na wirujący dysk, który rozpryskiwał bufor po szklanych ściankach oksygenatora. Układ ten zapewniał maksymalne natlenowanie buforu do 600-700 mm Hg ciśnienia parcjalnego tlenu. Ciśnienie perfuzyjne serca było sumą ciśnienia karbogenu i ciśnienia słupa buforu Krebsa-Henseleita ponad końcową kaniulą (10 mmHg), a

jego wartość regulowano zmieniając ciśnienie wywierane przez karbogen wewnątrz oksygenatora. Ciśnienie perfuzyjne w czasie eksperymentu wynosiło 90 mmHg. Stały poziom buforu Krebsa-Henseleita regulował czujnik elektroniczny (LLC, HSE) uruchamiający w miarę potrzeby mikropompę, która dopompowywała bufor do oksygenatora. Temperaturę oksygenatora, utrzymywaną przez termostat, ustalano na 41°C, co pozwalało na utrzymanie temperatury serca na poziomie 37°C.



Rycina 1. Schemat zmodyfikowanego aparatu Langendorffa do perfuzji izolowanego serca myszy.

Metoda izolacji serca

Myszy o wadze 12-35 g usypiano przez dootrzewnowe wstrzyknięcie tiopentalu ($100 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$), a następnie zabijano przez zerwanie rdzenia kręgowego. Natychmiast po zabiciu otwierano klatkę piersiową, wycinano serce razem z otaczającymi tkankami i umieszczano w zimnej (4°C) soli fizjologicznej. Następnie preparowano aortę wstępującą, kaniulowano i zawieszano serce w aparacie Langendorffa. Po przywróceniu przepływu wieńcowego usuwano otaczające tkanki i osierdzie oraz rozcinano tętnicę płucną w celu ułatwienia odpływu buforu Krebsa-Henseleita z prawej komory serca. Do prawego przedsionka wbijano

dwie platynowe elektrody połączone ze stymulatorem (HSE). Serce stymulowano z częstością 400 impulsy / min, falą prostokątną o amplitudzie 1 V i czasie trwania pojedynczego impulsu 2.2 ms. Eksperyment rozpoczynano po ok. 20 min (okres stabilizacji przepływu wieńcowego) od kaniulacji aorty i rozpoczęcia perfuzji naczyń wieńcowych wstecznie przez aortę.

Parametry perfuzji i stymulacji elektrycznej izolowanego serca ustawiono tak, by były jak najbardziej zbliżone do wartości fizjologicznych myszy i zapewniały optymalne warunki eksperymentalne. Taki dobór parametrów układu Langendorffa zapewniał stabilne odpowiedzi naczyń wieńcowych przez ok. 3 - 3,5 godziny. Czas trwania doświadczeń na izolowanym sercu nie przekraczał 2 godzin.

Rejestracja czynności izolowanego serca

W trakcie eksperymentu w sposób ciągły rejestrowano przepływ wieńcowy przy użyciu ultrasonograficznego przepływomierza (Transit Time Flowmeter TTFM Type 700, HSE). Do rejestracji i opracowania danych zbieranych przez zestaw wzmacniaczy aparatu Langendorffa (HSE) używano programu komputerowego PSCF firmy Igel (Przedsiębiorstwo Elektroniki Profesjonalnej IGEL, Zabrze). Program PSCF oprócz bezpośredniego pomiaru przepływu wieńcowego umożliwia również obliczanie średniego, chwilowego i maksymalnego przepływu wieńcowego oraz pola powierzchni pod krzywą zależności przepływu wieńcowego od czasu. W celu uwzględnienia różnic w masie serc, podstawowy przepływ wieńcowy oraz wzrost przepływu wieńcowego, zarejestrowany w czasie eksperymentu, był dzielony przez masę komór serca zważoną po eksperymencie i przedstawiany w postaci $\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$.

Badanie odpowiedzi naczyniorozszerzających krążenia wieńcowego izolowanego serca myszy

W badaniach czynności naczyń wieńcowych myszy przeprowadzanych w układzie Langendorffa stosowano następujące substancje naczyniorozszerzające, podawane w bolusie bezpośrednio do kaniuli łączącej oksygenator z aortą: adenozyne, AMP, ADP, ATP (w dawkach 0.1, 0.3 i 1.0 nmoli), bradykininę (Bk), nitroprusydek sodu (SNP), S-nitrozo-N-penicylaminę (SNAP), 1,1-dietyl-2-hydroksy-2-nitrozo-hydrazyna (DEA/NO) (w dawkach 0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmoli). Ze względu na przedłużony rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez acetylocholinę (Ach) podawano tylko jedną dawkę (0.3 nmole). W celu badania roli NO, PGI₂ oraz przemian autakoidów adenozynowych w czynności naczyniorozszerzającej krążenia wieńcowego myszy dodawano do buforu Krebsa-Henseleita

inhibitory o następujących stężeniach: inhibitor syntazy NO; L-NAME 500 μM , nieselektywny inhibitor COX-1 i COX-2; indometacyna 1 μM , wybiórczy inhibitor cyklooksygenazy-2 (COX-2); rofekoksyb 10 μM , inhibitor cyklazy guanylowej (sGC); ODQ 10 μM , inhibitor receptorów P1; 8-p-sulfofenyloteofilina (SPT) 50 μM .

Wszystkie doświadczenia wykonywano wg następującego schematu: po okresie stabilizacji przepływu wieńcowego zamykano przepływ wieńcowy na 30 sekund, wywołując reaktywną hiperemię (Rh 30), następnie wywoływano odpowiedzi naczyniorozszerzające podając bradykininę (Bk), acetylocholinę (Ach), adenozyne, AMP, ADP, ATP lub NO-donory: nitroprusydek sodu (SNP), SNAP lub DEA/NO, tak by każde doświadczenie obejmowało maksymalnie trzy odpowiedzi naczyniorozszerzające różnego typu. Następnie do buforu perfuzyjnego dodawano jeden z inhibitorów. Po 20 minutach, potrzebnych do zablokowania enzymów lub receptorów, powtarzano reaktywną hiperemię oraz wszystkie odpowiedzi naczyniorozszerzające wywoływane w danym doświadczeniu.

BADANIA BIOCHEMICZNE EFLUENTU SERCOWEGO

Badanie poziomu 6-keto-PGF_{1 α} w efluencie sercowym

Podstawowe wytwarzanie PGI₂ w krążeniu wieńcowym badano mierząc poziom jej stabilnego metabolitu, 6-keto-PGF_{1 α} , w efluencie sercowym. Efluent w ilości ok. 300 μL pobierano na początku eksperymentu po ustabilizowaniu przepływu wieńcowego. W celu zbadania stymulowanego wytwarzania PGI₂, efluent pobierano również na szczycie rozkurczu wieńcowego wywołanego przez podanie 0.3 nmol acetylocholino. Podstawowe i stymulowane wytwarzanie PGI₂ w krążeniu wieńcowym była badane również w obecności inhibitorów COX, indometacyny (nieselektywny inhibitor COX-1 i COX-2) i rofekoksybu (wybiórczy inhibitor COX-2). Natychmiast po pobraniu, próbki efluentu były zamrażane w -80°C i tak przechowywane do czasu oznaczenia. Poziom 6-keto-PGF_{1 α} oznaczano metodą ELISA przy użyciu komercyjnie dostępnych kitów (Assay Designs, USA). Wyniki przedstawiono jako ng/ml x ml/min, uwzględniając wielkość przepływu wieńcowego w czasie pobierania efluentu.

Badanie poziomu AMP, adenozyiny i inozyiny w efluencie sercowym

Produkcję AMP, adenozyiny i inozyiny w krążeniu wieńcowym badano mierząc ich poziom w efluencie sercowym po dosercowym podaniu adenozyiny, AMP lub ADP. Efluent w ilości ok. 300 μL pobierano w czasie wzrostu przepływu wieńcowego wywołanego przez

adenozynę, AMP i ADP. Natychmiast po pobraniu, próbki efluentu były zamrażane w -80°C i tak przechowywane do czasu oznaczenia. Poziom AMP, adenozyne i inozyne po dosercowym podaniu AMP i ADP oznaczano przy użyciu chromatografii płynowej wysokiej precyzji (HPLC). Poziom adenozyne po dosercowym podaniu adenozyne oznaczano metodą spektrometrii masowej. Analizę przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, według opracowanej wcześniej metodyki [Smolenski, 94; Kalsi, 03]. Wyniki przedstawiono jako nM x ml/min, uwzględniając zmianę przepływu wieńcowego wywołaną przez podanie agonisty. Przedstawiono również stosunki stężeń AMP/adenozyne oraz adenozyne/inozyne w efluencie sercowym po podaniu AMP, co odzwierciedla aktywność odpowiednio CD73 oraz deaminazy adenozyne.

BADANIA BIOCHEMICZNE OSOCZA

Badanie stężenia sCD40L

W celu oceny aktywacji krążących płytek krwi oznaczano w osoczu stężenie rozpuszczonej formy ligandu CD40 (sCD40L). Przez nakłucie żyły głównej dolnej pobierano krew do strzykawki z 3.2% cytrynianem sodu (9:1 v/v). Krew wirowano (1000 x g przez 5 min), osocze było zamrażane w -80°C i tak przechowywane do czasu oznaczenia. Stężenie sCD40L oznaczano metodą ELISA przy użyciu komercyjnie dostępnych kitów zgodnie z zaleceniami producenta (Bender MedSystems, Austria). Wyniki przedstawiono jako ng/ml.

Badanie stężenia SAA

W celu oceny odpowiedzi ostrej fazy badano w osoczu stężenie białka ostrej fazy, SAA (*ang. serum amyloid A*). Przez nakłucie żyły głównej dolnej pobierano krew do strzykawki z 3.2% cytrynianem sodu (9:1 v/v). Krew wirowano (1000 x g przez 5 min), osocze było zamrażane w -80°C i tak przechowywane do czasu oznaczenia. Stężenie SAA oznaczano metodą ELISA przy użyciu komercyjnie dostępnych kitów zgodnie z zaleceniami producenta (Invitrogen, USA). Wyniki przedstawiono jako $\mu\text{g/ml}$.

Badanie stężenia 6-keto-PGF_{1 α} oraz próba wysiłkowa

W celu oceny systemowego śródbłonkowego wytwarzania PGI₂ badano stężenie jej stabilnego metabolitu, 6-keto-PGF_{1 α} , w osoczu. Stężenie 6-keto-PGF_{1 α} , w osoczu badano w warunkach spoczynku oraz po próbie wysiłkowej by ocenić wydolność śródbłonkowych mechanizmów przeciwplatekcyjnych w toku wysiłku fizycznego. Myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy oraz myszy kontrolne w wieku 2 miesięcy poddane zostały wysiłkowi

fizycznemu poprzez pływanie w pojemniku z wodą (32° C) wg następującego protokołu: 1 dzień - 10 min. pływania, 2 dzień - 20 min, 3 dzień - przerwa, 4 dzień - 90 min. Natychmiast po ukończeniu ostatniej sesji pływania, zwierzęta usypiano przez dootrzewnowe podanie tiopentalu (100 mg x kg⁻¹) i przez nakłucie żyły głównej dolnej pobierano krew do strzykawki z 3.2% cytrynianem sodu (9:1 v/v). Krew wirowano (1000 x g przez 5 min), osocze było zamrażane w -80⁰C i tak przechowywane do czasu oznaczenia. Stężenie 6-keto-PG9F_{1α} oznaczano metodą ELISA przy użyciu komercyjnie dostępnych kitów zgodnie z zaleceniami producenta (Assay Designs, USA). Wyniki przedstawiono jako ng/ml.

BADANIE POZIOMU NITROZYLHEMOGLOBINY (HbNO) W ERYTROCYTACH

W celu oceny systemowego śródbłonkowego wytwarzania NO badano poziom nitrozyłhemoglobiny (HbNO) w erytrocytach metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Analizę przeprowadzono w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (Pracownia Radiospektroskopowych Metod Badań Struktury i Dynamiki Biocząsteczek kierowana przez prof. dr hab. W. Froncisz). Po uśpieniu myszy, przez nakłucie żyły głównej dolnej pobierano krew do strzykawki z 3.2% cytrynianem sodu (9:1 v/v). Krew wirowano (1000 g przez 5 min), supernatant oddzielano, pozostałą zawiesinę erytrocytów zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80⁰C do czasu oznaczenia. Pomiary widm EPR wykonywano przy użyciu spektrometru ELEXSYS E-580 (Bruker, Niemcy) w paśmie X w temperaturze ciekłego azotu. Analizę widm EPR przeprowadzono przy użyciu oprogramowania OriginPro 8 (OriginLab Corp, USA). Widmo EPR erytrocytów jest charakterystycznym obrazem 3 pików, które tworzą widma odpowiednio ceruloplazminy, nitrozyłhemoglobiny oraz wolnych rodników, a stężenie HbNO jest wprost proporcjonalne do amplitudy sygnału drugiego pików widma EPR erytrocytów [Dikalov, 05; Fink, 06] (**ryc. 25A**). Wyniki przedstawiono jako amplitudę sygnału drugiego pików widma EPR.

BADANIA EKSPRESJI BIAŁEK BŁONOWYCH KRAŻĄCYCH PŁYTEK KRWI

W celu oceny aktywacji krążących płytek krwi oznaczano błonową ekspresję selektyny P, ligandu CD40 (CD40L) oraz aktywowanej glikoproteiny GPIIb-IIIa (aGPIIb-IIIa). Analizę przeprowadzono w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Przez nakłucie żyły głównej dolnej pobierano krew do strzykawki z 3.2% cytrynianem sodu (9:1 v/v). Krew rozcieńczano 4 x w zmodyfikowanym buforze Tyrode'a (o składzie 134 mM NaCl; 0.34 mM Na₂HPO₄; 2.9 KCl; 12 mM NaHCO₃; 20 mM

HEPES, 5 mM glukoza, 0.35% BSA) i utrwalano w 1% roztworze CellFix (Beckton-Dickinson, USA). Następnie płytki były inkubowane z następującymi przeciwciałami: przeciw selektynie P (CD62P) znakowanymi izotiocyanianem fluoresceiny (FITC); przeciw CD40L znakowanymi faszfatydyloetanoliną (PE) lub przeciw aGPIIb-IIIa znakowanymi PE (w tym ostatnim przypadku płytki znajdowały się w buforze zawierającym 1 mM wapnia). Wszystkie przeciwciała zakupiono w Beckton-Dickinson. Płytki we krwi pełnej bramkowano w oparciu o odpowiednią fluorescencję przeciwciał przeciw CD41 (CD41 FITC lub CD41 PE). Fluorescencja płytek była mierzona przy użyciu cytometru przepływowego BD LSR II (Beckton-Dickinson, USA). Wyniki przedstawiono jako odsetek płytek wykazujących fluorescencję odpowiednich przeciwciał przeciw selektynie P, CD40L lub aGPIIb-IIIa.

OZNACZANIE STĘŻENIA CHOLESTEROLU I TRÓJGLICERYDÓW W OSOCZU

W celu potwierdzenia obecności zaburzeń gospodarki lipidowej u myszy apoE/LDLR^{-/-} oznaczono poziom całkowitego cholesterolu i trójglicerydów w osoczu. Krew pobrano przez nakłucie żyły głównej dolnej, osocze oddzielono poprzez wirowanie 1000×g przez 5 min w temp. 4°C. Poziom całkowitego cholesterolu i trójglicerydów oznaczano metodą fotometryczną przy użyciu analizatora biochemicznego REFLOVET PLUS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy) i komercyjnie dostępnych pasków Reflotron (Roche Diagnostics GmbH).

ODCZYNNIKI

W niniejszej pracy stosowano następujące odczynniki chemiczne: adenozyina (Ado), adenozyinomonofosforan (AMP), adenozynodifosforan (ADP), adenozynotrifosforan (ATP), bradykinina (Bk), acetylocholina (Ach), nitroprusydek sodu (SNP), DEA/NO, N^ω-nitro-L-arginina (L-NAME), indometacyna (Indo), SPT, ODQ, wszystkie zakupione w Sigma Chemical Company (St. Luis, USA). Rofekoksyb (Vioxx) był darem od firmy MSD a S-nitrozo-N-penicylamina (SNAP) została zsyntetyzowana w Katedrze Farmakologii CMUJ. Indo rozpuszczano w 5% roztworze NaHCO₃, rofekoksyb w DMSO a DEA/NO w 0.01 M NaOH. Pozostałe odczynniki rozpuszczano w soli fizjologicznej. W czasie doświadczenia roztwory SNAP, SNP i DEA/NO przechowywano w temperaturze 4°C w ciemnych pojemnikach. Wszystkie roztwory przygotowywano *ex tempore*.

Substancje wazoaktywne podawano w postaci jednorazowych wstrzyknięć (bolusów) o stałej objętości 10 µl stosując mikrostrzykawkę Hamilton firmy Sigma-Aldrich. L-NAME,

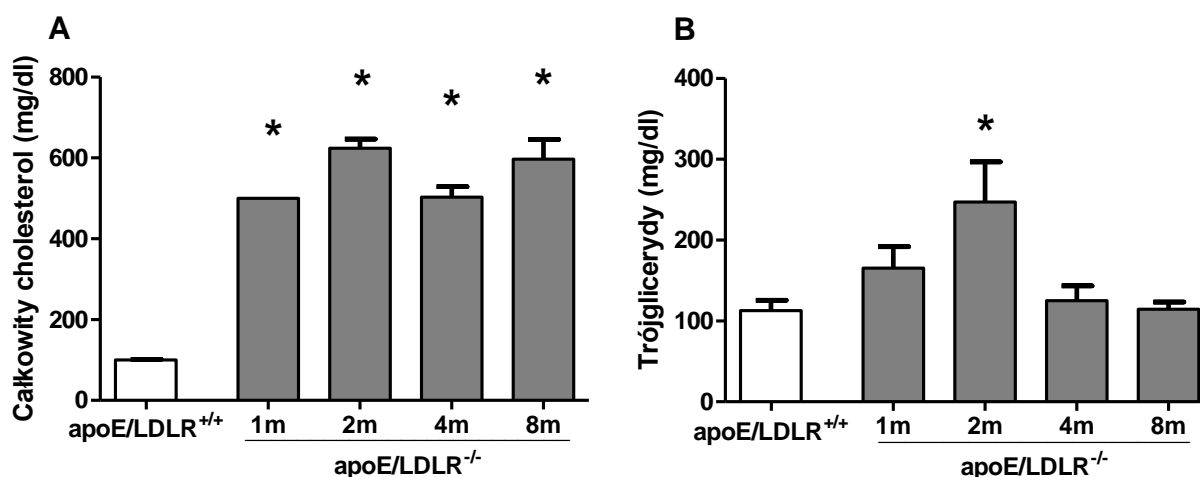
indometacynę, rofekoksyb, SPT i ODQ dodawano do buforu perfuzyjnego Krebsa-Henseleita w takiej ilości, by osiągnąć odpowiednie stężenia końcowe w perfundowanym sercu.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Dane z doświadczeń przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm błąd standardowy średniej. Analizując dane zebrane w trakcie jednego doświadczenia (np. przed i po podaniu inhibitora) stosowano test t Studenta dla par wiązanych. Porównując dane z różnych doświadczeń stosowano jednoczynnikową lub wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz *post hoc* test Tukey'a. Za różnice znamienne statystycznie przyjmowano te dla których $p < 0.05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism (wersja 5).

WYNIKI**ROZWÓJ HIPERCHOLESTEROLEMII U MYSZY apoE/LDLR^{-/-}**

Już u jednomiesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} stężenie całkowitego cholesterolu było podwyższone. Całkowita cholesterolemia była znacznie większa również u starszych myszy apoE/LDLR^{-/-} w porównaniu do myszy kontrolnych (502.1±2.1, 624.3±22.8, 503.0±26.2, 597.0±48.5 vs 100.3±1.3 mg/dl odpowiednio dla apoE/LDLR^{-/-} 1, 2, 4, 8 miesięcy i apoE/LDLR^{+/+} 2 miesiące) (**ryc. 2A**). W przeciwieństwie do tak wysokiego stężenia cholesterolu całkowitego, stężenie trójglicerydów było podwyższone w niewielkim stopniu u myszy apoE/LDLR^{-/-}. Trójglicerydemia była znacznie większa tylko u 2 miesięcznych apoE/LDLR^{-/-} w porównaniu do myszy kontrolnych (165.5±26.3, 247.3±49.6, 125.3±18.3, 114.5±8.84 vs 112.8±12.7 mg/dl odpowiednio dla apoE/LDLR^{-/-} 1, 2, 4, 8 miesięcy i apoE/LDLR^{+/+} 2 miesiące)(**ryc. 2B**).



Rycina 2. Całkowita cholesterolemia i trójglicerydemia u myszy apoE/LDLR^{-/-} i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+}.

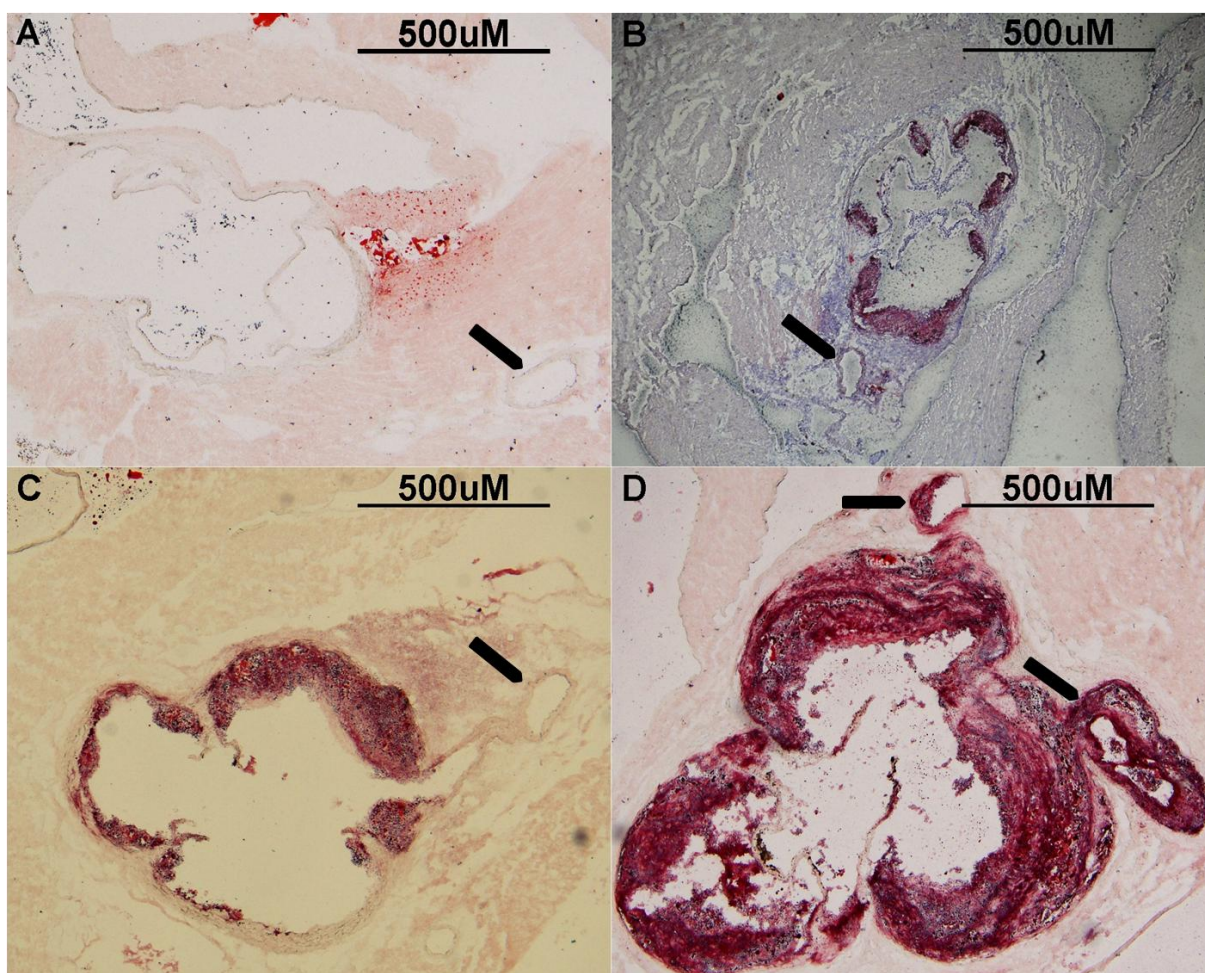
Całkowita cholesterolemia (n=3-4, panel A) i trójglicerydemia (n=3-4, panel B) u myszy apoE/LDLR^{-/-} i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+}. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

* oznacza p < 0.05 apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel A)

* oznacza p < 0.05 apoE/LDLR^{-/-} 2 mies. vs apoE/LDLR^{-/-} 4, 8 mies. i apoE/LDLR^{+/+} (panel B)

ROZWÓJ MIAŻDŻYCY U MYSZY $apoE/LDLR^{-/-}$

U myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 2 miesięcy nie stwierdzono w mikroskopii optycznej zmian miażdżycowych w proksymalnej aorticie i tętnicach wieńcowych po barwieniu Oil Red-O (ryc. 3A). W preparatach mikroskopowych serc 4 miesięcznych myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ zmiany miażdżycowe obserwowano w proksymalnej aorticie, ale nie w tętnicach wieńcowych (ryc. 3B, C). Natomiast u myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 8 miesięcy zmiany miażdżycowe widoczne były zarówno w aorticie, jak i proksymalnych odcinkach tętnic wieńcowych (ryc. 3D).



Rycina 3. Mikroskopowa ocena zmian miażdżycowych w aorticie i tętnicach wieńcowych myszy $apoE/LDLR^{-/-}$.

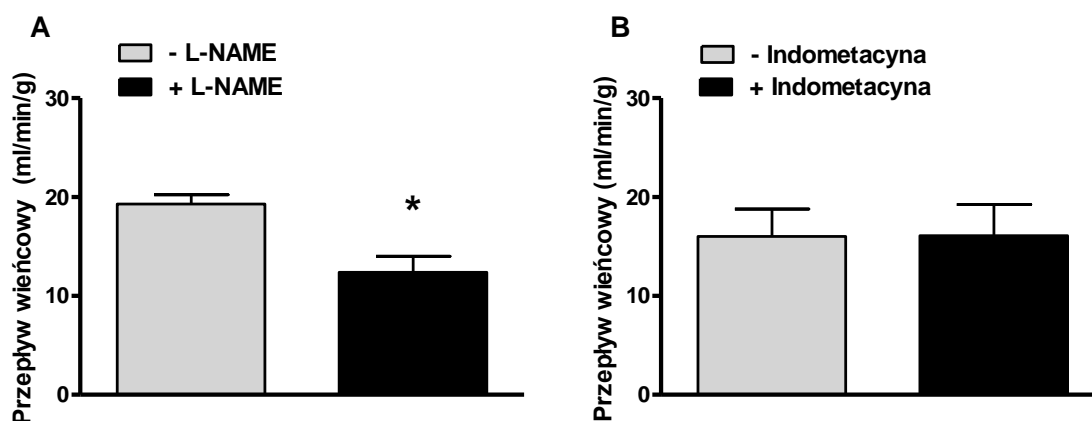
Reprezentatywne zdjęcia preparatów w mikroskopii optycznej przedstawiające przekroje poprzeczne przez proksymalny odcinek korzenia aorty i tętnic wieńcowych myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 2 (A), 4 (B, C) i 8 (D) miesięcy (barwienie Oil Red-O). Strzałką zaznaczono tętnice wieńcowe.

CHARAKTERYSTYKA ODPOWIEDZI NACZYNIOROSZERZAJĄCYCH W MODELU IZOLOWANEGO SERCA MYSZY KONTROLNYCH apoE/LDLR^{+/+}

W pierwszym etapie doświadczeń scharakteryzowano odpowiedzi naczyńrozszerzające krążenia wieńcowego w modelu izolowanego serca u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+}. Uzyskane wyniki były punktem odniesienia dla charakterystyki czynności śródbłonka wieńcowego u myszy apoE/LDLR^{-/-} w toku rozwoju miażdżycy.

Podstawowy przepływ wieńcowy

Podstawowy przepływ wieńcowy w izolowanym sercu myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} był znacząco zmniejszony przez L-NAME [500μM] o 36% (**ryc. 4A**), natomiast indometacyna [1μM] pozostawała bez wpływu na wielkość podstawowego przepływu wieńcowego (**ryc. 4B**). Zatem podstawowy przepływ wieńcowy w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{+/+} był zależny od uwalniania śródbłonkowego NO, ale nie śródbłonkowej PGI₂.



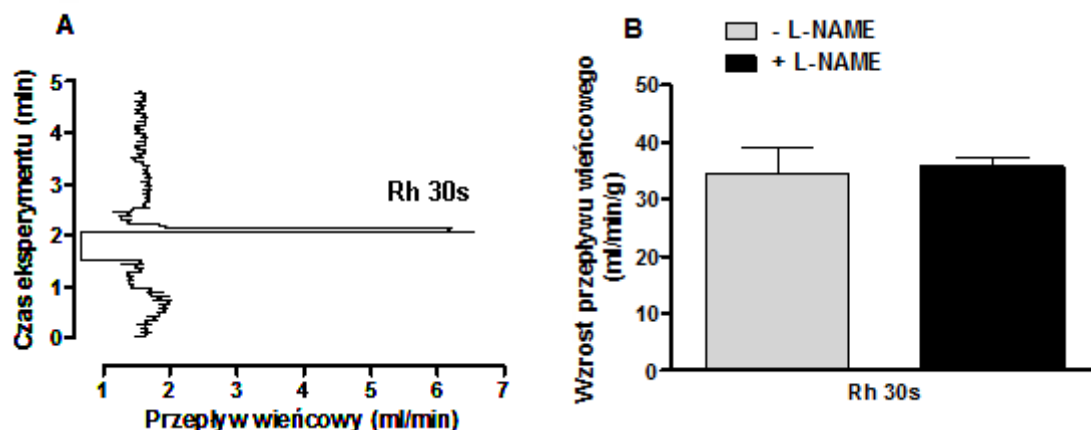
Rycina 4. Wpływ L-NAME i indometacyny na podstawowy przepływ wieńcowy w izolowanym sercu myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+}. Wpływ L-NAME [500 μM] (n=6-21, panel A) i indometacyny [1 μM] (n=5, panel B) na podstawowy przepływ wieńcowy u myszy apoE/LDLR^{+/+}.

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

* oznacza p < 0.05 w obecności L-NAME vs bez L-NAME

Reaktywna hiperemia

Reaktywna hiperemia wywołana 30s zamknięciem perfuzji wieńcowej (RH30s) była krótkotrwała (ok. 1 min)(**ryc. 5A**), a dodanie L-NAME [500μM] nie wpływało na wielkość tej odpowiedzi (**ryc. 5B**). Zatem reaktywna hiperemia wywołana przez 30s zamknięcie przepływu wieńcowego w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{+/+} nie była zależna od NO.



Rycina 5. Reaktywna hiperemia w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{+/+}.

Reprezentatywny zapis reaktywnej hiperemii wywołanej przez 30s zamknięcie perfuzji wieńcowej w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A); Wpływ L-NAME [500 μM] na wielkość reaktywnej hiperemii w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{+/+} (n=6, panel B).

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

Charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od śródbłonkowego NO oraz wywołanych przez donory NO

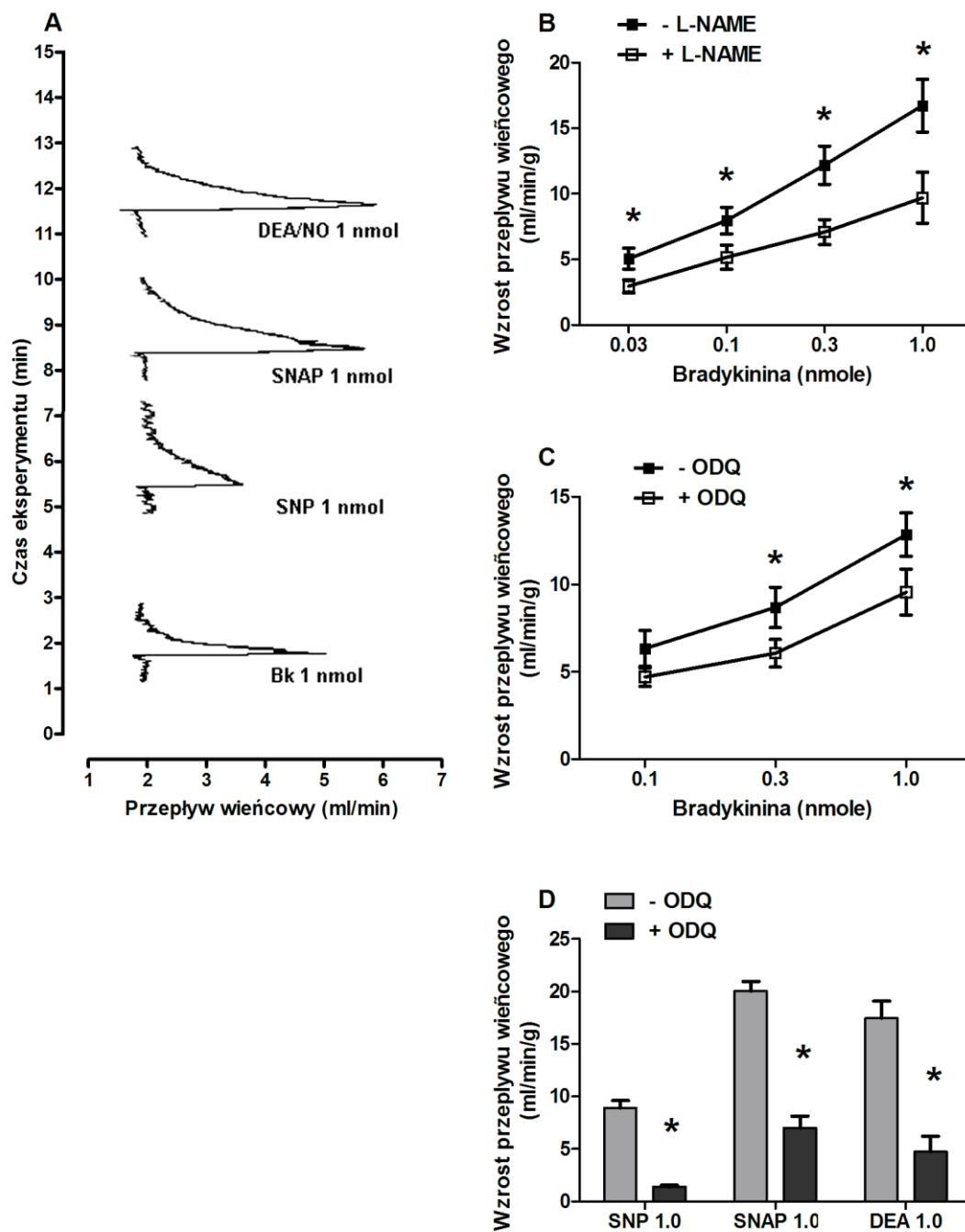
W celu scharakteryzowania śródbłonkowej produkcji NO w krążeniu wieńcowym izolowanego serca myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} śródbłonkowo-zależną odpowiedź naczyniorozszerzającą wywoływano przez podawanie Bk (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmoli). Bolus Bk (1 nmol) wywoływał krótkotrwały (ok. 1 min) wzrost przepływu wieńcowego (**ryc. 6A**), hamowany w 42% przez L-NAME [500 μM] i w 25% przez selektywny inhibitor rozpuszczalnej cyklazy guanylowej, ODQ [5 μM]. Zatem odpowiedź wywoływana przez Bk była częściowo zależna odpowiednio od uwalniania śródbłonkowego NO i aktywacji rozpuszczalnej cyklazy guanylowej, sGC (**ryc. 6B, 6C**).

W celu scharakteryzowania odpowiedzi naczyniorozszerzających wywoływanych przez egzogenne NO stosowano NO-donory o różnym mechanizmie uwalniania NO: SNP, SNAP oraz DEA/NO. ODQ [5 μM] hamował efekt SNP, SNAP i DEA/NO odpowiednio w 85, 65 i 73%. Odpowiedzi wywołane przez NO-donory były więc zależne głównie od aktywacji sGC. (**ryc. 6D**).

Czynnościowa i biochemiczna charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez acetylocholinę

W celu scharakteryzowania śródbłonkowej produkcji PGI₂ w krążeniu wieńcowym myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} analizowano śródbłonkowo-zależną odpowiedź

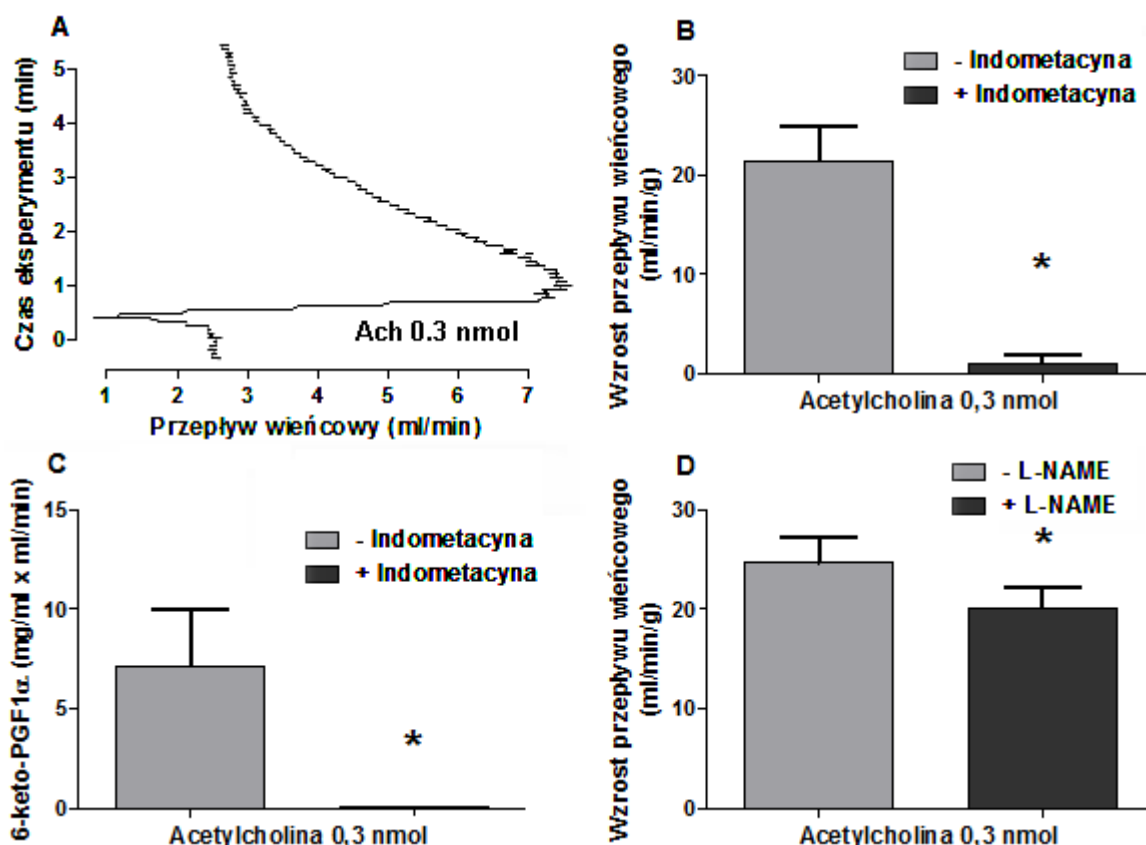
naczyniorozszerzającą wywołaną przez Ach (0.3 nmole). Bolus Ach wywoływał 2 fazową odpowiedź złożoną z początkowego krótkotrwałego spadku, a następnie długotrwałego (trwającego 6-10 min.) wzrostu przepływu wieńcowego (**ryc. 7A**), któremu towarzyszył wzrost stężenia 6-keto-PGF_{1α} w efluencie sercowym. Indometacyna [1 μM], nieselektywny inhibitor cyklooksygenaz, prawie całkowicie hamowała wzrost przepływu wieńcowego (z 21.4±3.57 do 1.1±0.80 ml/min/g) i całkowicie hamowała wzrost poziomu 6-keto-PGF_{1α} w efluencie sercowym (z 7139±2889 do 16.33±2.22 ng/ml x ml/min) wywołany przez Ach, co jest dowodem na udział śródbłonkowej PGI₂ w naczyniorozszerzającym działaniu Ach (**ryc. 7 B, C**). W obecności L-NAME [500 μM], odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez Ach była zahamowana tylko w niewielkim stopniu (z 21.4±3.57 do 20.17±2.13 ml/min/g), co może świadczyć o permissyjnym wpływie NO na rozkurcz naczyń zależny od PGI₂ (**ryc. 7 D**).



Rycina 6. Odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od NO w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{+/+}. Reprezentatywne zapisy odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez bolus 1 nmol Bk, SNP, SNAP i DEA/NO (panel A); wpływ L-NAME [500 μ M] (n=6, panel B) oraz ODQ [5 μ M] (n=6, panel C) na wzrost przepływu wieńcowego wywołanego przez Bk; wpływ ODQ [5 μ M] na wzrost przepływu wieńcowego wywołanego przez SNP, SNAP i DEA/NO (n=2-6, panel D).

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM.

* oznacza $p < 0.05$ w obecności inhibitora vs bez inhibitora



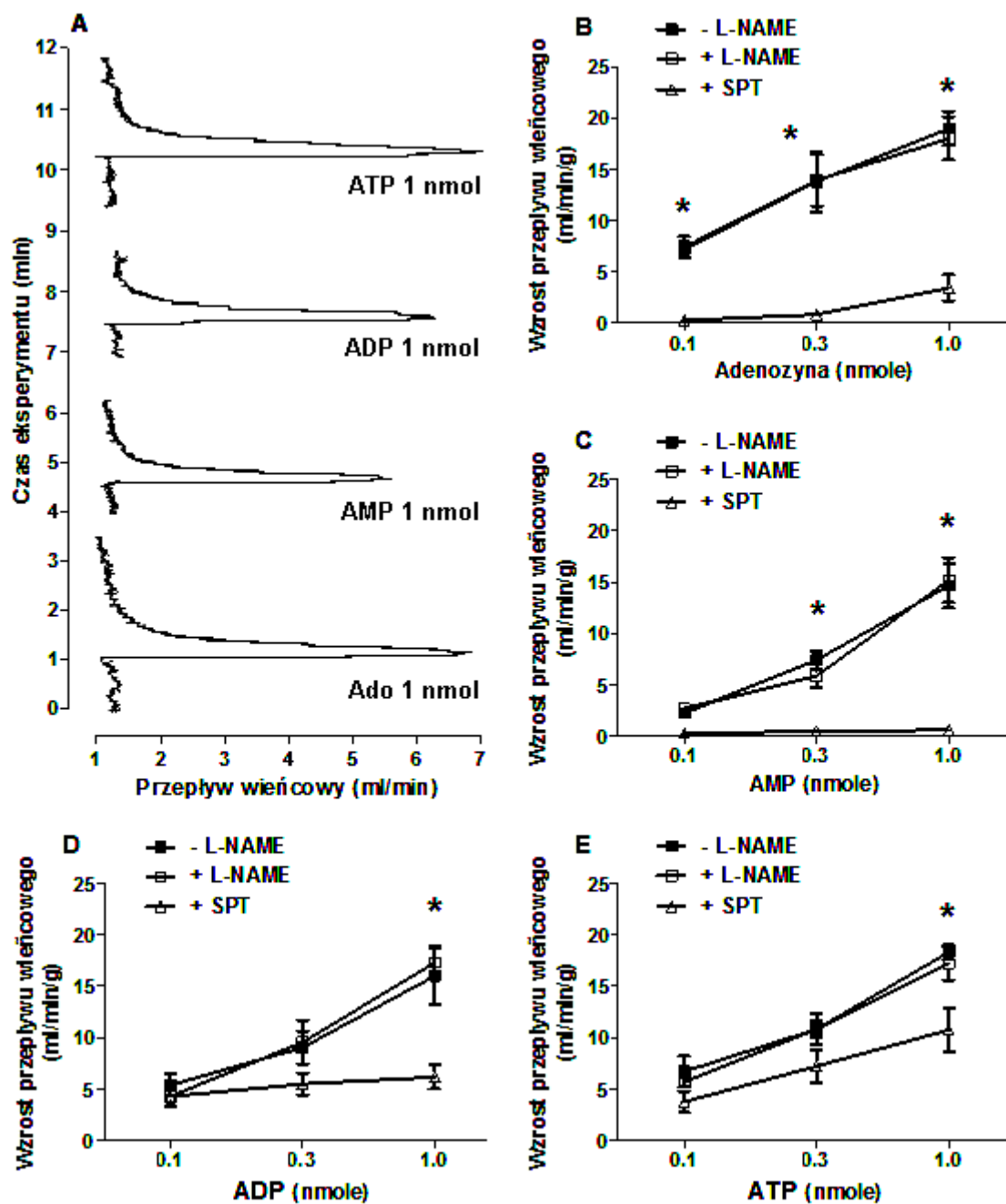
Rycina 7. Czynnosiowa i biochemiczna charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez Ach w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{+/+}. Reprezentatywne zapisy odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez bolus 0.3 nmol Ach (panel A); wpływ indometacyny [1 μM] na wzrost przepływu wieńcowego (n=4, panel B) i wytwarzanie 6-keto-PG_{1α} (n=3, panel C) wywołane pod wpływem Ach; wpływ L-NAME [500 μM] na odpowiedź naczyniorozszerzającą wywołaną przez Ach (n=9, panel D). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

* oznacza $p < 0.05$ w obecności inhibitora vs bez inhibitora

Charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez adenozyne, AMP, ADP i ATP

W celu scharakteryzowania aktywności naczyniorozkurczowej autakoidów purynergicznych w krążeniu wieńcowym stosowano adenozyne, AMP, ADP i ATP. Każda z powyższych substancji wywoływała krótkotrwały wzrost przepływu wieńcowego, który nie był hamowany przez L-NAME, a więc był niezależny od śródbłonkowego NO (ryc. 8 A, B, C, D, E). Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyne i AMP były całkowicie hamowane przez SPT [50 μM], a więc były zależne wyłącznie od aktywacji receptorów P1 (ryc. 8 B, C). Odpowiedzi wywołane przez ADP i ATP były hamowane przez SPT tylko częściowo (odpowiednio w 61 i 41% dla 1 nmola ADP i ATP), a więc były zależne od aktywacji receptorów P1 tylko częściowo. (ryc. 8 D, E). Udział aktywacji receptorów P1

w odpowiedziach wywołanych przez ADP i ATP świadczy o ich wewnątrznaczyniowym metabolizmie do AMP i adenozy, gdyż ADP i ATP nie są agonistami receptorów P1.



Rycina 8. Charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od autakoidów purynowych i ich śródbłonkowych przemian do adenozy w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{+/+}. Reprezentatywne zapisy odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez adenozyne, AMP, ADP i ATP (panel A); wpływ L-NAME [500 μM] oraz SPT [50 μM] na odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyne (n=4-7, panel B), AMP (n=4-6, panel C), ADP (n=4-7, panel D) i ATP (n=4-7, panel E).

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

* oznacza $p < 0.05$ w obecności SPT vs bez SPT

Podsumowanie charakterystyki odpowiedzi naczyńorozszerzających w izolowanym sercu myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+}.

Przedstawione powyżej wyniki badań czynności krążenia wieńcowego u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{-/-} pozwoliły stwierdzić, że:

1. Reaktywna hiperemia jest dobrym sposobem oceny rezerwy krążenia wieńcowego.
2. Bk wywołuje odpowiedź naczyńorozszerzającą zależną od NO i rozpuszczalnej cyklicznej guanylowej.
3. Ach wywołuje odpowiedź naczyńorozszerzającą zależną głównie od PGI₂.
4. Adenozyna, AMP, ADP i ATP wywołują odpowiedzi naczyńorozszerzające niezależne od NO i PGI₂; odpowiedzi wywołane przez ADP i ATP zależą od ich śródbłonkowych przemian do AMP i adenozyny.
5. Donory NO wywołują odpowiedzi naczyńorozszerzające zależne od rozpuszczalnej cyklicznej guanylowej, chociaż jej udział w tych odpowiedziach jest różny dla różnych donorów NO.

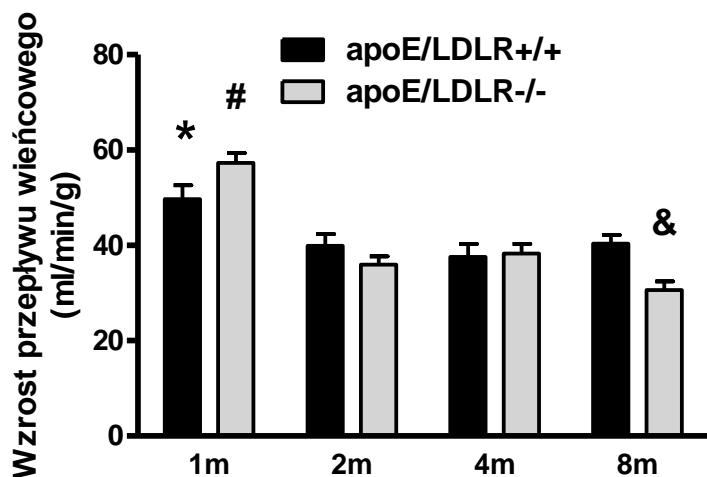
W kolejnym etapie doświadczeń analizowano, jak wielkość powyższych odpowiedzi naczyńorozszerzających zmienia się u myszy apoE/LDLR^{-/-} w toku rozwoju miażdżycy.

CZYNNOŚCIOWA I BIOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA CZYNNOŚCI ŚRÓDBŁONKA WIEŃCOWEGO W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY U MYSZY apoE/LDLR^{-/-}

Rezerwa krążenia wieńcowego

Reaktywna hiperemia

Rezerwę krążenia wieńcowego badano na podstawie wielkości reaktywnej hiperemii wywołanej przez 30 sekundowe zamknięcie przepływu wieńcowego (RH30s). Wielkość tak wywołanej reaktywnej hiperemii w izolowanych sercach myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2 i 4 miesięcy była podobna. Upośledzenie RH30s stwierdzono dopiero w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 8 miesięcy (odpowiednio 40.4± 1.8 i 30.7±1.8 dla myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 8 miesięcy) (**ryc. 9**). Stwierdzono również, że RH30s była większa u myszy miesięcznych niż u myszy starszych; zjawisko to obserwowano zarówno u myszy apoE/LDLR^{+/+}, jak i apoE/LDLR^{-/-} (**ryc. 9**).



Rycina 9. Wielkość reaktywnej hiperemii wywołanej przez 30s. zamknięcie perfuzji wieńcowej u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wielkość RH30s u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy.

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM dla n=14-20 doświadczeń.

* oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{+/+} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy

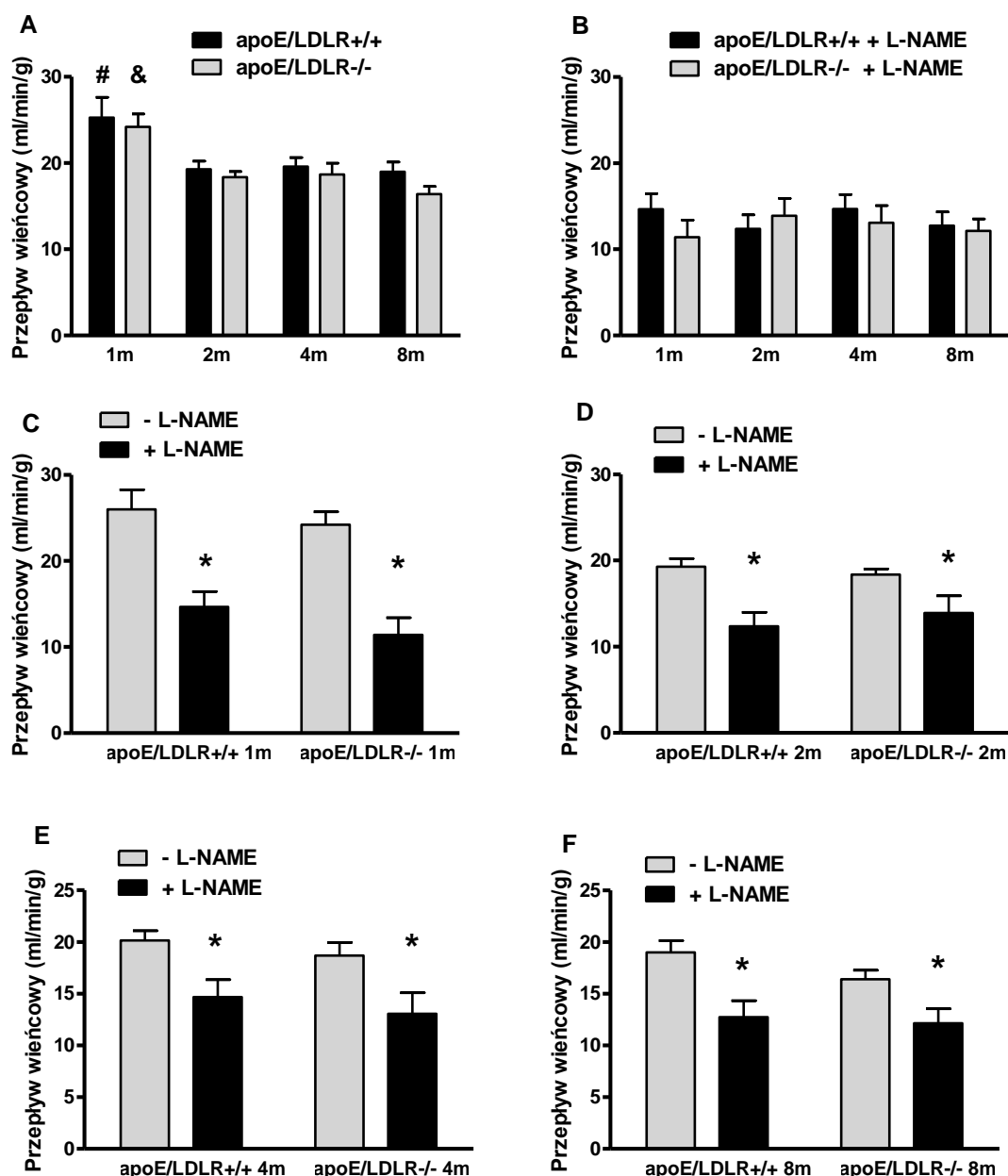
oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy

& oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} 8 miesięcy vs apoE/LDLR^{+/+} 8 miesięcy

Charakterystyka czynności śródbłonna wieńcowego zależnej od NO

Podstawowy przepływ wieńcowy

Podstawowy przepływ wieńcowy w sercach pochodzących od jednomiesięcznych myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} był większy w porównaniu do serc myszy w wieku 2, 4 i 8 miesięcy (25.3 ± 2.4 vs 19.3 ± 1.0 , 19.6 ± 1.0 , 19.0 ± 1.1 ml/min/g dla apoE/LDLR^{+/+}; 24.2 ± 1.5 vs 18.4 ± 0.7 , 18.7 ± 1.3 , 16.4 ± 0.9 ml/min/g dla apoE/LDLR^{-/-}) (**ryc. 10 A**). Zahamowanie aktywności NOS przez L-NAME zmniejszało podstawowy przepływ wieńcowy do podobnego poziomu w izolowanych sercach myszy kontrolnych i apoE/LDLR^{-/-} we wszystkich grupach wiekowych (**ryc. 10 B**). W żadnej grupie wiekowej nie stwierdzono różnicy w wielkości podstawowego przepływu wieńcowego pomiędzy sercami myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}, zarówno w sercach traktowanych, jak i nie traktowanych L-NAME (**ryc. 10 C,D,E,F**). Nie wykryto więc czynnościowych zmian w podstawowej aktywności śródbłonkowego NO w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-}.



Rycina 10. Podstawowy przepływ wieńcowy u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}.

Podstawowy przepływ wieńcowy badano w warunkach pełnej aktywności NOS (panel A, n=16-25) oraz po zahamowaniu NOS (w obecności 500 μ M L-NAME, panel B, n=5-8) w wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Panele C-F: udział NO w podstawowym przepływie wieńcowym myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=5-25), 2 (n=6-21), 4 (n=6-17) oraz 8 miesięcy (n=5-18). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{+/+} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy (panel A)

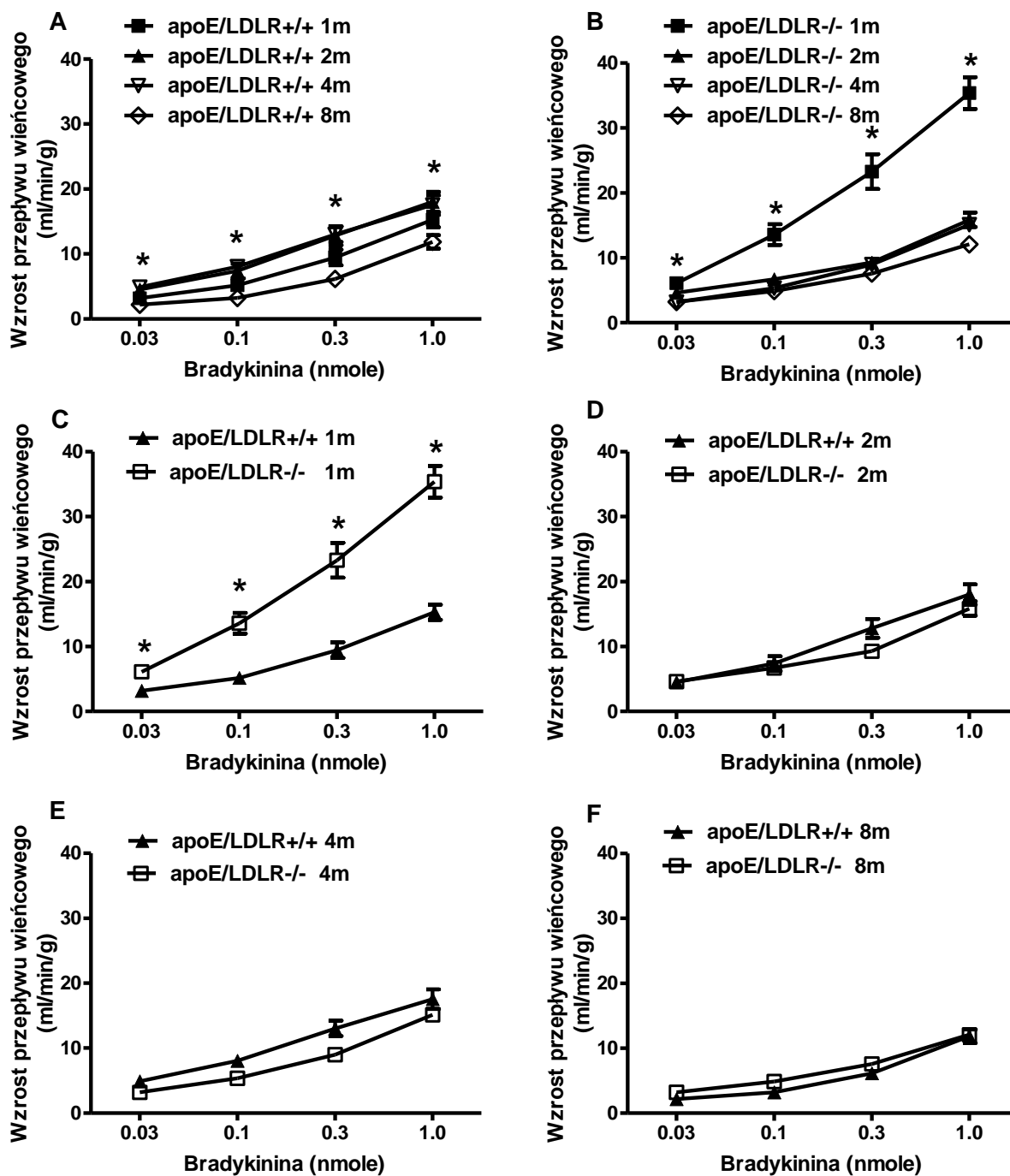
& oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy (panel A)

* oznacza $p < 0.05$ w obecności L-NAME vs bez L-NAME (panele C-F)

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Bk

W przeciwieństwie do braku znamiennych różnic w wartościach przepływu podstawowego pomiędzy sercami myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}, odpowiedź przepływu wieńcowego wywołana przez Bk (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmol) była zróżnicowana. Wyróżniała się zwiększona odpowiedź naczyniorozszerzająca wywoływana przez Bk w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca w porównaniu do myszy kontrolnych w tym samym wieku oraz starszych apoE/LDLR^{-/-} (**ryc. 11 B,C**). U starszych myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} wielkość odpowiedzi na Bk była porównywalna (**ryc. 11 D,E,F**). Ciekawe, że u myszy kontrolnych w wieku 8 miesięcy odpowiedzi na Bk były upośledzone w stosunku do odpowiedzi u myszy młodszych, ale tej prawidłowości nie obserwowano u myszy apoE/LDLR^{-/-} (**ryc. 11 A,B**).

Analogicznie do całej odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez Bk, jej część zależna od śródbłonkowego NO (obliczona jako różnica pomiędzy wywołanym przez Bk wzrostem przepływu wieńcowego bez L-NAME oraz w obecności L-NAME) była znamienne większa w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca w porównaniu do myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w tym samym wieku oraz starszych apoE/LDLR^{-/-} (**ryc. 12 B,C**). U starszych myszy apoE/LDLR^{+/+} natomiast, wielkość zależnej od NO odpowiedzi na Bk była zbliżona do tej u apoE/LDLR^{-/-} (**ryc. 12 D,E,F**). Dodatkowo, zarówno u myszy kontrolnych, jak i apoE/LDLR^{-/-}, zależna od NO część wzrostu przepływu wieńcowego wywołanego przez Bk wydawała się być mniejsza w wieku 8 niż 2 i 4 miesięcy (**ryc. 12 A, B**). Tak więc, zależna od NO odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez Bk nie była upośledzona u myszy apoE/LDLR^{-/-}, a jedynie kompensacyjnie zwiększona u myszy 1 miesięcznych.

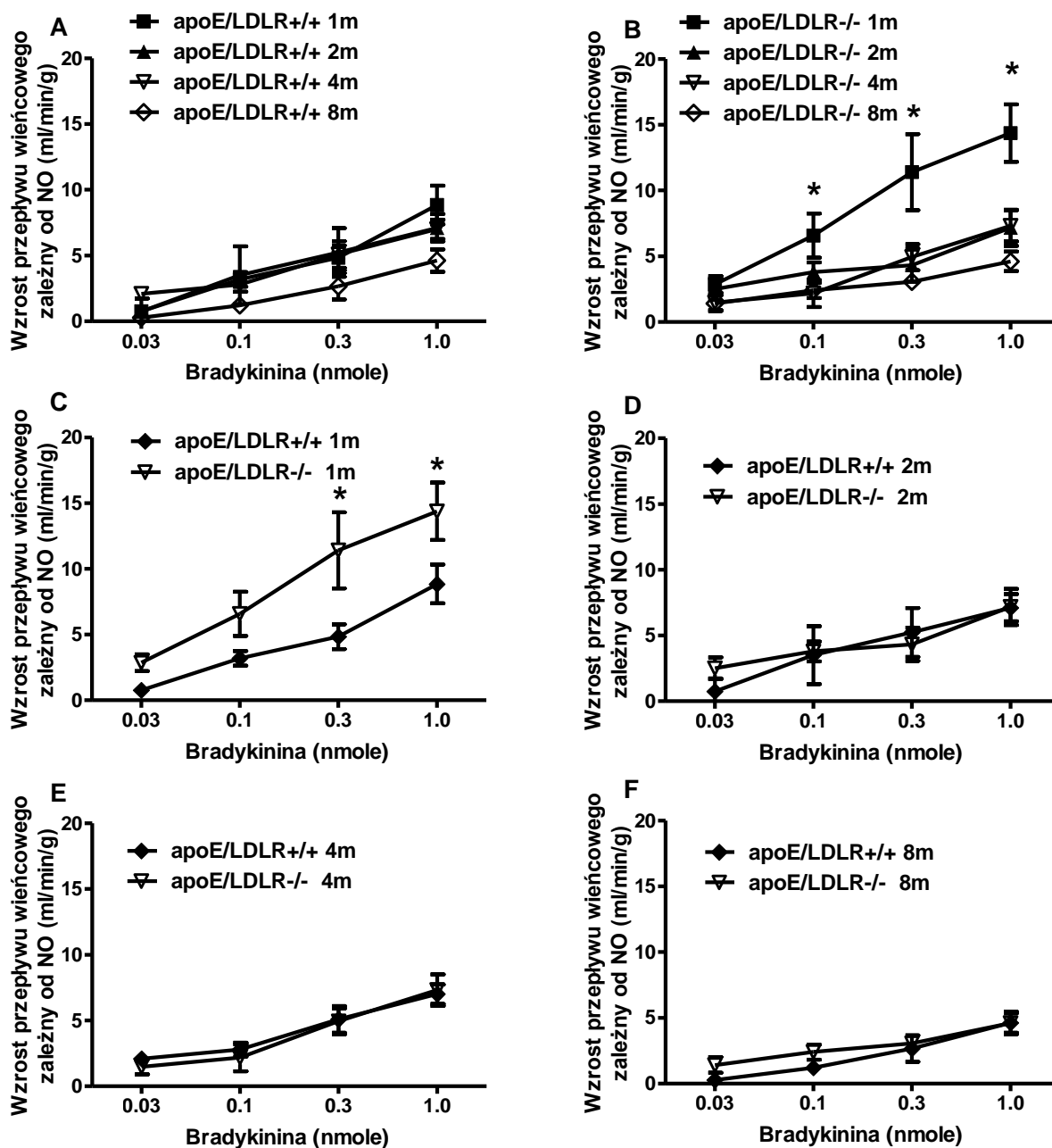


Rycina 11. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez bradykininę u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Bk (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmole) badano w warunkach pełnej aktywności NOS we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=9-14) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=10-18); Panele C-F: odpowiedzi naczyniorozszerzające u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=10-11), 2 (n=11-13), 4 (n=10-14) oraz 8 miesięcy (n=9-18). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

* oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{+/+} 8 miesięcy vs 2 i 4 miesiące (panel A)

* oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel C)



Rycina 12. Zależna od śródblonkowego NO część wzrostu przepływu wieńcowego stymulowanego przez bradykininę u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Zależną od NO część wzrostu przepływu wieńcowego stymulowanego przez Bk badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=5-6) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=6-8); Panele C-F: odpowiedzi naczyniorozszerzające u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=6-7), 2 (n=6), 4 (n=6) oraz 8 miesięcy (n=5-8). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

* oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel C)

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNP

Odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez nitroprusydek sodu (SNP) (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmol) była znamienne większa w izolowanych sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy w porównaniu do odpowiedzi u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w podobnym wieku oraz w porównaniu do odpowiedzi u miesięcznych apoE/LDLR^{-/-} (**ryc. 13 B, D, E, F**). Co ciekawe, w sercach miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} SNP wywoływał odpowiedź niewiele większą od odpowiedzi w sercach myszy kontrolnych, różnica nie była istotna statystycznie (**ryc. 13 C**). U myszy kontrolnych odpowiedź przepływu wieńcowego wywołane przez SNP była podobna w każdej grupie wiekowej (**ryc. 13 A**).

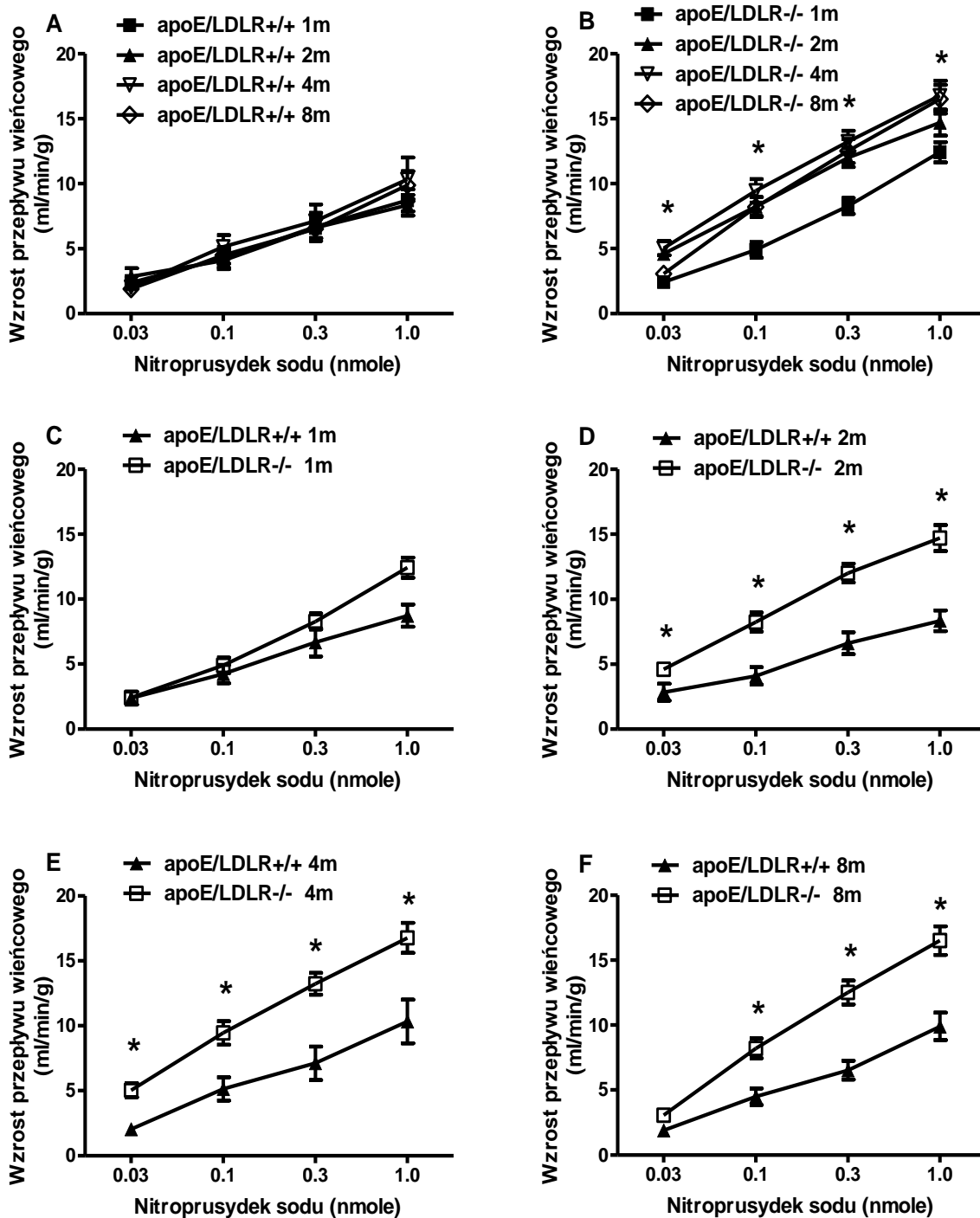
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNAP

W przeciwieństwie do odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez SNP, zwiększonej w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} starszych niż miesięczne, odpowiedzi wywołane przez inny donor NO, SNAP, były zwiększone w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w każdym wieku (**ryc. 14 C, D, E, F**). Co więcej, właśnie w wieku 1 miesiąca wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNAP był największy, istotnie większy niż u starszych myszy apoE/LDLR^{-/-} (**ryc. 14 B**). Zróżnicowanie wielkości odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez SNAP w izolowanych sercach w zależności od wieku nie występowało u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+}, gdzie odpowiedzi były porównywalne w każdej grupie wiekowej (**ryc. 14 A**).

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez DEA/NO

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez kolejny badany NO-donor, DEA/NO (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmol) również był większy w sercach miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} w porównaniu do starszych apoE/LDLR^{-/-} i odpowiednich myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} (**ryc. 15 B, C**). Jednak w przeciwieństwie do odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez SNAP, odpowiedzi wywołane przez DEA/NO w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy były niewiele większe od odpowiedzi w sercach odpowiednich myszy apoE/LDLR^{+/+}, a różnica nie osiągnęła istotności statystycznej (**ryc. 15 D, E, F**). Co zaskakujące, wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez DEA/NO u miesięcznych myszy apoE/LDLR^{+/+} był mniejszy niż u myszy w wieku 2 i 8 miesięcy (**ryc. 15 A**).

Tak więc, odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez donory NO były kompensacyjnie zwiększone u myszy apoE/LDLR^{-/-} w każdej grupie wiekowej; zjawisko to w odniesieniu do DEA/NO i SNAP było największe u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca, natomiast w odniesieniu do SNP było największe w wieku 2, 4 i 8 miesięcy.

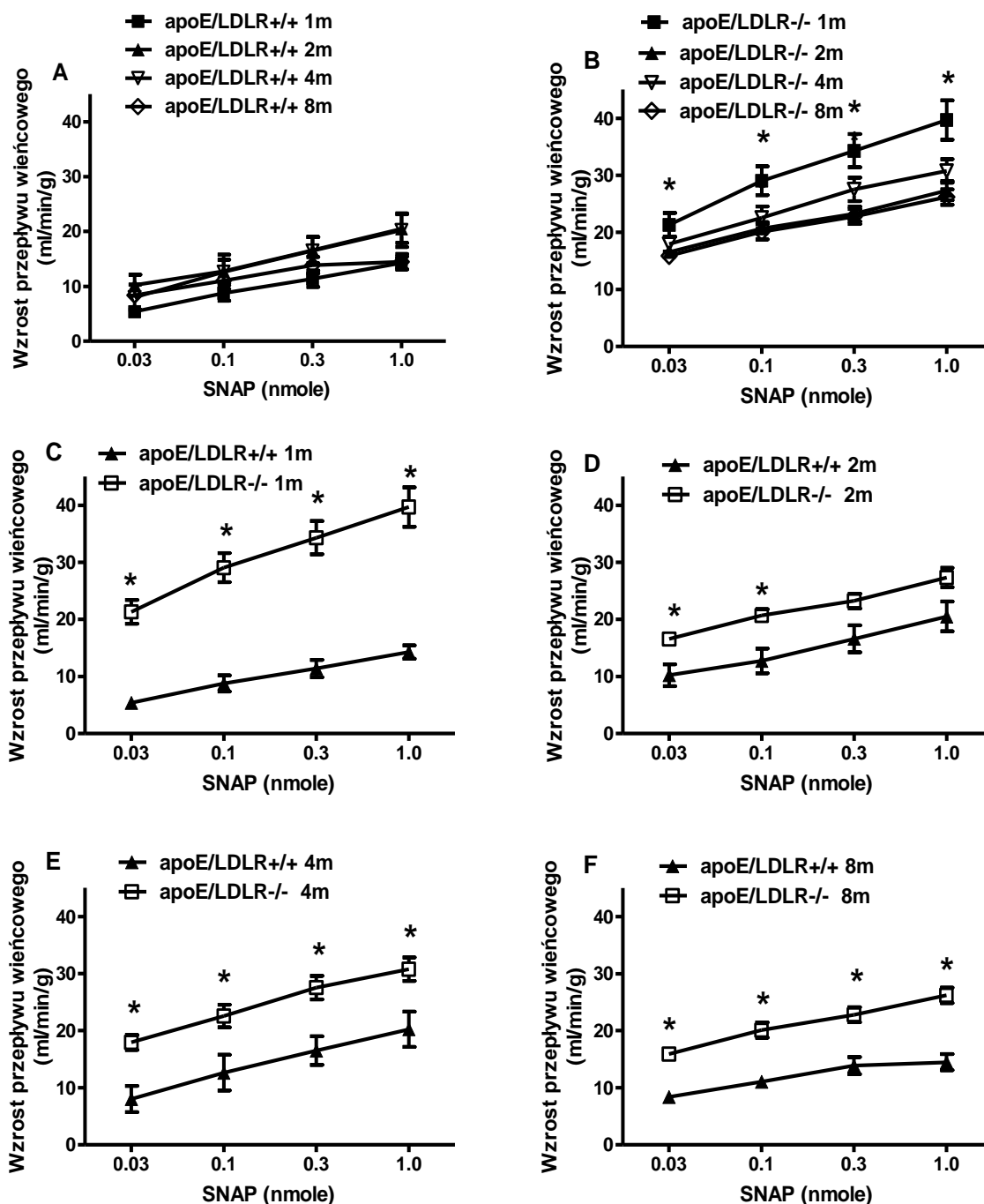


Rycina 13. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNP u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNP (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmol) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=5-10) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=14-15); Panele C-F: odpowiedzi naczyniorozszerzające u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=8-14), 2 (n=7-14), 4 (n=5-14) oraz 8 miesięcy (n=10-15).

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM.

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panele D, E, F)

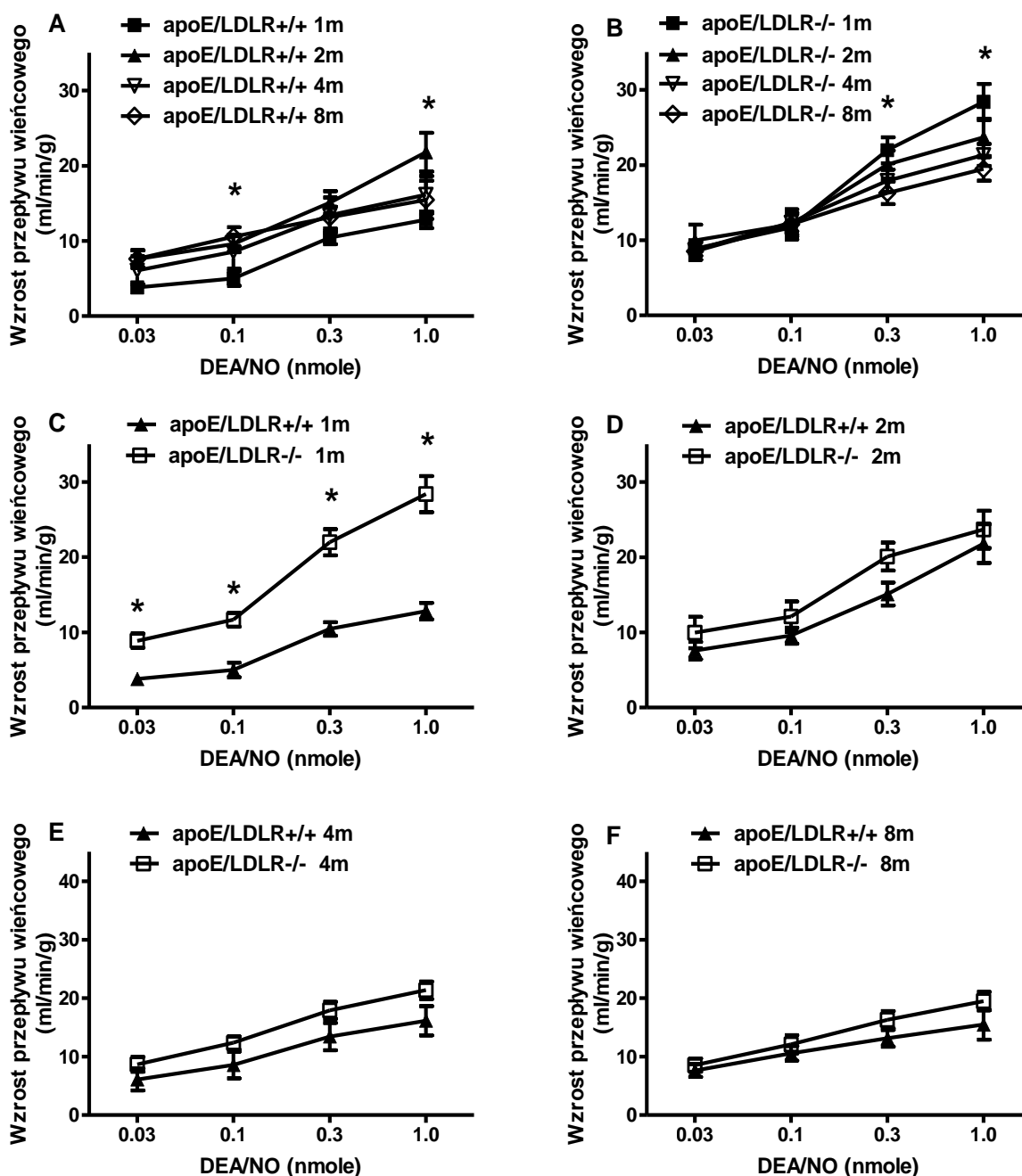


Rycina 14. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNAP u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNAP (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmol) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=6-12) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=7-13); Panele C-F: odpowiedzi naczyniorozszerzające u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=10-12), 2 (n=7-12), 4 (n=6-9) oraz 8 miesięcy (n=7-13).

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM.

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panele C, D, E, F)



Rycina 15. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez DEA/NO u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez DEA/NO (0.03, 0.1, 0.3 i 1.0 nmol) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=6-9) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=7-10); Panele C-F: odpowiedzi naczyniorozszerzające u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=9-10), 2 (n=7-9), 4 (n=6-10) oraz 8 miesięcy (n=8-10).

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM.

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{+/+} 1 miesiąc vs 2 i 8 miesięcy (panel A)

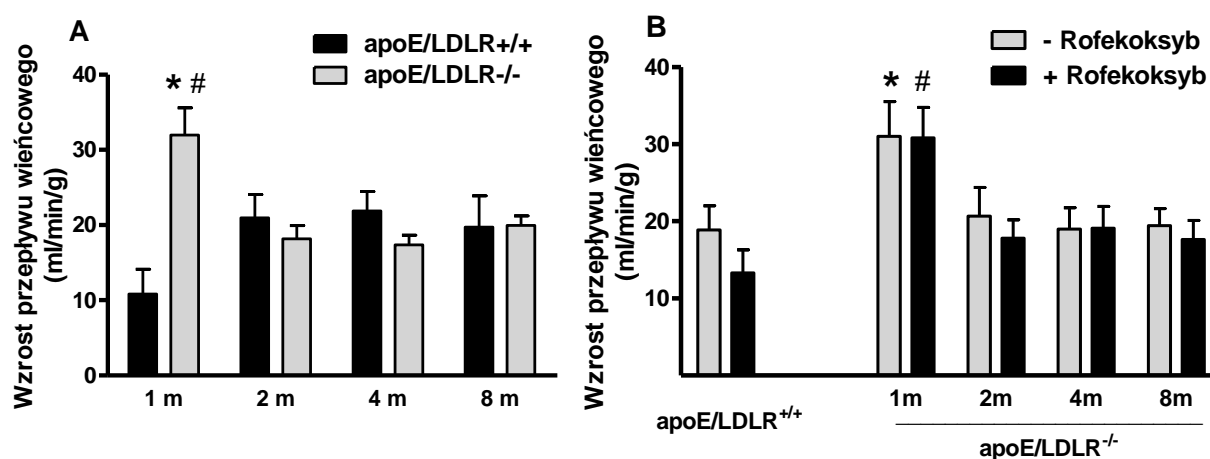
* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs apoE/LDLR^{+/+} 1 miesiąc (panel C)

Charakterystyka czynności śródbłonka wieńcowego zależnej od PGI₂

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Ach

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Ach (0.3 nmole) był zwiększony u 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} w porównaniu do odpowiednich myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i starszych apoE/LDLR^{-/-} (odpowiednio 32.0±3.6 vs 18.2±1.7, 17.4±1.3, 19.9±1.3 i 10.8±3.3 ml/min/g dla myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4, 8 miesięcy i 1 miesięcznych myszy kontrolnych) (ryc. 16 A). W pozostałych grupach wiekowych odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez Ach była podobna w sercach myszy kontrolnych i apoE/LDLR^{-/-} (ryc. 16 A). Wybiórczy inhibitor COX-2, rofekoksyb (10 μM), nie wpływał na wielkość odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez Ach w sercach zarówno 2-4 miesięcznych myszy kontrolnych, jak i apoE/LDLR^{-/-}, niezależnie od ich wieku (ryc. 16 B).



Rycina 16. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Ach u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}; rola COX-2. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez podanie Ach (0.3 nmole) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel A, n=3-23). Wpływ selektywnego hamowania COX-2 (rofekoksyb, 10 μM) na wywołany przez Ach wzrost przepływu wieńcowego (panel B, n=6-10). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

* $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel A)

$p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 2, 4 i 8 miesięcy (panel A)

* $p < 0.05$ apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} 2 i 4 miesiące (panel B)

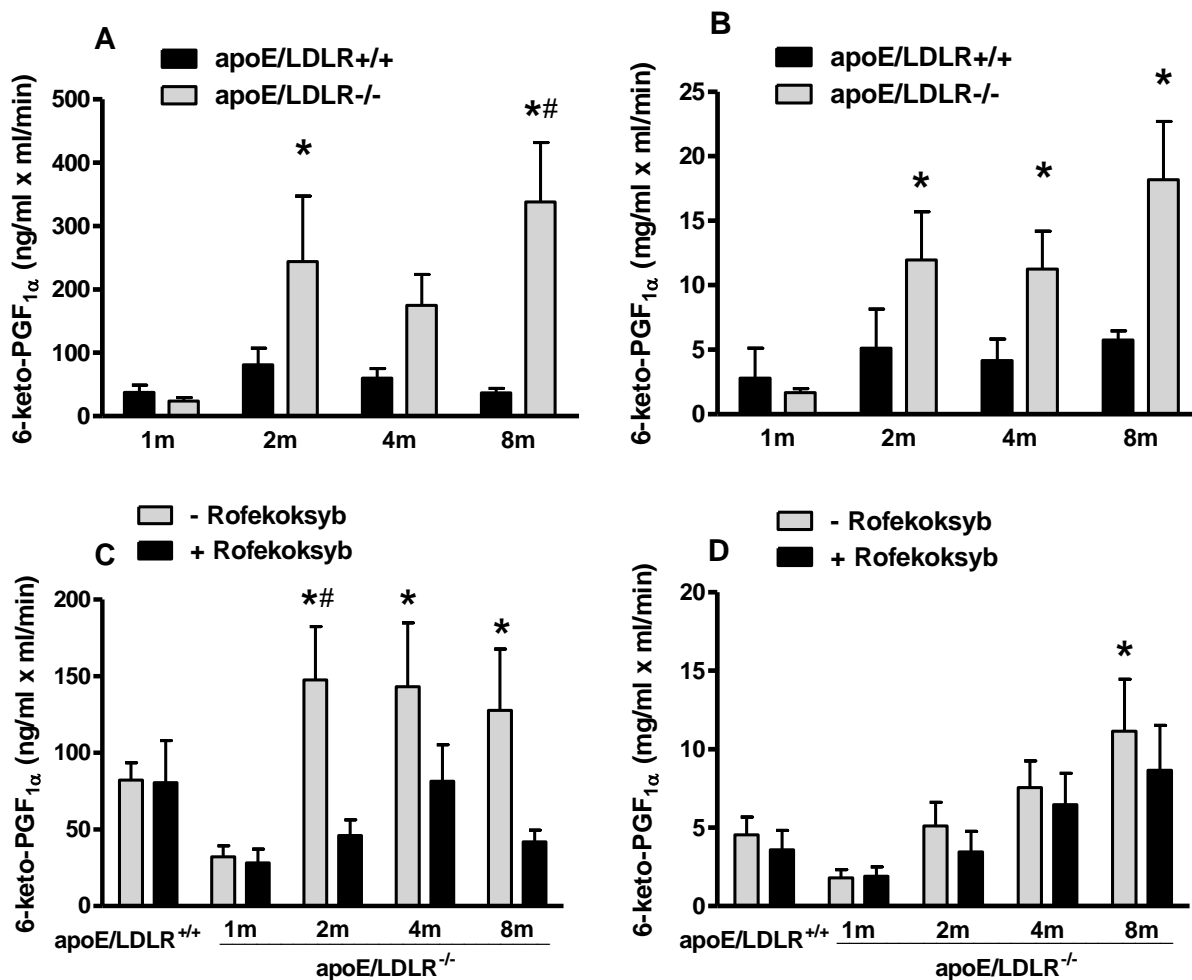
$p < 0.05$ w obecności rofekoksybu apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} 2, 4 i 8 miesięcy (panel B)

Podstawowe i stymulowane przez podanie Ach wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} w krążeniu wieńcowym

W przeciwieństwie do odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez Ach, zwiększonej w sercach 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}, wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} było zwiększone wyłącznie w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} starszych niż miesięczne. Zarówno podstawowe, jak i stymulowane przez podanie Ach (0.3 nmole) wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} było większe w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy w porównaniu do myszy miesięcznych (odpowiednio 243.82±103.65, 174.78±48.81, 338.19±93.89 vs 24.14±5.3 ng x ml/min dla podstawowego oraz 11.98±3.71, 11.27±2.93, 18.18±4.51 vs 1.68±0.3 mg x ml/min dla stymulowanego wytwarzania 6-keto-PGF_{1α}) oraz w porównaniu do odpowiednich myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} (**ryc. 17 A, B**). U myszy apoE/LDLR^{+/+} natomiast, wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} utrzymywało się na podobnym poziomie w każdej grupie wiekowej.

Podobnie jak w przypadku wzrostu przepływu wieńcowego wywołanego przez Ach, stymulowane przez podanie Ach wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} w sercach 2-4 miesięcznych myszy kontrolnych i apoE/LDLR^{-/-} nie było hamowane przez rofekoksyb (10 μM) (**ryc. 17 D**). Pomimo tego, hamujący wpływ rofekoksybu na podstawowe wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} był wyraźny, ale tylko w tych grupach wiekowych, w których wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} było zwiększone. Rofekoksyb hamował podstawowe wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy (odpowiednio do 31.2, 56.1 i 32.8 % wartości wyjściowej) i znosił różnicę w podstawowym wytwarzaniu 6-keto-PGF_{1α} między myszami apoE/LDLR^{-/-} i apoE/LDLR^{+/+} (**ryc. 17 C**).

Tak więc, w izolowanych sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} podstawowe i stymulowane przez podanie Ach wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} było zwiększone począwszy od 2 miesiąca życia i zależało od aktywności odpowiednio COX-2 i COX-1. Pomimo tego, odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez Ach była zwiększona wyłącznie u 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}.



Rycina 17. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w efluencie sercowym myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i

apoE/LDLR^{-/-}; rola COX-2. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w warunkach bazalnych (panel A, n=3-12) oraz po podaniu Ach (0.3 nmole, panel B, n=3-12) badano w efluencie sercowych myszy apoE/LDLR^{+/+} oraz apoE/LDLR^{-/-} we wszystkich grupach wiekowych. Wpływ selektywnej inhibicji COX-2 (rofekoksyb, 10 μM) na podstawowe (panel C, n=5-7) i wywołane przez podanie Ach (panel D, n=5-8) wytwarzanie 6-keto-PGF_{1α} w izolowanych sercach. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

* p < 0.05 apoE/LDLR^{-/-} 2, 4 i 8 miesięcy vs apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc (panel A, B, C, D)

p < 0.05 apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel A)

p < 0.05 w obecności rofekoksybu vs bez obecności rofekoksybu (panel C)

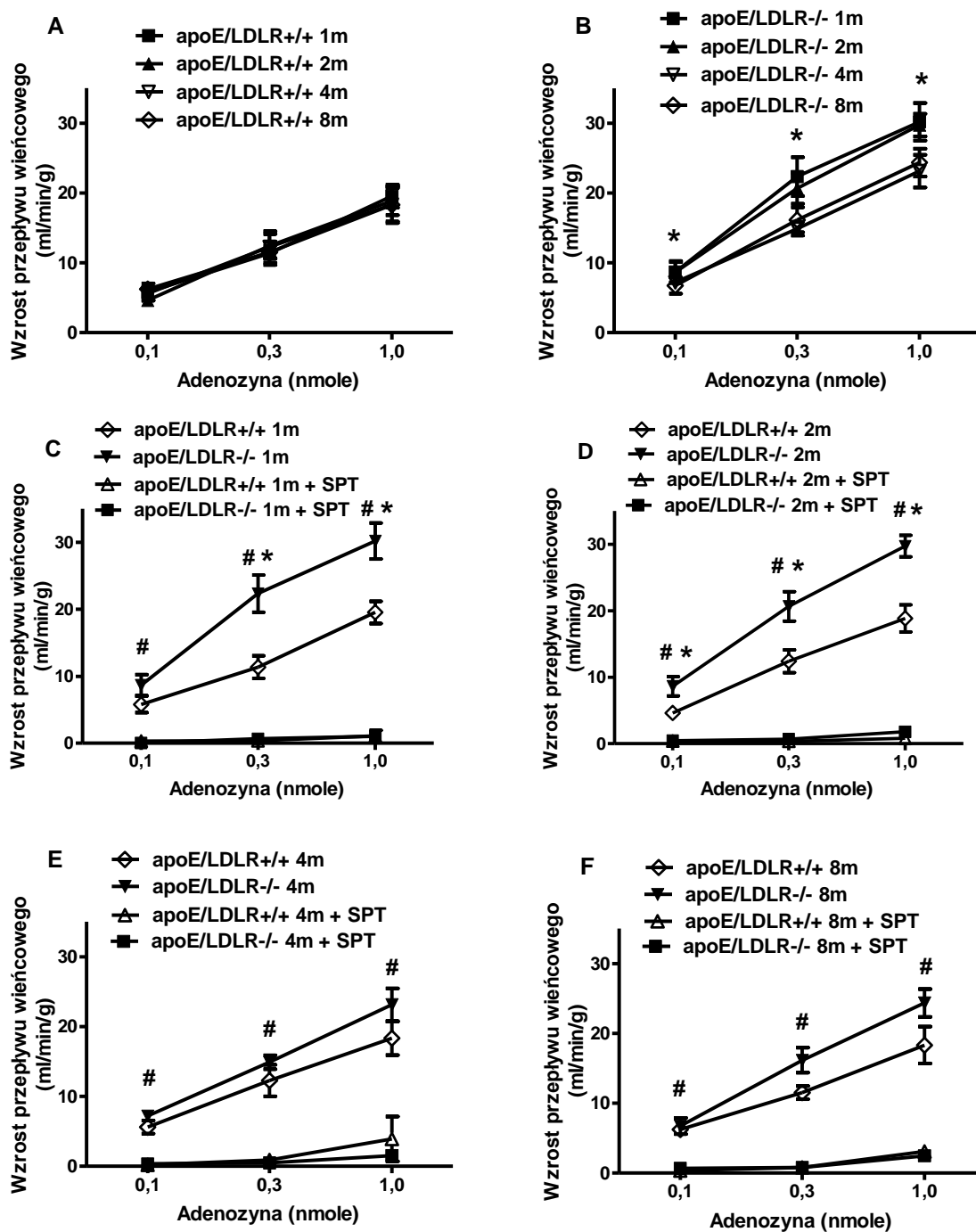
Charakterystyka czynności śródbłonna wieńcowego zależnej od autakoidów purynowych i ich wewnątrznaczyniowych przemian

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez adenozyne

Charakterystyczną cechą odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez wszystkie stosowane autakoidy purynowe był zwiększony wzrost przepływu wieńcowego u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy. Tak więc, odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez adenozyne (0.1, 0.3 i 1.0 nmol) była większa w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy w porównaniu do odpowiedzi w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} starszych (**ryc. 18 B**) i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w odpowiednim wieku (**ryc. 18 C, D**). Niewielka różnica w wielkości rozkurczu naczyń wieńcowych wywołanym przez adenozyne u myszy apoE/LDL^{-/-} i apoE/LDLR^{+/+} była obecna również w wieku 4 i 8 miesięcy, ale nie osiągnęła znamienności statystycznej (**ryc. 18 E, F**). We wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} zablokowanie receptora P1 (SPT 50μM) prawie całkowicie hamowało wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez adenozyne (**ryc. 18 C, D, E, F**).

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez AMP

Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez AMP i adenozyne były podobne. Analogicznie do efektu adenozyne, wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez AMP (0.1, 0.3 i 1.0 nmol) był większy w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy niż w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} starszych (**ryc. 19 B**) i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w odpowiednim wieku (**ryc. 19 C, D**). Niewielka różnica w wielkości rozkurczu naczyń wieńcowych wywołanym przez AMP u myszy apoE/LDL^{-/-} i apoE/LDLR^{+/+} była obecna również w wieku 4 i 8 miesięcy, ale nie osiągnęła znamienności statystycznej (**ryc. 19 E, F**). We wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} zablokowanie receptora P1 (SPT 50μM) prawie całkowicie hamowało wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez AMP (**ryc. 19 C, D, E, F**).

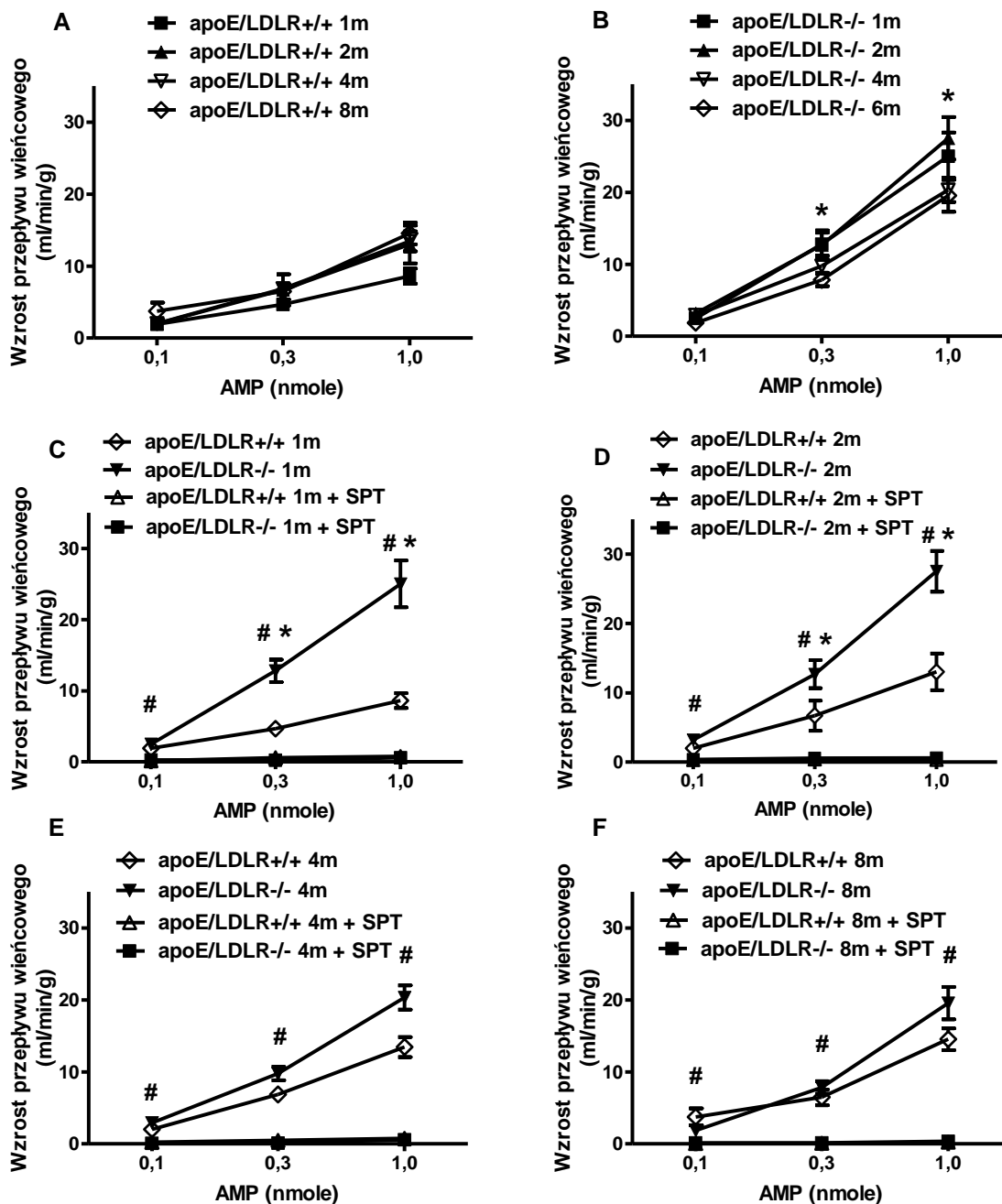


Rycina 18. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez adenozynę u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez adenozynę (0,1, 0,3 i 1,0 nmol) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=6) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=9-11); Panele C-F: wpływ zablokowania receptora P1 (SPT, 50μM) na rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez adenozynę u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=2-9), 2 (n=2-9), 4 (n=3-9) oraz 8 miesięcy (n=4-11). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

* oznacza p < 0,05, apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza p < 0,05, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel C, D)

oznacza p < 0,05, w obecności SPT vs bez SPT (panel C, D, E, F)



Rycina 19. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez AMP u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez AMP (0,1, 0,3 i 1,0 nmole) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=5-6) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=7-9); Panele C-F: wpływ zablokowania receptora P1 (SPT, 50μM) na rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez AMP u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=3-9), 2 (n=3-9), 4 (n=3-9) oraz 8 miesięcy (n=3-11). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

* oznacza $p < 0,05$, apoE/LDLR^{-/-} 1 i 2 miesiące vs 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza $p < 0,05$, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel C, D)

oznacza $p < 0,05$, w obecności SPT vs bez SPT (panel C, D, E, F)

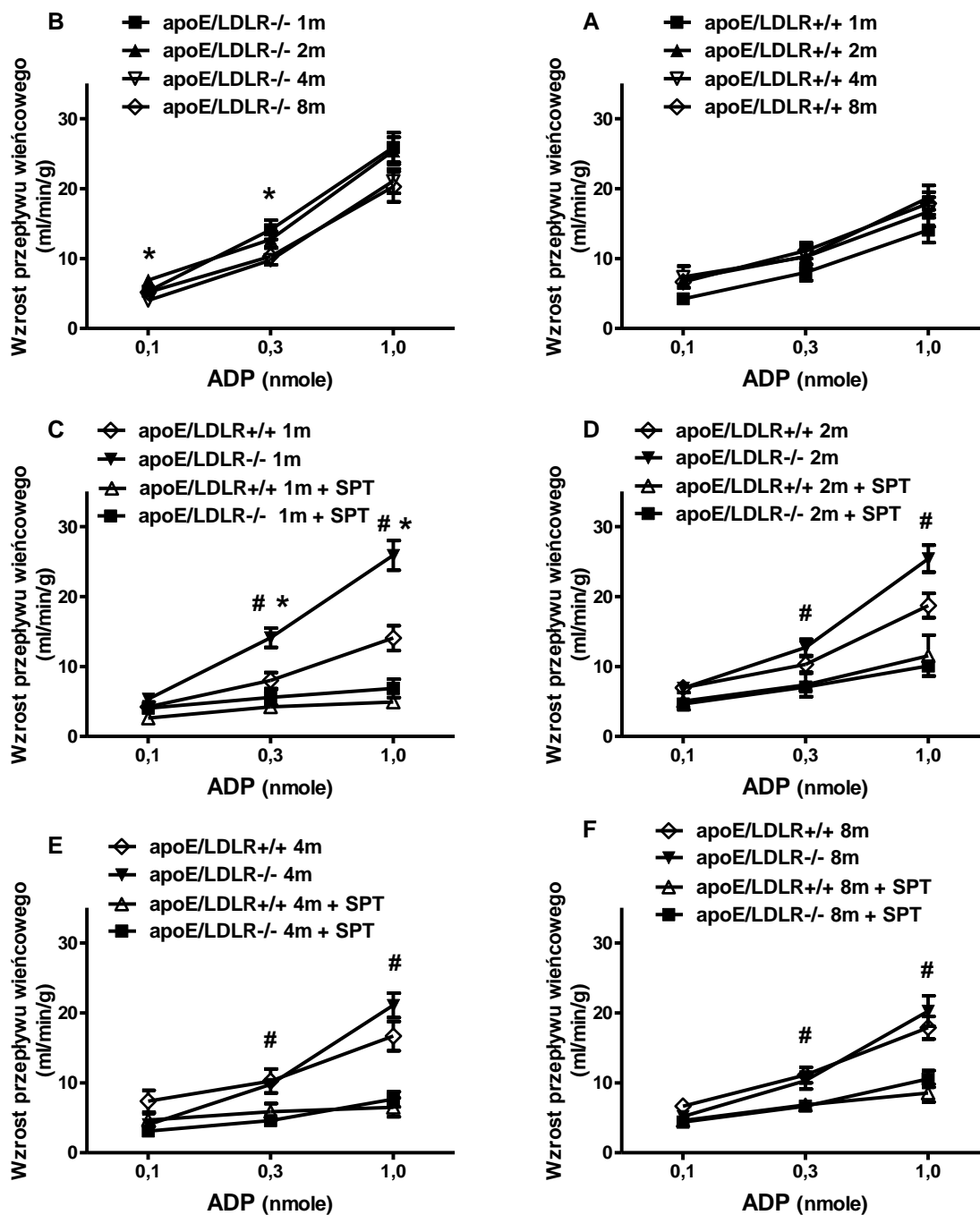
Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ADP

Również wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ADP (0.1, 0.3 i 1.0 nmol) był większy w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy niż w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} starszych (**ryc. 20 B**) i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w odpowiednim wieku (**ryc. 20 C, D**). Nie było natomiast różnicy w wielkości rozkurczu naczyń wieńcowych wywołanym przez ADP u starszych myszy apoE/LDL^{-/-} i odpowiednich apoE/LDLR^{+/+} (**ryc. 20 E, F**). We wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} zablokowanie receptora P1 (SPT 50μM) redukowało wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ADP do podobnego poziomu, znosząc różnice pomiędzy wielkością odpowiedzi naczyniorozszerzającej u myszy apoE/LDLR^{-/-} i apoE/LDLR^{+/+} w wieku 1 i 2 miesięcy (**ryc. 20 C, D, E, F**).

Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ATP

Podobnie do efektu ADP, wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ATP (0.1, 0.3 i 1.0 nmol) był większy w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy niż w sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} starszych (**ryc. 21 B**) i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w odpowiednim wieku (**ryc. 21 C, D**). Nie stwierdzono również różnicy w wielkości rozkurczu naczyń wieńcowych wywołanym przez ATP u starszych myszy apoE/LDL^{-/-} i odpowiednich apoE/LDLR^{+/+} (**ryc. 21 E, F**). We wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} zablokowanie receptora P1 (SPT 50μM) znamiennie redukowało wielkość odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez ATP; w wieku 4 i 8 miesięcy do podobnego poziomu u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}, natomiast w wieku 1 i 2 miesięcy różnica pomiędzy wzrostem przepływu wieńcowego wywołanym przez ATP u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w obecności SPT nie była istotna statystycznie (**ryc. 21 C, D, E, F**).

Tak więc, w izolowanych sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy, zależne od aktywacji receptora P1 odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyne, AMP, ADP i ATP były znamiennie większe w porównaniu do starszych myszy apoE/LDLR^{-/-} i odpowiednich apoE/LDLR^{+/+}.

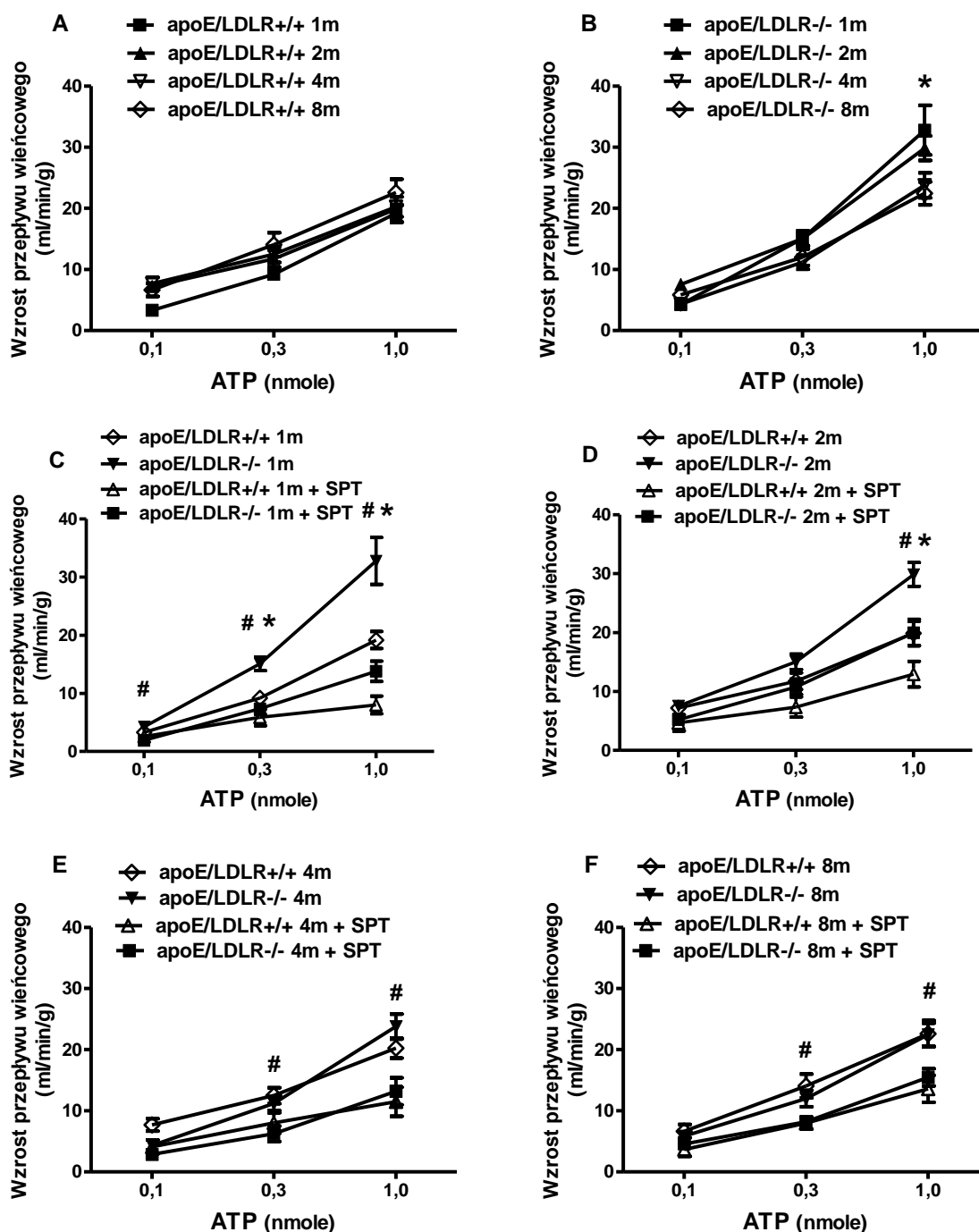


Rycina 20. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ADP u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ADP (0.1, 0.3 i 1.0 nmol) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=5-6) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=9-10); Panele C-F: wpływ zablokowania receptora P1 (SPT, 50μM) na rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez ADP u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=6), 2 (n=6-8), 4 (n=6-7) oraz 8 miesięcy (n=5-10). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc vs 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel C)

oznacza $p < 0.05$, w obecności SPT vs bez SPT (panel C, D, E, F)



Rycina 21. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ATP u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ATP (0.1, 0.3 i 1.0 nmol) badano we wszystkich grupach wiekowych myszy apoE/LDLR^{+/+} (panel A, n=5-6) oraz apoE/LDLR^{-/-} (panel B, n=8-10); Panele C-F: wpływ zablokowanie receptora P1 (SPT, 50μM) na rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez ATP u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1 (n=6), 2 (n=6-8), 4 (n=6-7) oraz 8 miesięcy (n=5-10). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM.

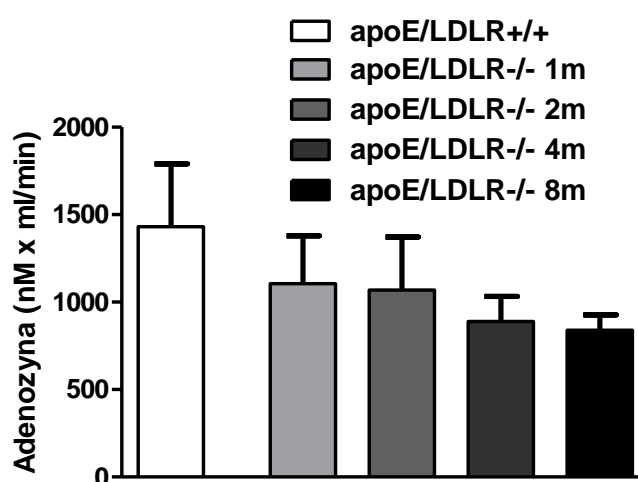
* oznacza p < 0.05, apoE/LDLR^{-/-} 1 i 2 miesiące vs 4 i 8 miesięcy (panel B)

* oznacza p < 0.05, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} (panel C, D)

oznacza p < 0.05, w obecności SPT vs bez SPT (panel C, D, E, F)

Poziom adenozyiny, inozyiny i AMP w efluencie wieńcowym

W celu oszacowania wychwyty i/lub rozkładu adenozyiny w naczyniach wieńcowych, badany był poziom adenozyiny w efluencie z krążenia wieńcowego po podaniu adenozyiny (1 nmol) do perfundowanego izolowanego serca. Po podaniu adenozyiny, jej poziom w efluencie sercowym wydawał się być niższy u myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 4 i 8 miesięcy w porównaniu do młodszych $apoE/LDLR^{-/-}$ i myszy kontrolnych $apoE/LDLR^{+/+}$, jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej (odpowiednio 1431 ± 359.6 , 1106 ± 273.5 , 1069 ± 303.6 , 889.7 ± 142.2 i 838.3 ± 89.1 nM x ml/min dla myszy $apoE/LDLR^{+/+}$ w wieku 2-4 miesięcy oraz $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy) (ryc. 22).



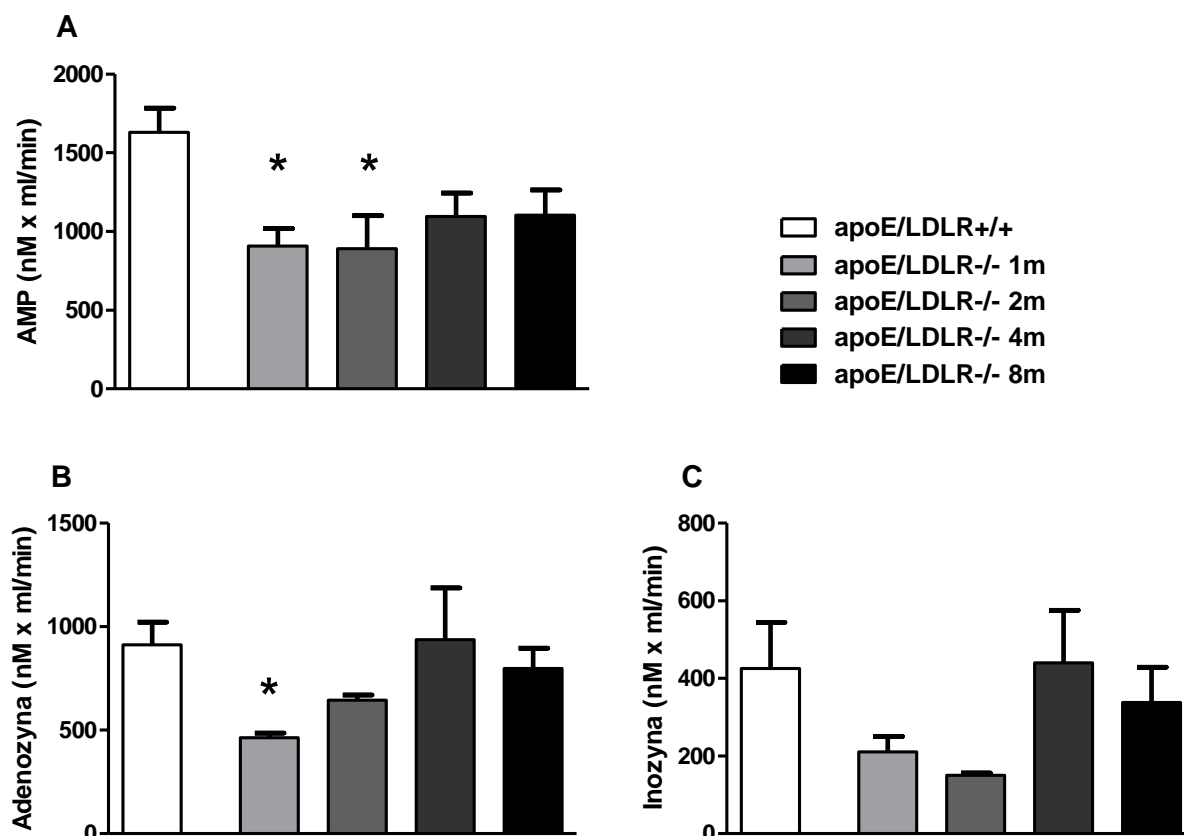
Rycina 22. Poziom adenozyiny w efluencie wieńcowym po podaniu adenozyiny do perfundowanego izolowanego serca myszy kontrolnych $apoE/LDLR^{+/+}$ i $apoE/LDLR^{-/-}$.

Poziom adenozyiny po dosercowym podaniu adenozyiny (1 nmol, n=7-8) badano w efluencie wieńcowym myszy $apoE/LDLR^{+/+}$ w wieku 2-4 miesięcy oraz myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy.

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

Określano również poziom AMP, adenozyiny i inozyiny w efluencie wieńcowym po podaniu ADP i AMP (po 1 nmol), w celu oszacowania rozkładu ADP i AMP w naczyniach wieńcowych, będącego odzwierciedleniem aktywności śródbłonkowych ektoenzymów CD39 i CD73. Po podaniu ADP poziom wszystkich 3 badanych metabolitów, AMP, adenozyiny oraz inozyiny w efluencie z izolowanego serca myszy $apoE/LDLR^{+/+}$ i $apoE/LDLR^{-/-}$ był zróżnicowany. Poziom AMP po podaniu ADP u myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 1 i 2 miesięcy był zaniżony, a w wieku 4 i 8 miesięcy niezaniżony niż u myszy kontrolnych $apoE/LDLR^{+/+}$ (odpowiednio 907.3 ± 111.6 , 890.2 ± 210.6 , 1096 ± 147.6 i 1105 ± 158.9 vs 1631 ± 152.0 nM x ml/min dla myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy oraz myszy $apoE/LDLR^{+/+}$) (ryc. 23 A). Poziom adenozyiny i inozyiny w efluencie po podaniu ADP był

niższy u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy w porównaniu do apoE/LDLR^{-/-} starszych i myszy apoE/LDLR^{+/+} (odpowiednio apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy oraz apoE/LDLR^{+/+}: dla adenozyiny: 463.3±21.66 i 645.0±26.21 vs 938.4±249.0, 798.0±98.59 i 912.9±108.7 nM x ml/min; dla inozyny 210.8±39.41 i 150.4±5.90 vs 440.3±135.7, 338.3±90.72 i 425.4±118.7 nM x ml/min)(ryc. 23 B, C).



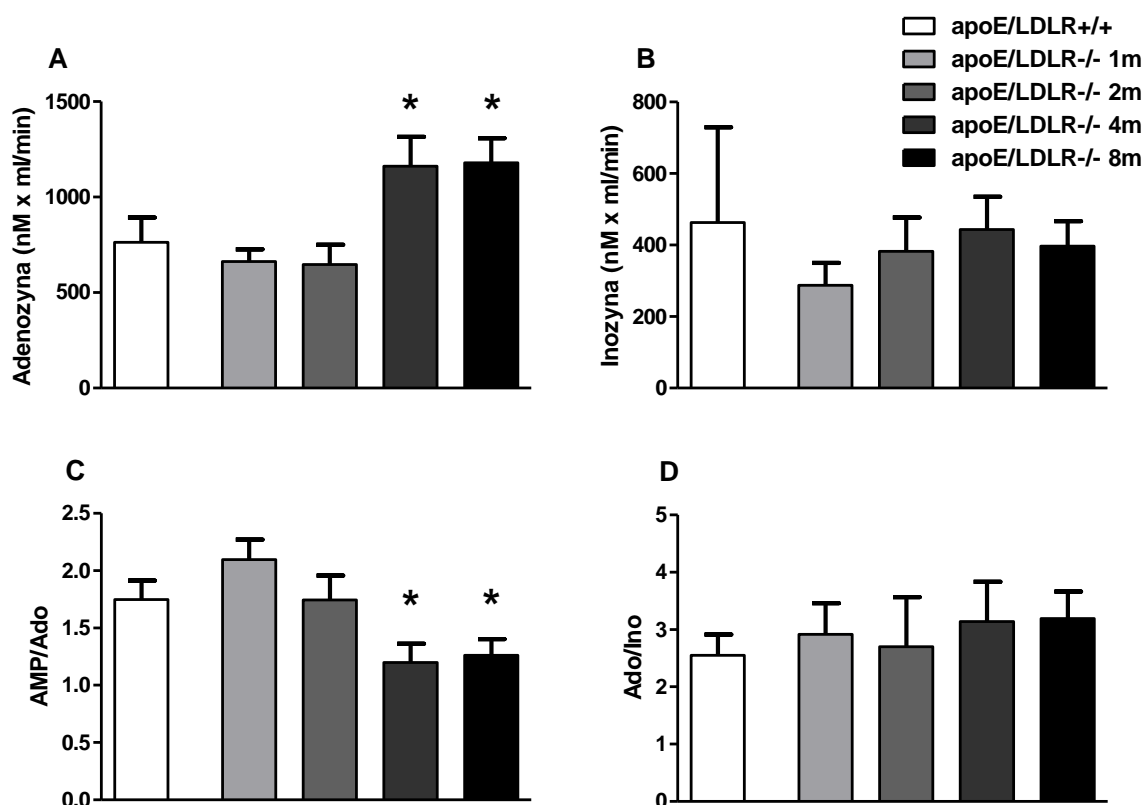
Rycina 23. Poziom AMP, adenozyiny i inozyny w efluencie wieńcowym myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} po podaniu ADP do izolowanego perfundowanego serca.

Poziom AMP (panel A, n=4-13), adenozyiny (panel B, n=4-12) oraz inozyny (panel C, n=2-6) badano w efluencie wieńcowym po dosercowym podaniu ADP (1 nmol) u myszy apoE/LDLR^{+/+} w wieku 2-4 miesięcy oraz myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+}

Co ciekawe, po dosercowym podaniu AMP poziom adenozyiny w efluencie sercowym u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy był znamienne wyższy w porównaniu do młodszych apoE/LDLR^{-/-} oraz nieznamienne wyższy w porównaniu do myszy kontrolnych (odpowiednio 1162±154.3 i 1180±127.7 nM x ml/min vs 662.7±63.8, 646.9±103.6 i 762.7±130.3 nM x ml/min dla myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 vs 1 i 2 miesięcy oraz

myszki apoE/LDLR^{+/+}) (ryc. 24 A). Również stosunek stężeń AMP do adenozyiny w efluencie wieńcowym, odzwierciedlający aktywność CD73, był obniżony u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy (odpowiednio 1.20±0.17 i 1.26±0.14 vs 2.10±0.17, 1.75±1.16, 1.75±1.39 nM x ml/min dla myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 vs 1 i 2 miesięcy oraz myszy apoE/LDLR^{+/+}) (ryc. 24 C). Pomimo tego, poziom inozyiny oraz odzwierciedlający aktywność deaminazy adenozyiny stosunek adenozyiny do inozyiny w efluencie sercowym po podaniu AMP był podobny u myszy apoE/LDLR^{+/+} oraz myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy (ryc. 24 B, D).



Rycina 24. Poziom adenozyiny i inozyiny w efluencie wieńcowym myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} po podaniu AMP do izolowanego perfundowanego serca.

Poziom adenozyiny (panel A, n=5-8), inozyiny (panel B, n=2-6) oraz stosunek poziomów AMP do adenozyiny (panel C, n=5-12) i inozyiny do adenozyiny (panel D, n=4-8) badano w efluencie wieńcowym po dosercowym podaniu AMP (1 nmol) u myszy kontrolnych w wieku 2-4 miesięcy oraz myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 4 i 8 miesięcy vs 1 i 2 miesiące (panel A)

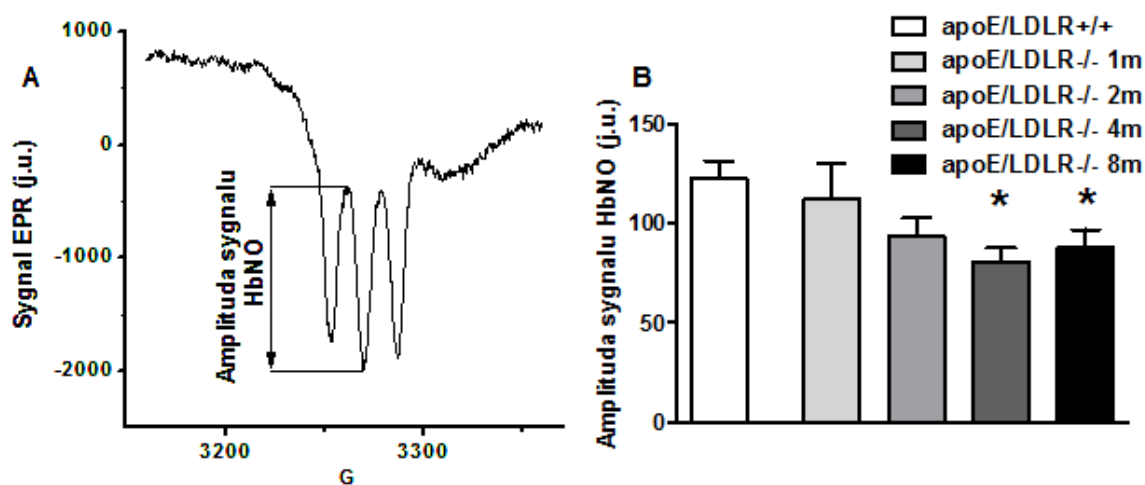
* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 4 i 8 miesięcy vs 1 miesiąc (panel C)

Podsumowując, po dosercowym podaniu ADP poziom AMP w efluencie z krążenia wieńcowego myszy apoE/LDLR^{-/-} był obniżony w każdej grupie wiekowej, a poziom adenozyiny był obniżony tylko w wieku 1 i 2 miesięcy. Natomiast po podaniu AMP, poziom adenozyiny w efluencie sercowym myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy był zwiększony.

OCENA SYSTEMOWEGO WYTWARZANIA ŚRÓDBŁONKOWEGO NO I PGI₂ W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY U MYSZY apoE/LDLR^{-/-}

Poziom nitrozyhemoglobiny (HbNO) w erytrocytach

Poziom HbNO w erytrocytach myszy apoE/LDLR^{-/-} tylko w wieku 1 miesiąca był na poziomie porównywalnym z tym u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+}. Myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy charakteryzowały się niższym poziomem HbNO niż myszy apoE/LDLR^{+/+} (amplituda sygnału EPR HbNO odpowiednio dla apoE/LDLR^{-/-} 1, 2, 4 i 8 miesięcy vs apoE/LDLR^{+/+} 111.8 ± 18.1, 93.9 ± 8.9, 80.8 ± 6.8, 88.0 ± 8.9 vs 122.2 ± 8.9 j.u.) (ryc. 25).



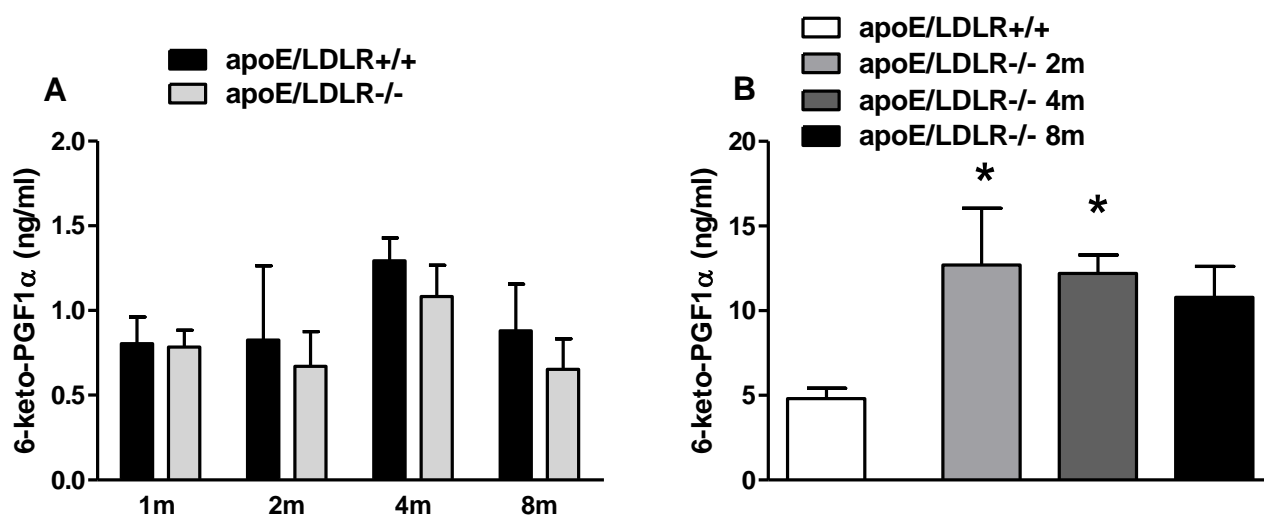
Rycina 25. Poziom HbNO w erytrocytach myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Reprezentatywny zapis widma EPR erytrocytów myszy apoE/LDLR^{+/+}, strzałką zaznaczono generowany przez HbNO drugi pik widma (panel A); Poziom HbNO w erytrocytach myszy apoE/LDLR^{+/+} w wieku 2-8 miesięcy oraz myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy (n=6-11) (panel B). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+}

Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu w warunkach podstawowych i po wysiłku fizycznym

Osoczkowe stężenie 6-keto-PGF_{1α}, będące odzwierciedleniem układowej produkcji PGI₂ przez śródbłonek, było porównywalne u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w warunkach spoczynku i wynosiło odpowiednio 0.804±0.159, 0.826±0.438, 1.294±0.135 i 0.880±0.275 ng/ml dla apoE/LDLR^{+/+} oraz 0.784±0.099, 0.671±0.204, 1.083±0.185 i 0.653±0.180 ng/ml dla apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy (**ryc. 26 A**). Różnica pomiędzy wytwarzaniem PGI₂ u myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} zaznaczała się dopiero po próbie wysiłkowej. Wysiłek fizyczny wywoływał znaczne zwiększenie stężenia 6-keto-PGF_{1α} w osoczu zarówno myszy apoE/LDLR^{+/+}, jak i apoE/LDLR^{-/-}. Powysiłkowy poziom 6-keto-PGF_{1α} w osoczu myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy był jednak większy niż u myszy apoE/LDLR^{+/+}, różnica osiągnęła znaczenie statystyczne dla grup 2 i 4 miesięcznych (odpowiednio 12.7±3.3, 12.2±1.1 i 10.8±1.8 vs 4.8±0.6 ng/ml dla apoE/LDLR^{-/-} 2, 4, 8 miesięcy i apoE/LDLR^{+/+})(**ryc. 26 B**).

Próbie wysiłkową ukończyło 100% myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2 i 4 miesięcy oraz 87,5% myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 8 miesięcy.



Rycina 26. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w warunkach spoczynkowych i po wysiłku fizycznym. Stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy w spoczynku (n=6-11, panel A) oraz po próbie wysiłkowej u myszy apoE/LDLR^{+/+} w wieku 2-4 miesięcy i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy (n=4-8, panel B). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

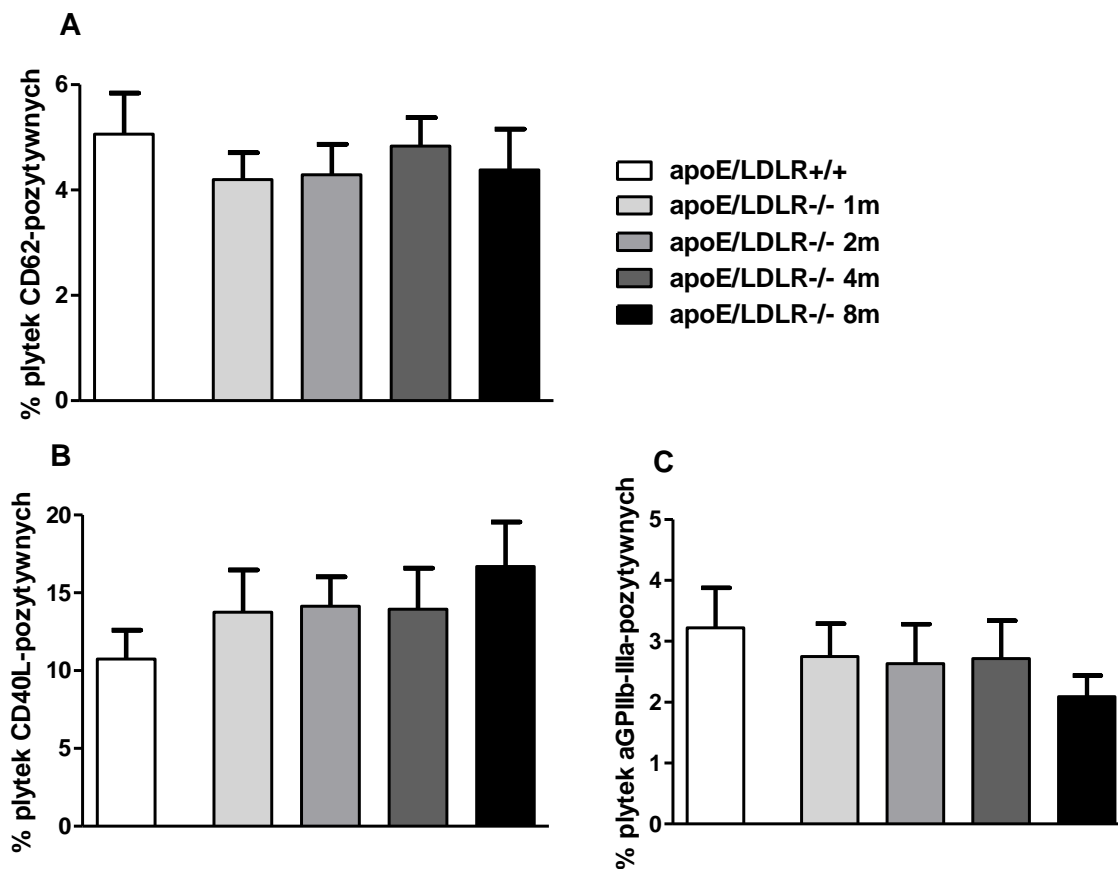
* oznacza p < 0.05, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+}

OCENA AKTYWACJI KRAŻĄCYCH PŁYTEK KRWI ORAZ OSOCZOWYCH PARAMETRÓW ZAPALNYCH W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY U MYSZY apoE/LDLR^{-/-}

Aktywacja krążących płytek krwi

Błonowa ekspresja selektyny P, CD40L oraz aktywowanej GPIIb-IIIa krążących płytek krwi

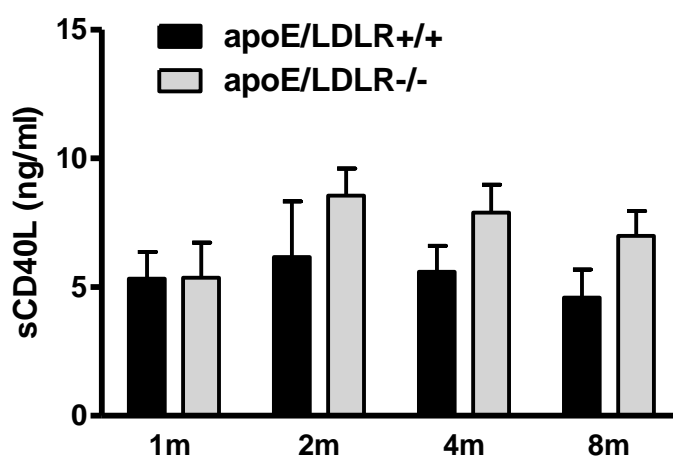
Błonowa ekspresja selektyny P oraz aktywowanej glikoproteiny GPIIb-IIIa (aGPIIb-IIIa) krążących płytek krwi była podobna u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w wieku 2-4 miesięcy (odpowiednio 4.2±0.5, 4.29±0.57, 4.83±0.54, 4.38±0.77 i 5.06±0.78% dla selektyny P oraz 2.75±0.54, 2.63±0.97, 2.72±1.12, 2.09±1.25 i 3.22±0.65% dla aGPIIb-IIIa) (**ryc. 27 A, C**). Pomimo braku różnic w ekspresji selektyny P i aGPIIb-IIIa, błonowa ekspresja CD40L krążących płytek krwi była większa w każdej grupie wiekowej myszy apoE/LDLR^{-/-} niż u myszy apoE/LDLR^{+/+}, ale różnica nie osiągnęła istotności statystycznej (odpowiednio 13.76±2.72, 14.14±1.89, 13.93±2.65, 16.70±2.86 vs 10.74±1.87% dla apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy i apoE/LDLR^{+/+})(**ryc. 27 B**).



Rycina 27. Błonowa ekspresja wybranych markerów aktywacji krążących płytek krwi u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Odsetek krążących płytek krwi wykazujących błonową ekspresją selektyny P (panel A, n=10-12), CD40L (panel B, n=10-14) oraz aktywowanej GPIIb-IIIa (panel C, n=6-9) u myszy apoE/LDLR^{+/+} oraz apoE/LDLR^{-/-}. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

Stężenie sCD40L w osoczu

Podobnie do błonowej ekspresji CD40L krążących płytek krwi, stężenie sCD40L, rozpuszczalnej w osoczu postaci CD40L, również było nieco podniesione u myszy apoE/LDLR^{-/-}, ale nie w każdej grupie wiekowej. U apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy osoczowe stężenie sCD40L był większe niż u miesięcznych apoE/LDLR^{-/-} (odpowiednio 8.56±1.04, 7.89±1.08, 7.00±0.96 vs 5.37±1.37 ng/ml) i myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w odpowiednim wieku, ale różnica nie osiągnęła istotności statystycznej (ryc. 28). Stężenie sCD40L w osoczu myszy apoE/LDLR^{+/+} było na podobnym poziomie niezależnie od wieku myszy (ryc. 28).

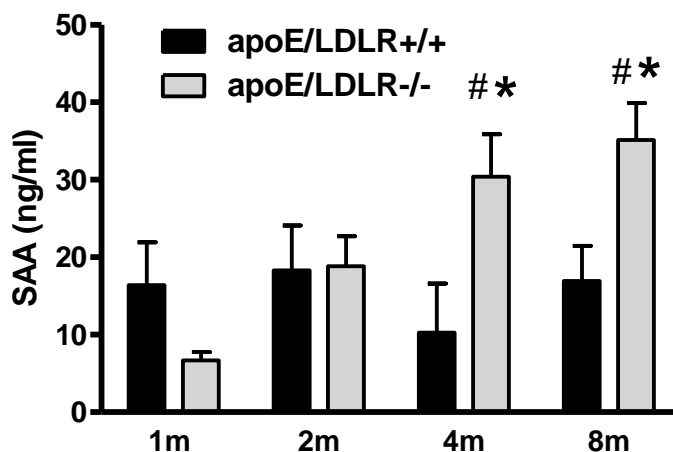


Rycina 28. Stężenie sCD40L w osoczu myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} oraz apoE/LDLR^{-/-}. Stężenie sCD40L w osoczu myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy (n=6-13). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

Odpowiedź ostrej fazy

Stężenie SAA w osoczu

Stężenie SAA w osoczu myszy apoE/LDLR^{-/-} było wyraźnie zależne od wieku myszy i narastało wraz z wiekiem. Stężenie SAA w osoczu myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca było mniejsze, w wieku 2 miesięcy podobne, natomiast w wieku 4 i 8 miesięcy istotnie większe niż u myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} w odpowiednim wieku (odpowiednio apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+} dla 1, 2, 4 i 8 miesięcy: 6.67±1.11 vs 16.41±5.51 µg/ml, 18.84±3.91 vs 18.33±5.77 µg/ml, 30.40±5.48 vs 10.27±6.32 µg/ml i 35.15±4.74 vs 16.93±4.54 µg/ml). Dodatkowo, poziom SAA u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy był znamienne większy niż u apoE/LDLR^{-/-} 1 miesięcznych. U myszy apoE/LDLR^{+/+} poziom SAA utrzymywał się na podobnym poziomie w każdej grupie wiekowej (**ryc. 29**).



Rycina 29. Stężenie SAA w osoczu myszy kontrolnych apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-}. Stężenie SAA w osoczu myszy apoE/LDLR^{+/+} i apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy (n=6-11). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną + SEM.

oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} 4 i 8 miesięcy vs apoE/LDLR^{-/-} 1 miesiąc

* oznacza $p < 0.05$, apoE/LDLR^{-/-} vs apoE/LDLR^{+/+}

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Poniżej przedstawiono podsumowanie najważniejszych wyników tej pracy oraz krótki komentarz do nich.

Układowa dysfunkcja śródbłonka, aktywacja krążących płytek krwi oraz rozwój miażdżycy i odpowiedzi ostrej fazy u myszy apoE/LDLR^{-/-}.

Zmiany miażdżycowe w proksymalnej aorcie były obecne u 4 i 8 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}, w wieku 8 miesięcy blaszki miażdżycowe były rozwinięte również w pniach tętnic wieńcowych. Wzrost osoczowego stężenia białka ostrej fazy, SAA, towarzyszył miażdżycy i był widoczny u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy.

Stężenie HbNO w erytrocytach było prawidłowe u 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} i zmniejszone u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2-8 miesięcy. Równolegle stwierdzono niezamienny statystycznie wzrost osoczowego stężenia sCD40L u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2-8 miesięcy i błonowej ekspresji CD40L krążących płytek u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1-8 miesięcy. Co ciekawe, inne parametry aktywacji krążących płytek krwi (błonowa ekspresja P-selektyny i aGPIIb-IIIa) pozostawały niezmienione.

Uzyskane wyniki świadczą, że układowe upośledzenie biodostępności NO i cechy aktywacji krążących płytek krwi zależnej od ekspresji CD40L są obecne w hipercholesterolemii u myszy apoE/LDLR^{-/-} począwszy od 2 miesiąca ich życia i wyprzedzają rozwój zmian miażdżycowych. Rozwojowi blaszek miażdżycowych towarzyszy wzrost stężenia SAA w osoczu.

Czynność śródbłonka wieńcowego u myszy apoE/LDLR^{-/-}.

W izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{-/-} dominowały zmiany o charakterze kompensacyjnym, a zależna od NO czynność śródbłonka wieńcowego nie była upośledzona. Upośledzona była jedynie rezerwa wieńcowa na etapie zaawansowanej miażdżycy pni tętnic wieńcowych u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 8 miesięcy.

Odpowiedź naczyniorozszerzająca zależna od śródbłonkowego NO (wywołana przez Bk) oraz ta zależna od śródbłonkowej PGI₂ (wywołana przez Ach) były zwiększone u 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}. Odpowiedź naczyniorozszerzająca zależna od egzogennej i endogennej adenozyiny wytwarzanej przez enzymy śródbłonkowe (wywołana przez AMP, ADP lub ATP i blokowana przez antagonistę receptorów P1) była zwiększona u 1 i 2 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}. Jednak wewnątrznaczyniowe wytwarzanie adenozyiny z ADP w wieku 1 i 2 miesięcy było zmniejszone.

W krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-} zwiększone były również odpowiedzi wywołane przez donory NO: te wywołane przez SNAP i DEA/NO głównie u myszy 1 miesięcznych, natomiast te wywołane przez SNP głównie u myszy 2-8 miesięcznych.

Na poziomie biochemicznym wykryto zależne od aktywności COX-2 zwiększone podstawowe uwalnianie PGI₂ w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2-8 miesięcy (którego odbiciem był podniesiony poziom 6-ketoPGF_{1α} w efluencie sercowym). Równolegle stwierdzono zwiększone uwalnianie PGI₂ pod wpływem Ach, zależne od COX-1. Tych zmian nie obserwowano u 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}.

Wykryto również zmniejszony poziom adenozyiny i AMP w efluencie sercowym po podaniu ADP u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku odpowiednio 1-2 i 1-8 miesięcy, natomiast po podaniu AMP, poziom adenozyiny było zwiększony myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy.

W sumie więc wykazano, że:

W krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-}, przed pojawieniem się zmian miażdżycowych, upośledzone jest wewnątrznaczyniowe wytwarzanie adenozyiny oraz rozwijają się kompensacyjne zmiany aktywności przekaźnictwa śródbłonkowego zależnego od NO, PGI₂ i adenozyiny. Zmiany te obejmują:

1. Zwiększoną wrażliwość ściany naczyń wieńcowych na działanie NO, najprawdopodobniej na poziomie sGC, które utrzymuje prawidłową czynność naczyniorozszerzającą zależną od śródbłonkowego NO, pomimo zwiększonego stresu oksydacyjnego w hipercholesterolemii.

2. Zwiększoną aktywność podstawową układu COX-2/PGI₂ oraz zwiększoną wrażliwość układu COX-1/PGI₂ na stymulujące działanie acetylocholiny, co prowadzi do zwiększonego wytwarzania PGI₂ zarówno przez COX-2, jak i COX-1.

3. Zwiększoną wrażliwość na naczyniorozszerzające działanie adenozyiny.

4. Zwiększone wytwarzanie adenozyiny z AMP, które kompensuje obecne na wczesnych etapach rozwoju miażdżycy upośledzenie wewnątrznaczyniowego wytwarzania adenozyiny z ADP i normalizuje dostępność biologiczną adenozyiny.

Wydolność wysiłkowa myszy apoE/LDLR^{-/-}

Wydolność wysiłkowa nie była upośledzona u myszy apoE/LDLR^{-/-} w żadnej grupie wiekowej. Po wysiłku fizycznym osoczowe stężenie 6-ketoPGF_{1α}, wskaźnik układowej produkcji PGI₂, było wyższe u myszy apoE/LDLR^{-/-} w porównaniu do myszy kontrolnych.

Przedstawione wyniki zdają się sugerować, że pomimo obecności hipercholesterolemii i zaawansowanych zmian miażdżycowych, utrzymanie prawidłowej wydolności wysiłkowej

myszy ApoE/LDL^{-/-}, która zależy od prawidłowej czynności krążenia wieńcowego, może być zależne od adaptacyjnych zmian czynności śródbłonna, które obejmują wszystkie trzy układy przeciwplatekowej obrony ściany naczynia (NO, PGI₂, adenozyne).

DYSKUSJA

ZABURZENIA LIPIDOWE I ROZWÓJ MIAŻDŻYCY U MYSZY apoE/LDLR^{-/-}

W przeprowadzonych badaniach potwierdziłem znaczne zaburzenia gospodarki lipidowej i spontaniczny rozwój miażdżycy u myszy apoE/LDLR^{-/-}. Poziom cholesterolu całkowitego kilkakrotnie przewyższał poziom fizjologiczny u myszy w każdej grupie wiekowej, co zgadza się z poprzednimi doniesieniami [Ishibashi, 94]. Dodatkowo, w wykonanych w Katedrze Farmakologii badaniach profilu lipidowego u myszy apoE/LDLR^{-/-} wykazaliśmy, że główną frakcją lipoprotein były LDL, co odpowiada ludzkiej rodzinnej hiperlipoproteinemii typu IIa (wyniki dotąd nie publikowane). Wart podkreślenia jest fakt, że w odróżnieniu od wielu innych badań, w tej pracy w celu pogłębienia hipercholesterolemii nie stosowano diet aterogennych, często związanych z innymi zaburzeniami metabolicznymi u myszy, takimi jak cukrzyca i hipertrójglicerydemia [Phillips, 03; Hansmann, 07; Su, 06]. Zarówno hipertrójglicerydemia [Benitez, 08; Lundman, 01; de Man, 00; Bartus, 08], jak i cukrzyca i insulinooporność [Gao, 08; Zhang, 08] niezależnie wywołują dysfunkcję śródbłonna, aktywację płytek krwi [Schafer, 04] oraz wzrost osoczowych markerów zapalenia [Surwit, 88; Su, 06]. Ponieważ jedynym obserwowanym zaburzeniem metabolicznym u myszy apoE/LDLR^{-/-} była hipercholesterolemia, można założyć, że stwierdzone w moich badaniach zmiany czynnościowe i biochemiczne są wynikiem hipercholesterolemii lub obecności lokalnego procesu zapalnego w ścianie tętnic.

Zmiany miażdżycowe w aorcie wstępującej myszy apoE/LDLR^{-/-} były obecne w wieku 4 i 8 miesięcy, ale nie obserwowano ich u myszy 1 i 2 miesięcznych, co jest potwierdzeniem poprzednich badań prowadzonych w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej Katedry Farmakologii CM UJ (wyniki nie publikowane). Zmiany miażdżycowe pni tętnic wieńcowych wystąpiły jeszcze później, dopiero w wieku 8 miesięcy. Zwężenie pni tętnic wieńcowych prawdopodobnie wywołuje efekt hemodynamiczny i upośledza rezerwę wieńcową, gdyż była ona zmniejszona wyłącznie u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 8 miesięcy. Pomimo tego, że nie badano obecności miażdżycy w oporowych tętniczkach wieńcowych, zgodnie z danymi z literatury można uznać, że miażdżycy w nich nie występuje [VanderLaan, 04; Sellke, Armstrong, 90; Zeiher, 91]. Prowadzone badania czynnościowe w modelu izolowanego serca dotyczyły więc naczyń oporowych nie dotkniętych bezpośrednio przez miażdżycę.

CZYNNOŚĆ ŚRÓDBŁONKA WIEŃCOWEGO U MYSZY KONTROLNYCH

apoE/LDLR^{+/+}

W pierwszym etapie przedstawionej pracy scharakteryzowałem czynność śródbłonka wieńcowego izolowanych serc myszy kontrolnych (myszy apoE/LDLR^{+/+}), co było koniecznym punktem odniesienia dla pełniejszej oceny funkcji śródbłonka wieńcowego w hipercholesterolemii i miażdżycy u myszy apoE/LDLR^{-/-}.

Podstawowy przepływ wieńcowy

Podstawowy przepływ wieńcowy był hamowany przez L-NAME i nie był hamowany przez indometacynę, co świadczy o udziale NO, ale nie PGI₂, w jego regulacji u myszy. Udział NO w regulacji podstawowego przepływu wieńcowego w izolowanych sercach myszy jest dobrze udokumentowany [Zatta, 05; Godecke, 98; Chlopicki, 05; Drelicharz, 08]. Udział PGI₂ nie jest tak jednoznaczny: część autorów go neguje [Chlopicki, 05; Godecke, 02], inni potwierdzają [Zatta, 05]. Przyczyny tych rozbieżności nie są jasne. Inne postulowane mechanizmy odpowiedzialne za utrzymanie podstawowego przepływu wieńcowego w izolowanych sercach myszy obejmują aktywację błonowych kanałów potasowych (K_{ATP}), receptora adenozynowego A_{2A} oraz wytwarzanie EDHF [Zatta, 05], jednak udział tych mechanizmów nie był badany w tej pracy.

Reaktywna hiperemia

Reaktywna hiperemia wywołana 30 s zatrzymaniem perfuzji wieńcowej nie była hamowana przez L-NAME, co świadczy o braku udziału NO w jej regulacji. Była również niezależna od PGI₂, o czym świadczy krótki czas jej trwania, ok. 1 min. Czas półtrwania PGI₂ w buforze wodnym wynosi ok. 4 minuty [Gryglewski, 08], a odpowiedzi naczyniorozszerzające przez nią mediowane trwają 6-10 min (np. odpowiedź wywołana przez Ach). Dokładne mechanizmy reaktywnej hiperemii w izolowanym sercu myszy, których jednym z mediatorów może być adenozyna [Godecke, 08], nie są do końca poznane i nie były badane w tej pracy. Rh wywołana 30 s zatrzymaniem perfuzji wieńcowej wywoływała maksymalny wzrost przepływu wieńcowego i służyła do oceny rezerwy krążenia wieńcowego [Olsson, 75].

Odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowego NO

W obecności L-NAME odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez Bk była zmniejszona o ok. 40%, co świadczy o uwalnianiu śródbłonkowego NO przez Bk w krążeniu wieńcowym. Odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez Bk trwała ok. 1 min., więc była niezależna od uwalniania śródbłonkowej PGI₂. Jest to w zgodzie z poprzednimi doniesieniami o działaniu Bk na śródbłonek oporowych naczyń wieńcowych u myszy

[Godecke, 98; Godecke, 02; Loke, 99; Gwozdz, 07; Drelicharz, 08]. Pozostała po zahamowaniu NOS część odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez Bk wynika z uwalniania innych śródbłonkowych mediatorów naczyniorozszerzających (EDHF), których natura biochemiczna nie była badana w tej pracy. Przewaga udziału EDHF nad NO w regulacji napięcia naczyń jest charakterystyczna dla krążenia oporowego myszy [Brandes, 00b; Wolfle, 05].

Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez donory NO

Do badania odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez egzogenne NO stosowano NO-donory o różnych mechanizmach działania i uwalniania NO [Zembowicz, 90]. Rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez SNP był całkowicie hamowany przez ODQ, a więc jest on całkowicie zależny od aktywacji cytoplazmatycznej formy cyklicznej guanylowej (sGC) i cytozolowego wzrostu stężenia cGMP, co potwierdzają też inni badacze [Adachi, 01]. SNAP i DEA/NO nie były całkowicie hamowane przez ODQ, więc działają zarówno w sposób zależny, jak i niezależny od sGC. Udowodniono, że SNAP i DEA/NO działają również poprzez aktywację pompy wapniowej retikulum sarko/endoplazmatycznego (SERCA) [Ying, 07], co powoduje spadek cytozolowego stężenia wapnia i rozkurcz [Cohen, 06]. Ten mechanizm działania może odpowiadać za niezależną od sGC część rozkurczu wywołanego przez SNAP i DEA/NO, ale jego udział nie był badany w niniejszej pracy.

Odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowej PGI₂

Unikalną cechą oporowego krążenia wieńcowego myszy jest uwalnianie śródbłonkowej PGI₂ przez Ach [Gwozdz, 07; Drelicharz, 08; Godecke, 02]. Odpowiedź naczyń wieńcowych wywołana przez Ach była dwufazowa: po początkowym krótkotrwałym skurczu naczyń wieńcowych następował dłuższy, trwający 6-10 min. rozkurcz, co koresponduje ze stosunkowo długim czasem półtrwania PGI₂ w roztworze wodnym. Faza skurczu była niezależna od PGI₂, natomiast faza rozkurczu była całkowicie hamowana przez indometacynę i była związana ze wzrostem poziomu stabilnego metabolitu PGI₂, 6-ketoPGF_{1α}, w efluencie sercowym. Czynność naczyń wieńcowych oceniano wyłącznie na podstawie zależnej od PGI₂ fazy rozkurczowej. Odpowiedź naczyniorozszerzająca wywołana przez Ach była w niewielkim stopniu hamowana przez L-NAME, co może wynikać z permisyjnego działania NO na naczyniorozszerzające działanie PGI₂ [Drelicharz, 08; Maurice, 03].

Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyne, AMP, ADP i ATP

Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyne, AMP, ADP i ATP były krótkotrwałe i nie były hamowane przez L-NAME, a więc były niezależne od NO i PGI₂.

Ich działanie naczyniorozszerzające w krążeniu wieńcowym wynikało z pobudzenia receptorów mięśniówkowych naczyń oporowych [Godecke, 02]. Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyne i AMP były w całości hamowane przez antagonistę receptorów purynergicznyc P1, SPT, co świadczy, że ich działanie wynikało z pobudzenia receptora/receptorów klasy P1. W skład rodziny receptorów purynergicznyc P1 wchodzą receptory adenozynowe A₁, A_{2A}, A_{2B}, i A₃ [Burnstock, 07]. Uznaje się, że wzrost przepływu wieńcowego w izolowanym sercu myszy odpowiadają sprzężone z białkiem G_s i stymulujące wzrost cAMP w miocytach receptory A_{2A} [Flood, 01], aczkolwiek wg niektórych autorów również pozostałe receptory klasy P1 odgrywają pewną rolę [Talukder, 02; Tawfik, 06]. Odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez ADP i ATP były częściowo hamowane przez SPT, a więc były zależne zarówno od aktywacji receptorów P1, jak i P2. ADP i ATP aktywują receptory purynergiczne klasy P2, ale nie P1 [Burnstock, 07], a więc hamowanie ich działania naczyniorozszerzającego przez SPT świadczy o wewnątrznaczyniowym rozkładzie ATP i ADP do AMP i adenozyne.

ZMIANY AKTYWNOŚCI ŚRÓDBŁONKOWEGO NO W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY

U myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy, ale nie w wieku 1 miesiąca, poziom krwinkowej HbNO był obniżony. HbNO powstaje w wyniku reakcji uwalnianego przez śródbłonek NO z deoksyhemoglobina, a jej poziom jest odzwierciedleniem ogólnoustrojowej biodostępności NO pochodzenia śródbłonkowego [Dikalov, 05; Fink, 06]. Obniżenie poziomu HbNO świadczy o uogólnionym upośledzeniu śródbłonkowego wytwarzania NO w hipercholesterolemii, począwszy od 2 miesiąca życia myszy apoE/LDLR^{-/-}. Niedobór NO wyprzedza więc rozwój blaszek miażdżycowych. Co ciekawe, wyraźnym zmianom poziomu HbNO nie towarzyszyły cechy niedoboru NO w krążeniu wieńcowym. Biodostępność NO w izolowanym sercu była oceniana na podstawie wielkości podstawowego przepływu wieńcowego i odpowiedzi naczyniorozszerzającej wywołanej przez Bk, które nie były upośledzone u myszy apoE/LDLR^{-/-}. Co więcej, wywołany przez Bk rozkurcz naczyń wieńcowych był zwiększony w grupie myszy 1 miesięcznych.

Prawdopodobną przyczyną uzyskanych rozbieżności w obecności dysfunkcji śródbłonka w krążeniu wieńcowym i systemowym może być kompensacyjne zwiększenie aktywności wewnątrzkomórkowych efektorów dla działania NO w krążeniu wieńcowym, przede wszystkim sGC, maskujące upośledzoną produkcję NO przez śródbłonek wieńcowy. Istotnie, odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez wszystkie stosowane w tej pracy donory

NO (SNP, SNAP oraz DEA/NO) były zwiększone u myszy apoE/LDLR^{-/-}. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNP był znacznie nasilony u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy, a więc w obecności układowej dysfunkcji śródbłonka. U myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca, przy prawidłowej układowej biodostępności NO, nadreaktywność naczyń na SNP była niewielka. Prawdopodobną przyczyną nadreaktywności naczyń na SNP mógł być wzrost aktywności sGC w mięśniówce oporowych tętniczek wieńcowych. Jak wynika z moich wstępnych doświadczeń oraz doniesień innych autorów [Adachi, 01], naczyniorozszerzające działanie SNP było zależne wyłącznie od aktywacji sGC. Wzrost aktywności sGC jest częstym mechanizmem adaptacji do warunków upośledzonej biodostępności NO [Moncada, 91; Brandes, 00a; Jebelovszki, 08], również w hipercholesterolemii [Woodman, 04].

Z drugiej strony, naczyniorozszerzające działanie pozostałych donorów NO, SNAP i DEA/NO, było największe u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca, więc przypuszczalnie opierało się na innym mechanizmie. W przeciwieństwie do SNP, SNAP i DEA/NO działają naczyniorozszerzająco aktywując nie tylko sGC, ale też SERCA [Ying, 07]. Aktywacja SERCA wymaga reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym [Adachi, 04] i zwiększa się w warunkach stresu oksydacyjnego [Strosova, 09]. Ponieważ w hipercholesterolemii produkcja O₂⁻ jest zwiększona, mechanizm ten może odgrywać rolę w nadreaktywności naczyń na SNAP i DEA/NO. Należy jednak również zaznaczyć, że działanie spontanicznie uwalniającego NO DEA/NO w hipercholesterolemii w obecności zwiększonego wytwarzania O₂⁻ może być upośledzone i zapewne dlatego zwiększenie odpowiedzi wywołanej przez DEA/NO było wyraźne tylko u myszy apoE/LDLR^{-/-} 1 miesięcznych.

Niezależnie od rzeczywistych mechanizmów różnicujących odpowiedzi na SNP, SNAP i DEA/NO, wzmożone odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez donory NO w izolowanym sercu wydają się świadczyć o nadreaktywności sGC wynikającej z niedoboru NO w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-}.

Opisana w tej pracy rozbieżność w obecności dysfunkcji śródbłonka na poziomie układowym i w krążeniu wieńcowym może wynikać nie tylko z mechanizmów kompensacyjnych krążenia wieńcowego, które nie występują w innych łożyskach naczyniowych, ale również z metodyki badań. Zależna od NO czynność śródbłonka wieńcowego badana była *ex vivo* w modelu izolowanego serca perfundowanego buforem Krebsa-Henseleita, w warunkach znacznie odbiegających od warunków *in vivo*, natomiast poziom krwinkowej HbNO odzwierciedlał produkcję NO *in vivo* przez śródbłonek pozostający pod ciągłym wpływem krążącej krwi. W hipercholesterolemii jedną z przyczyn

dysfunkcji śródbłonka jest zwiększona produkcja anionorodnika ponadtlenowego, między innymi przez osoczną oksydazę ksantynową [White, 96; Cardillo, 97], której ewentualny wpływ nie mógł być uwzględniony w modelu izolowanego serca. Nie był uwzględniony również wpływ krążących we krwi LDL i oxLDL. LDL i oxLDL wywierają bezpośredni wpływ na śródbłonek, wywołujący zwiększoną śródbłonkową produkcję anionorodnika ponadtlenkowego, upośledzoną produkcją NO i zapalenie śródbłonka [Hein, 00; Simon, 90; Myers, 94].

Badania w modelu izolowanego serca pomijały również wpływ krążących elementów morfotycznych krwi na czynność śródbłonka, który wydaje się mieć olbrzymią rolę *in vivo*. Istnieją liczne dowody na udział krążących płytek krwi i leukocytów w patogenezie dysfunkcji śródbłonka o różnych przyczynach jak hipercholesterolemia, cukrzyca, starzenie się czy też ostra infekcja [Wolfort, 08; Nellore, 04; Bulckaen, 08; Massberg, 02; Kharbanda, 02]. Wpływ krążących płytek i leukocytów na czynność śródbłonka w warunkach patologii jest szczególnie wyraźny w mikrokrazeniu. Jednym z pierwszych zjawisk obserwowanych w hipercholesterolemii *in vivo* jest nasilona adhezja i transmigracja leukocytów i płytek krwi w *venulach* oraz dysfunkcja motoryczna sąsiadujących z nimi tętniczek [Scalia, 98; Stokes, 01; Stokes, 07; Stokes, 09b; Tailor, 03; Tailor, 04]. Napięcie tętniczek znajduje się pod tonicznym wpływem NO parakrynnie uwalnianego z sąsiadnych *venul* [Nellore, 02; Falcone, 90; McKay, 98; Saito, 94], a uwalnianie NO w *venulach* jest hamowane przez przylegające do nich w hipercholesterolemii płytki krwi, neutrofile i limfocyty T, co wiąże się z upośledzeniem czynności naczyniorozszerzającej tętniczek [Zamboni, 97; Nellore, 04; Harris, 05; Stokes, 06; Stokes, 07]. Analogiczne mechanizmy mogą dotyczyć naczyń krążenia wieńcowego. Interwencje zmniejszające wzmożony bezpośredni kontakt płytek krwi i leukocytów ze śródbłonkiem, zwłaszcza deaktywacja selektyny P, mogą więc poprawiać zależną od NO czynność motoryczną tętniczek w modelach doświadczalnych [Kim, 07; Nellore, 02; Stokes, 06; Massberg, 02]. Również u pacjentów z dysfunkcją śródbłonka, zastosowanie leków przeciwplatek: aspiryny [Noon, 98; Kharbanda, 02], inhibitora receptora TXA₂ [Belhassen, 03], inhibitorów GpIIb/IIIa [Heitzer, 03; Aymong, 02] oraz kłopidogrelu [Heitzer, 06], przywraca prawidłową czynność śródbłonka zależną od NO w mikrokrazeniu i dużych tętnicach. Przylegające do śródbłonka płytki krwi i leukocyty upośledzają biodostępność NO poprzez ekspresję i miejscowe uwalnianie mediatorów prozapalnych, działających na śródbłonkowe receptory błonowe i wzmagające śródbłonkową produkcję reaktywnych form tlenu [Stokes, 03; Stokes, 06; Wolfort, 08]. Dodatkowo, zwiększona w hipercholesterolemii aktywność płytkowej NAD(P)H oksydazy prowadzi do większej produkcji anionorodnika

ponadtlenkowego, który bezpośrednio upośledza biodostępność śródbłonkowego NO [Stokes, 07]. Również krążące agregaty płytkowo-leukocytarne, obecne w krwi pacjentów z hipercholesterolemią, mogą wywoływać dysfunkcję śródbłonka przez uwalnianie cytokin prozapalnych [Klinkhardt, 02].

Bardzo ciekawą obserwacją tej pracy jest stwierdzony brak dysfunkcji śródbłonka u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca, pomimo znacznej cholesterolemii. Wzmoczone odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez Bk w izolowanych sercach 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} wydają się wynikać ze wzmożonej aktywności wewnątrzkomórkowych efektorów dla działania NO (sGC, SERCA), a nie jego zwiększonej produkcji, która, przynajmniej w krążeniu układowym, była podobna w porównaniu do myszy kontrolnych. Również Yang i wsp. stwierdzili, że u młodych myszy apoE^{-/-} w wieku 6 tygodni czynność śródbłonka badana *in vivo* był prawidłowa, natomiast dysfunkcja śródbłonka pojawiała się u myszy starszych [Yang, 99]. Być może u podstaw tego zjawiska leży różnica w pokarmie, którym żywione były zwierzęta. Myszy w wieku 4 tygodni karmione były mlekiem, natomiast myszy starsze standardową karmą laboratoryjną. Wiadomo, że niektóre związki naturalnie występujące w diecie i mogące występować w mleku, jak witamina C i E czy l-arginina w dużych dawkach mogą zapobiegać rozwojowi dysfunkcji śródbłonka w hipercholesterolemii [Ting, 97; Engler, 03; Brown, 01; Creager, 92]. Mechanizm oporności 1 miesięcznych myszy apoE/LDL^{-/-} na rozwój dysfunkcji śródbłonka pomimo hipercholesterolemii wymaga dalszych badań.

Przedstawione w tej pracy wyniki świadczą jednoznacznie o upośledzeniu biodostępności śródbłonkowego NO w krążeniu układowym u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2 miesięcy i u myszy starszych. Tak więc, pomimo zachowanych odpowiedzi naczyniorozszerzających w krążeniu wieńcowym, wydaje się, że układowa biodostępność NO jest upośledzona. Warto dodać, że dysfunkcja śródbłonka i upośledzenie biodostępności NO w izolowanej aorcie również widoczne były u myszy apoE/LDLR^{-/-} 2 miesięcznych (wyniki nie publikowane). Należy podkreślić, że dysfunkcja śródbłonka u myszy apoE/LDLR^{-/-}, podobnie jak u pacjentów z hipercholesterolemią [Celermajer, 92; Sorensen, 94; Steinberg, 97], wyprzedza wystąpienie miażdżycy. Sugeruje to, że upośledzenie naczynioprotekcyjnych funkcji śródbłonkowego NO stanowi *conditio sine qua non* rozwoju miażdżycy i można je wykryć na podstawie pomiarów poziomu HbNO w erytrocytach. W krążeniu wieńcowym rozwijają się jednak mechanizmy kompensacyjne (na poziomie sCG), co pozwala zmniejszyć niekorzystne skutki niedoboru NO.

ZMIANY WYTWARZANIA ŚRÓDBŁONKOWEJ PGI₂ W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY

W celu zbadania aktywności śródbłonkowej PGI₂ w krążeniu wieńcowym w hipercholesterolemii i miażdżycy badano rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez Ach oraz wytwarzanie stabilnego metabolitu PGI₂, 6-ketoPGF_{1α}, w efluencie z izolowanego serca myszy apoE/LDLR^{-/-}. Dodatkowo, aby ocenić układowe wytwarzanie PGI₂, badano stężenie 6-ketoPGF_{1α} w osoczu. Zależny od śródbłonkowej PGI₂ wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Ach u myszy apoE/LDLR^{-/-} był zwiększony w wieku 1 miesiąca, ale nie w wieku 2, 4 i 8 miesięcy. Podstawowe i stymulowane przez Ach uwalnianie 6-ketoPGF_{1α} do efluentu sercowego było zwiększone u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy, ale nie w wieku 1 miesiąca. Zwiększonemu wytwarzaniu PGI₂ w krążeniu wieńcowym wywołanym przez Ach u myszy apoE/LDLR^{-/-} nie towarzyszył zwiększony rozkurcz naczyń. Ten fakt można wytłumaczyć tym, że stosowano dawkę Ach (0.3 nmole) wywołującą maksymalną odpowiedź naczyniorozszerzającą. Wytwarzanie PGI₂ w krążeniu systemowym myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy było również zwiększone po próbie wysiłkowej, ale nie w warunkach spoczynku. Wyniki te świadczą o zwiększonej produkcji PGI₂ w hipercholesterolemii zarówno w krążeniu wieńcowym i systemowym, która rozpoczyna się w wieku 2 miesięcy. W krążeniu systemowym zwiększona produkcja PGI₂ ujawniała się w warunkach wysiłku fizycznego, natomiast w warunkach spoczynku poziom PGI₂ utrzymywał się na fizjologicznym poziomie, prawdopodobnie dzięki zwiększonemu jej wydalaniu z moczem, powszechnie obserwowanym w hipercholesterolemii [Pratico, 00; Belton, 00].

Co zaskakujące, u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca, pomimo wytwarzania PGI₂ na poziomie analogicznym do myszy kontrolnych, rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez Ach był zwiększony. PGI₂ produkowana przez śródbłonek pod wpływem stymulacji przez Ach działa naczyniorozszerzająco poprzez aktywację sprzężonego z białkiem G_s receptora błonowego, aktywację cyklazy adenylowej i wzrost stężenia cAMP w miocytach. cAMP jest rozkładane przez fosfodiesterazy (PDEs), których aktywność jest modulowana przez cGMP [Maurice, 03]. Głównym enzymem rozkładającym cAMP w mięśniówce naczyń jest PDE3, której aktywność jest hamowana przez zależny od NO wzrost stężenia cGMP. Wyniki moich doświadczeń z użyciem NO-donorów sugerują, że w wieku 1 miesiąca u myszy apoE/LDLR^{-/-} wrażliwość na NO jest zwiększona, więc tonicznie uwalniany ze śródbłonek NO może *via* cGMP hamować zależny od PDE3 rozkład cAMP i potęgować naczyniorozszerzające działanie PGI₂.

Znamienny jest fakt, że wytwarzanie PGI₂ w krążeniu wieńcowym i systemowym myszy apoE/LDLR^{-/-} było zwiększone w wieku 2, 4 i 8 miesięcy, a więc towarzyszyło układowej dysfunkcji śródbłonna. Natomiast przy prawidłowej biodostępności NO, u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca, produkcja PGI₂ nie była zwiększona. Zwiększona produkcja PGI₂ była wielokrotnie opisywana u pacjentów z hipercholesterolemią i miażdżycą [FitzGerald, 84; Mehta, 88; Belton, 00], w zwierzęcych modelach hipercholesterolemii wywołanej dietą [Norman, 94; Bode-Boger, 98; Kim, 91] oraz u myszy z genetyczną hipercholesterolemią [Pratico, 00; Belton, 03]. Co więcej, wzrost wytwarzania PGI₂ nie jest specyficzny dla hipercholesterolemii i miażdżycy, ale jest powszechny również w innych stanach upośledzonej biodostępności NO, jak niewydolność serca [Drelicharz, 08], hipertrójglicydemia [Lovati, 88], nadciśnienie tętnicze [Lemne, 92], przewlekłe choroby zapalne [Hishinuma, 01], infekcje [Bernard, 91] czy u palaczy tytoniu [McAdam, 05; Nowak, 87]. Powszechne współwystępowanie niedoboru NO i wzrostu wytwarzania PGI₂ w śródbłonku w różnych stanach patofizjologicznych sugeruje wspólne mechanizmy odpowiedzialne za obydwa zjawiska. PGI₂ produkowana jest z PGH₂ przez aktywność śródbłonkowego enzymu, syntazy prostacykliny (PGIS), PGH₂ natomiast powstaje z kwasu arachidonowego w reakcji katalizowanej przez COX-1 i COX-2 [Ullrich, 01]. PGIS w śródbłonku jest konstytutywnie aktywna, więc wytwarzanie PGI₂ jest zależne od dostępności kwasu arachidonowego i aktywności cyklooksygenaz. Obie formy COX, by być aktywne, wymagają pewnego stężenia nadtlenków w komórce (tzw. „peroxide tone”), który dla COX-2 wynosi 2.3 nM, a dla COX-1 21 nM [Ullrich, 01]. Głównym czynnikiem determinującym „peroxide tone” jest O₂⁻, którego zwiększona generacja w hipercholesterolemii z jednej strony upośledza biodostępność NO, ale również zapewnia poziom „peroxide tone” konieczny do pełnej aktywności COX i zwiększonego wytwarzania PGI₂, obserwowanego w warunkach dysfunkcji śródbłonna [Ullrich, 01]. Być może zwiększony „peroxide tone” stanowi wytłumaczenie dla zwiększonego wytwarzania PGI₂ toku rozwoju miażdżycy.

Inny mechanizm odpowiedzialny za upośledzenie biodostępności NO i wzrost produkcji PGI₂ w hipercholesterolemii może być związany z działaniem aktywowanych krążących płytek krwi na śródbłonek. Aktywowane krążące płytki krwi w hipercholesterolemii i innych stanach związanych z dysfunkcją śródbłonna upośledzają biodostępność śródbłonkowego NO, ale również uwalniają nadtlenki prostaglandyn, które dyfundują do śródbłonna i tam są metabolizowane do PGI₂ [Schafer, 84]. Dodatkowo, wydaje się, że NO może wywierać bezpośredni toniczny hamujący wpływ na produkcję PGI₂, gdyż upośledzenie biodostępności NO prowadzi do odhamowania jej produkcji *in vitro* i *ex vivo* [Osanai, 00; Matthews, 95], a

przywrócenie prawidłowej produkcji NO przez zwiększoną podaż l-argininy w diecie redukuje zwiększoną produkcję PGI₂ w hipercholesterolemii [Bode-Boger, 98].

Działanie wazoprotekcyjne PGI₂ obejmuje hamowanie aktywacji płytek, proliferacji mięśniówki naczyń oraz interakcji leukocytów i płytek krwi ze śródbłonkiem [Cheng, 02; Egan, 04; Kobayashi, 04], pokrywa się więc w pewnym stopniu z przeciwmiażdżycowym działaniem NO. Podczas gdy w warunkach fizjologii homeostaza układu krążenia jest utrzymana głównie dzięki działaniu NO, w warunkach dysfunkcji śródbłonka PGI₂ staje się głównym czynnikiem chroniącym naczynia [Godecke, 98; Anning, 06; Sun, 06], co potwierdzają również przedstawione w tej pracy wyniki. Ściana naczynia „broni się” przed upośledzeniem wytwarzania PGI₂, gdyż może ono mieć katastrofalne skutki, zwłaszcza w warunkach dysfunkcji śródbłonka. W modelach zwierzęcych i u pacjentów, hipertensyjny i prozakrzepowych efekt hamowania wytwarzania PGI₂ jest obecny wyłącznie przy równoczesnym zahamowaniu eNOS [McAdam, 99; Beierwaltes, 02; Sun, 06; Anning, 06]. Genetycznie modyfikowane myszy pozbawione receptora dla PGI₂ wykazują zwiększoną zakrzepową, zapalną i aterogenną odpowiedź w warunkach dysfunkcji śródbłonka wywołanej uszkodzeniem naczyń, ischemią/reperfuzją i hipercholesterolemią [Murata, 97; Xiao, 01; Cheng, 02; Kobayashi, 04; Egan, 04]. Ponadto, Arehart i wsp. wykazali, że naturalnie występująca u ludzi mutacja receptora dla PGI₂ (wariant receptora R212C), upośledzająca wiązanie PGI₂ i aktywację receptora, prowadzi do przyspieszonego rozwoju *atherothrombosis*, ale tylko u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, hiperlipidemią, palących tytoń czy cukrzycą, a więc w obecności czynników upośledzających biodostępność NO [Arehart, 08]. U pacjentów bez czynników ryzyka miażdżycy natomiast nie obserwowano przyspieszenia *atherothrombosis*, co potwierdza, że w warunkach upośledzonej biodostępności NO, PGI₂ odgrywa fundamentalną rolę w hamowaniu rozwoju patologii naczyń. Innym przykładem zgubnego wpływu niedoboru NO i braku kompensacyjnego wzmożonego wytwarzania PGI₂ jest cukrzyca [Nie, 06; Zou, 02]. W cukrzycy produkcja anionorodnika ponadtlenkowego w śródbłonku jest tak duża, że reaguje on z NO unieczynniając go, a powstałe duże ilości nadtlenoazotynu powodują nitrację reszt tyrozynowych białek, w tym PGIS [Zou, 96; Davis, 05; Nie, 06]. Efektem nitracji PGIS jest jej unieczynnienie, obniżone wytwarzanie PGI₂ [Johnson, 79; Silberbauer, 79] i nasilona patologia naczyń makro- i mikrokrążenia [Johansson, 08; Bartels, 09]. Wyniki przedstawione w tej pracy sugerują, że wzrost produkcji PGI₂ w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-} w warunkach podstawowych jest zależny od COX-2, natomiast po stymulacji przez Ach jest zależny od COX-1. Ponieważ PGI₂ powstaje w śródbłonku głównie

na skutek działania sił ścinających krążącej krwi, wydaje się, że główną rolę w kompensacyjnym wzroście wytwarzania PGI₂ u myszy apoE/LDLR^{-/-} odgrywa COX-2. Również u ludzi COX-2 jest głównym źródłem ogólnoustrojowej PGI₂ [McAdam, 99]. Tragicznym potwierdzeniem udziału COX-2 w kompensacyjnym wzroście wytwarzania PGI₂ w warunkach niedoboru NO u pacjentów były próby badań klinicznych z zastosowaniem selektywnych inhibitorów COX-2 (VIGOR, APPROVe) [Solomon, 05; Bresalier, 05] w prewencji gruczolaków jelita grubego, zakończone przedwcześnie z powodu dużej liczby powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów stosującymi celekoksyb lub rofekoksyb.

Podsumowując, u myszy apoE/LDLR^{-/-} upośledzonej biodostępności NO towarzyszy zwiększone wytwarzanie PGI₂ w krążeniu wieńcowym i układowym. PGI₂ staje się więc głównym przeciwplatekowym mechanizmem dysfunkcyjnego śródbłonka w hipercholesterolemii.

ZMIANY CZYNNOŚCI ŚRÓDBŁONKA WIEŃCOWEGO ZALEŻNEJ OD AUTAKOIDÓW PURYNOWYCH I ICH WEWNĄTRZNACZYNIOWYCH PRZEMIAN W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY

Trzecim głównym mechanizmem przeciwplatekowym śródbłonka naczyniowego, poza wytwarzaniem NO i PGI₂, jest błonowa ekspresja i aktywność kaskady ektoenzymów rozkładających ATP i ADP do adenozy. ATP i ADP rozkładany jest na skutek skoordynowanej aktywności 2 ektoenzymów śródbłonkowych, ektodifosfohydrolazy (eNTPD, CD39) i 5'-nukleotyduazy (CD73), do odpowiednio AMP i adenozy [Zimmermann, 00; Godecke, 08]. Aktywność śródbłonkowych CD39 i CD73 wykazuje silne działanie przeciwplatekowe i przeciwzapalne poprzez 2 mechanizmy [Kawashima, 00]. W pierwszej kolejności, CD39 rozkłada uwalniany z ziarnistości gęstych aktywowanych płytek silny mediator ich aktywacji, ADP. ADP działa auto i parakrynnie i poprzez wiązanie z płytkowymi receptorami P2Y1 [Jin, 98; Hechler, 98; Fabre, 99] rekrutuje i aktywuje kolejne płytki, nasila ich agregację [Marcus, 93] oraz zwiększa interakcje leukocytów ze śródbłonkiem [Oryu, 96]. Drugim mechanizmem przeciwplatekowego i przeciwzapalnego działania kaskady ektoenzymów śródbłonkowych jest wytwarzanie adenozy przez CD73. Adenoza, poprzez aktywację receptora A_{2A} (należących do klasy receptorów purynergicznycy P1) i wzrost cytoplazmatycznego cAMP, działa silnie przeciwplatekowo [Kawashima, 00], wzmacnia produkcję śródbłonkowego NO [Li, 95], hamuje śródbłonkowe

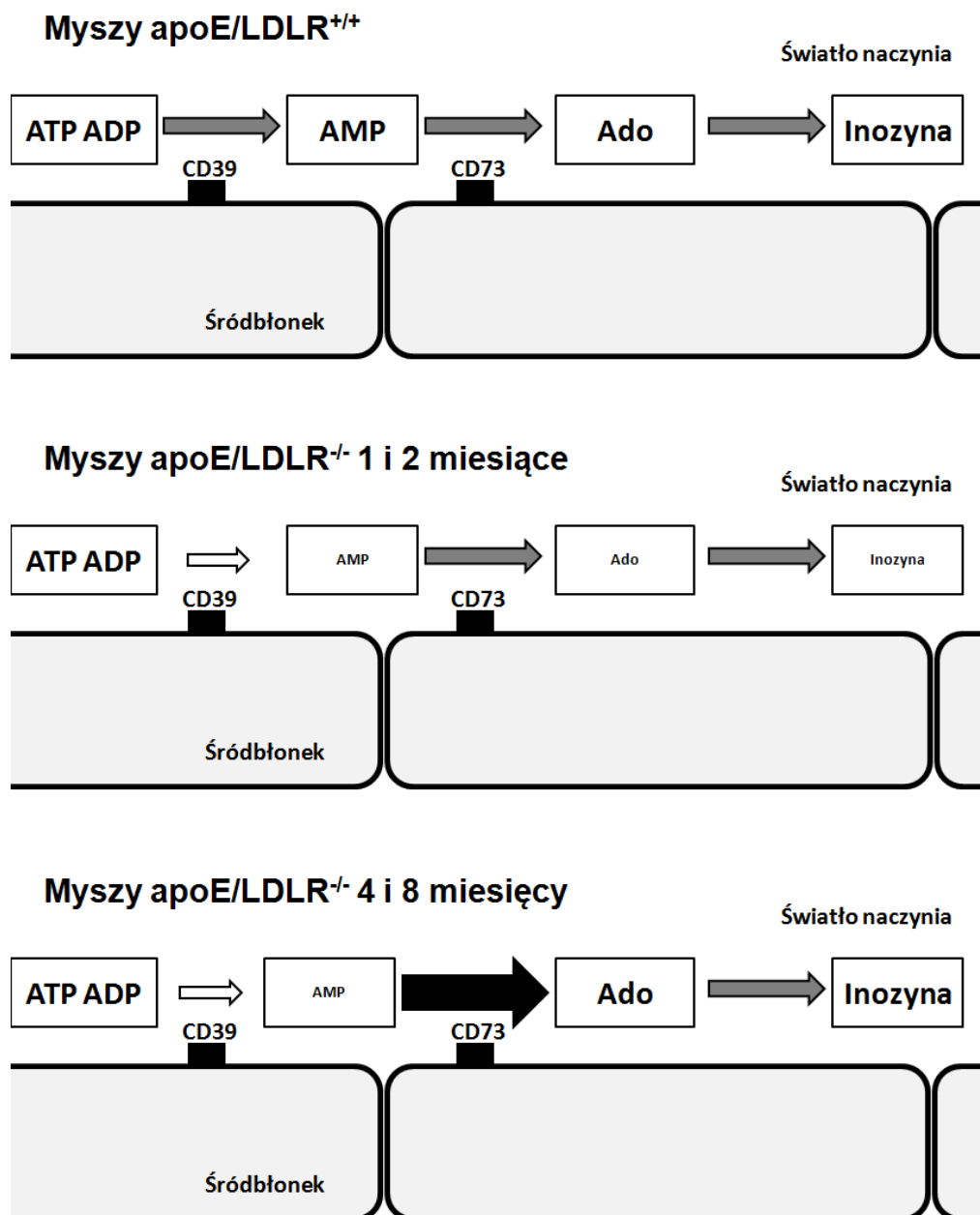
wydzielanie cytokin, ekspresję cząstek adhezyjnych [Bouma, 96], czynnika tkankowego [Deguchi, 98] i hamuje aktywność leukocytów [Cronstein, 83; Cronstein, 86].

Ponieważ aktywność CD39 i CD73 jest niezależna od uwalniania NO i PGI₂ przez śródbłonek [Marcus, 91; Marcus, 97], może mieć fundamentalne znaczenie w utrzymaniu aktywności przeciw płytkowej w stanach dysfunkcji śródbłonna. Dlatego też podjąłem próbę oszacowania wewnątrznaczyniowych przemian ADP, AMP i adenozyiny w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-} poprzez pomiary metabolitów purynowych w efluencie z izolowanego serca (**ryc. 30**). U myszy apoE/LDLR^{-/-} poziom AMP w efluencie sercowym po dosercowym podaniu ADP był obniżony w każdej grupie wiekowej, co może wskazywać na upośledzenie aktywności CD39 w krążeniu wieńcowym. Innym wytłumaczeniem tego zjawiska mógłby być przyspieszony rozkład AMP, ale ponieważ poziom metabolitów AMP, adenozyiny i inozyiny, po podaniu ADP również był obniżony u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy, jest to mało prawdopodobne, przynajmniej w tych grupach wiekowych. Kolejnym potencjalnym wytłumaczeniem jest znacznie zwiększony transport dokomórkowy adenozyiny u myszy apoE/LDLR^{-/-} połączony ze zwiększoną aktywnością CD73, lecz wydaje się to mało prawdopodobne, gdyż po podaniu adenozyiny jej poziom jest nieznacznie obniżony u myszy apoE/LDLR^{-/-}, co wyklucza duże zwiększenie dokomórkowego transportu adenozyiny. Poziom adenozyiny w efluencie wieńcowym po podaniu ADP był obniżony u myszy apoE/LDLR^{-/-} tylko w wieku 1 i 2 miesięcy, natomiast u myszy starszych wracał do poziomu fizjologicznego, co można być może tłumaczyć wzrostem aktywności drugiego enzymu kaskady rozkładającej ADP do adenozyiny, CD73, u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy. Rzeczywiście, po dosercowym podaniu AMP poziom adenozyiny w efluencie wieńcowym był zwiększony w wieku 4 i 8 miesięcy, a stosunek stężeń AMP do adenozyiny w efluencie był obniżony, co może wynikać ze zwiększonej aktywności CD73. Innym wytłumaczeniem zwiększonego poziomu adenozyiny po podaniu AMP mógłby być zmniejszony jej rozkład lub wychwyty przez komórki. Ten mechanizm można jednak wykluczyć, gdyż po podaniu adenozyiny jej poziom w efluencie sercowym był nieco obniżony, co sugeruje, że jej wychwyty mógł być wręcz zwiększony. Również odzwierciedlający aktywność deaminazy adenozyiny stosunek stężeń adenozyiny do inozyiny w efluencie wieńcowym po podaniu AMP był podobny u myszy apoE/LDLR^{-/-} i myszy kontrolnych, co przemawia przeciwko zwiększonemu rozkładowi adenozyiny u myszy apoE/LDLR^{-/-}. Tak więc, wydaje się, że zwiększone wytwarzanie adenozyiny przez CD73 w wieku 4 i 8 miesięcy kompensuje upośledzone wytwarzanie AMP z ADP i normalizuje produkcję adenozyiny z ADP, pomimo upośledzonej aktywności CD39 (**ryc. 30**). Warto

podkreślić, że głównym źródłem pozakomórkowej adenozyiny jest ATP rozkładany przez CD39 i CD73 *via* ADP i AMP, a jej generacja jest funkcją aktywności całej kaskady [Godecke, 08], więc upośledzenie aktywności CD39 w hipercholesterolemii może być przyczyną istotnego niedoboru adenozyiny *in vivo* w krążeniu wieńcowym, który jest kompensowany u myszy apoE/LDLR^{-/-}. Należy zaznaczyć, że przeprowadzone przeze mnie badania przemian nukleotydów w krążeniu wieńcowym są pierwszą próbą oszacowania wpływu hipercholesterolemii i miażdżycy na metabolizm nukleotydów adenozyinowych przez CD39 i CD73 *ex vivo*, jednak bezpośrednia aktywność enzymów ani aktywność wychwytu adenozyiny nie była oznaczana. Upośledzona generacja adenozyiny w krążeniu wieńcowym w wieku 1 i 2 miesięcy ma odbicie w czynności oporowych tętnic wieńcowych, gdyż odpowiedzi naczyniorozszerzające wywołane przez adenozyinę, AMP, ADP i ATP były zwiększone u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy. Co ciekawe, wzrost aktywności naczyniorozszerzającej badanych nukleotydów jest w całości zależny od aktywacji receptorów P1, gdyż był znoszony przez antagonistę receptorów P1, SPT. Zależny od receptorów P1 wzrost reaktywności naczyń wieńcowych jest prawdopodobnie mechanizmem kompensacji niedoboru adenozyiny, głównego fizjologicznego agonisty receptorów P1 [Burnstock, 07], umożliwiającym prawidłową regulację zależnego od adenozyiny przepływu wieńcowego w hipercholesterolemii.

Obniżenie wytwarzania AMP z ADP u myszy apoE/LDLR^{-/-} nie jest zaskoczeniem, gdyż aktywność śródbłonkowej CD39 obniża się w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego aktywacją śródbłonka cytokinami prozapalnymi *in vitro* i w warunkach ischemii/reperfuzji *in vivo* [Candinas, 96; Robson, 97; Krotz, 02]. W hipercholesterolemii wytwarzanie reaktywnych form tlenu w naczyniach jest również zwiększone i może tłumaczyć uzyskane wyniki sugerujące upośledzenie aktywności CD39. Interesującą obserwacją tej pracy jest wzrost generacji adenozyiny z AMP w wieku 4 i 8 miesięcy, sugerujący wzrost aktywności CD73, kompensujący upośledzenie aktywności CD39 i przywracający prawidłowe wytwarzanie adenozyiny z ADP. Wzrost aktywności śródbłonkowej CD73 nie był dotąd opisywany w hipercholesterolemii, ale jest dobrze opisanym mechanizmem kardioprotekcji w warunkach hipoksji i ischemii, w których również dochodzi do upośledzenia aktywności CD39 [Minamino, 95]. Wzrost aktywności śródbłonkowej CD73 jest również jednym z mechanizmów wazoprotekcyjnego działania statyn [Ledoux, 02], których duża skuteczność kliniczna w zapobieganiu *atherothrombosis* może wynikać ze wzmacniania endogennych śródbłonkowych mechanizmów przeciwpłytkowych, obejmujących również mechanizmy zależne od adenozyiny.

Prawidłowa aktywność CD39 i CD73 ma duże znaczenie w utrzymaniu homeostazy układu krążenia w warunkach fizjologii. Myszy pozbawione genów dla CD39 wykazują upośledzoną czynność hemostatyczną płytek krwi, przejawiającą się wydłużonym czasem krwawienia, nieefektywną hemostazą *in vivo* i upośledzona agregacja *ex vivo*, a tym zmianom towarzyszy fenotyp prozapalny i prozakrzepowy śródbłónka [Enjyoji, 99; Guckelberger, 04]. Pozbawienie aktywności CD73 z kolei prowadzi do jednoznacznie prozakrzepowego i prozapalnego fenotypu, wynikającego z niedoboru adenozyiny [Koszalka, 04]. Zwiększenie aktywności CD39 *in vivo* poprzez podanie jej rekombinowanej rozpuszczalnej formy lub transgenicznie zwiększoną ekspresję zmniejsza agregację płytek krwi oraz działa przeciwzapalnie w różnych modelach eksperymentalnych [Gayle, III, 98; Guckelberger, 04; Dwyer, 04]. Wydaje się więc, że upośledzenie wytwarzania adenozyiny (oraz prawdopodobne upośledzenie rozkładu ADP), obserwowane w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-}, może mieć swój udział w rozwoju miażdżycy i prozakrzepowego fenotypu w hipercholesterolemii. Powyższe rozważania pozostają jednak jak na razie w kręgu hipotez i wymagają dalszych, szczegółowych badań.



Rycina 30. Wewnątrzścięncowe przemiany nukleotydów purynowych u myszy apoE/LDLR^{+/+} i ich hipotetyczne zmiany u myszy apoE/LDLR^{-/-}. Panel górny: w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{+/+} dzięki aktywności śródbłonkowych ektoenzymów CD39 i CD73, ATP i ADP są dwuetapowo metabolizowane do odpowiednio AMP i adenozy (Ado). Powstała adenozy jest rozkładana przez deaminazę adenozynową do inozyny lub aktywnie transportowana do wnętrza komórek śródbłonka.

Panel środkowy: U myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy wytwarzanie AMP i adenozy z ADP jest upośledzone, co może wynikać z upośledzonej aktywności CD39 przy prawidłowej aktywności CD73.

Panel dolny: U myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy, wytwarzanie AMP, ale nie adenozy, z ADP jest upośledzone, natomiast wytwarzanie adenozy z AMP jest zwiększone, co może wynikać ze zwiększonej aktywności CD73, kompensującej upośledzoną aktywność CD39.

Strzałki białe – upośledzona aktywność CD39. Strzałki czarne – zwiększona aktywność CD73.

AKTYWACJA KRAŻĄCYCH PŁYTEK KRWI W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY

W celu zbadania aktywacji krążących płytek krwi u myszy apoE/LDLR^{-/-} oznaczałem błonową ekspresję aktywowanej GPIIb-IIIa, białek prozapalnych - selektyny P i CD40L, oraz osoczowy poziom sCD40L. Błonowa ekspresja selektyny P i aktywowanej GpIIb-IIIa nie różniła się pomiędzy myszami apoE/LDLR^{-/-} i apoE/LDLR^{+/+} w żadnej grupie wiekowej, natomiast błonowa ekspresja CD40L była większa u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1, 2, 4 i 8 miesięcy, a stężenie osoczowego sCD40L w wieku 2, 4 i 8 miesięcy.

Krażące płytki krwi pod wpływem różnych bodźców mogą ulegać aktywacji i przybierać fenotyp prozapalny i prozakrzepowy, co przejawia się zmianą kształtu, sekrecją ziarnistości, błonową ekspresją białek prozapalnych (CD40L, selektyna P), aktywacją receptorów błonowych (GPIIb-IIIa), wydzielaniem substancji prozakrzepowych i wazoaktywnych (jak ADP i TXA₂), adhezją do leukocytów, śródbłonna i białek macierzy podśródbłonkowej, agregacją i ostatecznie tworzeniem zakrzepu [Schwarz, 01]. Aktywacja płytek zachodzi głównie na skutek wiązania agonistów (ADP, TXA₂, trombina, vWF, kolagen czy 5-HT) z odpowiednimi receptorami błonowymi, zazwyczaj sprzężonymi z białkami G_i lub G_q, co uruchamia wewnątrzpłytkowe kaskady sygnałowe i powoduje reorganizację cytoszkieletu płytkowego. Najważniejszym i głównym wewnątrzpłytkowym mechanizmem aktywacji jest wzrost cytozolowego stężenia wapnia oraz aktywacja kinazy białkowej C (PKC) na skutek działania aktywnej fosfolipazy C (PLC). Aktywację płytek ogranicza toniczne działanie śródbłonkowego NO, PGI₂ oraz ektoenzymów CD39 i CD73 generujących adenozyne. NO działa poprzez aktywację płytkowej sGC z wytwarzaniem cGMP, natomiast PGI₂ i adenozyne aktywują odpowiednie receptory błonowe sprzężone z białkami G_s, co prowadzi do wzrostu wewnątrzpłytkowego stężenia cAMP. cGMP i cAMP w płytkach działają synergistycznie poprzez aktywację odpowiednich kinaz białkowych (cAK i cGK), czego efektem jest spadek wewnątrzpłytkowego stężenia wapnia, hamowanie reorganizacji cytoszkieletu, degranulacji ziarnistości, aktywacji białek powierzchniowych i szlaków transdukcji sygnałów aktywujących. W warunkach fizjologii układu krążenia istnieje równowaga pomiędzy działaniem czynników przeciwpłytkowych i aktywujących, a krążące płytki nie wykazują cech aktywacji. W hipercholesterolemii równowaga ta zostaje zaburzona na skutek bezpośredniego działania LDL i oxLDL na płytki krwi oraz upośledzenia śródbłonkowych mechanizmów przeciwpłytkowych [Chen, 96; Lehr, 95; Hein, 00; Ardlie, 89; Hassall, 83; Vink, 00]. LDL oraz oxLDL wywierają działanie aktywujące na płytki, głównie poprzez fosforylację i aktywację p38^{MAPK}, co aktywuje cytoplazmatyczną fosfolipazę

A₂ (cPLA₂). W reakcji katalizowanej przez cPLA₂ z fosfolipidów błonowych jest uwalniany kwas arachidonowy, z którego następnie, w reakcjach katalizowanych przez płytkową COX-1 i syntazę TXA₂, powstaje TXA₂ [Hackeng, 99b; Hackeng, 99a; Korporaal, 05]. TXA₂ działa auto i parakrynnie na odpowiedni receptor płytkowy (TR) sprzężony z białkiem G_q i G_{12/13} i amplifikuje aktywację płytek krwi wywołaną przez LDL i oxLDL, uruchamiając oparte na aktywacji PLC, PKC i wzroście stężenia wapnia główne szlaki aktywacji płytek. U pacjentów z hipercholesterolemią występują cechy pełnej aktywacji płytek krwi, tj. wzrost produkcji TXA₂ [FitzGerald, 84; Davi, 92; Broijersen, 98a; Belton, 00], zwiększona ekspresja błonowa P-selektyny [Broijersen, 98b], sP-selektyny [Davi, 98; Ferroni, 99], CD40L [Garlichs, 01b; Cipollone, 02; Semb, 03; Sanguigni, 05; Martino, 07], aktywacja GPIIb-IIIa [Labios, 05] oraz tworzenie agregatów płytkowo-leukocytarnych [Klinkhardt, 02]. W mysich modelach hipercholesterolemii i miażdżycy, pomimo zwiększonej podatności na eksperymentalnie wywołaną zakrzepicę tętniczą [Schafer, 03; Wilson, 07], jedyną jednoznacznie udokumentowaną cechą aktywacji krążących płytek krwi *in vivo* jest wzrost syntezy TXA₂ [Pratico, 00; Cyrus, 01; Belton, 03]. Płytkowa ekspresja GPIIb-IIIa w mysiej hipercholesterolemii nie była dotąd badana, natomiast istnieją rozbieżności co do płytkowej ekspresji selektyny P. Wyniki uzyskane przez Kobayashi i wsp. oraz Wilsona sugerują, że spoczynkowa błonowa ekspresja selektyny P u myszy apoE^{-/-} nie jest zwiększona, co znajduje potwierdzenie w przedstawionych w tej pracy wynikach [Kobayashi, 04; Wilson, 07]. Z drugiej strony, w modelu ostrej hipercholesterolemii wywołanej dietą, stwierdzono wzrost ekspresji płytkowej selektyny P [Tailor, 03]. Również zwiększone interakcje płytek krwi i leukocytów ze śródbłonkiem, zależne od selektyny P i obecne w mysich modelach hipercholesterolemii [Scalia, 98; Stokes, 06], sugerują jej zwiększoną płytkową ekspresję. Wyżej opisane rozbieżności mogą wynikać z metodyki badań. W czasie aktywacji płytek dochodzi do degranulacji ziarnistości α zawierających selektynę P, co zwiększa jej błonową ekspresję. Przez połączenie selektyny P z odpowiednim receptorem na neutrofilach i monocytach (PSGL-1) [Hamburger, 90], dochodzi do ich aktywacji i tworzenia kompleksów płytkowo-leukocytarnych [Peters, 99], co umożliwia interakcje leukocytów ze śródbłonkiem i rekrutację leukocytów do miejsc zapalenia. Po związaniu z PSGL-1 płytkowa selektyna P jest degradowana do rozpuszczalnej formy osoczowej [Michelson, 96b], a płytki wykazujące ekspresję selektyny P są fagocytowane [Valles, 93; Peters, 99; Maugeri, 09]. Z tego powodu oznaczanie błonowej ekspresji selektyny P może nie wykrywać aktywowanych płytek i stąd wynikają niejednoznaczności w wynikach badań aktywacji płytek krwi opartych na oznaczaniu błonowej ekspresji selektyny P [Michelson, 96a].

Pomimo braku wzrostu ekspresji selektyny P i aktywacji GPIIb-IIIa, błonowa ekspresja CD40L w płytkach krwi myszy apoE/LDLR^{-/-} była zwiększona we wszystkich grupach wiekowych. Ekspresja selektyny P i CD40L oraz aktywacja GPIIb-IIIa w płytkach krwi jest zależna od aktywacji różnych szlaków sygnałowych, więc możliwa jest selektywna ekspresja tylko jednej z prozapalnych cząstek płytkowych [Schwarz, 00; Hermann, 01; Inwald, 03]. CD40L, podobnie jak selektyna P, jest magazynowany w puli cytoplazmatycznej płytek [Henn, 01; Hermann, 01] i przemieszczany do plazmalemmy pod wpływem bodźca aktywującego. Po reakcji z odpowiednim receptorem błonowym (CD40), CD40L jest usuwany do osocza, gdzie krąży jako rozpuszczalna forma (sCD40L) [Henn, 01]. Aktywowane płytki krwi są głównym źródłem sCD40L [Andre, 02a; Viallard, 02], a osoczowe stężenie sCD40L jest odzwierciedleniem błonowej ekspresji CD40L w aktywowanych płytkach [Cipollone, 02; Sanguigni, 05]. Zależność tę potwierdzają do pewnego stopnia uzyskane w tej pracy wyniki, gdyż osoczowe stężenie sCD40L u myszy apoE/LDLR^{-/-} było zwiększone w wieku 2, 4 i 8 miesięcy. Jedynie u 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} poziom sCD40L nie był podniesiony, pomimo zwiększonej płytkowej ekspresji błonowego CD40L. Do uwalniania sCD40L z aktywowanych płytek krwi wymagany jest udział dodatkowych płytkowych przekazników, m. in. TXA₂ [Nannizzi-Alaimo, 03], które mogą być hamowane przez śródbłonkowy NO u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca. U apoE/LDLR^{-/-} z upośledzoną biodostępnością NO w wieku 2 miesięcy i starszych, produkcja płytkowego TXA₂ może być zwiększona i przyczyniać się do uwalniania sCD40L. U pacjentów z hipercholesterolemią płytkowa ekspresja CD40L oraz osoczowe stężenie sCD40L są zwiększone [Garlichs, 01b; Semb, 03; Sanguigni, 05]. Stężenie sCD40L jest również podniesione w osoczu myszy apoE^{-/-} [Li, 08], co sugeruje jego zwiększoną płytkową ekspresję.

Błonowa ekspresja CD40L w płytkach krwi nie była dotąd bezpośrednio badana w modelu mysiej hipercholesterolemii. CD40L jest głównym płytkowym mediatorem zapalnym i wzrost jego ekspresji w hipercholesterolemii ma duże znaczenie dla rozwoju dysfunkcji śródbłonka, miażdżycy i jej powikłań zakrzepowych. Osoczowe sCD40L wykazuje aktywność biologiczną w stężeniach rzędu 0.5 – 1.0 µg/ml [Urbich, 02; Chen, 08], a więc znacznie przekraczających stężenia w osoczu pacjentów i myszy apoE/LDLR^{-/-} i prawdopodobnie nie ma znaczenia patofizjologicznego *in vivo* [Henn, 01].

Błonowy CD40L poprzez bezpośrednią interakcję z receptorem CD40 [Henn, 01] aktywuje prozapalnie główne komórki biorące udział w patogenezie miażdżycy, a więc śródbłonek, płytki krwi i monocyty [Alderson, 93; Kiener, 95; Mach, 97]. CD40L działa również

pośrednio, pobudzając limfocyty do produkcji silnie aktywującego śródbłonek interferonu [Poudrier, 98; Stokes, 09a].

CD40L stymuluje śródbłonek do ekspresji cząstek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1, E-selektyna) [Karmann, 95; Kotowicz, 00; Singh, 01; Omari, 03], produkcji chemokin (Il-8, MCP-1) [Thienel, 99] i cytokin prozapalnych (Il-12) [Dechanet, 97; Lienenluke, 00] oraz wzmacnia produkcję reaktywnych form tlenu w śródbłonku, efektem czego jest upośledzenie biodostępności NO i dysfunkcja śródbłonka [Urbich, 02; Davis, 05; Chen, 08; Stokes, 09a]. Aktywacja śródbłonka przez CD40L w hipercholesterolemii *in vivo* zachodzi w miejscach nasilonych interakcji elementów morfotycznych krwi ze ścianą naczynia, a więc w dużych tętnicach oraz *venulach* mikrokrążenia, czego efektem jest rozwój miażdżycy [Mach, 98; Lutgens, 99; Schonbeck, 00], zapalenia śródbłonka *venul* oraz dysfunkcji motorycznej arterioli [Heitzer, 06; Wohrle, 06; Stokes 09a].

CD40L, działając przez CD40, aktywuje również płytki krwi do degranulacji i ekspresji selektyny P [Inwald, 03], co nasila interakcje płytek z leukocytami i śródbłonkiem i ich wzajemną aktywację [Stokes, 06]. CD40L wiąże się również z płytkową GPIIb-IIIa, co stabilizuje agregaty płytkowe w zatorze tętniczym, nasila eksperymentalną zakrzepicę w warunkach dużych sił ścinających [Andre, 02b] i sugeruje, że CD40L może odgrywać rolę w zakrzepowych powikłaniach miażdżycy. Istotnie, podniesione stężenie sCD40L występuje u pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi [Garlichs, 01a] i jest również związane z ryzykiem powikłań *atherothrombosis* u zdrowych kobiet [Schonbeck, 01].

Podsumowując, można postawić tezę, że u myszy apoE/LDLR^{-/-}, pomimo zwiększonego śródbłonkowego wytwarzania PGI₂ kompensującego upośledzoną biodostępność NO i upośledzone wytwarzania adenozyiny, dochodzi do selektywnej aktywacji układu CD40L – sCD40L, co może mieć kluczowe znaczenie w rozwoju dysfunkcji śródbłonka i miażdżycy w tym modelu [Mach, 98].

ODPOWIEDŹ OSTREJ FAZY W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY

W celu zbadania wpływu hipercholesterolemii i miażdżycy na odpowiedź ostrej fazy u myszy apoE/LDLR^{-/-} oznaczałem osoczowe stężenie białka ostrej fazy, SAA. Stężenie SAA w osoczu myszy apoE/LDLR^{-/-} było zwiększone wyłącznie w wieku 4 i 8 miesięcy, a więc dopiero w wieku, w którym występują nasilone zmiany miażdżycowe w dużych tętnicach. U młodszych myszy poziom SAA nie był podniesiony.

U myszy SAA jest głównym białkiem należącym do grupy białek ostrej fazy, czyli protein osocza, których wątrobowa synteza jest zwiększona w odpowiedzi na uszkodzenie

tkanek lub zakażenie [Uhlar, 99]. U ludzi głównym białkiem ostrej fazy jest CRP, które jednak nie występuje u myszy [Szalai, 02]. Głównymi mediatorami pobudzającymi wątrobową produkcję SAA i innych białek ostrej fazy są prozapalne cytokiny (Il-6, Il-1 β , TNF- α), uwalniane przez aktywowane komórki zapalne w miejscu lokalnego zapalenia wywołanego przez uraz tkanek lub infekcję [Kushner, 82]. Wzrost osoczowego stężenia SAA i CRP towarzyszy nie tylko ostrym stanom zapalnym wywołanym przez uraz lub infekcję, ale też czynnikom ryzyka miażdżycy związanym z dysfunkcją i zapaleniem śródbłonna oraz aktywacją krążących płytek krwi, jak hipercholesterolemia, otyłość, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, hipertrójglicydemia czy palenie tytoniu [Danesh, 04; Chait, 05]. Może to sugerować, że odpowiedź ostrej fazy jest generowana przez czynniki ryzyka miażdżycy *per se* lub mediatory zapalne uwalniane przez aktywowane płytki lub śródbłonek. Uzyskane w tej pracy wyniki nie potwierdzają tych przypuszczeń, gdyż poziom SAA nie był podniesiony u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2 miesięcy, pomimo obecności hipercholesterolemii, dysfunkcji śródbłonna i cech aktywacji krążących płytek krwi. Również u pacjentów z hipercholesterolemią występuje wzrost poziomu CRP, który jednak nie koreluje ze stężeniem LDL [Ridker, 01] i nie jest obniżany przez leczenie aspiryną [Ferroni, 99]. Nie stwierdza się również zależności pomiędzy wzrostem stężenia CRP a występowaniem dysfunkcji śródbłonna w hipercholesterolemii [Rueda-Clausen, 09]. Powyższe fakty przemawiają przeciwko udziałowi aktywowanych krążących płytek krwi i dysfunkcji śródbłonna w wyzwalaniu odpowiedzi ostrej fazy w hipercholesterolemii.

Obserwowany przez mnie wzrost poziomu SAA u myszy apoE/LDLR^{-/-} dopiero w wieku 4 i 8 miesięcy sugeruje, że jest on wynikiem lokalnego zapalenia i wytwarzania cytokin zapalnych przez zmienioną miażdżycowo ścianę naczynia i wtórnej stymulacji wątrobowej odpowiedzi ostrej fazy. W płytce miażdżycowej toczy się proces zapalny z udziałem płytek krwi, makrofagów i limfocytów, które produkują prozapalne cytokiny (Il-6, Il-1, TNF- α) uwalniane do krążenia i mogące stymulować hepatocyty do produkcji białek ostrej fazy [Ross, 99]. Potwierdzeniem centralnej roli lokalnego zapalenia w tętnicach w wywoływaniu wątrobowej odpowiedzi ostrej fazy jest fakt, że leczenie przeciwzapalne statynami, redukujące ilość komórek zapalnych w płytkach miażdżycowych [Williams, 98], zmniejsza również poziom CRP w hipercholesterolemii [Ferroni, 99; Ridker, 01]. U pacjentów osoczowy poziom CRP i SAA jest pozytywnie skorelowany z klinicznym i radiologicznym nasileniem choroby niedokrwiennej serca [Jousilahti, 01; Mezaki, 03]. Również w zwierzęcych modelach hipercholesterolemii i miażdżycy stwierdzono korelację między nasileniem miażdżycy a poziomem osoczowego SAA [Lewis, 04; van Lenten, 07]. Co więcej,

Liao i wsp. stwierdzili, że wzrost SAA wywołany długotrwałą dietą aterogenną był większy w szczepie myszy wrażliwym na rozwój miażdżycy (C57Bl/6) niż w szczepie myszy miażdzyco-opornym (C3H/HeJ) [Liao, 94]. Tak więc, uzyskane przez mnie wyniki wydają się potwierdzać, że SAA jest pośrednim markerem nasilenia miażdżycy i zapalenia ściany naczynia, ale nie uogólnionej dysfunkcji śródbłonna i aktywacji krążących płytek krwi w hipercholesterolemii.

Innym zagadnieniem związanym z rolą SAA w hipercholesterolemii i miażdżycy jest jego wpływ na rozwój *atherothrombosis*. Badania epidemiologiczne i kliniczne sugerują, że podniesiony poziom SAA, jak również CRP, jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju *atherothrombosis* [Liuzzo, 94; Ridker, 98; Ridker, 00; Albert, 03; Blake, 03]. W związku z tym, niektórzy autorzy sugerują, że SAA może mieć bezpośredni wpływ patogenny na rozwój blaszki miażdżycowej [Lewis, 04; van Lenten, 07], aczkolwiek jak dotąd nie ma na to bezpośrednich dowodów wynikających z badań *in vivo*. *In vitro*, SAA wykazuje szereg działań o proaterogennym potencjale, jak pobudzanie chemotaksji i adhezji monocytów i neutrofilii [Badolato, 95; Badolato, 00], upośledzanie biodostępności śródbłonkowego NO przez stymulację produkcji reaktywnych form tlenu [Wang, 08] czy pobudzanie syntezy proteoglikanu przez mioocyty i retencji lipoprotein w tętnicach [Wilson, 08]. SAA również wpływa na transport lipidów i wypiera apolipoproteinę apoA-I z cząstek HDL, co hamuje estryfikację cholesterolu i zwiększa stężenie wolnego cholesterolu w osoczu [Steinmetz, 89]. Dodatkowo, SAA wiąże wolny cholesterol i zwiększa jego wychwyt przez makrofagi [Kisilevsky, 92]. Z drugiej strony, SAA wykazuje również działanie przeciwzapalne i przeciwmiażdżycowe: hamuje aktywację płytek krwi [Zimlichman, 90], zwiększa wytwarzanie PGI₂ [Shainkin-Kestenbaum, 96] i hamuje czynność limfocytów [Benson, 79]. Tak więc, udział SAA w patogenezie miażdżycy nie jest rozstrzygnięty. U myszy apoE/LDLR^{-/-} zwiększone stężenie SAA towarzyszyło wyłącznie już rozwiniętej miażdżycy, co sugeruje, że SAA nie odgrywa znaczącej roli na wczesnych etapach rozwoju miażdżycy i wydaje się być jedynie wskaźnikiem odpowiedzi zapalnej wątroby towarzyszącej progresji miażdżycy.

WYDOLNOŚĆ WYSIŁKOWA W HIPERCHOLESTEROLEMII I MIAŻDŻYCY

W celu zbadania wpływu hipercholesterolemii i miażdżycy na wydolność wysiłkową, myszy apoE/LDLR^{-/-} poddane zostały próbie wysiłkowej. Wydolność wysiłkowa myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 2, 4 i 8 miesięcy była prawidłowa, a wywołane wysiłkiem wytwarzania PGI₂ było większe niż u myszy kontrolnych.

Prawidłowa tolerancja wysiłku fizycznego zależy od wydolności zintegrowanych śródbłonkowych mechanizmów przeciwplatekowych i naczyniorozszerzających, zapewniających odpowiednią perfuzję tkankową, zwłaszcza perfuzję mięśnia sercowego, i transport tlenu do mięśni. Fizjologiczną reakcją na intensywny wysiłek fizyczny jest aktywacja krążących płytek krwi, co przejawia się zwiększoną produkcją TXA_2 , błonową ekspresją selektywny P krążących płytek krwi oraz tworzeniem agregatów płytkowo-płytkowych i płytkowo-leukocytarnych [Mehta, 83; Laustiola, 84; Bartsch, 99; Li, 99; Broadley, 03; Li, 07]. Równocześnie, zwiększone jest uwalnianie PGI_2 ze ściany naczynia [Mehta, 83; Laustiola, 84; Feng, 99; Zoladz, 09]. Zwiększone uwalnianie PGI_2 wydaje się mieć ogromną rolę w utrzymaniu prawidłowej wydolności wysiłkowej, gdyż wzrost produkcji PGI_2 w wysiłku koreluje z wydolnością wysiłkową [Zoladz, 09]. PGI_2 ogranicza nadmierną aktywację krążących płytek i tworzenie agregatów płytkowych, które mogą upośledzać przepływ krwi w mikronaczyniach mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego (mechanicznie czopując kapilary lub uwalniając mediatory obkurczające naczynia, takie jak TXA_2 czy 5-HT), ograniczać perfuzję tkankową i upośledzać wydolność wysiłkową. Rolę przeciwplatekowej PGI_2 w fizjologii wysiłku fizycznego podkreśla fakt, że analogi PGI_2 poprawiają wydolność wysiłkową [Bugiardini, 86]. W przeciwieństwie do PGI_2 , udział NO w regulacji czynności układu krążenia w wysiłku fizycznym nie jest jednoznaczny, a prawidłowa biodostępność NO nie wydaje się odgrywać głównej roli w utrzymaniu prawidłowej wydolności wysiłkowej [Persson, 90; Wilson, 93; O'Leary, 94; Hussain, 92].

U pacjentów z miażdżycą wydolność wysiłkowa jest upośledzona, aczkolwiek mechanizm tego zjawiska jest złożony i oprócz nadmiernej wysiłkowej aktywacji krążących płytek krwi obejmuje również upośledzenie perfuzji tkankowej spowodowane zwężeniem zmienionych miażdżycowo tętnic [Kishi, 92; Mehta, 83]. Wpływ patologii układu krążenia na wytwarzanie PGI_2 w toku wysiłku fizycznego nie jest jednoznaczny. Według niektórych doniesień, w obecności miażdżycy, nadciśnienia tętniczego czy cukrzycy, wzrost produkcji PGI_2 w toku wysiłku fizycznego jest zwiększony, co pozwala na utrzymanie aktywacji płytek na poziomie fizjologicznym dla wysiłku [Lemne, 92; Lindemann, 99; Hilberg, 04]. Inni autorzy twierdzą jednak [Mehta, 83; Kishi, 92], że miażdżycza upośledza wysiłkowe uwalnianie PGI_2 , co wiąże się ze zwiększoną aktywacją płytek, konsekwencją której może być, oprócz upośledzonej wydolności wysiłkowej, występowanie zakrzepowych powikłań miażdżycy, których ryzyko u pacjentów niewytrenowanych w intensywnym wysiłku fizycznym rośnie wielokrotnie [Bartsch, 99].

Podsumowując, uzyskane w tej pracy wyniki wykazują, że u myszy apoE/LDLR^{-/-} wysiłek fizyczny związany jest ze zwiększonym wytwarzaniem PGI₂, co może przyczyniać się do zachowania wydolności wysiłkowej na prawidłowym poziomie, pomimo obecności hipercholesterolemii i blaszek miażdżycowych.

WNIOSKI

1. W modelu genetycznej hipercholesterolemii, jakim są myszy apoE/LDLR^{-/-}, miażdżycy w naczyniach tętniczych rozwija się spontanicznie. Rozwój blaszek miażdżycowych wyprzedza aktywacja krążących płytek krwi (CD40L) oraz upośledzone układowe wytwarzanie NO przez śródbłonek, a miażdżycy towarzyszy wzrost produkcji białka ostrej fazy, SAA.
2. W krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR^{-/-} występują zmiany aktywności wszystkich trzech głównych śródbłonkowych mechanizmów przeciwplatekcyjnych, NO, PGI₂ i adenozyiny. W izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{-/-} nie ma upośledzenia rozkurczu naczyń wieńcowych zależnego od śródbłonkowego NO, a nawet ta odpowiedź jest zwiększona u myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 miesiąca. Zwiększona wrażliwość na donory NO sugeruje jednak, że *in vivo* w krążeniu wieńcowym biodostępność NO może być upośledzona.
3. Wieńcowe wytwarzanie PGI₂ u myszy apoE/LDLR^{-/-} jest zwiększone w sposób zależny zarówno od COX-1, jak i COX-2. Wytwarzanie PG₁₂ jest zwiększone również na poziomie całego krążenia systemowego.
4. U młodych myszy apoE/LDLR^{-/-} upośledzone jest wewnątrznaczyniowe wytwarzanie adenozyiny z ADP w krążeniu wieńcowym, prawdopodobnie na skutek dysfunkcji CD39. Wytwarzanie adenozyiny w krążeniu wieńcowym ulega normalizacji u myszy starszych, prawdopodobnie dzięki kompensacyjnie zwiększonej aktywności CD73. Upośledzonemu wytwarzaniu adenozyiny towarzyszy zwiększona wrażliwość tętnic wieńcowych na adenozyinę.
5. Można przypuszczać, że opisane w tej pracy kompensacyjno-adaptacyjne zmiany czynności śródbłonka wieńcowego pozwalają zachować prawidłową wydolność wysiłkową u myszy apoE/LDLR^{-/-}, pomimo obecności prozapalnego i aktywującego płytki krwi środowiska hipercholesterolemii oraz upośledzonej biodostępności NO.

STRESZCZENIE

Prozapalna aktywacja krążących płytek krwi w hipercholesterolemii jest jednym z głównych patomechanizmów rozwoju miażdżycy. Aktywowane płytki krwi, poprzez szereg prozapalnych mechanizmów, wywołują dysfunkcję i zapalenie śródbłonka, migrację komórek zapalnych do ściany naczynia i rozwój blaszki miażdżycowej. Główne czynniki hamujące prozapalną aktywację krążących płytek krwi to śródbłonkowa produkcja NO, PGI₂ oraz aktywność śródbłonkowych ektoenzymów rozkładających aktywujący płytki ADP do działającej przeciwpłytkowo adenozyiny. Pomimo tego, że w hipercholesterolemii biodostępność NO jest upośledzona, wydaje się, że w śródbłonku ujawniają się inne mechanizmy kompensacyjne i adaptacyjne, hamujące aktywację płytek krwi, zapalenie naczyń i rozwój miażdżycy.

Celem tej pracy doktorskiej było określenie wpływu hipercholesterolemii i miażdżycy w toku jej rozwoju na aktywność głównych śródbłonkowych mechanizmów przeciwpłytkowych i przeciwzapalnych (NO, PGI₂ i adenozyiny) w krążeniu wieńcowym.

Badania niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzane były w mysim modelu genetycznej hipercholesterolemii i miażdżycy (myszy apoE/LDLR^{-/-}). W modelu tym myszy pozbawione są genów dla apolipoproteiny E oraz receptora dla LDL i metabolizm lipoprotein jest zaburzony, co skutkuje znaczną hipercholesterolemią i spontanicznym rozwojem miażdżycy.

Śródbłonkowe mechanizmy przeciwpłytkowe u myszy apoE/LDLR^{-/-} były badane w krążeniu wieńcowym przed rozwojem miażdżycy (myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 1 i 2 miesięcy) oraz w obecności miażdżycy o różnym stopniu nasilenia (myszy apoE/LDLR^{-/-} w wieku 4 i 8 miesięcy). Czynność krążenia wieńcowego była badana w modelu izolowanego serca myszy, perfundowanego wstecznie wg Langendorffa. Badane były następujące parametry: wielkość odpowiedzi naczyniorozszerzającej zależnej od śródbłonkowego NO (wywołanej przez Bk), śródbłonkowej PGI₂ (wywołanej przez Ach) lub od adenozyiny i jej wewnątrznaczyniowego wytwarzania (wywołanej przez AMP, ADP lub ATP). Badano również reaktywną hiperemię (RH30s) oraz odpowiedzi wywołane przez donory NO (SNP, SNAP, DEA/NO). Badania czynnościowe krążenia wieńcowego uzupełnione były o pomiary biochemiczne. W efluencie sercowym oznaczano poziom metabolitów PGI₂ (6-keto-PGF_{1α}) i adenozyiny. Aby ocenić aktywność śródbłonkowego NO i PGI₂ w krążeniu układowym, analizowano poziom HbNO w erytrocytach i stężenie 6-keto-PGF_{1α} w osoczu.

Badano również wybrane parametry prozapalnej aktywacji krążących płytek krwi metodą cytometrii przepływową (błonowa ekspresja selektyny P, CD40L i aktywowanej GPIIb-IIIa), a także osoczowe stężenie sCD40L oraz białka ostrej fazy, SAA. W końcu przeprowadzono badania wydolności wysiłkowej myszy, które miały ocenić całkowitą wydolność śródbłonkowych mechanizmów przeciwplatekcyjnych i wazoregulacyjnych.

Uzyskane wyniki dowodzą, że u myszy apoE/LDLR^{-/-} zmiany miażdżycowe są obecne począwszy od 4 miesiąca życia i towarzyszy im wzrost osoczowego stężenia SAA. Obecność zmian miażdżycowych jest poprzedzona upośledzeniem układowej biodostępności NO oraz aktywacją krążących płytek krwi zależną od ekspresji CD40L, począwszy od 2 miesiąca życia myszy apoE/LDLR^{-/-}.

W izolowanym sercu myszy apoE/LDLR^{-/-} obecne są zmiany aktywności przekąźnictwa śródbłonkowego zależnego od NO, PGI₂ i adenozyne. Zależna od NO czynność śródbłonka wieńcowego nie jest upośledzona, prawdopodobnie dzięki kompensacyjnie zwiększonej wrażliwości ściany naczyń wieńcowych na działanie NO na poziomie sGC. Zwiększone jest natomiast wieńcowe wytwarzanie PGI₂, zarówno przez śródbłonkowy COX-2, jak i COX-1. U młodych myszy apoE/LDLR^{-/-} upośledzone jest wewnątrznaczyniowe wytwarzanie adenozyne z ADP w krążeniu wieńcowym, prawdopodobnie na skutek dysfunkcji CD39, a niedoborowi adenozyne towarzyszy zwiększona wrażliwość tętnic wieńcowych na adenozynę. Wewnątrzwieńcowe wytwarzanie adenozyne ulega normalizacji u myszy starszych, prawdopodobnie dzięki kompensacyjnie zwiększonej aktywności CD73. Co ciekawe, odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowego NO i PGI₂ są zwiększone u 1 miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}.

Wydolność wysiłkowa nie jest upośledzona u myszy apoE/LDLR^{-/-}, a próbie wysiłkowej towarzyszy zwiększone układowe wytwarzanie PGI₂.

Uzyskane wyniki wskazują, że u myszy ApoE/LDL^{-/-} występują adaptacyjne zmiany czynności śródbłonka wieńcowego, które obejmują wszystkie trzy układy przeciwplatekowej obrony ściany naczynia (NO, PGI₂, adenozyne). Adaptacyjne zmiany czynności śródbłonka mogą być podstawą utrzymania prawidłowej wydolności wysiłkowej u myszy ApoE/LDL^{-/-}, pomimo obecności hipercholesterolemii i zaawansowanych zmian miażdżycowych

SUMMARY

Proinflammatory activation of circulating platelets is the principal pathomechanism of atherosclerosis development. Activated platelets stimulate endothelial inflammation and dysfunction, migration of inflammatory cells into vessel wall and atherosclerotic plaque development. Endothelial release of NO and PGI₂ and the activity of endothelial ectoenzymes generating adenosine are the main factors inhibiting proinflammatory activation of circulating platelets. In hypercholesterolemia, although NO bioavailability is impaired, it seems that endothelium develops other compensatory and adaptive mechanisms, attenuating platelet activation, vessel wall inflammation and atherosclerosis development.

The aim of this work was to characterise the activity of the main endothelial antiplatelet and antiinflammatory mechanisms (NO, PGI₂ and adenosine) in the coronary circulation in hypercholesterolemic mice along the development of atherosclerosis.

Mouse model of hypercholesterolemia and atherosclerosis was used (apoE/LDLR^{-/-} mice). In this model, genes for apolipoprotein E and LDL receptor are absent and lipoprotein metabolism is profoundly altered, resulting in hypercholesterolemia and spontaneous development of atherosclerosis.

Endothelium-dependent antiplatelet mechanisms in apoE/LDLR^{-/-} mice were investigated in coronary circulation before atherosclerosis development (in 1 and 2 month old apoE/LDLR^{-/-} mice) and in the presence of atherosclerotic lesions (in 4 and 8 month old apoE/LDLR^{-/-} mice). Coronary function was examined in the isolated mouse heart model according to Langendorff. The following parameters were examined: NO-dependent vasodilation (evoked by Bk), PGI₂-dependent vasodilation (evoked by Ach) and vasodilation evoked by adenosine or dependent on intracoronary production of adenosine (evoked by AMP, ADP or ATP). Reactive hyperemia and vasodilation evoked by NO-donors (SNP, SNAP, DEA/NO) were also examined. Functional characterisation of coronary vessels was accompanied by biochemical studies. Concentrations of PGI₂ (6-keto-PGF_{1α}) and adenosine metabolites were determined in coronary effluent. To investigate the activity of NO and PGI₂ in systemic circulation, HbNO level in erythrocytes and 6-keto-PGF_{1α} concentration in plasma was determined. Selected parameters of proinflammatory activation of circulating platelets were analyzed by flow cytometry (membrane expression of P-selectin, CD40L and activated GPIIb-IIIa), as well as plasma concentrations of sCD40L and acute phase protein, SAA.

Lastly, to determine sufficiency of endothelium-dependent antiplatelet and vasoregulatory function, physical exercise capacity was examined.

The results prove that in apoE/LDLR^{-/-} mice atherosclerotic lesions are present since 4 month of age and are accompanied by the increased plasma concentration of SAA.

Before atherosclerotic lesions development, starting at 2 month of age, systemic bioavailability of NO is impaired and circulating platelet CD40L-dependent activity is increased in apoE/LDLR^{-/-} mice.

In the isolated heart of apoE/LDLR^{-/-} mice, the activity of endothelial NO, PGI₂ and adenosine is altered. NO-dependent coronary endothelial function is not impaired, likely due to compensatory increased sensitivity of vessel wall to action of NO on the level of sGC. Coronary endothelial PGI₂ production is increased and dependent on both COX-2- and COX-1. Intracoronary adenosine production is attenuated in young apoE/LDLR^{-/-} mice, likely due to CD39 dysfunction, and adenosine deficiency is accompanied by increased sensitivity of coronary arteries to adenosine. Intracoronary adenosine production is normalised in older apoE/LDLR^{-/-} mice, probably due to compensatory increased CD73 activity. Interestingly, NO- and PGI₂-dependent coronary vasodilatory responses are augmented in 1 month old apoE/LDLR^{-/-} mice. Exercise capacity is preserved in apoE/LDLR^{-/-} mice, and during exercise training systemic production of PGI₂ is increased.

The presented results suggest that in ApoE/LDL^{-/-} mice adaptive alterations of endothelial function involving all three systems of antiplatelet defense of vessel wall (NO, PGI₂ and adenosine) are present. These adaptive changes of endothelial function may provide the explanation for the preservation of exercise capacity in ApoE/LDL^{-/-} mice, despite hypercholesterolemia and presence of advanced atherosclerotic lesions.

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat zmodyfikowanego aparatu Langendorffa do perfuzji izolowanego serca myszy.....	18
Rycina 2. Całkowita cholesterolemia i trójglicerydemia u myszy apoE/LDLR ^{-/-} i myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+}	25
Rycina 3. Mikroskopowa ocena zmian miażdżycowych w aorcie i tętnicach wieńcowych myszy apoE/LDLR ^{-/-}	26
Rycina 4. Wpływ L-NAME i indometacyny na podstawowy przepływ wieńcowy w izolowanym sercu myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+}	27
Rycina 5. Reaktywna hiperemia w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR ^{+/+}	28
Rycina 6. Odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od NO w izolowanym sercu myszy apoE/LDLR ^{+/+}	30
Rycina 7. Czynnościowa i biochemiczna charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających wywołanych przez Ach w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR ^{+/+}	31
Rycina 8. Charakterystyka odpowiedzi naczyniorozszerzających zależnych od autakoidów purynowych i ich śródbłonkowych przemian do adenozyiny w krążeniu wieńcowym myszy apoE/LDLR ^{+/+}	32
Rycina 9. Wielkość reaktywnej hiperemii wywołanej przez 30s. zamknięcie perfuzji wieńcowej u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	34
Rycina 10. Podstawowy przepływ wieńcowy u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	35
Rycina 11. Wzrost przepływu wieńcowego stymulowany przez bradykininę u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	37
Rycina 12. Zależna od śródbłonkowego NO część wzrostu przepływu wieńcowego stymulowanego przez bradykininę u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	38
Rycina 13. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNP u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	40
Rycina 14. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez SNAP u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	41
Rycina 15. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez DEA/NO u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	42
Rycina 16. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez Ach u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-} ; rola COX-2.....	43
Rycina 17. Stężenie 6-keto-PGF _{1α} w efluencie sercowym myszy	

kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-} ; rola COX-2.....	45
Rycina 18. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez adenozyne u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	47
Rycina 19. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez AMP u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	48
Rycina 20. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ADP u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	50
Rycina 21. Wzrost przepływu wieńcowego wywołany przez ATP u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	51
Rycina 22. Poziom adenozyne w efluencie wieńcowym po podaniu adenozyne do perfundowanego izolowanego serca myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	52
Rycina 23. Poziom AMP, adenozyne i inozyne w efluencie wieńcowym myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-} po podaniu ADP do izolowanego perfundowanego serca.....	53
Rycina 24. Poziom AMP, adenozyne i inozyne w efluencie wieńcowym myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-} po podaniu AMP do izolowanego perfundowanego serca.....	54
Rycina 25. Poziom HbNO w erytrocytach myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	55
Rycina 26. Stężenie 6-ketoPGF _{1α} w osoczu myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-} w warunkach spoczynkowych i po wysiłku fizycznym.....	56
Rycina 27. Błonowa ekspresja wybranych markerów aktywacji krążących płytek krwi u myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	58
Rycina 28. Stężenie sCD40L w osoczu myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} oraz apoE/LDLR ^{-/-}	59
Rycina 29. Stężenie SAA w osoczu myszy kontrolnych apoE/LDLR ^{+/+} i apoE/LDLR ^{-/-}	60
Rycina 30. Wewnątrzwieńcowe przemiany nukleotydów purynowych u myszy apoE/LDLR ^{+/+} i ich hipotetyczne zmiany u myszy apoE/LDLR ^{-/-}	78

WYKAZ NAJCZEŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ach	acetylocholina
Ado	adenozyna
ADP	adenozynodifosforan
apoE/LDLR ^{+/+}	myszy pozbawione genów dla apolipoproteiny E i receptora LDL
apoE/LDLR ^{-/-}	myszy kontrolne
AMP	adenozynomonofosforan
ATP	adenozynotrifosforan
Bk	bradykinina
cAK	kinaza białkowa zależna od cAMP
cAMP	cykliczny adenozynomonofosforan
CD39	ektodifosfohydrolaza (eNTPD)
CD40L	ligand CD40
CD73	5'-nukleotydaza
cGK	kinaza białkowa zależna od cGMP
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan
COX	cyklooksygenaza
cPLA ₂	cytoplazmatyczna fosfolipaza A2
CRP	białko C-reaktywne
DEA/NO	1,1-dietylo-2-hydroksy-2-nitrozo-hydrazyna
EDHF	śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący
eNOS	śródbłonkowa synteza tlenku azotu
EPR	elektronowy rezonans paramagnetyczny
GpIIb-IIIa	glikoproteina IIb-IIIa
HbNO	nitrozylhemoglobina
HPLC	chromatografia płynowa wysokiej precyzji
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina
NO	tlenek azotu
O ₂ ⁻	anionorodnik nadadtlenkowy
oxLDL	utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości
PDEs	fosfodiesterazy

PGI ₂	prostacyklina
PGIS	synteza prostacykliny
PKC	kinaza białkowa C
PLC	fosfolipaza C
RH30s	reaktywna hiperemia wywołana przez 30 sekundowe zamknięcie przepływu wieńcowego
SAA	ang. <i>serum amyloid A</i> – osoczowy amyloid A
sCD40L	rozpuszczalny ligand CD40
SERCA	pompa wapniowa retikulum sarko/endoplazmatycznego
sGC	rozpuszczalna cyklaza guanylowa
SNAP	S-nitrozo-N-penicylamina
SNP	nitroprusydek sodu
SPT	8-p-sulfofenyloteofilina
TXA ₂	tromboksan A ₂

PIŚMIENICTWO

Adachi T, Matsui R, Weisbrod RM, Najibi S, Cohen RA. Reduced sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+) uptake activity can account for the reduced response to NO, but not sodium nitroprusside, in hypercholesterolemic rabbit aorta. *Circulation* 2001; **104**:1040-1045.

Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR *et al.* S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat.Med.* 2004; **10**:1200-1207.

Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham Coronary Heart Disease Risk Score. *Circulation* 2003; **108**:161-165.

Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J.Exp.Med.* 1993; **178**:669-674.

Alp NJ, McAteer MA, Khoo J, Choudhury RP, Channon KM. Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; **24**:445-450.

Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002a; **106**:896-899.

Andre P, Prasad KS, Denis CV *et al.* CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat.Med.* 2002b; **8**:247-252.

Anning PB, Coles B, Morton J *et al.* Nitric oxide deficiency promotes vascular side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Blood* 2006; **108**:4059-4062.

Ardlie NG, Selley ML, Simons LA. Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1989; **76**:117-124.

Arehart E, Stitham J, Asselbergs FW *et al.* Acceleration of cardiovascular disease by a dysfunctional prostacyclin receptor mutation: potential implications for cyclooxygenase-2 inhibition. *Circ.Res.* 2008; **102**:986-993.

Aymong ED, Curtis MJ, Youssef M *et al.* Abciximab attenuates coronary microvascular endothelial dysfunction after coronary stenting. *Circulation* 2002; **105**:2981-2985.

Badolato R, Johnston JA, Wang JM *et al.* Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin-sensitive signaling pathway. *J.Immunol.* 1995; **155**:4004-4010.

Badolato R, Wang JM, Stornello SL, Ponzi AN, Duse M, Musso T. Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. *J.Leukoc.Biol.* 2000; **67**:381-386.

Bartels ED, Bang CA, Nielsen LB. Early atherosclerosis and vascular inflammation in mice with diet-induced type 2 diabetes. *Eur.J.Clin.Invest* 2009; **39**:190-199.

- Bartsch P. Platelet activation with exercise and risk of cardiac events. *Lancet* 1999; **354**:1747-1748.
- Bartus M, Lomnicka M, Kostogryś RB *et al.* 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol.Rep.* 2008; **60**:127-138.
- Beierwaltes WH. Cyclooxygenase-2 products compensate for inhibition of nitric oxide regulation of renal perfusion. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2002; **283**:F68-F72.
- Belhassen L, Pelle G, Dubois-Randé JL, Adnot S. Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003; **41**:1198-1204.
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000; **102**:840-845.
- Belton OA, Duffy A, Toomey S, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis. *Circulation* 2003; **108**:3017-3023.
- Benitez MB, Cuniberti L, Fornari MC *et al.* Endothelial and leukocyte adhesion molecules in primary hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2008; **197**:679-687.
- Benson MD, Aldo-Benson M. Effect of purified protein SAA on immune response in vitro: mechanisms of suppression. *J.Immunol.* 1979; **122**:2077-2082.
- Bernard GR, Reines HD, Halushka PV *et al.* Prostacyclin and thromboxane A2 formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1991; **144**:1095-1101.
- Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J.Biol.Chem.* 1999; **274**:32512-32519.
- Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003; **41**:37S-42S.
- Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S *et al.* Chronic dietary supplementation with L-arginine inhibits platelet aggregation and thromboxane A2 synthesis in hypercholesterolaemic rabbits in vivo. *Cardiovasc.Res.* 1998; **37**:756-764.
- Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; **98**:1842-1847.
- Boger RH, Sydow K, Borlak J *et al.* LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ.Res.* 2000; **87**:99-105.

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.

Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J.Clin.Invest* 1987a; **79**:170-174.

Bossaller C, Yamamoto H, Lichtlen PR, Henry PD. Impaired cholinergic vasodilation in the cholesterol-fed rabbit in vivo. *Basic Res.Cardiol.* 1987b; **82**:396-404.

Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am.J.Physiol* 1996; **270**:C522-C529.

Brandes RP, Kim D, Schmitz-Winnenthal FH *et al.* Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 2000a; **35**:231-236.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M *et al.* An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000b; **97**:9747-9752.

Bresalier RS, Sandler RS, Quan H *et al.* Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N.Engl.J.Med.* 2005; **352**:1092-1102.

Broadley AJ, Gapper P, Schmitt M, Frenneaux MP. Supine rest reduces platelet activation and aggregation. *Platelets.* 2003; **14**:3-7.

Broeders MA, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS, oude Egbrink MG. Hypercholesterolemia enhances thromboembolism in arterioles but not venules: complete reversal by L-arginine. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2002; **22**:680-685.

Broijerssen A, Hamsten A, Eriksson M, Angelin B, Hjendahl P. Platelet activity in vivo in hyperlipoproteinemia--importance of combined hyperlipidemia. *Thromb.Haemost.* 1998a; **79**:268-275.

Broijerssen A, Karpe F, Hamsten A, Goodall AH, Hjendahl P. Alimentary lipemia enhances the membrane expression of platelet P-selectin without affecting other markers of platelet activation. *Atherosclerosis* 1998b; **137**:107-113.

Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 2001; **73**:673-686.

Bugiardini R, Galvani M, Ferrini D *et al.* Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, on exercise capacity and platelet aggregation in stable angina pectoris. *Am.J.Cardiol.* 1986; **58**:453-459.

Bulckaen H, Prevost G, Boulanger E *et al.* Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2008; **294**:H1562-H1570.

Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol.Life Sci.* 2007; **64**:1471-1483.

Busnelli M, Froio A, Bacci ML *et al.* Pathogenetic role of hypercholesterolemia in a novel preclinical model of vascular injury in pigs. *Atherosclerosis* 2009.

Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 1998; **139**:205-222.

Candinas D, Koyamada N, Miyatake T *et al.* Loss of rat glomerular ATP diphosphohydrolase activity during reperfusion injury is associated with oxidative stress reactions. *Thromb.Haemost.* 1996; **76**:807-812.

Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1996; **16**:44-50.

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, III, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; **30**:57-63.

Cardona-Sanclemente LE, Born GV. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. *Br.J.Pharmacol.* 1995; **114**:1490-1494.

Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000; **20**:1724-1728.

Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1994; **24**:1468-1474.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM *et al.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; **340**:1111-1115.

Celik S, Langer H, Stellos K *et al.* Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium. *Thromb.Haemost.* 2007; **98**:798-805.

Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J.Lipid Res.* 2005; **46**:389-403.

Chen C, Chai H, Wang X *et al.* Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 2008; **112**:3205-3216.

Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996; **93**:1740-1746.

Cheng Y, Austin SC, Rocca B *et al.* Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 2002; **296**:539-541.

Chlopicki S, Kozlovski VI, Lorkowska B, Drelicharz L, Gebaska A. Compensation of endothelium-dependent responses in coronary circulation of eNOS-deficient mice. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2005; **46**:115-123.

Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E *et al.* Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation* 2002; **106**:399-402.

Cohen P, McCombs HL. Platelets and atherogenesis. I. Augmentation of cholesterol atherogenesis in the rabbit by a phlebotomy programme designed to induce thrombocytosis. *Br.J.Exp.Pathol.* 1967; **48**:346-356.

Cohen P, McCombs HL. Platelets and atherogenesis. 2. Amelioration of cholesterol atherogenesis in rabbits with reduced platelet counts as the result of 32P administration. *J.Atheroscler.Res.* 1968; **8**:389-398.

Cohen RA, Adachi T. Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends Cardiovasc.Med.* 2006; **16**:109-114.

Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J.Clin.Invest* 1992; **90**:1168-1172.

Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler.Thromb.* 1994; **14**:653-655.

Crauwels HM, Van Hove CE, Holvoet P, Herman AG, Bult H. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc.Res.* 2003; **59**:189-199.

Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME *et al.* Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J.Clin.Invest* 1990; **86**:228-234.

Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J.Clin.Invest* 1992; **90**:1248-1253.

Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J.Exp.Med.* 1983; **158**:1160-1177.

Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J.Clin.Invest* 1986; **78**:760-770.

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ *et al.* Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990; **87**:5134-5138.

Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Pratico D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002; **106**:1282-1287.

Cyrus T, Tang LX, Rokach J, FitzGerald GA, Pratico D. Lipid peroxidation and platelet activation in murine atherosclerosis. *Circulation* 2001; **104**:1940-1945.

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

Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM *et al.* C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.* 2004; **350**:1387-1397.

Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A *et al.* In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997; **17**:3230-3235.

Davi G, Averna M, Catalano I *et al.* Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation* 1992; **85**:1792-1798.

Davi G, Romano M, Mezzetti A *et al.* Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998; **97**:953-957.

Davis B, Zou MH. CD40 ligand-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in vivo. *Circulation* 2005; **112**:2184-2192.

de Man FH, Weverling-Rijnsburger AW, van der Laarse A, Smelt AH, Jukema JW, Blauw GJ. Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation: reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000; **20**:744-750.

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007; **115**:1285-1295.

Dechanet J, Grosset C, Taupin JL *et al.* CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J.Immunol.* 1997; **159**:5640-5647.

Deguchi H, Takeya H, Urano H, Gabazza EC, Zhou H, Suzuki K. Adenosine regulates tissue factor expression on endothelial cells. *Thromb.Res.* 1998; **91**:57-64.

Dikalov S, Fink B. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues. *Methods Enzymol.* 2005; **396**:597-610.

Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* 2005; **106**:2334-2339.

- Drelicharz L, Kozlovski V, Skorka T *et al.* NO and PGI(2) in coronary endothelial dysfunction in transgenic mice with dilated cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* 2008; **103**:417-430.
- Drexler H, Zeiher AM. Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension* 1991a; **18**:II90-II99.
- Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991b; **338**:1546-1550.
- Dwyer KM, Robson SC, Nandurkar HH *et al.* Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J.Clin.Invest* 2004; **113**:1440-1446.
- Egan KM, Lawson JA, Fries S *et al.* COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 2004; **306**:1954-1957.
- Egashira K, Inou T, Hirooka Y *et al.* Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J.Clin.Invest* 1993; **91**:29-37.
- Engler MM, Engler MB, Malloy MJ *et al.* Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation* 2003; **108**:1059-1063.
- Enyoji K, Sevigny J, Lin Y *et al.* Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat.Med.* 1999; **5**:1010-1017.
- Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J.* 2001; **15**:1149-1157.
- Fabre JE, Nguyen M, Latour A *et al.* Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat.Med.* 1999; **5**:1199-1202.
- Falcone JC, Bohlen HG. EDRF from rat intestine and skeletal muscle venules causes dilation of arterioles. *Am.J.Physiol* 1990; **258**:H1515-H1523.
- Fateh-Moghadam S, Li Z, Ersel S *et al.* Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005; **25**:1299-1303.
- Feng DL, Murillo J, Jadhav P *et al.* Upright posture and maximal exercise increase platelet aggregability and prostacyclin production in healthy male subjects. *Br.J.Sports Med.* 1999; **33**:401-404.
- Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J.Clin.Invest* 1999; **103**:897-905.

Ferroni P, Basili S, Vieri M *et al.* Soluble P-selectin and proinflammatory cytokines in patients with polygenic type IIa hypercholesterolemia. *Haemostasis* 1999; **29**:277-285.

Fink B, Dikalov S, Fink N. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo as an index of endothelial function. *Pharmacol.Rep.* 2006; **58 Suppl**:8-15.

FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 1983; **67**:1174-1177.

FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, Brash AR. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N.Engl.J.Med.* 1984; **310**:1065-1068.

Flood A, Headrick JP. Functional characterization of coronary vascular adenosine receptors in the mouse. *Br.J.Pharmacol.* 2001; **133**:1063-1072.

Freiman PC, Mitchell GG, Heistad DD, Armstrong ML, Harrison DG. Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ.Res.* 1986; **58**:783-789.

Fuster W, Bowie EJ, Lewis JC, Fass DN, Owen CA, Jr., Brown AL. Resistance to arteriosclerosis in pigs with von Willebrand's disease. Spontaneous and high cholesterol diet-induced arteriosclerosis. *J.Clin.Invest* 1978; **61**:722-730.

Gao X, Zhang H, Schmidt AM, Zhang C. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2008; **295**:H491-H498.

Garcia CE, Kilcoyne CM, Cardillo C, Cannon RO, III, Quyyumi AA, Panza JA. Evidence that endothelial dysfunction in patients with hypercholesterolemia is not due to increased extracellular nitric oxide breakdown by superoxide anions. *Am.J.Cardiol.* 1995; **76**:1157-1161.

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**:1774-1777.

Garlichs CD, Eskafi S, Raaz D *et al.* Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001a; **86**:649-655.

Garlichs CD, John S, Schmeisser A *et al.* Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* 2001b; **104**:2395-2400.

Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1995; **15**:1652-1659.

Gawaz M, Brand K, Dickfeld T *et al.* Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; **148**:75-85.

- Gayle RB, III, Maliszewski CR, Gimpel SD *et al.* Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J.Clin.Invest* 1998; **101**:1851-1859.
- Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, Garcia CE, Quyyumi AA, Cannon RO, III. Selective loss of microvascular endothelial function in human hypercholesterolemia. *Circulation* 1994; **90**:35-41.
- Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dzau VJ, Creager MA. L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ.Res.* 1990; **67**:1301-1308.
- Godecke A. cAMP: fuel for extracellular adenosine formation? *Br.J.Pharmacol.* 2008; **153**:1087-1089.
- Godecke A, Decking UK, Ding Z *et al.* Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ.Res.* 1998; **82**:186-194.
- Godecke A, Ziegler M, Ding Z, Schrader J. Endothelial dysfunction of coronary resistance vessels in apoE^{-/-} mice involves NO but not prostacyclin-dependent mechanisms. *Cardiovasc.Res.* 2002; **53**:253-262.
- Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol.Rep.* 2008; **60**:3-11.
- Guckelberger O, Sun XF, Sevigny J *et al.* Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Thromb.Haemost.* 2004; **91**:576-586.
- Gwozdz P, Drelicharz L, Kozlovski VI, Chlopicki S. Prostacyclin, but not nitric oxide, is the major mediator of acetylcholine-induced vasodilatation in the isolated mouse heart. *Pharmacol.Rep.* 2007; **59**:545-552.
- Habib JB, Bossaller C, Wells S, Williams C, Morrisett JD, Henry PD. Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium blocker PN 200110. *Circ.Res.* 1986; **58**:305-309.
- Hackeng CM, Huigsloot M, Pladet MW, Nieuwenhuis HK, van Rijn HJ, Akkerman JW. Low-density lipoprotein enhances platelet secretion via integrin- α IIb β 3-mediated signaling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999a; **19**:239-247.
- Hackeng CM, Relou IA, Pladet MW, Gorter G, van Rijn HJ, Akkerman JW. Early platelet activation by low density lipoprotein via p38MAP kinase. *Thromb.Haemost.* 1999b; **82**:1749-1756.
- Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990; **75**:550-554.
- Hansmann G, Wagner RA, Schellong S *et al.* Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Circulation* 2007; **115**:1275-1284.
- Harris NR, Whatley JR, Carter PR, Specian RD. Venular constriction of submucosal arterioles induced by dextran sodium sulfate. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2005; **11**:806-813.

Hassall DG, Owen JS, Bruckdorfer KR. The aggregation of isolated human platelets in the presence of lipoproteins and prostacyclin. *Biochem.J.* 1983; **216**:43-49.

Hechler B, Leon C, Vial C *et al.* The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 1998; **92**:152-159.

Hein TW, Liao JC, Kuo L. oxLDL specifically impairs endothelium-dependent, NO-mediated dilation of coronary arterioles. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000; **278**:H175-H183.

Heitzer T, Ollmann I, Koke K, Meinertz T, Munzel T. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade improves vascular nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2003; **108**:536-541.

Heitzer T, Rudolph V, Schwedhelm E *et al.* Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006; **26**:1648-1652.

Henn V, Slupsky JR, Grafe M *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; **391**:591-594.

Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczek RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001; **98**:1047-1054.

Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets.* 2001; **12**:74-82.

Hilberg T, Eichler E, Glaser D, Schmidt V, Gabriel HH. Platelet activity, reactivity and platelet-leukocyte conjugate formation before and after exhaustive or moderate exercise in patients with IDDM. *Platelets.* 2004; **15**:101-108.

Hishinuma T, Nakamura H, Sawai T *et al.* Analysis of urinary prostacyclin and thromboxane/prostacyclin ratio in patients with rheumatoid arthritis using gas chromatography/selected ion monitoring. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 2001; **65**:85-90.

Huo Y, Schober A, Forlow SB *et al.* Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat.Med.* 2003; **9**:61-67.

Hussain SN, Stewart DJ, Ludemann JP, Magder S. Role of endothelium-derived relaxing factor in active hyperemia of the canine diaphragm. *J.Appl.Physiol* 1992; **72**:2393-2401.

Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ.Res.* 2003; **92**:1041-1048.

Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. 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.U.S.A* 1994; **91**:4431-4435.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; **99**:3092-3095.

Jang JJ, Ho HK, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP. Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2000; **102**:1414-1419.

Jawien J, Csanyi G, Gajda M *et al.* Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Eur.J.Pharmacol.* 2007; **556**:129-135.

Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J.Physiol Pharmacol.* 2004; **55**:503-517.

Jebelovszki E, Kiraly C, Erdei N *et al.* High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2008; **294**:H2558-H2564.

Jiang F, Gibson AP, Dusting GJ. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. *Eur.J.Pharmacol.* 2001; **424**:141-149.

Jiang J, Valen G, Tokuno S, Thoren P, Pernow J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. *Br.J.Pharmacol.* 2000; **131**:1255-1261.

Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**:2030-2034.

Johansson F, Kramer F, Barnhart S *et al.* Type 1 diabetes promotes disruption of advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008; **105**:2082-2087.

Johnson M, Harrison HE, Raftery AT, Elder JB. Vascular prostacyclin may be reduced in diabetes in man. *Lancet* 1979; **1**:325-326.

Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM *et al.* Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J.Clin.Invest* 1997; **99**:1037-1043.

Jousilahti P, Salomaa V, Rasi V, Vahtera E, Palosuo T. The association of c-reactive protein, serum amyloid a and fibrinogen with prevalent coronary heart disease--baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis* 2001; **156**:451-456.

Kalsi KK, Yuen AH, Rybakowska IM *et al.* Decreased cardiac activity of AMP deaminase in subjects with the AMPD1 mutation--a potential mechanism of protection in heart failure. *Cardiovasc.Res.* 2003; **59**:678-684.

- Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S *et al.* Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* 1994; **84**:4242-4248.
- Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995; **92**:4342-4346.
- Kausar K, da C, V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000; **278**:H1679-H1685.
- Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 2000; **96**:2157-2162.
- Kharbanda RK, Walton B, Allen M *et al.* Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin. *Circulation* 2002; **105**:2600-2604.
- Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J.Immunol.* 1995; **155**:4917-4925.
- Kim DN, Schmee J, Lee CS, Solis O, Ross JS, Thomas WA. Reductions in serum thromboxane, prostacyclin, and leukotriene B4 levels in swine fed a fish oil supplement to an atherogenic diet. *Exp.Mol.Pathol.* 1991; **55**:1-12.
- Kim MH, Carter PR, Harris NR. P-selectin-mediated adhesion impairs endothelium-dependent arteriolar dilation in hypercholesterolemic mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2007; **292**:H632-H638.
- Kim MH, Harris NR. Leukocyte adherence inhibits adenosine-dependent venular control of arteriolar diameter and nitric oxide. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2006; **291**:H724-H731.
- Kirii H, Niwa T, Yamada Y *et al.* Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2003; **23**:656-660.
- Kishi Y, Ashikaga T, Numano F. Inhibition of platelet aggregation by prostacyclin is attenuated after exercise in patients with angina pectoris. *Am.Heart J.* 1992; **123**:291-297.
- Kisilevsky R, Subrahmanyam L. Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function. *Lab Invest* 1992; **66**:778-785.
- Klinkhardt U, Graff J, Harder S. Clopidogrel, but not abciximab, reduces platelet leukocyte conjugates and P-selectin expression in a human ex vivo in vitro model. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2002; **71**:176-185.
- Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M *et al.* Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J.Clin.Invest* 2004; **114**:784-794.

- Koenen RR, von HP, Nesselrode IV *et al.* Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat.Med.* 2009; **15**:97-103.
- Korporaal SJ, Gorter G, van Rijn HJ, Akkerman JW. Effect of oxidation on the platelet-activating properties of low-density lipoprotein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005; **25**:867-872.
- Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y *et al.* Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ.Res.* 2004; **95**:814-821.
- Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000; **100**:441-448.
- Koyama H, Maeno T, Fukumoto S *et al.* Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation* 2003; **108**:524-529.
- Krotz F, Sohn HY, Keller M *et al.* Depolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2002; **22**:2003-2009.
- Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; **24**:1988-1996.
- Kuo L, Davis MJ, Cannon MS, Chilian WM. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. Restoration of endothelium-dependent responses by L-arginine. *Circ.Res.* 1992; **70**:465-476.
- Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1982; **389**:39-48.
- Labios M, Martinez M, Gabriel F, Guiral V, Martinez E, Aznar J. Effect of atorvastatin upon platelet activation in hypercholesterolemia, evaluated by flow cytometry. *Thromb.Res.* 2005; **115**:263-270.
- Lamping KG, Nuno DW, Chappell DA, Faraci FM. Agonist-specific impairment of coronary vascular function in genetically altered, hyperlipidemic mice. *Am.J.Physiol* 1999; **276**:R1023-R1029.
- Laursen JB, Somers M, Kurz S *et al.* Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; **103**:1282-1288.
- Laustiola K, Seppala E, Nikkari T, Vapaatalo H. Exercise-induced increase in plasma arachidonic acid and thromboxane B2 in healthy men: effect of beta-adrenergic blockade. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1984; **6**:449-454.

Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 1994; **308**:367-372.

Ledoux S, Laouari D, Essig M *et al.* Lovastatin enhances ecto-5'-nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: implication of rho-family GTPases. *Circ.Res.* 2002; **90**:420-427.

Lehr HA, Becker M, Marklund SL *et al.* Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler.Thromb.* 1992; **12**:824-829.

Lehr HA, Frei B, Olofsson AM, Carew TE, Arfors KE. Protection from oxidized LDL-induced leukocyte adhesion to microvascular and macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E. *Circulation* 1995; **91**:1525-1532.

Lemne C, Vesterqvist O, Egberg N, Green K, Jogestrand T, de FU. Platelet activation and prostacyclin release in essential hypertension. *Prostaglandins* 1992; **44**:219-235.

Lewis KE, Kirk EA, McDonald TO *et al.* Increase in serum amyloid a evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice. *Circulation* 2004; **110**:540-545.

Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2003; **23**:816-821.

Li G, Sanders JM, Bevard MH *et al.* CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am.J.Pathol.* 2008; **172**:1141-1152.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler.Thromb.* 1993; **13**:197-204.

Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J.Pathol.* 2000; **190**:244-254.

Li JM, Fenton RA, Cutler BS, Dobson JG, Jr. Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. *Am.J.Physiol* 1995; **269**:C519-C523.

Li N, He S, Blomback M, Hjemdahl P. Platelet activity, coagulation, and fibrinolysis during exercise in healthy males: effects of thrombin inhibition by argatroban and enoxaparin. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007; **27**:407-413.

Li N, Wallen NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation* 1999; **100**:1374-1379.

Liao F, Lusis AJ, Berliner JA *et al.* Serum amyloid A protein family. Differential induction by oxidized lipids in mouse strains. *Arterioscler.Thromb.* 1994; **14**:1475-1479.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; **105**:1135-1143.

- Lienenluke B, Germann T, Kroczeck RA, Hecker M. CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. *Eur.J.Immunol.* 2000; **30**:2864-2870.
- Lindemann S, Klingel B, Fisch A, Meyer J, Darius H. Increased platelet sensitivity toward platelet inhibitors during physical exercise in patients with coronary artery disease. *Thromb.Res.* 1999; **93**:51-59.
- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA *et al.* Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J.Cell Biol.* 2001; **154**:485-490.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N.Engl.J.Med.* 1994; **331**:417-424.
- Loke KE, McConnell PI, Tuzman JM *et al.* Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ.Res.* 1999; **84**:840-845.
- Lovati MR, Manzoni C, Mosconi C *et al.* Reduced platelet aggregability and increased vascular prostacyclin formation in a variant rat strain (IVA-SIV) with endogenous hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1988; **74**:169-177.
- Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci.* 2008; **13**:5323-5344.
- Ludwig RJ, Schultz JE, Boehncke WH *et al.* Activated, not resting, platelets increase leukocyte rolling in murine skin utilizing a distinct set of adhesion molecules. *J.Invest Dermatol.* 2004; **122**:830-836.
- Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2001; **38**:111-116.
- Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ *et al.* Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat.Med.* 1999; **5**:1313-1316.
- Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997; **96**:396-399.
- Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; **394**:200-203.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH *et al.* The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J.Clin.Invest* 1997; **99**:1351-1360.
- Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J.* 1993; **7**:516-522.
- Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA *et al.* Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J.Clin.Invest* 1991; **88**:1690-1696.

- Martino F, Pignatelli P, Martino E *et al.* Early increase of oxidative stress and soluble CD40L in children with hypercholesterolemia. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2007; **49**:1974-1981.
- Massberg S, Brand K, Gruner S *et al.* A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J.Exp.Med.* 2002; **196**:887-896.
- Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M *et al.* Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* 2005; **112**:1180-1188.
- Matter CM, Ma L, von LT *et al.* Increased balloon-induced inflammation, proliferation, and neointima formation in apolipoprotein E (ApoE) knockout mice. *Stroke* 2006; **37**:2625-2632.
- Matthews JS, McWilliams PJ, Key BJ, Keen M. Inhibition of prostacyclin release from cultured endothelial cells by nitrovasodilator drugs. *Biochim.Biophys.Acta* 1995; **1269**:237-242.
- Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V *et al.* Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and β_2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood* 2009; **113**:5254-5265.
- Maurice DH. Dynamic regulation of cAMP signaling by cGMP in the cardiovascular system: roles of phosphodiesterase 2 and phosphodiesterase 3 enzymes. *Proc. West Pharmacol.Soc.* 2003; **46**:32-36.
- May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2008; **28**:s5-10.
- McAdam BF, Byrne D, Morrow JD, Oates JA. Contribution of cyclooxygenase-2 to elevated biosynthesis of thromboxane A₂ and prostacyclin in cigarette smokers. *Circulation* 2005; **112**:1024-1029.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**:272-277.
- McKay MK, Gardner AL, Boyd D, Hester RL. Influence of venular prostaglandin release on arteriolar diameter during functional hyperemia. *Hypertension* 1998; **31**:213-217.
- McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J.Clin.Invest* 1993; **92**:1004-1008.
- Mehta J, Mehta P, Horalek C. The significance of platelet-vessel wall prostaglandin equilibrium during exercise-induced stress. *Am.Heart J.* 1983; **105**:895-900.
- Mehta JL, Lawson D, Mehta P, Saldeen T. Increased prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis in atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988; **85**:4511-4515.
- Methia N, Andre P, Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* 2001; **98**:1424-1428.

Mezaki T, Matsubara T, Hori T *et al.* Plasma levels of soluble thrombomodulin, C-reactive protein, and serum amyloid A protein in the atherosclerotic coronary circulation. *Jpn.Heart J.* 2003; **44**:601-612.

Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996a; **87**:4925-4936.

Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB *et al.* In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996b; **93**:11877-11882.

Minamino T, Kitakaze M, Komamura K *et al.* Activation of protein kinase C increases adenosine production in the hypoxic canine coronary artery through the extracellular pathway. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1995; **15**:2298-2304.

Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991; **88**:2166-2170.

Moore S, Friedman RJ, Singal DP, Gauldie J, Blajchman MA, Roberts RS. Inhibition of injury induced thromboatherosclerotic lesions by anti-platelet serum in rabbits. *Thromb.Haemost.* 1976; **35**:70-81.

Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005; **25**:1551-1557.

Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T *et al.* Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997; **388**:678-682.

Murohara T, Asahara T, Silver M *et al.* Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J.Clin.Invest* 1998; **101**:2567-2578.

Myers PR, Wright TF, Tanner MA, Ostlund RE, Jr. The effects of native LDL and oxidized LDL on EDRF bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium. *J.Lab Clin.Med.* 1994; **124**:672-683.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler.Thromb.* 1994; **14**:133-140.

Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 2003; **107**:1123-1128.

Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M *et al.* Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler.Thromb.* 1994; **14**:746-752.

Nassar T, Sachais BS, Akkawi S *et al.* Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J.Biol.Chem.* 2003; **278**:6187-6193.

Nellore K, Harris NR. L-arginine and antineutrophil serum enable venular control of capillary perfusion in hypercholesterolemic rats. *Microcirculation*. 2002; **9**:477-485.

Nellore K, Harris NR. Inhibition of leukocyte adherence enables venular control of capillary perfusion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Microcirculation*. 2004; **11**:645-654.

Neumann FJ, Marx N, Gawaz M *et al.* Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; **95**:2387-2394.

Nie H, Wu JL, Zhang M, Xu J, Zou MH. Endothelial nitric oxide synthase-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in diabetes in vivo. *Diabetes* 2006; **55**:3133-3141.

Noon JP, Walker BR, Hand MF, Webb DJ. Impairment of forearm vasodilatation to acetylcholine in hypercholesterolemia is reversed by aspirin. *Cardiovasc.Res.* 1998; **38**:480-484.

Norman JF, Miller CW. Prostacyclin, thromboxane A₂, and atherosclerosis in young hypercholesterolemic swine. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 1994; **51**:293-298.

Nowak J, Murray JJ, Oates JA, FitzGerald GA. Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation* 1987; **76**:6-14.

O'Leary DS, Dunlap RC, Glover KW. Role of endothelium-derived relaxing factor in hindlimb reactive and active hyperemia in conscious dogs. *Am.J.Physiol* 1994; **266**:R1213-R1219.

Olsson RA. Myocardial reactive hyperemia. *Circ.Res.* 1975; **37**:263-270.

Omari KM, Dorovini-Zis K. CD40 expressed by human brain endothelial cells regulates CD4+ T cell adhesion to endothelium. *J.Neuroimmunol.* 2003; **134**:166-178.

Oryu M, Sakamoto H, Ogawa Y, Tanaka S, Sakamoto N. Effects of released products from platelets on neutrophilic adhesion to endothelial cells and nylon fibers. *J.Leukoc.Biol.* 1996; **60**:77-80.

Osanai T, Fujita N, Fujiwara N *et al.* Cross talk of shear-induced production of prostacyclin and nitric oxide in endothelial cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000; **278**:H233-H238.

Otterdal K, Smith C, Oie E *et al.* Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 2006; **108**:928-935.

Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 1985; **57**:65-73.

Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation* 2001; **103**:1752-1758.

Paul A, Calleja L, Camps J *et al.* The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci.* 2000; **68**:457-465.

Pei H, Wang Y, Miyoshi T *et al.* Direct evidence for a crucial role of the arterial wall in control of atherosclerosis susceptibility. *Circulation* 2006; **114**:2382-2389.

Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand.* 1990; **140**:449-457.

Peters MJ, Dixon G, Kotowicz KT, Hatch DJ, Heyderman RS, Klein NJ. Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br.J.Haematol.* 1999; **106**:391-399.

Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM *et al.* Rosiglitazone reduces the accelerated neointima formation after arterial injury in a mouse injury model of type 2 diabetes. *Circulation* 2003; **108**:1994-1999.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; **89**:4471-4475.

Plump AS, Smith JD, Hayek T *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; **71**:343-353.

Poole JC, Florey HW. Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *J.Pathol.Bacteriol.* 1958; **75**:245-251.

Poudrier J, van ED, Morales-Alcelay S, Leanderson T, Bergthorsdottir S, Gray D. CD40 ligand signals optimize T helper cell cytokine production: role in Th2 development and induction of germinal centers. *Eur.J.Immunol.* 1998; **28**:3371-3383.

Pratico D, Cyrus T, Li H, FitzGerald GA. Endogenous biosynthesis of thromboxane and prostacyclin in 2 distinct murine models of atherosclerosis. *Blood* 2000; **96**:3823-3826.

Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM *et al.* Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ.Res.* 1995; **77**:510-518.

Quillen JE, Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Long-term cholesterol feeding alters the reactivity of primate coronary microvessels to platelet products. *Arterioscler.Thromb.* 1991; **11**:639-644.

Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987; **84**:2995-2998.

Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO, III. Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation* 1995; **92**:320-326.

Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc.Res.* 1993; **27**:1380-1382.

Reilly MP, Pratico D, Delanty N *et al.* Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; **98**:2822-2828.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N.Engl.J.Med.* 2000; **342**:836-843.

Ridker PM, Rifai N, Lowenthal SP. Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation* 2001; **103**:1191-1193.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA *et al.* Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1998; **98**:839-844.

Rivard A, Fabre JE, Silver M *et al.* Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999; **99**:111-120.

Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB *et al.* Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J.Exp.Med.* 1997; **185**:153-163.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* 1999; **340**:115-126.

Rossi ML, Marziliano N, Merlini PA *et al.* Phenotype commitment in vascular smooth muscle cells derived from coronary atherosclerotic plaques: differential gene expression of endothelial nitric oxide synthase. *Eur.J.Histochem.* 2005; **49**:39-46.

Rueda-Clausen CF, Lopez-Jaramillo P, Luengas C, del Pilar OM, Cachofeiro V, Lahera V. Inflammation but not endothelial dysfunction is associated with the severity of coronary artery disease in dyslipidemic subjects. *Mediators.Inflamm.* 2009; **2009**:469169.

Sachais BS, Kuo A, Nassar T *et al.* Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface. *Blood* 2002; **99**:3613-3622.

Sachais BS, Turrentine T, Dawicki McKenna JM, Rux AH, Rader D, Kowalska MA. Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice. *Thromb.Haemost.* 2007; **98**:1108-1113.

Saito Y, Eraslan A, Lockard V, Hester RL. Role of venular endothelium in control of arteriolar diameter during functional hyperemia. *Am.J.Physiol* 1994; **267**:H1227-H1231.

Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L *et al.* Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 2005; **111**:412-419.

- Scalia R, Appel JZ, III, Lefer AM. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1998; **18**:1093-1100.
- Scalia R, Gooszen ME, Jones SP *et al.* Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; **103**:2598-2603.
- Schafer A, Alp NJ, Cai S *et al.* Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; **24**:1720-1726.
- Schafer AI, Crawford DD, Gimbrone MA, Jr. Unidirectional transfer of prostaglandin endoperoxides between platelets and endothelial cells. *J.Clin.Invest* 1984; **73**:1105-1112.
- Schafer K, Muller K, Hecke A *et al.* Enhanced thrombosis in atherosclerosis-prone mice is associated with increased arterial expression of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2003; **23**:2097-2103.
- Scheuerer B, Ernst M, Durrbaum-Landmann I *et al.* The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 2000; **95**:1158-1166.
- Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**:7458-7463.
- Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001; **104**:2266-2268.
- Schwarz UR, Kobsar AL, Kokschi M, Walter U, Eigenthaler M. Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem.Pharmacol.* 2000; **60**:1399-1407.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem.Pharmacol.* 2001; **62**:1153-1161.
- Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis* 1989; **9**:908-918.
- Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation* 1990; **81**:1586-1593.
- Semb AG, van WS, Ueland T *et al.* Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003; **41**:275-279.
- Shainkin-Kestenbaum R, Zimlichman S, Lis M, Preciado-Patt L, Fridkin M, Berenheim J. Modulation of prostaglandin I₂ production from bovine aortic endothelial cells by serum amyloid A and its N-terminal tetradecapeptide. *Biomed.Pept.Proteins Nucleic Acids* 1996; **2**:101-106.

Shi W, Wang NJ, Shih DM, Sun VZ, Wang X, Lusis AJ. Determinants of atherosclerosis susceptibility in the C3H and C57BL/6 mouse model: evidence for involvement of endothelial cells but not blood cells or cholesterol metabolism. *Circ.Res.* 2000; **86**:1078-1084.

Silberbauer K, Schernthaner G, Sinzinger H, Piza-Katzer H, Winter M. Decreased vascular prostacyclin in juvenile-onset diabetes. *N.Engl.J.Med.* 1979; **300**:366-367.

Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J.Clin.Invest* 1990; **86**:75-79.

Singh SR, Casper K, Summers S, Swerlick RA. CD40 expression and function on human dermal microvascular endothelial cells: role in cutaneous inflammation. *Clin.Exp.Dermatol.* 2001; **26**:434-440.

Smith EB. Transport, interactions and retention of plasma proteins in the intima: the barrier function of the internal elastic lamina. *Eur.Heart J.* 1990; **11 Suppl E**:72-81.

Smolenski RT, Kochan Z, McDouall R, Page C, Seymour AL, Yacoub MH. Endothelial nucleotide catabolism and adenosine production. *Cardiovasc.Res.* 1994; **28**:100-104.

Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA *et al.* Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N.Engl.J.Med.* 2005; **352**:1071-1080.

Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J.Clin.Invest* 1994; **93**:50-55.

Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; **256**:2823-2828.

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

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N.Engl.J.Med.* 1989; **320**:915-924.

Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G, Johnson A, Cronin J, Baron AD. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation* 1997; **96**:3287-3293.

Steinmetz A, Hocke G, Saile R, Puchois P, Fruchart JC. Influence of serum amyloid A on cholesterol esterification in human plasma. *Biochim.Biophys.Acta* 1989; **1006**:173-178.

Stokes KY, Calahan L, Hamric CM, Russell JM, Granger DN. CD40/CD40L contributes to hypercholesterolemia-induced microvascular inflammation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2009a; **296**:H689-H697.

Stokes KY, Calahan L, Russell JM, Gurwara S, Granger DN. Role of platelets in hypercholesterolemia-induced leukocyte recruitment and arteriolar dysfunction. *Microcirculation*. 2006; **13**:377-388.

Stokes KY, Clanton EC, Gehrig JL, Granger DN. Role of interleukin 12 in hypercholesterolemia-induced inflammation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2003; **285**:H2623-H2629.

Stokes KY, Clanton EC, Russell JM, Ross CR, Granger DN. NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circ.Res.* 2001; **88**:499-505.

Stokes KY, Cooper D, Tailor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic.Biol.Med.* 2002; **33**:1026-1036.

Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, Guidry E, Bryan NS. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2009b; **296**:H1281-H1288.

Stokes KY, Granger DN. The microcirculation: a motor for the systemic inflammatory response and large vessel disease induced by hypercholesterolaemia? *J.Physiol* 2005; **562**:647-653.

Stokes KY, Gurwara S, Granger DN. T-cell derived interferon-gamma contributes to arteriolar dysfunction during acute hypercholesterolemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007; **27**:1998-2004.

Strosova M, Karlovska J, Spickett CM *et al.* Modulation of SERCA in the chronic phase of adjuvant arthritis as a possible adaptation mechanism of redox imbalance. *Free Radic.Res.* 2009;1-13.

Su Z, Li Y, James JC *et al.* Genetic linkage of hyperglycemia, body weight and serum amyloid-P in an intercross between C57BL/6 and C3H apolipoprotein E-deficient mice. *Hum.Mol.Genet.* 2006; **15**:1650-1658.

Sun D, Liu H, Yan C *et al.* COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS-knockout mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2006; **291**:H1429-H1435.

Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988; **37**:1163-1167.

Szalai AJ, McCrory MA. Varied biologic functions of C-reactive protein: lessons learned from transgenic mice. *Immunol.Res.* 2002; **26**:279-287.

Tailor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes leukocyte-dependent platelet adhesion in murine postcapillary venules. *Microcirculation*. 2004; **11**:597-603.

Tailor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes P-selectin-dependent platelet-endothelial cell adhesion in postcapillary venules. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2003; **23**:675-680.

Talukder MA, Morrison RR, Jacobson MA, Jacobson KA, Ledent C, Mustafa SJ. Targeted deletion of adenosine A(3) receptors augments adenosine-induced coronary flow in isolated mouse heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002; **282**:H2183-H2189.

Tawfik HE, Teng B, Morrison RR, Schnermann J, Mustafa SJ. Role of A1 adenosine receptor in the regulation of coronary flow. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2006; **291**:H467-H472.

Theilmeier G, Michiels C, Spaepen E *et al.* Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood* 2002; **99**:4486-4493.

Thienel U, Loike J, Yellin MJ. CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. *Cell Immunol.* 1999; **198**:87-95.

Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; **95**:2617-2622.

Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur.J.Biochem.* 1999; **265**:501-523.

Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J.Biol.Chem.* 2000; **275**:11278-11283.

Ullrich V, Zou MH, Bachschmid M. New physiological and pathophysiological aspects on the thromboxane A(2)-prostacyclin regulatory system. *Biochim.Biophys.Acta* 2001; **1532**:1-14.

Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002; **106**:981-986.

Valles J, Santos MT, Marcus AJ *et al.* Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *J.Clin.Invest* 1993; **92**:1357-1365.

Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M *et al.* Lipoprotein inflammatory properties and serum amyloid A levels but not cholesterol levels predict lesion area in cholesterol-fed rabbits. *J.Lipid Res.* 2007; **48**:2344-2353.

VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; **24**:12-22.

Viallard JF, Solanilla A, Gauthier B *et al.* Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Blood* 2002; **99**:2612-2614.

Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M *et al.* Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J.Vasc.Res.* 2003; **40**:87-96.

Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000; **101**:1500-1502.

Vladimirova-Kitova L, Terzieva D, Marinov B. Intima-Media Thickness and Flow-Mediated Vasodilation in Asymptomatic Subjects with Newly Detected Severe Hypercholesterolemia. *Echocardiography*. 2009.

von Hundelshausen HP, Weber KS, Huo Y *et al.* RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001; **103**:1772-1777.

Wang X, Chai H, Wang Z, Lin PH, Yao Q, Chen C. Serum amyloid A induces endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human coronary artery endothelial cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2008; **295**:H2399-H2408.

Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R *et al.* Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000; **278**:H428-H434.

Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP *et al.* Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J.Clin.Invest* 1996; **97**:1525-1534.

White CR, Darley-USmar V, Berrington WR *et al.* Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996; **93**:8745-8749.

Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1998; **31**:684-691.

Wilson JR, Kapoor S. Contribution of endothelium-derived relaxing factor to exercise-induced vasodilation in humans. *J.Appl.Physiol* 1993; **75**:2740-2744.

Wilson KM, McCaw RB, Leo L *et al.* Prothrombotic effects of hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007; **27**:233-240.

Wilson PG, Thompson JC, Webb NR, de Beer FC, King VL, Tannock LR. Serum amyloid A, but not C-reactive protein, stimulates vascular proteoglycan synthesis in a pro-atherogenic manner. *Am.J.Pathol.* 2008; **173**:1902-1910.

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; **97**:1837-1847.

Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J.* 1999; **13**:667-675.

Wohrle J, Nusser T, Merkle N *et al.* Myocardial perfusion reserve in cardiovascular magnetic resonance: Correlation to coronary microvascular dysfunction. *J.Cardiovasc.Magn Reson.* 2006; **8**:781-787.

Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G *et al.* Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1997; **29**:479-485.

Wolfle SE, de WC. Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J.Vasc.Res.* 2005; **42**:475-482.

Wolfort RM, Manriquez R, Stokes KY, Granger DN. Platelet-Derived RANTES Mediates Hypercholesterolemia-Induced Superoxide Production and Endothelial Dysfunction. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2008.

Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Laughlin MH. Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs. *J.Appl.Physiol* 2004; **96**:1105-1113.

Xiao CY, Hara A, Yuhki K *et al.* Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 2001; **104**:2210-2215.

Yaghoubi M, Oliver-Krasinski J, Cayatte AJ, Cohen RA. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2000; **36**:751-757.

Yamamoto H, Bossaller C, Cartwright J, Jr., Henry PD. Videomicroscopic demonstration of defective cholinergic arteriolar vasodilation in atherosclerotic rabbit. *J.Clin.Invest* 1988; **81**:1752-1758.

Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK *et al.* Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999; **19**:2762-2768.

Ying J, Tong X, Pimentel DR *et al.* Cysteine-674 of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase is required for the inhibition of cell migration by nitric oxide. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007; **27**:783-790.

Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME *et al.* Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J.Clin.Invest* 1989; **84**:1086-1095.

Zamboni WA, Stephenson LL, Roth AC, Suchy H, Russell RC. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: CD 18-dependent neutrophil-endothelial adhesion and arteriolar vasoconstriction. *Plast.Reconstr.Surg.* 1997; **99**:2002-2007.

Zatta AJ, Headrick JP. Mediators of coronary reactive hyperaemia in isolated mouse heart. *Br.J.Pharmacol.* 2005; **144**:576-587.

Zeiber AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; **84**:1984-1992.

Zembowicz A, Dudek RD, Radziszewski W, Swierkosz TA, Trybulec M, Gryglewski RJ. Vasorelaxant and platelet-suppressant potencies of four NO-donors. *Pol.J.Pharmacol.Pharm.* 1990; **42**:275-281.

Zhang C, Park Y, Picchi A, Potter BJ. Maturation-induces endothelial dysfunction via vascular inflammation in diabetic mice. *Basic Res.Cardiol.* 2008; **103**:407-416.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; **258**:468-471.

Zimlichman S, Danon A, Nathan I, Mozes G, Shainkin-Kestenbaum R. Serum amyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation. *J.Lab Clin.Med.* 1990; **116**:180-186.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2000; **362**:299-309.

Zoladz JA, Majerczak J, Duda K, Chlopicki S. Exercise-induced prostacyclin release positively correlates with VO₂(max) in young healthy men. *Physiol Res.* 2009; **58**:229-238.

Zou MH, Shi C, Cohen RA. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H₂ receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes* 2002; **51**:198-203.

Zou MH, Ullrich V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett.* 1996; **382**:101-104.