

2011.2821.8

Université de Montréal

Dysfonction endothéliale après transplantation cardiaque hétérotopique chez le chien

Par

Philippe Demers

Département de Chirurgie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

Programme de sciences biomédicales

~~Décembre 1999~~

juillet 2000

© Philippe Demers, 1999

2000



Université de Montréal

Expérimentation en psychologie sociale - 2011-2012

W
H
U58
2000
N.106

Psychologie Sociale
Département de Psychologie
Université de Montréal

Même si l'on se rend compte que les résultats sont souvent en désaccord avec les prévisions, il est important de continuer à travailler sur ce sujet.

Professeur de psychologie (M. Sc.)

Le professeur de psychologie sociale



Psychologie Sociale
2011-2012
N.106

Le 22 juillet 2000

Docteur Eric Thorin
Docteur Michel White

Je vous remercie pour les commentaires formulés suite à la lecture de ce mémoire. Dans le but de faciliter la révision des corrections apportées, voici les réponses aux questions soulevées et la liste des changements apportés dans le texte.

Commentaires du Docteur Eric Thorin

Dans le résumé, l'introduction, les deux articles et la conclusion, il est spécifié que le fluorure de sodium active toutes les protéines G et n'est pas sélectif à la protéine Gi, que la thrombine stimule des récepteurs couplés à la fois à la protéine Gi et à la phospholipase C, et que l'acétylcholine stimule des récepteurs couplés à la protéine Gq.

Dans les sections méthodologie et résultats du premier article, la concentration d'aminoguanidine utilisée a été corrigée (300 $\mu\text{mol/L}$). De plus, les conditions dans lesquelles les effets vasorelaxants de la L-arginine étaient étudiés ont été précisées, soit en présence ou non d'aminoguanidine 300 $\mu\text{mol/L}$.

Les anticorps utilisés pour les études immunohistochimiques reconnaissent la forme canine des antigènes recherchés, tel que spécifié dans la section méthodologie des deux articles.

L'analyse statistique pour la relaxation maximale induite par le calcium ionophore a été refaite et donne une valeur de p de 0.99, tel qu'indiqué dans le tableau 2 des deux articles.

Dans le tableau 4 du premier article, la présentation des résultats a été modifiée de façon à les rendre plus compréhensibles.

La sévérité du rejet aigu des greffons cardiaques prélevés après 5 jours était évaluée par un pathologiste cardio-vasculaire, selon la classification de la société internationale de transplantation cardiaque et pulmonaire. Ainsi, tel qu'indiqué dans la section résultats des deux articles, tous les greffons présentaient un rejet sévère (grade 4 sur 4), consistant en une infiltration cellulaire diffuse et des foyers étendus d'oedème, d'hémorragie et de nécrose myocytaire.

L'importance physiologique de la NO synthase inductible identifiée dans l'endothélium coronarien après 24 heures de reperfusion est vraisemblablement limitée. Tel que soulevé par l'examineur, la relaxation endothélium-dépendante à la L-arginine était transitoire et ne modifiait aucunement les contractions musculaires lisses. L'activité faible et transitoire de la NO synthase inductible observée dans ces conditions

expérimentales n'entraîne pas de production massive de NO, comme dans le choc septique, et son rôle exact demeure donc à préciser lors d'études subséquentes. Par ailleurs, l'observation dans l'intima de la NO synthase inductible peut s'expliquer par la présence de cette enzyme dans les cellules endothéliales activées par les médiateurs de l'inflammation ou encore par la présence de la NO synthase inductible dans les leucocytes et les macrophages ayant infiltré la paroi vasculaire. Nos résultats ne nous permettent pas de d'éliminer ces deux hypothèses qui devront être validées. Cependant, la présence de la NO synthase inductible dans l'endothélium a été rapportée (références 16 et 31 du premier article). La discussion du premier article et la discussion finale ont été modifiées dans ce sens. Par ailleurs, étant donné l'absence de réactivité vasculaire des vaisseaux dénudés de leur endothélium, aucun graphique n'a été ajouté de façon à ne pas surcharger le premier article. Enfin, l'observation faite en présence de L-NMMA ayant été faite sur un nombre restreint de vaisseaux, les résultats et la discussion du premier article n'ont pas été modifiés. Des études subséquentes seront nécessaires pour valider cet aspect.

Tel que demandé, la discussion du premier article a été raccourcie.

Dans la discussion des deux articles, la conclusion portant sur la préservation de la NO synthase constitutive est basée sur les réponses au calcium ionophore qui sont identiques dans les trois groupes étudiés. Tel que spécifié par l'examinateur, le rôle de l'EDHF n'a pas été étudié dans ce projet, et il est difficile de spéculer sur l'implication de ce facteur après ischémie-reperfusion et en rejet cardiaque aigu. Ces limitations ont été indiquées dans la discussion des deux articles et dans la discussion finale.

Dans la discussion du deuxième article, la conclusion portant sur la potentialisation des réponses dépendantes de l'activation de la protéine Gi est basée sur les relaxations à la sérotonine, au UK14304 et au NaF, les deux premiers médiateurs étant spécifiques à la Gi et le fluorure de sodium étant un activateur de toutes les protéines G. Au jour 5, les relaxations maximales induites par le NaF étaient comparables au groupe contrôle mais la courbe dose-réponse était déplacée vers la gauche (Figure 3), témoignant d'une sensibilité accrue à ce médiateur.

Après révision des coupes histologiques des artères coronaires (Figure 1 du premier article), les rares zones de dénudation endothéliale initialement observées étaient comparables entre les trois groupes, témoignant de la préservation de l'endothélium dans ces conditions expérimentales. Les résultats des deux articles ont été modifiés en conséquence de façon à éviter l'inconsistance majeure soulevée par l'examinateur.

Le qualificatif «enzyme pathologique» a été retiré à la page 3.

Le terme «médié» a été modifié dans tout le texte.

À la page 4, la présentation des résultats a été clarifiée.

Dans tout le texte, « second messenger » a été remplacé par « protéine de transmission du signal ».

Dans le deuxième article, la concentration de thrombine est en unités internationales / millilitre.

Dans tout le texte, « PGF₂∇ » a été remplacé par « PGF₂α ».

Commentaires du Docteur Michel White

Tel que mentionné par l'examineur, l'utilisation d'un modèle canin de transplantation cardiaque est un facteur limitant étant donné la différence des systèmes d'histocompatibilité du chien et de l'homme produisant des cinétiques de rejet très différentes. Cependant, les observations faites en situation d'ischémie-reperfusion et en rejet aigu dans ces conditions expérimentales (voir descriptions histologiques du rejet dans la section résultats des deux articles) permettent malgré tout de valider nos hypothèses. Idéalement, ces résultats devraient être confirmés dans un modèle porcin, permettant une cinétique de rejet semblable à l'humain. Ces limitations ont été spécifiées dans la discussion des deux articles et dans la discussion finale.

Le modèle de transplantation cardiaque hétérotopique a été utilisé étant donné la complexité de la greffe orthotopique chez le chien. Malgré le fait que l'hémodynamie dans le greffon hétérotopique perfusé mais non travaillant est différente de celle retrouvée chez l'humain, l'extrapolation des résultats obtenus est difficile. Toutefois, la réactivité endothéliale après transplantation cardiaque hétérotopique porcine n'est pas influencé par un modèle de greffon travaillant versus non travaillant (LP Perrault, observations non publiées, 1997). Ces aspects sont mentionnés dans la discussion des deux articles.

Les observations faites dans ces conditions expérimentales, soit l'atteinte spécifique des récepteurs thrombinergiques et des protéines G et l'apparition transitoire d'une NO synthase endothéliale, permettent une caractérisation de la dysfonction endothéliale après ischémie-reperfusion et en rejet aigu. La signification de ces altérations de la fonction endothéliale dans la pathogénèse des dommages cellulaires induits par le rejet et dans la survenue de l'athérosclérose accélérée du greffon demeure à préciser. Tout d'abord, la confirmation de ces observations dans un modèle avec une cinétique de rejet plus lente est à faire. L'effet d'un traitement immunosuppresseur sur les altérations de la fonction endothéliale devra également être investigué.

Tel que mentionné par l'examineur, les observations faites en chambres d'organes devront être confirmées par études immunologiques quantitatives lors de la poursuite de ces recherches. Cette limitation est mentionnée dans la discussion des deux articles. Cependant, un modèle animal différent (le rat ou le porc) sera nécessaire pour ces études subséquentes étant donné les difficultés à effectuer de façon reproductible les études immunologiques quantitatives chez le chien (observation non publiée).

Tel que discuté dans les réponses aux questions du Docteur Thorin, il est difficile de départager à partir de ces observations le rôle de la dysfonction endothéliale en tant que telle par rapport aux phénomènes reliés à l'infiltration vasculaire par les neutrophiles et les macrophages. Plus particulièrement, l'observation d'une NO synthase inductible dans l'intima des artères coronaires pourrait refléter l'expression de cette enzyme dans les cellules endothéliales mais aussi dans les cellules inflammatoires ayant infiltrés la paroi vasculaire.

Aucune immunosuppression n'a été utilisée dans ce protocole afin de minimiser les interactions avec la fonction endothéliale, en particulier la cyclosporine qui modifie la dysfonction endothéliale induite par le rejet aigu chez le chien (référence 4 du premier article). Les études subséquentes devront confirmer l'absence des altérations de la fonction endothéliale avec la prévention du rejet aigu par un traitement immunosuppresseur. Cet aspect est mentionné dans la discussion des deux articles.

Un rejet aigu sévère (grade 4) apparaît à partir de la quatrième journée après transplantation cardiaque hétérotopique chez le chien sans immunosuppression. À partir de ce moment, la fonction cardiaque se détériore progressivement pour devenir médiocre ou nulle (thrombose du greffon) vers la sixième ou septième journée (A.Ducharme, P.Demers, S.Elkouri, et al. Characterization of the natural history of cervical heterotopic heart transplantation with echocardiography. *J Heart Lung Transplant* 1999, 18 : 510-6). Les greffons cardiaques étaient donc prélevés au jour 5 afin d'avoir un rejet aigu sévère et une fonction cardiaque encore présente.

L'observation d'une activité in vitro de la NO synthase inductible seulement au jour 1 et non au jour 5 malgré l'observation de cette enzyme tant au jour 1 qu'au jour 5 en immunohistochimie ne correspond pas à nos hypothèses initiales. Cependant, il est connu que la NO synthase inductible peut être exprimée après ischémie et reperfusion (référence 15 du premier article). Par ailleurs, il faut noter que la démonstration in vitro de l'activité de la NO synthase inductible est difficile dans certains modèles animaux (références 5 et 28 du premier article), ce qui pourrait expliquer que nous n'avons pas démontré de NO synthase inductible active en rejet aigu.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Mémoire intitulé :

Dysfonction endothéliale après transplantation cardiaque hétérotopique chez le chien

Présenté par :

Philippe Demers

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Éric Thorin	président-rapporteur
Raymond Cartier	directeur de recherche
Martin G. Sirois	codirecteur de recherche
Michel White	membre du jury

Mémoire accepté le :

Table des matières

	Page
Page titre	1
Évaluation du jury	2
Sommaire	3
Résumé	6
Liste des figures	12
Liste des tableaux	13
Hypothèses et objectifs	14
Introduction	16
Chapitre 1	26
Effets de l'ischémie-reperfusion et du rejet aigu sur la NO synthase après transplantation cardiaque hétérotopique	
Chapitre 2	60
Dysfonction endothéliale coronarienne dans un modèle canin de transplantation cardiaque hétérotopique	
Discussion	93
Bibliographie	100

Sommaire

La survie à 5 ans après transplantation cardiaque est d'environ 70%, mais ces résultats sont limités par la survenue d'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque. Les connaissances actuelles suggèrent qu'une activation anormale de l'endothélium coronarien est un événement précoce dans la pathogénèse de l'athérosclérose sénile. Cette activation pathologique entraîne une perte des propriétés régulatrices de l'endothélium. La dysfonction de l'endothélium coronarien est un phénomène précoce après transplantation cardiaque chez l'humain et semble être impliquée dans le développement de l'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque. Dans différents modèles expérimentaux, la dysfonction endothéliale précoce après transplantation cardiaque semble impliquer des mécanismes spécifiques permettant la relâche d'oxyde nitrique mais aussi l'apparition d'une enzyme, la NO synthase inductible. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'agression endothéliale au cours du processus de transplantation cardiaque dont l'ischémie froide suivie d'une reperfusion, les solutions cardioplogiques, le rejet aigu et la médication immunosuppressive. L'hypothèse directrice de ce travail était que la dysfonction endothéliale après transplantation cardiaque implique des mécanismes précis, soit une activité anormale de la signalisation intracellulaire médiée par les protéines Gi, ainsi que l'apparition de l'enzyme NO synthase inductible.

Un modèle canin de transplantation cardiaque hétérotopique sans immunosuppression a été utilisé. Trois groupes ont été étudiés : le premier groupe était constitué d'animaux transplantés 24 heures auparavant, afin d'évaluer l'effet de

l'ischémie suivie d'une reperfusion; le deuxième groupe était constitué d'animaux transplantés 5 jours auparavant, de façon à évaluer l'effet du rejet aigu; enfin, le troisième groupe était constitué d'animaux non transplantés. Pour caractériser la fonction endothéliale coronarienne après transplantation cardiaque, des études de réactivité vasculaire en chambres d'organes ont été faites avec des segments d'artères coronaires provenant des greffons cardiaques des animaux des groupes transplantés et des coeurs natifs des animaux du groupe contrôle. De plus, des études immunohistochimiques ont été réalisées pour identifier les enzymes NO synthase constitutive et inductible dans les artères coronaires des trois groupes expérimentaux.

Dans les 3 groupes étudiés, l'activité de la NO synthase constitutive était comparable. La dysfonction endothéliale identifiée 24 heures après la transplantation était caractérisée par une diminution des relaxations endothéliales dépendantes de l'activation des récepteurs thrombinergiques et une diminution légère des relaxations dépendantes des protéines G. Cinq jours après la transplantation, la dysfonction endothéliale était modifiée et impliquait spécifiquement une diminution persistante des relaxations endothéliales dépendantes de l'activation des récepteurs thrombinergiques et une augmentation des relaxations endothéliales dépendantes de l'activation des récepteurs couplés à la protéine Gi. De plus, l'enzyme NO synthase inductible a été détectée par études immunohistochimiques tant 24 heures que 5 jours après transplantation. Toutefois, l'activité de cette enzyme en chambre d'organes n'était présente que 24 heures après la greffe cardiaque.

Ainsi, dans un modèle canin de transplantation cardiaque hétérotopique, la dysfonction endothéliale implique des mécanismes spécifiques impliquant les récepteurs

thrombinergiques et les protéines G. De plus, dans ces conditions expérimentales, il y a apparition au niveau de l'intima de l'enzyme NO synthase inductible. L'identification et la caractérisation de ces phénomènes devraient mener à une meilleure compréhension de la dysfonction endothéliale après transplantation cardiaque et du rôle de cette dysfonction dans le développement de l'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque.

Résumé

La survie à 5 ans après transplantation cardiaque est d'environ 70 %, mais ces résultats demeurent limités par l'apparition d'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque qui demeure la première cause de mortalité au delà de la première année après la transplantation. L'agression subie par l'endothélium coronarien pendant et après une transplantation cardiaque serait un facteur important dans le développement de cette forme d'athérosclérose. Normalement, l'endothélium module le tonus vasculaire et contribue à l'homéostasie de la paroi artérielle. Lors d'une transplantation cardiaque, plusieurs facteurs peuvent contribuer à léser l'endothélium. Initialement, l'arrêt cardioplégique, l'ischémie froide dans une solution de préservation et la reperfusion subséquente peuvent endommager l'endothélium coronarien. Par la suite, le rejet aigu, résultant de la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte de peptides distincts dans le complexe majeur d'histocompatibilité du donneur, peut aussi produire une lésion endothéliale. De plus, le traitement immunosuppresseif, en particulier la cyclosporine A, peut avoir un effet toxique sur les cellules endothéliales. Ces différentes agressions sont à l'origine d'une activation pathologique de l'endothélium coronarien. Cette activation anormale entraîne une dysfonction de l'endothélium et une perte des fonctions régulatrices de l'endothélium sur la paroi vasculaire. Une dysfonction endothéliale spécifique a été identifiée comme étant un évènement précoce dans la survenue de l'athérosclérose sénile. Les récepteurs membranaires, les protéines de transmission du signal tels les protéines G, et l'enzyme NO synthase constitutive, sont des cibles potentielles au niveau de la cellule endothéliale activée. De plus, dans certaines

conditions pathologiques, l'induction d'une enzyme, la NO synthase inductible, entraîne la production de concentrations anormales d'oxyde nitrique et la génération de radicaux libres ayant des effets délétères sur les cellules avoisinantes. La dysfonction de l'endothélium coronarien est un phénomène précoce après transplantation cardiaque chez l'humain et ce phénomène pourrait être impliqué dans le développement de l'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque. Dans des modèles expérimentaux de transplantation cardiaque chez le porc et le chien, la dysfonction endothéliale est sélective et semble impliquer les relaxations endothéliales dépendantes de la protéine Gi sensible à la toxine de la coqueluche mais aussi par certains récepteurs spécifiques. Par ailleurs, dans des modèles expérimentaux de transplantation cardiaque chez le rongeur, la NO synthase inductible a été mise en évidence lors du rejet aigu et cette enzyme semble en partie être responsable des lésions cellulaires observées lors du rejet aigu.

L'hypothèse directrice de ce travail était que la dysfonction endothéliale apparaissant après une transplantation cardiaque implique des mécanismes spécifiques : d'une part certains récepteurs membranaires et certaines protéines G, et d'autre part l'induction de l'enzyme NO synthase inductible. Les objectifs de ce travail était donc de : caractériser les altérations spécifiques de la transduction cellulaire endothéliale permettant la synthèse de NO par la NO synthase constitutive; et d'identifier la présence de la NO synthase inductible après transplantation cardiaque expérimentale.

Le modèle expérimental utilisé était la transplantation cardiaque hétérotopique cervicale chez le chien. Ce modèle est caractérisé par de courtes périodes d'ischémie froide pour procéder à la greffe et l'apparition progressive en cinq jours d'un rejet aigu sévère. Aucune médication immunosuppressive n'était utilisée lors de ces études, afin de

minimiser les interactions potentielles entre les immunosuppresseurs et la fonction endothéliale. Afin de caractériser la dysfonction endothéliale avant et après l'apparition du rejet cardiaque sévère, nous avons étudié 3 groupes : le premier groupe était constitué d'animaux ayant eu une greffe cardiaque 24 heures auparavant, pour isoler l'effet de l'ischémie froide suivie d'une reperfusion; le deuxième groupe était constitué d'animaux ayant eu une greffe cardiaque 5 jours auparavant, de façon à évaluer l'effet du rejet aigu sévère non traité; enfin, le troisième groupe était constitué d'animaux normaux non transplantés, servant de contrôles.

L'intensité du dommage tissulaire suite à l'ischémie et la reperfusion ainsi que la sévérité du rejet cardiaque ont été évaluées par études histologiques. Des segments d'artères coronaires épicaudiques provenant des greffons cardiaques des animaux des groupes transplantés et des coeurs natifs des animaux du groupe contrôle ont été étudiés en chambres d'organes isolés. De façon à évaluer l'activité in vitro de la NO synthase constitutive, les réponses dépendantes de l'endothélium au calcium ionophore ont été étudiées. De plus, afin de caractériser la signalisation intra-cellulaire endothéliale, les réponses au fluorure de sodium (activateur direct des protéines G), à la sérotonine et au UK14304 (médiators utilisant la voie de la protéine Gi), à la bradykinine et à l'acétylcholine (médiators utilisant la voie de la protéine Gq) et à la thrombine (médiator utilisant la protéine Gi et la phospholipase C) ont été étudiées. Par ailleurs, les réponses dépendantes et indépendantes de l'endothélium à la L-arginine, avec et sans aminoguanidine, ont été étudiées afin d'identifier la présence de la NO synthase inductible. Également, les réponses indépendantes de l'endothélium au nitroprussiate de sodium, au chlorure de potassium et à la prostaglandine F_{2α} ont été évaluées. Enfin, des

études immunohistochimiques sur des segments d'artères coronaires ont été réalisées pour identifier la présence des enzymes NO synthase constitutive et inductible.

Les études histologiques ont démontré l'absence de rejet aigu ainsi que la présence de nécrose myocardique légère dans les greffons prélevés 24 heures après la transplantation, témoignant de la courte période d'ischémie froide suivie d'une reperfusion. Tous les greffons prélevés 5 jours après la transplantation présentaient un rejet aigu de grade sévère, avec une infiltration cellulaire diffuse et des foyers étendus d'oedème, d'hémorragie et de nécrose myocytaire. Les réponses endothéliales au calcium ionophore étaient comparables entre les groupes, témoignant d'une préservation de la fonction de la NO synthase constitutive après la transplantation cardiaque. Les réponses endothéliales à l'acétylcholine et à la bradykinine étaient également comparables entre les groupes, suggérant que la voie dépendante de la protéine Gq était intacte. Cependant, les relaxations dépendantes de l'endothélium au fluorure de sodium étaient significativement diminuées au jour 1 et augmentées au jour 5, en comparaison avec le groupe contrôle. Les relaxations dépendantes de l'endothélium à la sérotonine et au UK14304 étaient significativement augmentées au jour 5 en comparaison aux autres groupes. Ensembles, ces observations suggèrent une atteinte spécifique et variable dans le temps de la voie médiée par les protéines G, avec d'abord au jour 1 une inhibition globale légère de l'activité des protéines G mise en évidence seulement avec le fluorure de sodium; puis au jour 5, une potentialisation de la transmission du signal par la voie de la protéine Gi. Les réponses endothéliales à la thrombine, quant à elles, étaient diminuées de façon significative tant au jour 1 qu'au jour 5 après la transplantation, suggérant une atteinte spécifique précédant les protéines de transmission du signal, soit au niveau des

récepteurs thrombinergiques. La réactivité du muscle lisse vasculaire était comparable entre les 3 groupes étudiés, témoignant d'une préservation de la fonction du muscle lisse vasculaire dans ces conditions expérimentales.

Des relaxations dépendantes de l'endothélium suite à la stimulation par la L-arginine n'ont été observées qu'au jour 1, et ces réponses étaient significativement inhibées en présence d'aminoguanidine, un inhibiteur spécifique de la NO synthase inductible. Toutefois, les études immunohistochimiques ont révélé la présence de la NO synthase inductible au niveau de l'intima des artères coronaires tant au jour 1 qu'au jour 5 après la transplantation. Ces observations suggèrent l'apparition précoce dans l'intima de l'enzyme NO synthase inductible après transplantation cardiaque expérimentale et une activité variable en fonction du temps écoulé depuis la greffe.

En résumé, ce travail visait à caractériser la réactivité endothéliale coronarienne avant et après le développement d'un rejet aigu sévère dans un modèle canin de transplantation cardiaque hétérotopique sans immunosuppression, en mimant de façon expérimentale la situation de greffe cardiaque chez l'humain. Dans ces conditions expérimentales, nous avons démontré une préservation de la fonction de la NO synthase constitutive, de la voie dépendante de la protéine Gq, et de la fonction du muscle lisse vasculaire tant au jour 1 qu'au jour 5 après la transplantation. Par ailleurs, nous avons observé une atteinte spécifique de la voie empruntant les protéines G impliquant une inhibition initiale légère et transitoire au jour 1, puis une potentialisation spécifique tardive au jour 5 de la voie dépendante de la protéine Gi. De plus, une atteinte spécifique et persistante du récepteur de la thrombine a été démontrée aux jours 1 et 5 après la transplantation. Enfin, l'apparition de l'enzyme NO synthase inductible a été observée

par immunohistochimie aux jours 1 et 5 après la transplantation tandis que son activité in vitro n'a été démontrée que précocément après la greffe. Ces observations suggérant une atteinte précoce et spécifique de la fonction endothéliale après une transplantation cardiaque sont en accord avec plusieurs études récentes tant chez l'humain que dans des modèles expérimentaux de greffe cardiaque. L'identification de ces phénomènes, potentiellement impliqués dans l'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque, devrait mener à des stratégies visant à moduler les effets de l'ischémie-reperfusion et du rejet aigu et à prévenir le développement de l'athérosclérose coronarienne suite à une transplantation cardiaque.

*Listes des figures**Chapitre 1*

- Figure 1 Étude immuno-histochimique pour le facteur vonWillebrand
- Figure 2 Étude immuno-histochimique pour l'enzyme NO synthase constitutive
- Figure 3 Étude immuno-histochimique pour l'enzyme NO synthase inductible
- Figure 4 Courbes dose-réponse pour la L-arginine
- Figure 5 Courbes dose-réponse pour la L-arginine avec et sans aminoguanidine

Chapitre 2

- Figure 1 Courbes dose-réponse pour la sérotonine
- Figure 2 Courbes dose-réponse pour le UK14304
- Figure 3 Courbes dose-réponse pour le fluorure de sodium
- Figure 4 Courbes dose-réponse pour la thrombine

Liste des tableaux

Chapitre 1

- Tableau 1 EC50 à l'acétylcholine, au calcium ionophore et au nitroprussiate de sodium
- Tableau 2 Emax à l'acétylcholine, au calcium ionophore et au nitroprussiate de sodium
- Tableau 3 Contractions au chlorure de potassium et à la prostaglandine F2 α

Chapitre 2

- Tableau 1 EC50 des différents agonistes dépendants et indépendants de l'endothélium
- Tableau 2 Emax des différents agonistes dépendants et indépendants de l'endothélium
- Tableau 3 Contractions au chlorure de potassium et à la prostaglandine F2 α

Hypothèses et objectifs

Le rôle de l'endothélium en tant que modulateur du tonus et de l'homéostasie vasculaire a été établi. La dysfonction de l'endothélium coronarien a été identifiée comme un évènement important dans le développement de l'athérosclérose coronarienne et la dysfonction endothéliale semble précéder l'apparition de l'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque. Dans différents modèles expérimentaux de lésion endothéliale, la dysfonction endothéliale initiale semble impliquer des mécanismes spécifiques, en particulier la protéine de transmission du signal appelée protéine Gi, puis se généralise pour atteindre les autres voies menant à la synthèse de l'oxyde nitrique. Par ailleurs, dans des modèles expérimentaux de transplantation cardiaque chez le rongeur, l'apparition d'une enzyme, la NO synthase inductible, entraîne la synthèse d'oxyde nitrique en quantité supra-physiologique. Cette production anormale d'oxyde nitrique, par la génération de radicaux libres hautement réactifs et l'inhibition d'enzymes cellulaires importantes, serait directement impliquée dans la pathogénèse des dommages tissulaires causés par le rejet cardiaque aigu.

Ce travail avait pour but de caractériser les altérations des réponses dépendantes de l'endothélium dans un modèle canin de transplantation cardiaque hétérotopique. Plus spécifiquement, par des observations *in vitro* dans des chambres d'organes, l'activité de l'enzyme NO synthase constitutive et les différentes voies de transduction dépendantes des protéines G ont été étudiées afin de préciser la dysfonction endothéliale après une ischémie froide courte suivie d'une reperfusion de 24 heures et après un rejet aigu non traité. De plus, l'apparition de l'enzyme NO synthase inductible après ischémie-

reperfusion et rejet cardiaque aigu a été évaluée par des études in vitro et immuno-histochimiques.

Introduction

-Rôles de l'endothélium vasculaire

L'endothélium normal permet la régulation du tonus vasculaire et le maintien d'une surface non thrombogénique entre le sang et les vaisseaux sanguins. De plus, l'endothélium constitue une barrière sélective contrôlant la perméabilité vasculaire, contribue au contrôle de la prolifération du muscle lisse vasculaire et module les interactions des leucocytes et de la paroi vasculaire. Ces propriétés fondamentales de l'endothélium dépendent, entre autres, de la production et la sécrétion de facteurs dépendants de l'endothélium ainsi que de l'expression à la surface cellulaire de molécules d'adhésion et de récepteurs membranaires. La découverte en 1980 par Furchgott et Zawadzki du rôle obligatoire de l'endothélium dans la relaxation du muscle lisse vasculaire dépendante de l'acétylcholine¹ a confirmé le rôle important de l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et a pavé la voie à d'innombrables travaux scientifiques portant sur la physiologie de l'endothélium et son implication dans différentes pathologies vasculaires².

Les cellules endothéliales produisent plusieurs substances, appelées facteurs dépendants de l'endothélium, qui causent, entre autres fonctions, une relaxation (facteur relaxant dépendant de l'endothélium, *endothelium-derived relaxing factor* [EDRF]) ou une contraction (facteurs contractants dépendants de l'endothélium, *endothelium-derived contracting factors* [EDCF]) du muscle lisse vasculaire sous-jacent.

-Monoxyde d'azote (NO)

La substance labile, diffusible et non prostanoloïde médiant la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine a été identifiée comme étant le monoxyde d'azote³⁻⁵. Le NO et la L-citrulline sont formés à partir de l'acide aminé L-arginine par l'enzyme NO synthase constitutive située dans les cellules endothéliales (NO synthase type III). L'enzyme NO synthase produit des concentrations picomolaires de NO en fonction de la concentration intra-cellulaire d'ions calcium. Les cofacteurs essentiels à cette activité enzymatique sont la calmoduline, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), et la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH4) (Figure 1)⁵⁻⁷. L'enzyme NO synthase peut être inhibée de façon compétitive par des analogues de la L-arginine tel que le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA). Par ailleurs, il existe deux autres isoformes de l'enzyme NO synthase : l'isoforme neuronale (NO synthase type I), et l'isoforme inductible (NO synthase type II). La NO synthase inductible est indépendante de la concentration intra-cellulaire d'ions calcium, est capable de produire du NO à des concentrations nanomolaires, et elle a été observée dans différents types cellulaires, incluant les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les macrophages. L'isoforme inductible de la NO synthase serait induite par l'exposition à des endotoxines telles que les lipopolysaccharides et à certaines cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor* [TNF]). L'induction de la NO synthase inductible peut être prévenue par l'administration de glucocorticoïdes, tandis que l'activité de cette enzyme peut être bloquée par des inhibiteurs compétitifs spécifiques, tel que l'aminoguanidine^{5,8}.

Le NO diffuse vers les cellules musculaires lisses vasculaires et stimule l'enzyme guanylate cyclase soluble qui produit le 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique). L'augmentation de la concentration intra-cellulaire du GMP cyclique entraîne une inhibition de l'appareil contractile de la cellule musculaire lisse. Par ailleurs, il a été démontré que le NO inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires⁹. Le NO produit par la cellule endothéliale diffuse également vers la lumière du vaisseau sanguin. Normalement, l'oxyhémoglobine présente dans les érythrocytes circulants neutralise rapidement le NO, empêchant toute activité au-delà de la surface de la cellule endothéliale. À ce niveau, le NO inhibe l'adhésion des plaquettes et des leucocytes aux cellules endothéliales. De plus, en association avec la prostacycline, également produite par l'endothélium, le NO diminue l'aggrégation des plaquettes entre elles^{3,7}.

La synthèse du NO varie en fonction de différents facteurs physiques et chimiques. Les forces de cisaillement exercées par le flot sanguin sur les parois artérielles représentent un stimulus important régissant la synthèse locale de NO^{2,10}. Plusieurs médiateurs neurohumoraux peuvent moduler la synthèse du NO par l'activation de différents récepteurs présents à la surface de la cellule endothéliale⁶. Ainsi, la production de NO peut être stimulée par des hormones présentes dans la circulation (catécholamines, vasopressine); des autacoïdes générés par la paroi vasculaire et agissant localement (bradykinine, histamine); des médiateurs générés par l'activation plaquettaire ou par la cascade de la coagulation (sérotonine, adénosine diphosphate [ADP], thrombine); et des peptides (substance P, endothéline, angiotensine)^{3,11}.

Les récepteurs endothéliaux spécifiques à ces différents médiateurs sont en relation avec l'enzyme NO synthase constitutive par l'intermédiaire de protéines de

couplage, qui permettent la transmission et l'amplification du signal^{3,6,11}. Dans les cellules endothéliales porcines et canines, la principale protéine de transmission du signal est la protéine G^{11,12}. La protéine Gi, sensible à la toxine de la coqueluche, est liée aux récepteurs α_2 -adrénergiques, sérotoninergiques et thrombinergiques. L'activation de la protéine Gi entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase et une activation des canaux potassiques dépendants du calcium; toutefois, le mécanisme exact permettant le couplage de la protéine Gi et de la NO synthase constitutive demeure inconnu^{6,11}. Par ailleurs, la protéine Gq, insensible à la toxine de la coqueluche mais sensible à la toxine du botulisme, est liée aux récepteurs spécifiques à la bradykinine et aux purines (ADP, ATP). Lorsqu'activée, cette protéine G entraîne une stimulation de la phospholipase C, permettant une augmentation de la concentration intra-cellulaire d'ions calcium et ainsi une production accrue de NO par la NO synthase constitutive^{11,12}.

-Prostacycline

La prostacycline est formée par l'enzyme cyclooxygénase endothéliale à partir de l'acide arachidonique provenant de la membrane cellulaire. Les facteurs qui augmentent la production de prostacycline sont les forces de cisaillement, l'hypoxie, ainsi que plusieurs médiateurs qui stimulent à la fois la cyclooxygénase et la NO synthase constitutive. La prostacycline diffuse vers les cellules musculaires lisses de la paroi artérielle et active l'enzyme adénylate cyclase, ce qui cause une augmentation de la concentration intra-cellulaire de 3'-5' adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique) et ainsi une relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire^{3,7}. Cependant, la

contribution de la prostacycline aux relaxations dépendantes de l'endothélium est négligeable par rapport à la contribution du NO². Il existe tout de même une synergie entre le NO et la prostacycline quant à l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire.

-Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Une relaxation endothélium-dépendante associée à une hyperpolarisation transitoire des cellules musculaires lisses vasculaires a été observée après stimulation par certains médiateurs tels l'acétylcholine et la bradykinine. Cette hyperpolarisation dépendante de l'endothélium est due à un facteur diffusible dérivé de l'endothélium, le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarizing factor [EDHF])^{3,6,7,11}. La composition exacte de l'EDHF demeure incertaine; cependant, les acides époxyeicosatriénoïques, dérivés de l'acide arachidonique par l'action du cytochrome P-450, semblent correspondre à l'EDHF dans certaines conditions expérimentales^{6,13}. La synthèse de l'EDHF varie, tout comme la synthèse du NO, en fonction de la concentration d'ions calcium dans la cellule endothéliale. De plus, l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires par ce facteur endothélial serait dépendante de l'activation de canaux potassiques dépendants du calcium¹³. La contribution de l'hyperpolarisation dans les relaxations dépendantes de l'endothélium varie selon la taille des vaisseaux étudiés et serait plus importante dans les artères de résistance. Normalement, dans les vaisseaux de conductance, les relaxations dépendantes de l'endothélium dépendent surtout de la contribution du NO. Toutefois, lorsque la

production de NO est inhibée, l'EDHF peut médier des relaxations endothélium-dépendantes quasi normales, permettant ainsi une certaine compensation³.

-Facteurs contractants dérivés de l'endothélium

Des contractions dépendantes de l'endothélium peuvent s'expliquer par une diminution de la synthèse de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium ou par une production accrue de facteurs contractants dérivés de l'endothélium (endothelium-derived contracting factors [EDCF]). Les facteurs contractants dérivés de l'endothélium sont l'anion superoxyde, les endoperoxydes, la thromboxane A₂, et le peptide endothéline-1^{3,7,11}. Les stimuli entraînant la relâche de ces facteurs contractants incluent l'hypoxie, les forces d'étirement, et plusieurs médiateurs neurohumoraux tel la sérotonine.

-Dysfonction endothéliale

Endothélium régénéré suite à une dénudation

Le processus normal de vieillissement, en plus des différentes insultes dirigées vers la paroi artérielle, entraînent un renouvellement constant des cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales régénérées, malgré une morphologie normale, ne fonctionnent pas comme les cellules endothéliales originales. Dans un modèle in vivo d'endothélium coronarien régénéré suite à une dénudation, il a été démontré que les cellules endothéliales régénérées avaient perdu en partie la capacité de relâcher du NO, en particulier en réponse aux substances libérées lors de l'aggrégation plaquettaire¹⁴.

Ainsi, ces cellules endothéliales régénérées présentent une réactivité modifiée en présence des médiateurs utilisant la voie de la protéine G sensible à la toxine de la coqueluche pour stimuler la NO synthase constitutive¹⁵. Cette dysfonction endothéliale est sélective à la voie de la protéine Gi et elle prédispose à une vasoconstriction exagérée en présence des médiateurs tel la sérotonine.

Athérosclérose

Les études de la réactivité endothéliale dans des modèles expérimentaux d'hypercholestérolémie et d'athérosclérose coronarienne suite à une diète riche en lipides a démontré une détérioration de la relaxation dépendante de l'endothélium avec préservation de la fonction musculaire lisse¹⁶⁻¹⁷. Chez l'humain, des études de réactivité endothéliale réalisées sur des artères coronaires provenant de transplantés cardiaques ont démontré des relaxations dépendantes de l'endothélium moindres dans les segments d'artères athérosclérotiques en comparaison avec les segments sains¹⁸. Des études angiographiques chez l'humain ont démontré que les artères coronaires athérosclérotiques présentent une vasoconstriction après l'injection intra-coronarienne d'acétylcholine, tandis que les artères coronaires saines présentent une vasorelaxation suite à l'injection d'acétylcholine¹⁹. Cette dysfonction endothéliale a également été identifiée en l'absence d'épaississement intimal, et pourrait être un évènement précoce ou précurseur de l'athérogénèse coronarienne²⁰. Au début du processus d'athérogénèse coronarienne, la dysfonction endothéliale semble être limitée à la voie empruntant la protéine Gi, sensible à la toxine de la coqueluche, menant à la synthèse de NO^{11-12,14-17}. Ainsi, l'atténuation des relaxations dépendantes de l'endothélium est principalement secondaire à une relâche

diminuée de NO. L'endothélium anormal n'arrive plus à résister à l'adhésion et l'aggrégation plaquettaire et à la formation de thrombine. L'effet de rétroaction négative du NO est donc amoindrie tandis que des facteurs vasoconstricteurs et des facteurs de croissance, tel le facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor [PDGF]) sont libérés en plus grande quantité et entraînent l'initiation des changements morphologiques caractéristiques de l'athérosclérose^{2,3,11}.

Transplantation cardiaque

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à une lésion de l'endothélium vasculaire pendant et après une transplantation cardiaque. Un traumatisme mécanique, les solutions de cardioplégie et de préservation des organes, l'hypothermie, et le processus d'ischémie suivie d'une reperfusion, peuvent tous contribuer à une atteinte de l'endothélium coronarien²¹⁻²⁵. Une dénudation de l'endothélium suite à l'insulte péri-opératoire ou secondaire au processus de rejet cardiaque suivie d'une régénération peut également mener à une diminution des réponses vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium coronarien²⁶. Les médicaments immunosuppresseurs dont la cyclosporine A, nécessaires pour prévenir le rejet aigu suite à la transplantation d'organe, peuvent modifier la réactivité endothéliale des artères épigardiques et de résistance²⁷. Par ailleurs, d'autres facteurs tels que l'hypercholestérolémie associée à la prise de corticostéroïdes, l'hypertension artérielle secondaire à la cyclosporine A, et l'infection à cytomégalovirus des cellules endothéliales, peuvent aussi contribuer à la dysfonction endothéliale suivant une transplantation cardiaque.

Fonction endothéliale après transplantation cardiaque chez l'humain

Les réponses vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium en présence d'acétylcholine sont altérées chez la majorité des transplantés cardiaques dans la première année suivant la greffe. Les études in vivo chez l'humain utilisant l'injection intracoronarienne d'acétylcholine dans les premières semaines après la transplantation démontrent des réponses endothéliales modifiées précocément malgré l'absence de rejet cardiaque aigu²⁸⁻²⁹. La dysfonction endothéliale des artères coronaires observée 2 semaines après transplantation cardiaque serait prédictive de l'apparition d'hyperplasie intimale 1 an après la greffe tel qu'observée par échographie endovasculaire intracoronarienne³⁰. La relaxation endothéliale dépendante des récepteurs de la substance P et de l'acétylcholine est également altérée après transplantation cardiaque chez l'humain, en particulier chez les patients présentant une athérosclérose accélérée du greffon cardiaque³¹. La fonction du muscle lisse vasculaire semble préservée après transplantation cardiaque chez l'humain. En effet, même en présence d'épaississement intimal, la réactivité des vaisseaux coronariens suite à l'injection de vasodilatateurs indépendants de l'endothélium, tels le nitroprussiate de sodium et la nitroglycérine, est préservée tandis que les réponses dépendantes de l'endothélium sont modifiées³¹⁻³².

NO synthase inductible après transplantation cardiaque

L'apparition d'une NO synthase inductible vasculaire a été documentée chez l'humain après greffe cardiaque ainsi que dans différentes conditions expérimentales reproduisant l'ischémie-reperfusion, le rejet aigu et le rejet chronique³³⁻³⁶. Cependant, son rôle exact au niveau du greffon cardiaque demeure incertain. Par la synthèse constante de quantité supra-physiologique de NO, l'enzyme NO synthase inductible vasculaire entraîne la formation de radicaux libres hautement réactifs, tel le peroxy-nitrite⁵. La

présence de la NO synthase inductible suite à une transplantation cardiaque a entre autres été associée à une dysfonction contractile du ventricule gauche et à l'apoptose des myocytes du greffon cardiaque³⁶⁻³⁸. Chez l'animal, l'inhibition de cette enzyme par des inhibiteurs compétitifs spécifiques tel l'aminoguanidine entraîne une atténuation de la sévérité du rejet du greffon cardiaque, une amélioration de la fonction contractile du greffon et une meilleure préservation de la perméabilité sélective de l'endothélium vasculaire³⁹⁻⁴¹. Toutefois, la mise en évidence de l'enzyme NO synthase inductible dans des modèles expérimentaux autres que le rongeur demeure difficile⁴².

Rejet aigu et dysfonction endothéliale

Lors du rejet cardiaque aigu chez l'humain, des vasospasmes sévères attribués à une dysfonction de l'endothélium coronarien ont été observés⁴³⁻⁴⁴. Dans un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique chez le chien, une dysfonction endothéliale spécifique à la sérotonine et à la thrombine avec préservation de la réponse à l'acétylcholine, à l'ADP a été observée⁴⁵. De plus, une potentialisation des réponses dépendantes de l'endothélium à la sérotonine lors du traitement avec de la cyclosporine A a été identifiée dans ces conditions expérimentales⁴⁶. Par ailleurs, dans un modèle porcin de transplantation cardiaque hétérotopique, il a été démontré que l'atteinte précoce de la fonction endothéliale lors du rejet aigu non traité est spécifique à la voie empruntant la protéine Gi sensible à la toxine de la coqueluche avec une préservation de l'activité de la NO synthase constitutive⁴⁷. Lors du rejet aigu évoluant pendant 14 jours, la dysfonction endothéliale spécifique évolue de façon à devenir plus généralisée, impliquant aussi l'activité de la NO synthase constitutive.

Effects of Ischemia-Reperfusion and Acute Untreated Rejection on
Nitric Oxide Synthase After Heterotopic Heart Transplantation

Abstract

Background: Reperfusion and acute rejection are associated with an endothelial dysfunction and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression. The purpose of this study was to evaluate endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS) activity and the presence of iNOS during reperfusion and acute rejection in a heterotopic canine heart transplantation setting.

Methods: ecNOS and expression of iNOS were evaluated in two groups of mongrel dogs ($n = 7$) that underwent heterotopic heart transplantation without immunosuppression. The first group was studied after 24 hours of reperfusion and the second after 5 days of acute untreated rejection. A control group (group 3) consisting of normal unoperated dogs was used. Coronary artery vascular reactivity was studied in organ chambers.

Results: At the time of harvest, hearts from group 1 displayed scattered areas of ischemic damage without any rejection while hearts from group 2 reached grade IV/IV rejection. Expression of vonWillebrand factor was observed on coronary of the endothelial cells in animals of the three groups studied. Endothelium-dependent relaxations to acetylcholine and to calcium ionophore A23187 were unaffected by ischemia-reperfusion and acute rejection. L-arginine induced increased endothelium-dependent relaxations in group 1, which was significantly inhibited by the specific iNOS inhibitor aminoguanidine. Endothelium-independent responses were unaffected.

Conclusions: In our experimental setting, neither ischemia and reperfusion nor acute untreated rejection affected ecNOS. Expression of an endothelial iNOS was evident after both ischemia-reperfusion and acute untreated rejection but in vitro iNOS activity was only present early on after transplant.

INTRODUCTION

Cardiac allograft vasculopathy remains the major cause of late death after heart transplantation.¹ The exact pathogenesis of this accelerated coronary atherosclerosis syndrome is unknown but different risk factors have been suggested.^{1,2} Acute rejection, resulting from allorecognition of distinct peptides between the major histocompatibility complex (MHC) of the donor and recipient,² produces myocardial and endothelial damage.²⁻⁶ Cold ischemia and reperfusion at the time of allograft implantation can also produce endothelial injury and dysfunction.⁶⁻¹⁰ The vascular endothelium is an important regulator of local vascular tone and has antithrombotic and antiproliferative properties, mainly due to the release of nitric oxide (NO).¹¹ In animal model of acute allograft rejection as in human transplant recipients, coronary endothelial dysfunction has been demonstrated to occur early on.^{3-5, 12-14} Previous studies from our laboratory with a dog model of acute heart rejection have shown a receptor-specific effect in endothelium-dependent relaxations with enhancement of relaxations to certain agonists such as serotonin.³ In the endothelial cell, NO is produced from L-arginine by the constitutive NO synthase (ecNOS), depending on the intracellular concentration of calcium.¹¹ Ischemia reperfusion injury and allograft rejection has been shown to induce a different NO synthase isomere, calcium-independent, known as inducible nitric oxide synthase (iNOS). This enzyme is normally not "tissu" specific and can be present in the coronary arteries as well as in the myocardium and inflammatory cells. The contribution of acute rejection to the development of coronary allograft vasculopathy has not yet been defined, but experimental evidences suggest a link between them.²¹⁻²³ This study was designed to evaluate the effects of ischemia-reperfusion and acute untreated rejection on in vitro ecNOS activity and iNOS induction in a canine heterotopic heart transplantation model.

MATERIAL AND METHODS

Animal Care

Experiments were performed with heartworm-free mongrel dogs of either sex (donors : body weight 12 to 18 kg; recipients: body weight 25 to 35 kg). All animals were cared for in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1985). All procedures used in this study were approved by the Montreal Heart Institute ethical committee on animal care.

Heterotopic Heart Transplantation

Anesthesia

Donors and recipients were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg i.v.). After orotracheal intubation with a cuffed tube, ventilatory support (tidal volume: 15 mL/kg; 12 to 15 cycles/min) was established with a Harvard ventilator with oxygen supplementation. Venous access was obtained through the saphenous vein for blood samples and volume replacement.

Donor

After median sternotomy and pericardial incision, the heart was prepared with suture control without ligation of the superior and inferior vena cava and the azygos vein. After systemic administration of heparin (2 mg/kg i.v.), the distal innominate artery was clamped out and the proximal portion was cannulated with a catheter positioned in the ascending aorta for cardioplegic solution perfusion. Then, the aortic arch was cross-clamped, rapid diastolic arrest was achieved with the administration of cold (4° C) cristalloid cardioplegic solution (Na⁺ 130 mmol/L; Cl⁻ 129 mmol/L; K⁺ 24 mmol/L; Ca²⁺ 1.5 mmol/L; lactate 28 mmol/L) and both vena cava and the azygos vein were ligated. After excision of the donor heart, the

inter-atrial septum was removed and the chordae tendinae of the mitral valve were divided before ligation of the pulmonary veins. The heart was then preserved in a cold (4° C) crystalloid solution before implantation.

Recipient

A left cervical incision was made and the left external jugular vein and common carotid artery were isolated. After systemic administration of heparin (2.0 mg/kg i.v.), an end-to-side anastomosis was performed between the donor ascending aorta and the recipient carotid artery (5-0 running suture). The jugular vein was then anastomosed to the donor main pulmonary artery (7-0 running suture). After reperfusion (cold ischemic time of 45 to 60 minutes), de-airing was performed by left atrial venting, and sinus rhythm was reestablished with direct defibrillation (10 to 20 Joules) as needed. Meticulous hemostasis was achieved and a subcutaneous pocket was created to place the allograft. The wound was then closed in two layers using nonabsorbable sutures.

Postoperative Care

After extubation, the animals were left to recover in a temperature-controlled room and their diet resumed with standard dog chow ad libitum. Antibiotic prophylaxis was provided with oral administration of amoxicillin for 2 days. Daily examination by palpation of the grafted heart was performed until the end of the experiment.

Experimental Groups

In the first group ($n = 7$), the animals underwent heterotopic heart transplantation without immunosuppression and were sacrificed after 24 hours to evaluate the effects of cold ischemia and reperfusion. In the second group ($n = 7$), the animals underwent heterotopic heart transplantation without immunosuppression and were sacrificed after 5 days to study the effects

of acute graft rejection. Previous results from our laboratory suggested that in a canine heterotopic transplantation model without immunosuppression, severe grade IV/IV acute rejection developed in all animals 5 days after the surgery. A group of normal unoperated dogs ($n = 7$) was the control group.

In the transplanted animals, at the end of the experiment, after anesthesia with pentobarbital (30 mg/kg i.v.) and establishment of ventilatory support as described above, the cervical incision was reentered, and the grafted heart was dissected free, then explanted and placed in a cold (4° C) Krebs-Ringer solution (mmol/L): NaCl 118.3; KCl 4.7; MgSO₄ 1.2 : K₂PO₄ 1.22; CaCl₂ 1.3; NaHCO₃ 25 and dextrose 15. In the control dogs, after anesthesia and establishment of ventilatory support as described above, the hearts were explanted without cardioplegic arrest through a left thoracotomy and rapidly placed in a cold Krebs-Ringer solution.

Vascular Reactivity

The circumflex and left anterior descending arteries were dissected free from the epicardium, myocardium and the adventitial tissue. The arteries were then divided in 4 to 5 mm ring segments. In some rings, the endothelium was removed by gently rubbing the luminal surface of the vessel with a watchmaker's forceps. The segments were suspended in organ chamber (25 mL) filled with Krebs-Ringer solution at 37° C and aerated with a gas mixture of 95% O₂/5% CO₂. The rings were suspended between two stainless steel stirrups, one anchored to the bottom of the organ chamber and the other connected to a strain gauge for measurement of isometric tension with a Gould transducer. All studies were performed in the presence of indomethacin (10^{-5} mol/L) to prevent synthesis of endogenous prostanoids.

The rings were progressively stretched to their optimal length-tension ratio (8 to 10 g) as determined by measuring contraction to KCl 30 mmol/L at different levels of stretching. In all

experiments, the presence or absence of endothelium was confirmed by determination of the response to acetylcholine (10^{-6} mol/L). After washing, the vessels were allowed to stabilize for 40 minutes.

The endothelium-dependent and independent relaxations were studied after precontraction with prostaglandin $F_{2\alpha}$ (2×10^{-6} mol/L) to achieve a contraction averaging 50 to 80% of the maximal contraction. Responses to acetylcholine (10^{-9} to 10^{-4} mol/L; a receptor-dependent agonist) and the calcium ionophore A23187 (10^{-9} to 10^{-5} mol/L; a receptor-independent agonist) were compared between the three groups to evaluate the eNOS in vitro activity. To determine the presence of a vascular iNOS, the responses to L-arginine, the substrate of iNOS, (10^{-7} to 10^{-3} mol/L; in rings incubated or not for 30 minutes with aminoguanidine, a selective inhibitor of iNOS, 300 μ mol/L) were studied.

Endothelium-independent responses were studied in rings without endothelium by analyzing contractile responses to KCl (5 to 60 mmol/L) and prostaglandin $F_{2\alpha}$ (10^{-9} to 10^{-6} mol/L) and relaxation to sodium nitroprussiate (10^{-9} to 10^{-4} mol/L; a NO donor).

All drugs were given in a standard order for the three groups. The concentrations used always represent the final concentration obtained in organ chambers containing 25 mL of Krebs-Ringer solution.

Histologic and Immunohistochemical Studies

Segments from the circumflex artery, the right and left ventricles were fixed in 10% formalin solution buffered and embedded in paraffin. Hematoxylin-eosin (HPS) staining was performed and the specimens were evaluated by a cardiovascular pathologist for ischemic damage and rejection grade according to the International Society for Heart and Lung Transplantation classification. Immunohistochemistry was performed using the immunoperoxidase technique

with the following antibodies recognizing canine antigens: monoclonal anti-vonWillebrand factor (vWF) (Vector Laboratories, Burlingame, Ca.), polyclonal rabbit anti-ecNOS and monoclonal anti-iNOS (Transduction Laboratories, Lexington, Ky.). After deparaffinization, tissue rehydration, and blockade of endogenous peroxidase activity, the corresponding primary antibodies were applied for 60 minutes with 1% goat serum in phosphate-buffered saline solution. An equivalent concentration of nonspecific mouse IgG (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, Ca.) was used as control. Then, a secondary biotinylated goat anti-mouse or goat anti-rabbit antibody was applied for 60 minutes. Peroxidase labeling was achieved using avidin-peroxidase complex (Vector Laboratories) and antibody visualization was established after a 5-minute exposure to 0.05% 3,3'-diaminobenzidine in 0.05 mmol/L Tris-HCl at pH 7.6 with 0.003% hydrogen peroxide. The vessels were counterstained by immersion in Mayer's hematoxylin solution. Antigen expression was evaluated for each segment by using a dedicated 3CCD video microscope adapted to customized software.

Drugs

All solutions were prepared daily with nanopure water except indomethacin, which was initially dissolved in NaCO_3 (10^{-5} mmol/L) then in nanopure water and the calcium ionophore A23187 which was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (1%) and then in nanopure water. Acetylcholine, calcium ionophore A23187, L-arginine hydrochloride, aminoguanidine, prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, sodium nitroprussiate and indomethacin were purchased from (Sigma Chemicals, St-Louis, MO.).

Statistical Analysis

All the results are expressed as mean and standard error of the mean (mean \pm SEM). In all experiments, "n" refers to the number of animals studied. The vasorelaxation response obtained

from segments precontracted with $\text{PGF}_{2\alpha}$ is expressed as the maximal relaxation obtained (E_{\max}) and the logarithm of the effective concentration of the agonist causing 50% of the maximal response (EC_{50}). Dose-response curves were compared by one-way analysis of variance (ANOVA). The Student-Newman-Keuls was used at the post-hoc test. Paired observations were compared with the Student's t test. A p value < 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Histological Studies

On the first postoperative day, focal ischemic necrosis consisting mainly of areas of contraction band necrosis were found in some allografted hearts. Rare perivascular lymphocytes were also observed in some allografts. After 5 days, all the allografts showed a grade IV/IV rejection according to the International Society for Heart and Lung Transplantation classification, consisting of diffuse polymorphous cellular infiltration, cellular edema, hemorrhage, and myocyte necrosis.

Immunohistochemical Studies

Immunohistochemistry studies showed preserved endothelium with a lining expression of vonWillebrand factor in the three groups (Figure 1). In all groups, constitutive nitric oxide synthase was expressed on endothelial cells (Figure 2). Inducible nitric oxide synthase was not expressed in the control group. However, on day 1 and 5 post-transplant inducible nitric oxide synthase was observed in the intima of the coronary arteries (Figure 3).

In Vitro Studies

Constitutive Nitric Oxide Synthase

Relaxation to acetylcholine was maintained 1 and 5 days after transplantation (Tables I and II). Similarly, there was no significant difference in relaxations to the calcium ionophore A23187 between the control group and the allografts 1 and 5 days after surgery (Tables I and II).

Endothelium-Independent Relaxations

There were no significant differences in maximal relaxations and EC_{50} to the nitric oxide analogue sodium nitroprussiate between the three groups (Tables I and II).

Contractions

There were no significant differences in maximal contractions to KCl between the control group and the allografted hearts at days 1 and 5. Similarly, maximal contractions to prostaglandin F_{2V} were comparable in the three groups (Table III).

Inducible Nitric Oxide Synthase

There were no significant changes of the submaximal contractions to prostaglandin F_{2V} after addition of increasing concentrations of aminoguanidine in rings with and without endothelium from allografts 1 and 5 days after transplantation (data not shown).

In rings with endothelium, relaxations to L-arginine were increased 1 day after transplantation compared with the two other groups (Figure 4). Relaxations to L-arginine on day 5 were not statistically different from those in the control group. No significant differences between the three groups were found in rings without endothelium. Preincubation with aminoguanidine $300 \mu\text{mol/L}$ 30 minutes before the addition of L-arginine reduced significantly maximal relaxations and shifted significantly to the right concentration-response curve on day 1 (Figure 5, Table IV). There were no significant change in maximal relaxations and EC_{50} to L-arginine after incubation with aminoguanidine 5 days after surgery (Table IV).

Discussion

The donor vascular endothelium is the first biological barrier between the grafted organ and the recipient's blood. After reperfusion of the allografted organ, expression of adhesion molecules on the surface of the endothelial cells can lead to leukocyte adhesion that results in an inflammatory process. The recognition of genetically different molecules encoded by the MHC and expressed on different cell types in the allograft can activate recipient T lymphocytes which initiate the rejection process.² The structural and functional integrity of the donor vascular endothelium can be modified by these two inflammatory responses.

Our results show that in a canine model of heterotopic heart transplantation with a short period of cold ischemia, allografted hearts demonstrated only rare areas of ischemic injury 24 hours after transplantation and reached 5 days after surgery severe cellular rejection, consisting of diffuse polymorphous cellular infiltration, edema, hemorrhage, and myocyte necrosis.

The major findings of this study are the unaltered expression of the constitutive endothelial nitric oxide synthase both after ischemia-reperfusion and after acute untreated heart rejection and the appearance of an endothelial inducible nitric oxide synthase after 24 hours of reperfusion and after 5 days of acute untreated rejection. In vitro studies confirmed the unaffected activity of the constitutive nitric oxide synthase on day 1 and 5 but the inducible nitric oxide synthase was only active on day 1 post-transplant. The contractile and relaxation functions of the vascular smooth muscle were also maintained both 1 and 5 days after transplantation.

Endothelium-dependent relaxations after ischemia and reperfusion

The in vitro activity of the constitutive endothelial NO synthase was evaluated with two mediators which raise the intracellular calcium concentration: acetylcholine, a receptor-dependent agonist, and the calcium ionophore A23187, a receptor-independent agonist.²⁴ The conclusion that the capacity of the endothelial cells to produce the endothelium-derived relaxing factor nitric oxide is maintained after cold crystalloid hyperkalemic cardioplegia, cold ischemia of <60 minutes and 24 hours of reperfusion is based on the similar concentration-response curves to acetylcholine and the calcium ionophore A23187 between the control hearts and the allografts on day 1. However, our results cannot exclude an early and transient endothelial constitutive nitric oxide synthase dysfunction that subsequently recovers in the first 24 hours of reperfusion. Moreover, the effect of the endothelium-derived hyperpolarizing factor was not specifically studied, and the contribution of this enzyme to the endothelial relaxation after ischemia-reperfusion and in acute rejection remains to be determined. Coronary artery reactivity after regional or global ischemia with or without cardioplegic arrest and reperfusion of different duration has been extensively studied. In a regional model of ischemia and reperfusion,⁸ it was shown that after 60 minutes of warm ischemia followed by 60 minutes of reperfusion, coronary arteries exhibited impaired relaxations to acetylcholine and the calcium ionophore A23187 in addition to platelet-derived agonists serotonin and ADP. However, after 12 weeks of reperfusion, coronary arteries exhibited selective impairment of endothelium-dependent relaxations evoked by platelet-derived agonists but a preserved response to acetylcholine.⁹ Another study using a different model of regional ischemia of 60 minutes followed by progressive reperfusion of 60 minutes or 4 weeks demonstrated both initially and lately the integrity of the relaxations to acetylcholine and the calcium ionophore A23187.¹⁰ Recently, in a dog model of global ischemia with cold crystalloid or warm blood cardioplegia, it

was shown that after 120 minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion, endothelium-dependent relaxations to the calcium ionophore A23187 were maintained in the two cardioplegic solution groups, with an impairment in receptor-mediated release of EDRF and a G-protein signaling pathway dysfunction.⁷

Endothelium-dependent relaxations in acute untreated rejection

After 5 days, when all the allografts had reached high grade acute cellular rejection, endothelium-dependent relaxations to acetylcholine and the calcium ionophore A23187 were maintained. These results suggest that in the early stage of severe acute rejection, the ability of the coronary artery endothelium to produce nitric oxide is not affected. Previous work from our laboratory has shown that acute untreated heart rejection for 7 days in a similar canine heterotopic cardiac transplantation model alters coronary artery reactivity through receptor-specific mechanisms, mainly thrombin and serotonin, with a preserved response to acetylcholine and ADP and an unchanged vascular smooth muscle cells response.^{3,4} Moreover, treatment of rejection with cyclosporin A did not reduce the endothelial dysfunction but even potentiated the endothelium-dependent relaxations to serotonin.⁴ Similarly, in a swine model of heterotopic heart transplantation, it was demonstrated that the early endothelial dysfunction associated with acute rejection and accelerated atherosclerosis involved abnormal Gi-protein function and a preserved endothelial nitric oxide synthase activity. It was only after 14 days of acute untreated rejection that the endothelium-dependent relaxations to the calcium ionophore A23187 were reduced.⁵ Recently, in a canine model of single lung allograft acute rejection, a preserved response to the calcium ionophore A23187 was shown associated with a receptor-specific dysfunction implicating mainly bradykinin and histamine and this dysfunction

was abolished with treatment of rejection.²⁵ This integrity of the endothelial constitutive nitric oxide synthase is also seen in animal models of atherosclerosis where the endothelial dysfunction seems to involve initially only pertussis toxin-sensitive G-protein-dependent signaling pathways with a preservation of the endothelial cells capacity to produce NO.²⁶

Endothelium-independent relaxations and contractions

The preserved relaxations to sodium nitroprussiate both after ischemia and reperfusion and in acute rejection reflect an intact cyclic guanosine monophosphate pathway in the vascular smooth muscle cells.²⁴ Also, the preservation of the contractile responses of the vascular smooth muscle cells to the agonists potassium chloride and prostaglandin F_{2α} suggests that at this early stage of acute rejection, the coronary vascular smooth muscle cells are not yet affected by the inflammatory process.

Vascular reactivity to L-arginine and aminoguanidine

The amino acid L-arginine is the substrate of the different isoforms of nitric oxide synthase and the precursor of the EDRF-nitric oxide.¹¹ The constitutive isoform of nitric oxide synthase, coupled to calmoduline, is dependent on the intracellular calcium concentration to produce nitric oxide. Cytokines have been shown to induce in different cell types, including smooth muscle cells and endothelial cells,^{16,31} an inducible nitric oxide synthase, capable of producing large amount of NO independently of the intracellular concentration of calcium with the presence of sufficient amount of its substrate, L-arginine.¹⁷ This large amount of NO can have cytotoxic activity, through inhibition of key enzymes of the respiratory cycle and of the synthesis of DNA and through formation of highly reactive free radicals, as peroxynitrite.¹⁷ The different isoforms

of nitric oxide synthase can be inhibited both in vitro and in vivo, with nonspecific molecules as N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA)¹¹ or specific inhibitors of the iNOS isoform, such as aminoguanidine.²⁷

In this study, concentration-response curves to L-arginine of coronary artery rings denuded from their endothelium were not different between the control group and the allografts 1 and 5 days after transplantation, suggesting the absence of an inducible nitric oxide synthase in the coronary artery vascular smooth muscle cells²⁸ of the allografts. However, in intact coronary artery rings, L-arginine induced higher maximal relaxations in the allografts on day 1 than in the two other groups, and this effect was significantly reduced by the presence of the specific iNOS-inhibitor aminoguanidine. This inhibition was not reproducible in allografts 5 days after transplantation. Furthermore, this effect of L-arginine on coronary arteries of allografts on days 1 and 5 was completely abolished after incubation with N^G -monomethyl-L-arginine (unpublished observation), suggesting a nitric oxide-dependent effect. However, exposition of coronary artery rings to cumulative doses of aminoguanidine failed to modify submaximal contractions to prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the three study groups. Moreover, vascular smooth muscle cells contractility was not decreased in the allografts compared with the control hearts, suggesting the lack of a major inhibitory effect of nitric oxide on vascular contractions. However, immunohistochemical studies revealed the presence of an inducible nitric oxide synthase in the intima of the coronary arteries of allografts after 24 hours of reperfusion and after 5 days of acute untreated rejection. Together, these findings suggest that an inducible nitric oxide synthase was present in the intima of the coronary arteries both after ischemia-reperfusion and in acute rejection but the in vitro activity was only evident on day 1 post-transplant and in the presence of exogenous L-arginine. This effect seemed to disappear on day 5 even in the presence of severe

rejection. Moreover, the in vitro activity of the inducible nitric oxide synthase was weak, as evidenced by the unaffected vascular contractions. Also, the presence of inflammatory cells in the intima of the coronary arteries, such as leukocytes and macrophages, with their capacity to express the inducible nitric oxide synthase, might explain the results obtained in vitro.

There is experimental evidence that induction of inducible nitric oxide synthase occurs during ischemia-reperfusion, acute and chronic allograft rejection in animal models and in human.^{15-16,20} Its presence in cardiac allograft rejection has been linked to left ventricular contractile dysfunction²⁰ and apoptosis of cardiac myocytes,¹⁸ mainly through formation of highly reactive free radicals as peroxynitrite. Its inhibition with specific iNOS inhibitors can attenuate cardiac allograft rejection,²⁹⁻³⁰ prevent allograft contractile dysfunction and diminish endothelial barrier dysfunction in the rat.^{19,30} However, in vitro demonstration of inducible nitric oxide synthase activity in swine models of acute allograft rejection and septic shock is difficult.^{5,31}

The preservation of the capacity of the coronary endothelium to produce EDRF-NO and the early appearance of an iNOS in this canine heterotopic cardiac transplantation model is an indication that the endothelium might be more resistant to an acute immunologic aggression as we previously suggested,^{3,4}. The endothelial dysfunction associated with peritransplant injury and acute rejection in the dog could be localized at specific surface receptors or in intracellular signaling pathways.^{3,25} The clinical significance of these results and their implication in the development of cardiac allograft vasculopathy remain to be defined.

Some limitations are inherent to this experimental protocol. First, the heterotopic nonworking heart model is different than the orthotopic allograft with different hemodynamic conditions. Coronary arterial flow in this model, which produces an unloaded left ventricle, does not reproduce the orthotopic setting and could modulate the endothelial function, sensitive to change

in shear stress. Short ischemic times and the cardioplegic and preservation solutions used do not reproduce perfectly the conditions used in the clinical situation. More relevant ischemic times and different preservation conditions may have modified the results of this study. No immunosuppressive drugs were used in this protocol to avoid the possible interactions on endothelial reactivity. Finally, the immunology of rejection in the dog, which does not have ABO antigens and has a different major histocompatibility complex than the human, may be different than the acute untreated rejection process observed in the human transplant recipient.

In conclusion, in the canine heterotopic cervical heart transplantation model, neither ischemia and reperfusion nor acute untreated allograft rejection affected the coronary artery endothelial capacity to produce nitric oxide or the vascular smooth muscle cells function. An endothelial inducible nitric oxide synthase was expressed both on days 1 and 5 post-transplant but in vitro activity was only evident on day 1.

REFERENCES

1. Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR. Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments and future directions. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:9-23.
2. Duquesnoy RJ, Demetris AJ. Immunopathology of cardiac transplant rejection. *Curr Opin Cardiol* 1995;10:193-206.
3. Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, Carrier M, Leung TK. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:404-8.
4. Bouchard D, Despatis MA, Buluran J, Cartier R. Vascular effects of cyclosporin A and acute rejection on coronary artery reactivity in a canine model of heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1325-30.
5. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, et al. Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997;16:643-57.
6. Gohra H, McDonald TO, Verrier ED, Aziz S. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant atherosclerosis. *Transplantation* 1995;60:96-102.
7. Chang CH, Lin PJ, Chu Y, Lee YS. Impaired endothelium-dependent relaxation after cardiac global ischemia and reperfusion: role of warm blood cardioplegia. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:681-7.
8. Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine arteries. *Circ Res* 1990;67:385-93.

9. Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 1990;81:1921-7.
10. Lee JJ, Olmos L, Vanhoutte PM. Recovery of endothelium-dependent relaxations four weeks after ischemia and progressive reperfusion in canine coronary artery. *Proc Ass Am Physicians* 1996;108:362-7.
11. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
12. Fish RD, Nabel EG, Selwyn AP, et al. Responses of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine. *J Clin Invest* 1988;81:21-31.
13. Ryan TJ, Vekshein VI, Yeung AC, et al. Recovery of endothelial function in coronary arteries early after cardiac transplantation (Abstract). *Circulation* 1990;82(suppl III):III-256.
14. Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, et al. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year post-transplant. *Circulation* 1996;93:457-62.
15. Akyurek LM, Fellstrom BC, Yan ZQ, Hansson GK, Fura K, Larsson E. Inducible and endothelial nitric oxide synthase expression during development of transplant arteriosclerosis in rat aortic grafts. *Am J Pathol* 1996;149:1981-90.
16. Kuo PC, Alfrey EJ, Krieger NR, Abe KY, Huie P, Sibley RK. Differential localization of allograft nitric oxide synthesis: comparison of liver and heart transplantation in the rat model. *Immunology* 1996;87:647-53.

17. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145:201-27.
18. Szabolcs M, Michler RE, Yang X, et al. Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. *Circulation* 1996;94:1665-73.
19. Worrall NK, Chang K, Suau GM, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents myocardial and systemic vascular barrier dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Circ Res* 1996;78:769-79.
20. Lewis NP, Tsao PS, Rickenbacher PR, et al. Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle. *Circulation* 1996;93:720-9.
21. Narrod J, Kormos R, Armitage J, et al. Acute rejection and coronary artery disease in long-term survivors of heart transplantation. *J Heart Transplant* 1989;8:418-21.
22. Nakawaga T, Sukhova GK, Rabkin E, Winters GL, Schoen FJ, Libby P. Acute rejection accelerates graft coronary disease in transplanted rabbit hearts. *Circulation* 1995;92:987-93.
23. Gaudin PB, Rayburn BK, Hutchins GM, et al. Peri-transplant injury in the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1994;18:338-46.
24. Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Progr Cardiovasc Dis* 1996;39:229-38.
25. Aarnio P, Schersten H, Tazelaar HD, Miller VM, McGregor CGA. Effects of acute rejection and antirejection therapy on arteries and veins from canine single lung allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:1219-29.

26. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991;83:652-60.
27. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharm* 1993;233:119-25.
28. Shibano T, Vanhoutte PM. Induction of NO production by TNF- α and lipopolysaccharide in porcine coronary arteries without endothelium. *Am J Physiol* 1993;264:H403-7.
29. Worrall NK, Misko TP, Sullivan PM, Hui JJ, Ferguson TB. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates established acute cardiac allograft rejection. *Ann Thorac Surg* 1996;62:378-85.
30. Worrall NK, Lazenby WD, Misko TP, et al. Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995;181:63-70.
31. Lamas S, Michel T, Brenner BM, Marsden PA. Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF- α . *Am J Physiol* 1991;261:C634-41.
32. Chan SY, Kobashigawa J, Stevenson LW, Brownfield E, Brunken RC, Schelbert HR. Myocardial blood flow at rest and during pharmacological vasodilation in cardiac transplants during and after successful treatment of rejection. *Circulation* 1994;90:204-12.
33. Mugge A, Brandes RP, Heublein B, Nolte C, Howerich A, Lichtlen PR. Endothelial dysfunction in heart transplanted patients with graft vasculopathy. *Eur Heart J* 1995;16(suppl J):78-83

34. Kobashigawa JA, Miller L, Yeung A. Does acute rejection correlate with the development of transplant coronary disease? A multicenter study using intravascular ultrasound. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:S221-6.
35. Day JA, Rayburn BK, Gaudin PB, et al. Cardiac allograft vasculopathy: the central role of ischemia-induced endothelial cell injury. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:S142-9.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1** Immunoperoxidase staining for vonWillebrand factor (vWF) of coronary arteries from control heart (A), allograft on day 1 (B) and allograft on day 5 [lower panels, with (C) and without primary antibody (D)] showing preserved endothelial cells (original magnification: 1000X).
- Figure 2** Immunoperoxidase staining for endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS) of coronary arteries from control heart (A), allograft on day 1 (B) and allograft on day 5 [lower panels, with (C) and without primary antibody (D)] showing endothelial expression of ecNOS (original magnification: 1000X).
- Figure 3** Immunoperoxidase staining for inducible nitric oxide synthase (iNOS) of coronary arteries from control heart (A), allograft on day 1 (B) and allograft on day 5 [lower panels, with(C) and without primary antibody (D)] showing intimal expression of iNOS (original magnification: 1000X).
- Figure 4** Concentration-response curves showing endothelium-dependent relaxations of coronary arteries to L-arginine (L-arg) in control hearts and in allografts 1 day and 5 days after transplantation. A significant increased response is observed on day 1.
- Figure 5** Concentration-response curves showing endothelium-dependent relaxations of coronary arteries to L-arginine (L-arg) in allografts on day 1 post-transplant before and after incubation with aminoguanidine (pre- and

post-AMG). Pre-incubation with aminoguanidine reduced significantly responses to L-arginine.

TABLE I EC_{50} values for acetylcholine (ACh), calcium ionophore A23187 (A23187) and sodium nitroprussiate (SNP) in control and allograft coronary arteries at day 1 and 5 after transplantation

Agonist	Control	Day 1	Day 5	<i>p</i> Value
Ach	-7.65 ± 0.10	-7.65 ± 0.16	-7.68 ± 0.11	0.98
A23187	-6.21 ± 0.07	-6.04 ± 0.12	-6.23 ± 0.03	0.17
SNP	-8.03 ± 0.07	-7.75 ± 0.17	-7.72 ± 0.08	0.15

EC_{50} , logarithm of the effective molar concentration of agonist that causes 50% of maximal relaxation; *Ach*, acetylcholine; *SNP*, sodium nitroprussiate.

TABLE II E_{max} (%) values for acetylcholine (ACh), calcium ionophore A23187 (A23187) and sodium nitroprussiate (SNP) in control and allograft coronary arteries at day 1 and 5 after transplantation

Agonist	Control	Day 1	Day 5	<i>p</i> Value
Ach	99.7 ± 0.3	99.5 ± 0.5	97.0 ± 3.0	0.49
A23187	100	100	100	0.99
SNP	100	100	100	0.99

E_{max} , maximal relaxation expressed as the % of initial precontraction with prostaglandin $F_{2\alpha}$.

TABLE III Maximal contractions (g) to potassium chloride (KCl) and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) of control and allograft coronary arteries at Day 1 and 5 after transplantation

Agonist	Control	Day 1	Day 5	<i>p</i> Value
KCl	12.2 ± 1.3	9.2 ± 0.8	10.0 ± 1.1	0.18
PGF _{2α}	9.7 ± 0.9	8.2 ± 0.5	8.4 ± 0.7	0.29

TABLE IV EC_{50} and E_{max} values for L-arginine (L-arg) before and after incubation with aminoguanidine (AMG) in allograft coronary arteries at Day 1 and 5 after transplantation

	Before AMG	AMG 300 μ M	<i>p</i> Value
Day 1			
EC_{50}	-5.02 ± 0.19	-4.51 ± 0.32	0.03
E_{max}	52.9 ± 5.0	30.0 ± 10.7	0.05
Day 5			
EC_{50}	-5.02 ± 0.25	-4.93 ± 0.06	0.73
E_{max}	22.5 ± 4.6	31.9 ± 7.4	0.23

EC_{50} , logarithm of the effective molar concentration of agonist that causes 50% of maximal relaxation; E_{max} , maximal relaxation expressed as the % of initial precontraction with prostaglandin $F_{2\alpha}$

A



B



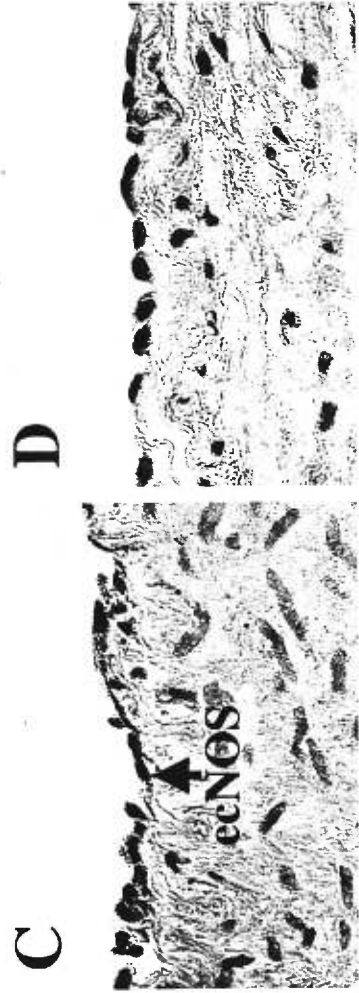
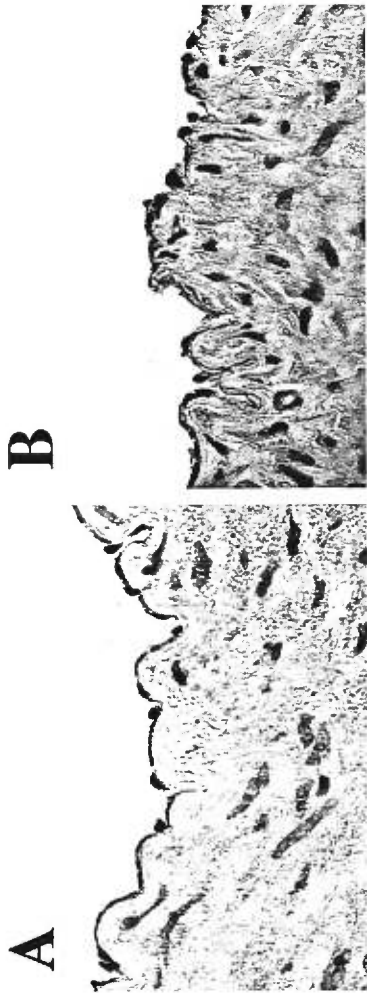
C



D



WF



A



B



C



D



↑
iNOS

Figure 4

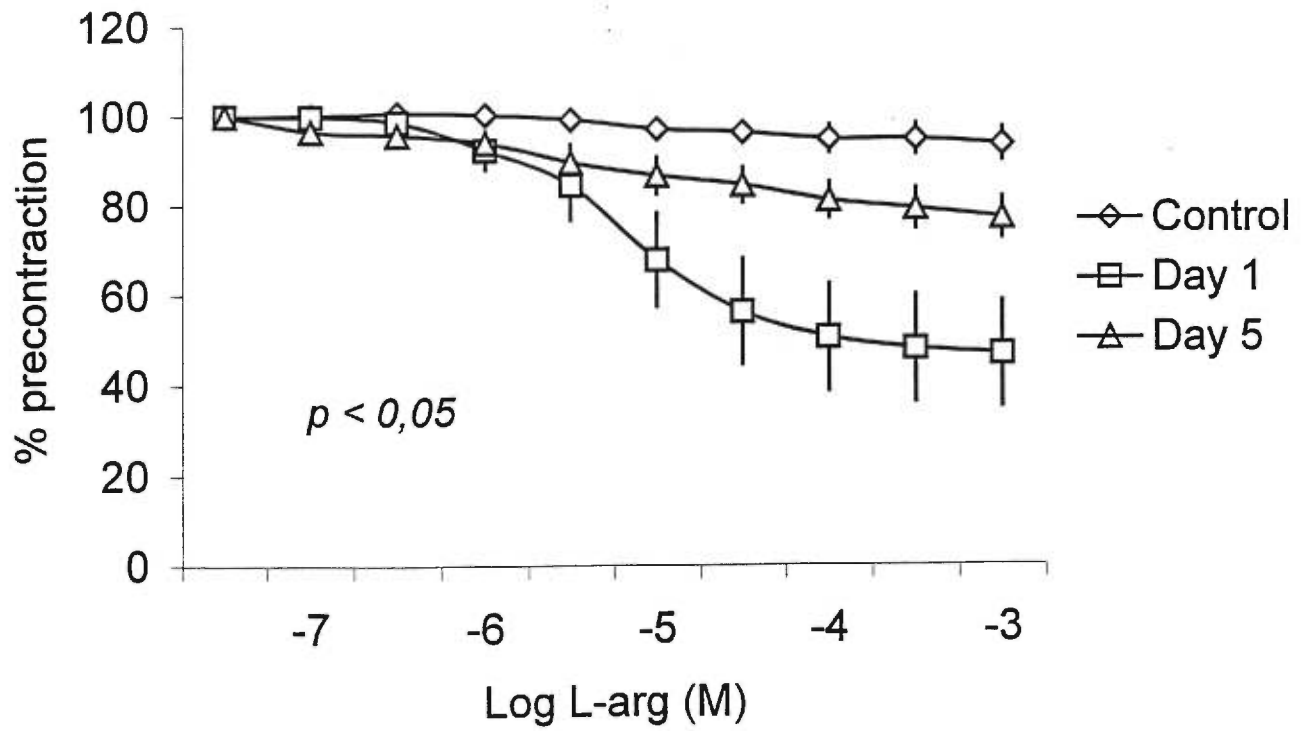
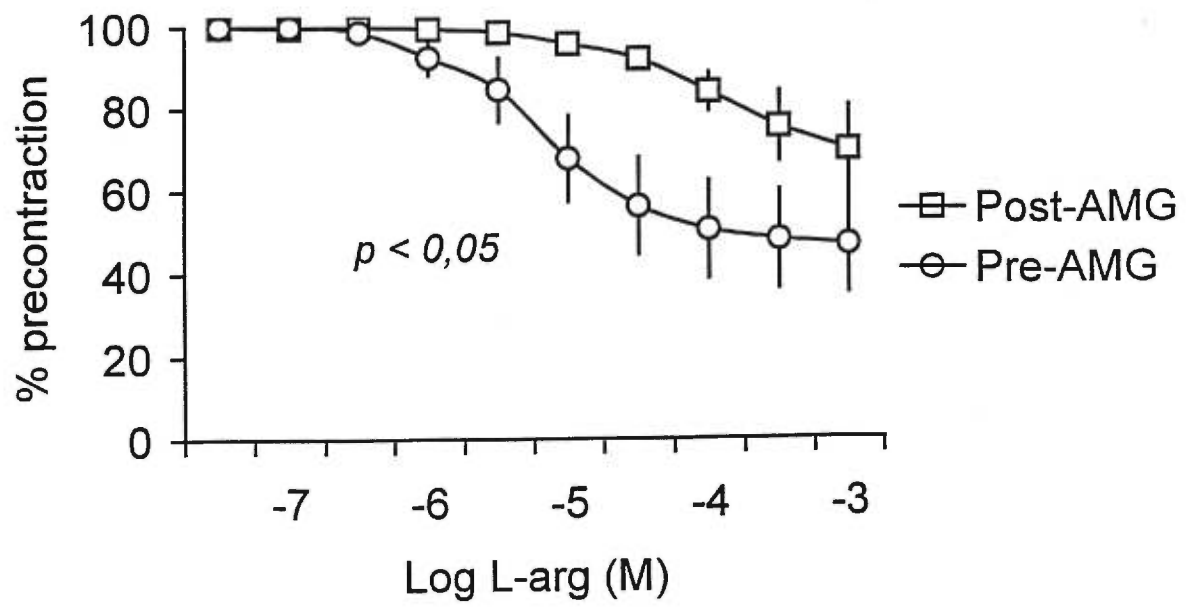


Figure 5



**CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AFTER
ISCHEMIA-REPERFUSION AND ACUTE UNTREATED
REJECTION IN A CANINE HETEROTOPIC
HEART TRANSPLANTATION MODEL**

ABSTRACT

Background. Acute rejection is a common problem in heart transplantation and may contribute to the development of cardiac allograft vasculopathy. This study was designed to evaluate the mechanisms of coronary endothelial dysfunction associated with ischemia-reperfusion and acute untreated rejection.

Methods. Two groups of mongrel dogs (n=7 per group) underwent heterotopic cervical heart transplantation without immunosuppression. Allografts were harvested on post-transplant day 1 (group 1) and day 5 (group 2). A third group of unoperated dogs served as control (group 3). After harvesting, epicardial coronary arteries were studied in organ chamber for endothelium-dependent and independent reactivity.

Results. Group 1 displayed multifocal ischemic damage without any rejection while hearts from group 2 reached grade IV rejection. Immunohistochemical studies for von Willebrand factor showed expression on coronary endothelial cells in all animals. Endothelium-dependent responses to acetylcholine, calcium ionophore A23147 and bradykinin were unaffected in groups 1 and 2. Endothelial relaxations to sodium fluoride was significantly reduced in group 1 and significantly increased in group 2 compared to control. Responses to serotonin and UK14304 were significantly increased in group 2. Endothelium-dependent relaxations to thrombin were decreased in groups 1 and 2. Endothelium-independent responses were unaffected.

Conclusions. The early (24 hr) endothelial dysfunction is specific to the thrombin receptor and the G-protein signaling pathways. Acute untreated rejection did not modify the alteration in endothelial reactivity to thrombin but enhanced the sensibility of the Gi-protein signaling pathway.

INTRODUCTION

Cardiac allograft vasculopathy remains the major cause of late death after heart transplantation (1). The pathogenesis of this accelerated coronary atherosclerosis syndrome is not completely understood but different etiologic factors have been proposed (1, 2). Acute rejection, resulting from allorecognition of distinct peptides between the major histocompatibility complex (MHC) of the donor and recipient (2), produces tissue damage, affecting mainly myocytes and endothelial cells (2-6). Cold ischemia and reperfusion at the time of allograft implantation have also been shown to produce endothelial injury and vascular dysfunction (6-10). The vascular endothelium is an important regulator of local vascular tone and has antithrombotic and antiproliferative properties, mainly due to the release of the endothelium-derived relaxing factor-nitric oxide (NO) (11). In animal model of acute allograft rejection as in human transplant recipients, coronary endothelial dysfunction has been demonstrated to occur early on (3-5, 12-14). This dysfunction involves the intracellular signaling pathways leading to NO release but also NO generation directly. In the endothelial cell, NO production relies on availability of the amino acid L-arginine, the enzyme constitutive NO synthase (ecNOS), and the intracellular concentration of calcium. Various endothelial second messengers, as G-proteins and phospholipases are known to couple membrane receptors to intracellular enzymes (11). Alteration in endothelial G-protein pathway is an early important event leading to atherosclerosis (15) and could also be associated with cardiac allograft vasculopathy. The contribution of the acute rejection process to the development of coronary

allograft vasculopathy has not been defined yet, but experimental and clinical data suggest a link between them (16-17).

This study was designed to evaluate the effects of ischemia-reperfusion and acute untreated rejection on in vitro endothelial constitutive nitric oxide synthase activity and intracellular G-proteins signaling pathways in a canine heterotopic heart transplantation model.

MATERIAL AND METHODS

Animal care. Experiments were performed with heartworm-free mongrel dogs of either sex (donors: body weight 12 to 18 kg; recipients: body weight 25 to 35 kg). All animals were cared for in compliance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published by the National Institute of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1985). All procedures used in this study were approved by the Montreal Heart Institute ethical committee on animal care.

Heterotopic heart transplantation technique. Donors and recipients were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg i.v.). After orotracheal intubation with a cuffed tube, ventilatory support (tidal volume: 15 ml/kg; 12 to 15 cycles/min) was established with a Harvard ventilator with oxygen supplementation. Venous access was obtained through the saphenous vein for blood samples and volume replacement.

Donor. After median sternotomy and pericardial incision, the heart was prepared with suture control without ligation of the superior and inferior vena cavae and the azygos vein. After systemic administration of heparin (2 mg/kg i.v.), the distal innominate artery was clamped and the proximal portion was cannulated with a catheter positioned in the ascending aorta for cardioplegic solution perfusion. Then, the aortic arch between the innominate artery and the left common carotid artery was clamped, rapid diastolic arrest was achieved with the administration of cold (4°C) crystalloid cardioplegic solution (Na^+ 130 mmol/L; Cl^- 129 mmol/L; K^+ 24 mmol/L; Ca^{++} 1.5 mmol/L; lactate 28 mmol/L). Following cardiac arrest, both vena cavae and the azygos vein were ligated and the heart was vented by incision of the left atrial appendage. After excision of the donor heart, the interatrial septum was removed and the chordae tendinae of the

mitral valve were divided before ligation of the pulmonary veins. The heart was then preserved in a cold (4°C) crystalloid solution before implantation.

Recipient. After a left cervical incision, the left external jugular vein and the left common carotid artery were exposed. After systemic administration of heparin (0.2 mg/kg i.v.), the carotid artery was cross-clamped and an end-to-side anastomosis was performed between the donor ascending aorta and the recipient carotid artery with a continuous running suture of 5-0 polypropylene. The jugular vein was then controlled with another vascular clamp and an end-to-side anastomosis of the donor main pulmonary artery and the recipient jugular vein were performed with a continuous running suture of 7-0 polypropylene. After reperfusion (cold ischemic time of 45 to 60 min), de-airing was performed by the left atrial decompression before ligation of the left atrial appendage incision, and sinus rhythm was reestablished with direct defibrillation (10 to 20 Joules) as needed. Meticulous hemostasis was achieved and a subcutaneous pocket was dissected to place the allograft. The wound was then closed in two layers using nonabsorbable sutures.

Postoperative. Care After extubation, the animals were left to recover in a temperature-controlled room and their diet resumed with standard dog chow ad libitum. Antibiotic prophylaxis was provided with oral administration of amoxicillin for 2 days. Daily examination by palpation of the grafted heart was performed until the animal sacrifice.

Experimental groups. In the first group (n=7), the animals underwent heterotopic heart transplantation without immunosuppression and were sacrificed after 24 hr to evaluate the effects of cold ischemia and reperfusion. In the second group (n=7), the animals underwent heterotopic

heart transplantation without immunosuppression and were sacrificed after 5 days to study the effects of acute graft rejection. A group of unoperated dogs (n=7) was used as control group.

At the end of the experiment, transplanted animals were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg i.v.) and ventilatory support was established as described above. Through the cervical incision the grafted heart was dissected free, explanted and placed in a cold (4°C) Krebs-Ringer solution (mmol/L): NaCl 118.3; KCl 4.7; MgSO₄ 1.2; K₂PO₄ 1.22; CaCl₂ 1.3; NaHCO₃ 25; and dextrose 15. In the control dogs, after anesthesia and establishment of ventilatory support as described above, the hearts were explanted without cardioplegic arrest through a left thoracotomy and rapidly placed in a cold Krebs-Ringer solution.

Vascular reactivity. The circumflex and left anterior descending arteries were dissected free from the epicardium, myocardium and the adventitial tissue. The arteries were then divided in 4 to 5 mm ring segments. In some rings, the endothelium was removed by gently rubbing the luminal surface of the vessel with a watchmaker's forceps. The segments were suspended in organ chamber (25 ml) filled with Krebs-Ringer solution at 37°C and aerated with a gas mixture of 95% O₂/5% CO₂. The rings were suspended between two stainless steel stirrups, one anchored to the bottom of the organ chamber and the other connected to a strain gauge for measurement of isometric tension with a Gould transducer. All studies were performed in the presence of indomethacin (10⁻⁵ mol/L) to prevent synthesis of endogenous prostanoids. The rings were progressively stretched to their optimal length-tension ratio (8 to 10 g) as determined by measuring contraction to potassium chloride 30 mmol/L at different levels of stretching. In all experiments, the presence or absence of endothelium was confirmed by determination of the

response to acetylcholine (10^{-6} mol/L). After washing, the vessels were allowed to stabilize for 40 min.

The endothelium-dependent and independent relaxations were studied after precontraction with prostaglandin $F_{2\alpha}$ (2×10^{-6} mol/L) to achieve a contraction averaging 50 to 80% of the maximal contraction. Responses to the calcium ionophore A23187 (10^{-9} to 10^{-5} mol/L), a receptor-independent agonist, were compared between the three groups to evaluate the endothelial constitutive NO synthase in vitro activity. Responses to serotonin (5-HT, 10^{-9} to 10^{-4} mol/L) in the presence of ketanserin (10^{-6} mol/L) incubated 40 min before the addition of serotonin to block 5-HT₂ receptors, UK14304 (10^{-9} to 10^{-5} mol/L) an α_2 -adrenergic agonist, thrombin (10^{-3} to 1 international units/mL), sodium fluoride (NaF: 0.5 to 9.5 mmol/L) and aluminium chloride (10^{-5} mol/L), a direct activator of endothelial G-protein, acetylcholine (10^{-9} to 10^{-4} mol/L) and bradykinin (10^{-10} to 10^{-7} mol/L) were compared between the three groups to evaluate the intracellular G-proteins signaling pathways.

Endothelium-independent responses were studied in rings without endothelium by analyzing contractile responses to KCl (5 to 60 mmol/L) and prostaglandin $F_{2\alpha}$ (10^{-9} to 10^{-6} mol/L) and relaxation to sodium nitroprussiate (10^{-9} to 10^{-4} mol/L; a NO donor).

All drugs were given in a standard order for the three groups. The concentrations used always represent the final concentration obtained in organ chambers containing 25 ml of Krebs-Ringer's solution.

Histologic and immunohistochemical studies. Segments from the circumflex artery and myocardium sample from the right and left ventricles were fixed in 10% formalin PBS-buffered

solution and embedded in paraffin. Hematoxylin-eosin staining was performed and the myocardial specimens were evaluated by a cardiovascular pathologist for ischemic damage and rejection grade according to the International Society for Heart and Lung Transplantation classification. Immunohistochemistry on the vessel segments was performed with immunoperoxidase technique using a monoclonal anti-von Willebrand factor (vWF) antibody recognizing the canine isoform (Vector Laboratories, Burlingame, CA). After deparaffinization, tissue rehydration, and blockade of endogenous peroxidase activity, the primary antibody was applied for 60 min with 1% goat serum in phosphate-buffered saline as diluent. An equivalent concentration of nonspecific mouse IgG (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, CA) was used as control. Then, a secondary biotinylated goat anti-mouse antibody (Vector Laboratories) was applied for 60 min. Peroxidase labeling was achieved using avidin peroxidase complex (Vector Laboratories) and antibody visualization was established after a 5-minute exposure to 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) in 0.05 mmol/L Tris-HCl at pH 7.6 with 0.003% hydrogen peroxide. The vessels were counterstained by immersion in Mayer's hematoxylin solution. vWF expression (brown staining) was evaluated for each segment by using a dedicated 3CCD video microscope adapted to customized software.

Drugs. All solutions were prepared daily with nanopure water except indomethacin, which was initially dissolved in NaCO_3 (10^{-5} mol/L), then in nanopure water and the calcium ionophore A23187 and UK14304 which were initially dissolved in dimethyl sulfoxide (1%) and then in water. Acetylcholine, the calcium ionophore A23187, serotonin, ketanserin, UK14304,

thrombin, sodium fluoride, aluminium chloride, bradykinine, prostaglandin $F_{2\alpha}$, sodium nitroprussiate and indomethacin were all purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

Statistical analysis. All the results are expressed as mean and standard error of the mean (mean \pm SEM). In all experiments, "n" refers to the number of animals studied. The vasorelaxation response obtained from segments precontracted with $PGF_{2\alpha}$ expressed as the maximal relaxation obtained (E_{max}) and the logarithm of the effective concentration of the agonist causing 50% of the maximal response (EC_{50}). Dose-response curves were compared by one-way analysis of variance (ANOVA). The Student-Newman-Keuls test was used as the post-hoc test. A P value ≤ 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Histologic studies. On the first postoperative day, focal ischemic necrosis and rare perivascular lymphocytes were found in allografted hearts. After 5 days, all the allografts showed a grade 4/4 rejection according to the International Society for Heart and Lung Transplantation classification, consisting of diffuse polymorphous cellular infiltration, edema, hemorrhage, and myocyte necrosis.

Immunohistochemical studies. Immunoperoxidase studies showed preserved endothelium lining expressing vWF in the three groups.

In vitro studies. Endothelial-dependent relaxations. There was no significant difference in relaxations to the calcium ionophore A23187 between the control group and the allografts 1 and 5 days after surgery (Tables 1 and 2). Relaxations to acetylcholine and bradykinin were also maintained in allografts 1 and 5 days after the transplantation compared with the control group (Tables 1 and 2).

No difference in the relaxations to serotonin and to UK14304 was seen between the allografts on day 1 and the control animals. However, 5 days after the transplantation, the endothelium-dependent relaxations to serotonin and to UK14304 were enhanced compared to the control group, with a significant leftward shift in the concentration-response curves of both agonists and an increased maximal relaxation to UK14304 (Figs. 1 and 2; Tables 1 and 2). Relaxations to sodium fluoride were significantly decreased with a rightward shift of the concentration-response curve in allografts on day 1 compared with the control group (Fig. 3). On day 5, however, maximal relaxations to sodium fluoride were comparable to the control

group but the concentration-response curve was significantly shifted to the left (Fig. 3). Concentration-response curves to thrombin were significantly shifted to the right on day 1 (but not on day 5) after the transplantation compared with controls (Fig. 4; Tables 1 and 2).

Endothelium-independent relaxations. No statistical difference was observed between the three groups in dose-response curves to serotonin on rings without endothelium (data not shown). There were no significant differences in maximal relaxations and EC_{50} to the NO analogue sodium nitroprussiate between the three groups (Tables 1 and 2).

Endothelium-independent contractions. There were no significant differences in maximal contractions to potassium chloride between the control group and the allografted hearts at days 1 and 5. Similarly, maximal contractions to prostaglandin $F_{2\alpha}$ were comparable in the three groups (Table 3).

DISCUSSION

After reperfusion of the allografted organ, expression of adhesion molecules on the surface of the endothelial cells leads to leukocyte adhesion and activation of the inflammatory cascade. The recognition of genetically different molecules encoded by the MHC and expressed on different cell types in the allograft can activate recipient T lymphocytes which initiate the rejection process (2). The structural and functional integrity of the vascular endothelium can be modified by these two inflammatory responses.

Our results show that, in our model, allografted hearts demonstrated only scattered areas of ischemic injury 24 hr after transplantation whereas 5 days after surgery, a severe cellular rejection was evident. Immunohistochemistry studies identified the presence of vWF on the endothelial cells of the allografts with areas of denudation, suggesting the preservation of the endothelial cells proteinic structure.

The major findings of this study are the identification of specific alterations in coronary artery endothelial function associated with ischemia-reperfusion and with acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation in a canine model. The endothelial dysfunction after 24 hr of reperfusion consisted of a receptor-specific impairment in relaxations to thrombin and an intracellular signaling pathway dysfunction implicating the G-protein signaling pathway. After 5 days of acute untreated rejection, the receptor-specific dysfunction to thrombin persisted but the impairment of G-protein transduction mechanism was reversed and relaxations to mediators coupled to Gi-protein were enhanced. Moreover, neither ischemia-reperfusion nor

acute untreated rejection affected the constitutive NO synthase, the Gq-protein signaling pathway nor the vascular smooth muscle cell functions.

Endothelium-dependent relaxations after ischemia and reperfusion.

Initial impairment of the coronary endothelium-dependent relaxations after cold crystalloid hyperkalemic cardioplegia, cold ischemia and 24 hr of reperfusion involved the G-protein pathway, as shown by the reduced responsiveness to sodium fluoride, a specific in vitro G-protein activator (18, 19). However, responses to the agonists, serotonin and UK14304, as well as to acetylcholine and bradykinin, were maintained after 24 hr, even if these mediators use respectively Gi- and Gq-protein pathways to stimulate endothelial NO synthase (11, 30). Response to the agonist thrombin, which is linked to Gi-protein but also to phospholipase C to activate the endothelial constitutive NO synthase (18, 30), were reduced on day 1 in the allografts. The reduced responsiveness to the agonist thrombin may represent a receptor-specific dysfunction, prior to the G-protein transduction mechanism, associated with the reperfusion injury, as previously suggested (3). Taken together, these findings suggest a mild global G-protein involvement associated with the ischemia and reperfusion injury of these experimental conditions. Also, endothelial responses to the calcium ionophore A23187, which stimulates the release of NO independently of G-protein pathways, were unaffected on day 1, suggesting that the capacity of the endothelial cell to produce the endothelium-derived relaxing factor (EDRF)-NO is maintained. However, our results cannot exclude an early and transient endothelial constitutive NO synthase dysfunction that subsequently recovers in the first 24 hr of reperfusion, as already evidenced by other groups (22). Moreover, the effect of the endothelium-

derived hyperpolarizing factor was not specifically studied, and the contribution of this enzyme to the endothelial relaxation after ischemia-reperfusion and in acute rejection remains to be determined.

Coronary artery reactivity in association with global or regional ischemic insults has been extensively studied in the recent years. Conclusions differ according to different factors, such as type (global versus regional, cold versus warm) of ischemia and its duration, myocardial protection before ischemic insult, and duration of reperfusion. In a regional model of warm ischemia and reperfusion (20), it was shown that after 60 min of ischemia and 60 min of reperfusion, coronary arteries exhibited a global dysfunction with impaired responses to acetylcholine, the calcium ionophore A23187 but also to platelets and platelet-derived agonists as serotonin and adenosine diphosphate (ADP). When the reperfusion was extended to 12 weeks (21), a selective impairment of endothelium-dependent relaxations to serotonin, thrombin and ADP, but preserved response to acetylcholine, implicating a specific dysfunction of signal transduction rather than an involvement of the capacity of the endothelium to produce NO. Cold crystalloid cardioplegia has been shown to impair release of NO and responses to aggregating platelets while blood cardioplegic solution did not alter endothelial reactivity (22). In coronary microvessels of hearts submitted to 60 min of cold cardioplegic arrest and 60 min of reperfusion, endothelium-dependent relaxations to bradykinin and the calcium ionophore A23187 were significantly reduced even with minimal endothelial damage seen on electron microscopy (9). Recently, in a dog model of ischemic arrest with cold intermittent crystalloid or continuous warm blood cardioplegia during 120 min followed by 60 min of reperfusion, a selective

impairment in receptor-mediated release of NO and Gi-protein signaling pathway was shown in epicardial coronary arteries of hearts protected with intermittent cold crystalloid cardioplegia (7). Experimental evidence suggests that the mechanism of this reperfusion injury could be oxygen free radicals produced by neutrophils, as in vitro exposure of coronary arteries to oxygen radicals produce a specific Gi-protein dysfunction (32).

Endothelium-dependent relaxations after acute untreated rejection.

In our model, 5 days after transplantation, when all the allografts had reached high grade acute cellular-rejection, endothelium-dependent relaxations mediated by Gi-proteins were enhanced. This observation is based on a significant increase in responsiveness to serotonin, UK14304 and sodium fluoride. Relaxations to acetylcholine and bradykinin were unimpaired by acute rejection and suggest an unaffected Gq-protein-dependent pathway. Endothelium-dependent responses to thrombin were still depressed on day 5 and this may still be due to a specific dysfunction implicating the thrombin receptor, prior to the G-protein transduction mechanism. Responses to the calcium ionophore A23187 were intact, suggesting that in the early stages of severe acute rejection, the capacity of the endothelial constitutive NO synthase to produce EDRF-NO is not affected. However, a compensatory phenomenon implicating the endothelium-derived hyperpolarizing factor cannot be excluded with our results.

Previous experimental work from our laboratory has shown that acute untreated rejection for 7 days in the similar experimental model results in a mediator-specific impairment of endothelium-dependent relaxations. Significantly reduced endothelium-dependent responses to thrombin and increased endothelium-dependent relaxations to serotonin were observed, with

preserved responses to acetylcholine and ADP and unchanged endothelium-independent relaxations (3). Treatment of rejection with cyclosporin A did not modify the responses to thrombin but potentiated the relaxations to serotonin (4). Recently, in a swine model of heterotopic heart transplantation, specific Gi-protein dysfunction was observed early in the course of acute rejection, with a more diffuse impairment of endothelial function with 14 days of acute untreated rejection (5). In another study, using a dog model of acute lung rejection, an intact response to the calcium ionophore A23187 was shown in association with a specific impairment in endothelial-dependent responses to bradykinin and an enhancement in relaxations to histamine. These changes in pulmonary artery reactivity were reversible with treatment of acute rejection with cyclosporin A, azathioprine and methylprednisone, suggesting that they were truly associated with acute rejection (23).

Endothelium-independent responses.

The preserved endothelium-independent relaxation to sodium nitroprussiate both on days 1 and 5 reflect an intact cyclic guanosine monophosphate pathway in the coronary artery smooth muscle cells after 24 hr of reperfusion and 5 days of acute cellular rejection, respectively. The preservation of the contractile responses of the vascular smooth muscle cells to the agonists potassium chloride and prostaglandin F_{2α} suggests that in these experimental conditions, the smooth muscle cell functions are not yet affected by the inflammatory response.

Endothelial dysfunction and coronary allograft vasculopathy.

In cardiac transplant recipients, abnormal endothelium-dependent responses of coronary arteries to acetylcholine have been shown to occur as early as 15 days after transplantation

(12, 14). This paradoxical vasoconstriction to acetylcholine can recover weeks later in some patients but can persist up to 2 years post-transplant (13, 14). Moreover, impaired endothelial vasodilation induced by acetylcholine and substance P has been demonstrated in patients with coronary allograft vasculopathy (27). Recently, a clinical longitudinal study using intravascular ultrasound has demonstrated that coronary artery segments with impaired endothelial responses to acetylcholine 2 weeks after transplantation developed more intimal thickening 1 year post-transplant than segments with preserved endothelial function (12). Thus, endothelial dysfunction is an early event after transplantation and may be implicated in the pathogenesis of coronary allograft vasculopathy.

The relation between episodes of acute rejection and the development of coronary allograft vasculopathy remains controversial. In an experimental model, repetitive episodes of acute rejection accelerated the development of allograft vascular lesion (17). In clinical studies using coronary arteriography, a link between rejection episodes or rejection scores and subsequent coronary allograft vasculopathy was shown (16, 28). Recently, in a prospective study using intravascular ultrasound in heart transplant recipients, the averaged biopsy rejection score in the first 3 months post-transplant had a significant correlation with intimal thickening 1 year after transplantation (16).

Clinical implications. Our study points out that coronary artery endothelial cell receptors and G-proteins are primary targets in the peritransplant injury and acute rejection after heart transplantation. The receptor-specific impairment to the agonist thrombin observed in these experimental conditions may lead to a hypercoagulable state in the peritransplant period, but this

hypothesis should be confirmed with further studies. The enhanced Gi-protein pathway signaling found in our study may reflect some transient compensatory mechanism in the acute process of rejection. Few clinical data exist on importance of Gi-protein in human coronary arteries (33, 34), however immunohistochemical studies showed lower levels of Gi-protein in human atherosclerotic coronary arteries. These results should lead to further experimental and clinical studies on the effects of treated and untreated acute rejection episodes on endothelial reactivity and the subsequent development of graft vasculopathy. Emphasizing the role of endothelial G-proteins in the endothelial dysfunction following heart transplantation may lead to new therapeutic targets.

Limitations The heterotopic cervical nonworking heart transplant model does not reproduce the hemodynamic parameters of the orthotopic heart transplant, although hemodynamic factors are probably not implicated in the endothelial injury in the peritransplant period and in acute rejection. The animal model used and the variable histocompatibility mismatching of hearts between study animals may have influenced the kinetic and the severity of the rejection process. However, no evidence of cellular rejection was found on day 1 and all allografts studied on day 5 showed severe grade IV acute cellular rejection. Ischemic times and preservation solutions are potential factors responsible for the initial endothelial dysfunction and may have modulated the late endothelial function alterations. Finally, no immunosuppression was used to minimize interactions between drugs, mainly cyclosporine and endothelial reactivity (4, 29).

CONCLUSIONS

In conclusion, in the canine heterotopic heart transplantation model, the endothelial dysfunction occurring after 24 hr of reperfusion is specific to the thrombin receptor and to the G-protein-mediated pathways. Acute untreated rejection did not modify the receptor-specific dysfunction to thrombin persists but enhanced the sensibility of the Gi-protein signaling pathway.

lapran/publ/transplantation/coronary artery cartier

REFERENCES

1. Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR. Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments and future directions. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 9.
2. Duquesnoy RJ, Demetris AJ. Immunopathology of cardiac transplant rejection. *Curr Opin Cardiol* 1995; 10: 193.
3. Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, Carrier M, Leung TK. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 404.
4. Bouchard D, Despatis MA, Buluran J, Cartier R. Effects of cyclosporin A-treated acute rejection on coronary artery reactivity in a canine model of heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1325.
5. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, et al. Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 643.
6. Gohra H, McDonald TO, Verrier ED, Aziz S. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant atherosclerosis. *Transplantation* 1995; 60: 96.
7. Chang CH, Lin PJ, Chu Y, Lee YS. Impaired endothelium-dependent relaxation after cardiac global ischemia and reperfusion: role of warm blood cardioplegia. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 681.

8. Pearson PJ, Lin PJ, Schaff HV. Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103: 1147.
9. Selke FW, Shafique T, Schoen FJ, Weintraub RM. Impaired endothelium-dependent coronary microvascular relaxation after cold potassium cardioplegia and reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 52.
10. Lee JJ, Olmos L, Vanhoutte PM. Recovery of endothelium-dependent relaxations four weeks after ischemia and progressive reperfusion in canine coronary artery. *Proc Assoc Am Phys* 1996; 108: 362.
11. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8: 28S.
12. Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, et al. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant. *Circulation* 1996; 93: 457.
13. Fish RD, Nabel EG, Selwyn AP, et al. Responses of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine. *J Clin Invest* 1988; 81: 21.
14. Ryan TJ, Vekshein VI, Yeung AC, et al. Recovery of endothelial function in coronary arteries early after cardiac transplantation. *Circulation* 1990; 82 (suppl III): III-256.
(Abstract)

15. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G-protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83: 652.
16. Kobashigawa JA, Miller L, Yeung A, et al. Does acute rejection correlate with the development of transplant coronary artery disease? A multicenter study using intravascular ultrasound. Sandoz/CVIS Investigators. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: S221.
17. Nakagawa T, Sukhova GK, Rabkin E, Winters GL, Schoen FJ, Libby P. Acute rejection accelerates graft coronary disease in transplanted rabbit hearts. *Circulation* 1995; 92: 987.
18. Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels* 1990; 27: 218.
19. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations evoked by fluoride. *Eur J Pharmacol* 1990; 178: 121.
20. Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ Res* 1990; 67: 385.
21. Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 1990; 81: 1921.

22. Nilsson FN, Miller VM, Vanhoutte PM, McGregor CGA. Methods of cardiac preservation alter the function of the endothelium in porcine coronary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102: 923.
23. Aarnio P, Schersten H, Tazelaar HD, Miller VM, McGregor CG. Effects of acute rejection and antirejection therapy on arteries and veins from canine single lung allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 1219.
24. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992; 145: 201.
25. Fullerton DA, Mitchell MB, McIntyre RC Jr, et al. Mechanisms of coronary vasomotor dysfunction in the transplanted heart. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 86.
26. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15: 1667.
27. Mugge A, Brandes RP, Heublein B, Nolte C, Haverich A, Lichtlen PR. Endothelial dysfunction in heart transplanted patients with graft vasculopathy. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl J): 78.
28. Narrod J, Kormos R, Armitage J, Hardesty R, Ladowski J, Griffith B. Acute rejection and coronary artery disease in long-term survivors of heart transplantation. *J Heart Transplant* 1989; 8: 418.
29. Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, et al. Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* 1994; 90: 3018.

30. Shimokawa S, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelium removal in porcine coronary arteries. *Circ Res* 1989; 65: 740.
31. Kuroiwa M, Aoki H, Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H. Mechanisms of endothelium-dependent relaxation induced by substance P in the coronary artery of the pig. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2040.
32. Seccombe JF, Schaff HV. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 778.
33. Tsutsui M, Shimokawa H, Tanaka I, et al. Endothelial Gi protein in human coronary arteries. *Eur Heart J* 1994; 15: 1261.
34. Shimokawa H, Tsutsui M, Mizuki T, et al. Endothelial Gi protein expression is markedly low in human coronary microvessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 297.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1** Concentration-response curves showing endothelium-dependent relaxations to serotonin (5-HT) in coronary arteries of control hearts, allografts on day 1 and allografts on day 5. A significant increased response is observed in allografts on day 5.
- Figure 2** Concentration-response curves showing endothelium-dependent relaxations to UK14304 (UK) in coronary arteries of control hearts, allografts on day 1 and allografts on day 5. Significantly increased relaxations are observed in allografts on day 5.
- Figure 3** Concentration-response curves showing endothelium-dependent relaxations to sodium fluoride (NaF) in coronary arteries of control hearts, allografts on day 1 and allografts on day 5. Asterisks indicate significant differences between control and indicated time for indicated concentration ($P \leq 0.05$).
- Figure 4** Concentration-response curves showing endothelium-dependent relaxations to thrombin (Thr) in coronary arteries of control hearts, allografts on day 1 and allografts on day 5. Significantly decreased responses are observed in allografts on day 1 and 5.

TABLE 1. EC₅₀ values for the different endothelium-dependent and independent agonists in control and allograft coronary arteries at day 1 and 5 after transplantation

Agonist	Control	Day 1	Day 5	<i>P</i> -value
Ach	-7.65±0.10	-7.65±0.16	-7.68±0.11	0.98
A23187	-6.21±0.07	-6.04±0.12	-6.23±0.03	0.17
BK	-9.26±0.12	-9.34±0.22	-9.07±0.18	0.56
Thr	-1.67±0.13	-1.13±0.17	-1.32±0.05	0.02
5-HT	-5.95±0.24	-6.23±0.44	-7.16±0.28	0.04
UK	-6.97±0.17	-6.96±0.20	-7.58±0.13	0.03
SNP	-8.03±0.07	-7.75±0.17	-7.72±0.08	0.15

ACh indicates acetylcholine; A23187, calcium ionophore A23187; BK, bradykinine; Thr, thrombin; 5-HT, serotonin; UK, UK14304; SNP, sodium nitroprussiate; EC₅₀, logarithm of the effective molar concentration of agonist that causes 50% of maximal relaxation.

TABLE 2. E_{\max} (%) values for the different endothelium-dependent and independent agonists in control and allograft coronary arteries at day 1 and 5 after transplantation

Agonist	Control	Day 1	Day 5	<i>P</i> -value
Ach	99.7±0.3	99.5±0.5	97.0±3.0	0.49
A23187	100	100	100	0.99
BK	99.0±1.0	96.6±3.1	100	0.44
Thr	98.5±1.5	71.5±14.6	90.8±5.6	0.13
5-HT	98.2±1.8	98.4±0.9	80.8±12.0	0.16
UK	31.9±14.1	28.8±10.4	87.3±6.4	0.002
NaF	94.8±2.3	47.9±17.1	91.9±3.3	0.007
SNP	100	100	100	0.99

ACh indicates acetylcholine; A23187, calcium ionophore A23187; BK, bradykinine; Thr, thrombin; 5-HT, serotonin; UK, UK14304; NaF, sodium fluoride; SNP, sodium nitroprussiate; E_{\max} , maximal relaxation expressed as the % of initial precontraction with prostaglandin $F_{2\alpha}$.

TABLE 3. Maximal contractions (g) to potassium chloride (kcl) and prostaglandin $f_{2\alpha}$ ($pgf_{2\alpha}$) of control and allograft coronary arteries at day 1 and 5 after transplantation

Agonist	Control	Day 1	Day 5	<i>P</i> -value
KCl	12.2±1.3	9.2±0.8	10.0±1.1	0.18
PGF _{2α}	9.7±0.9	8.2±0.5	8.4±0.7	0.29

Figure 1

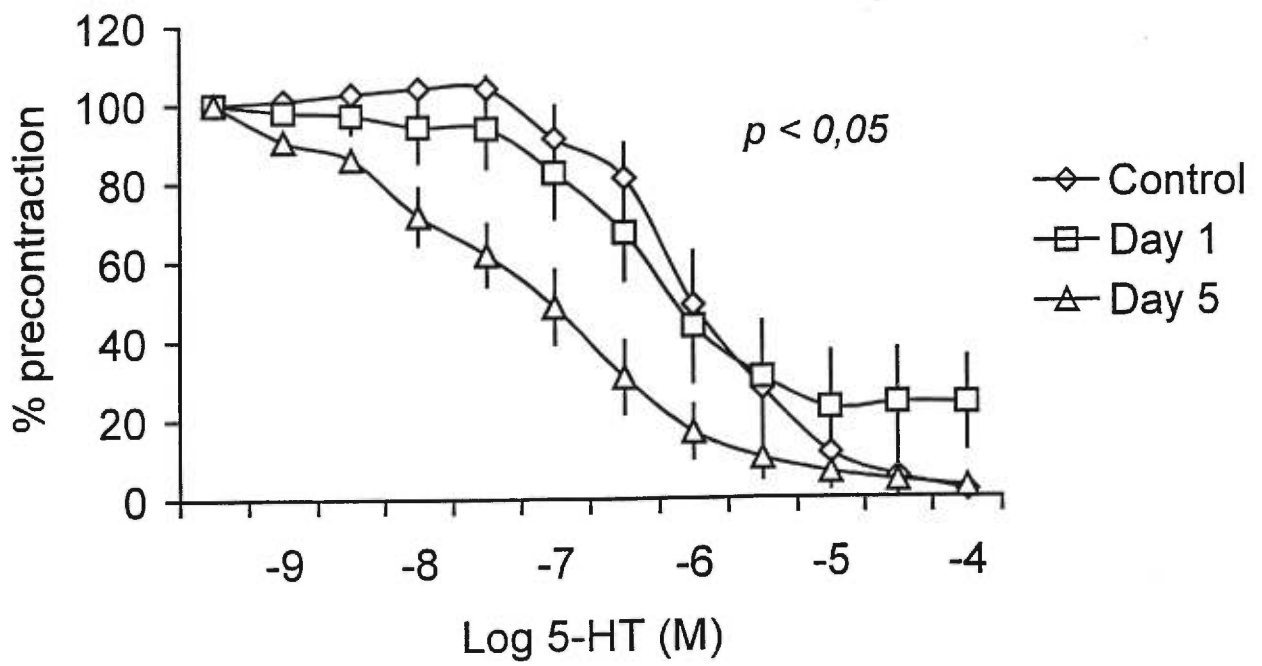


Figure 2

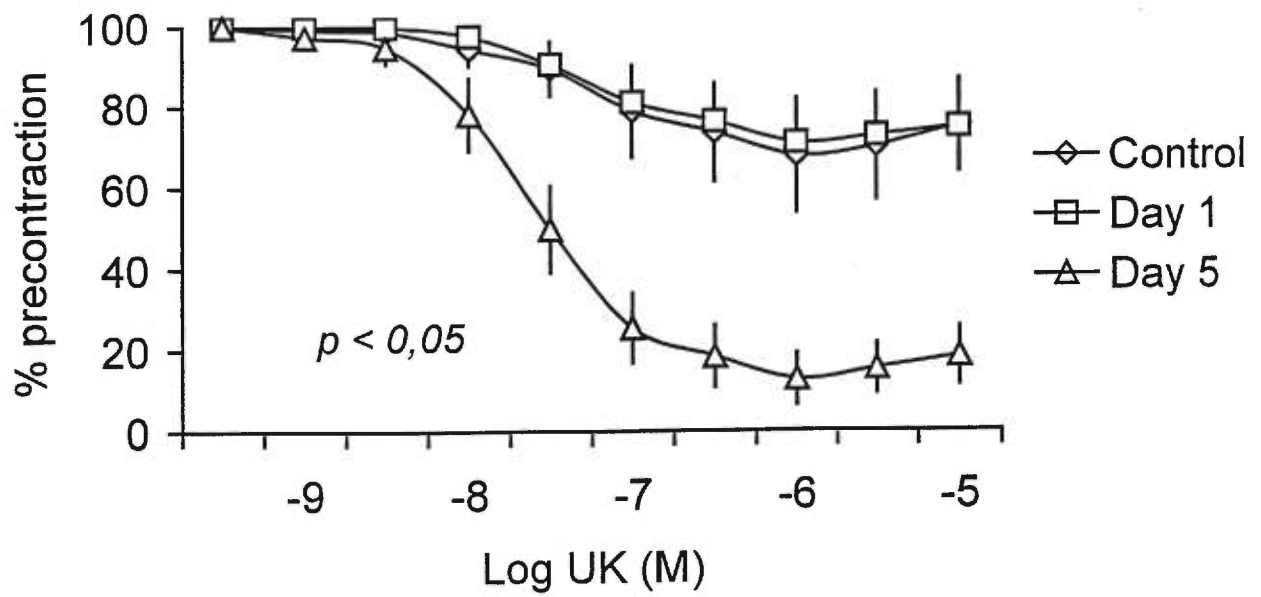


Figure 3

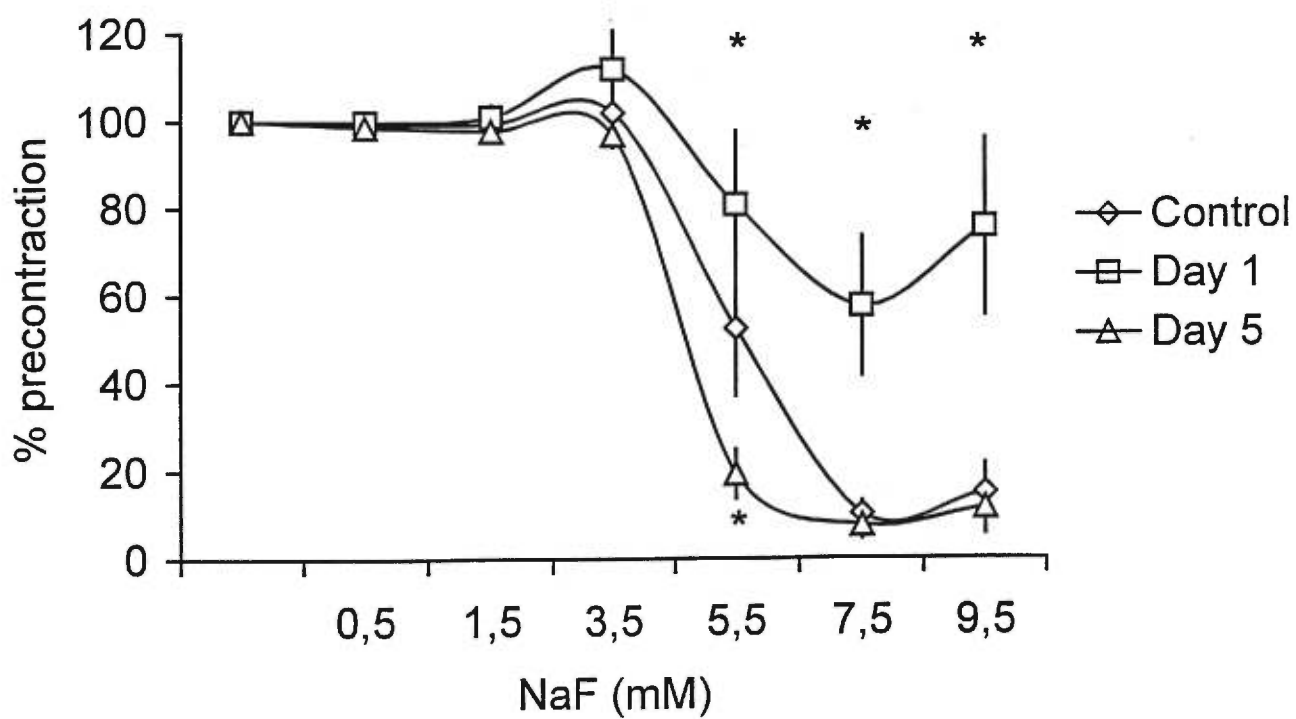
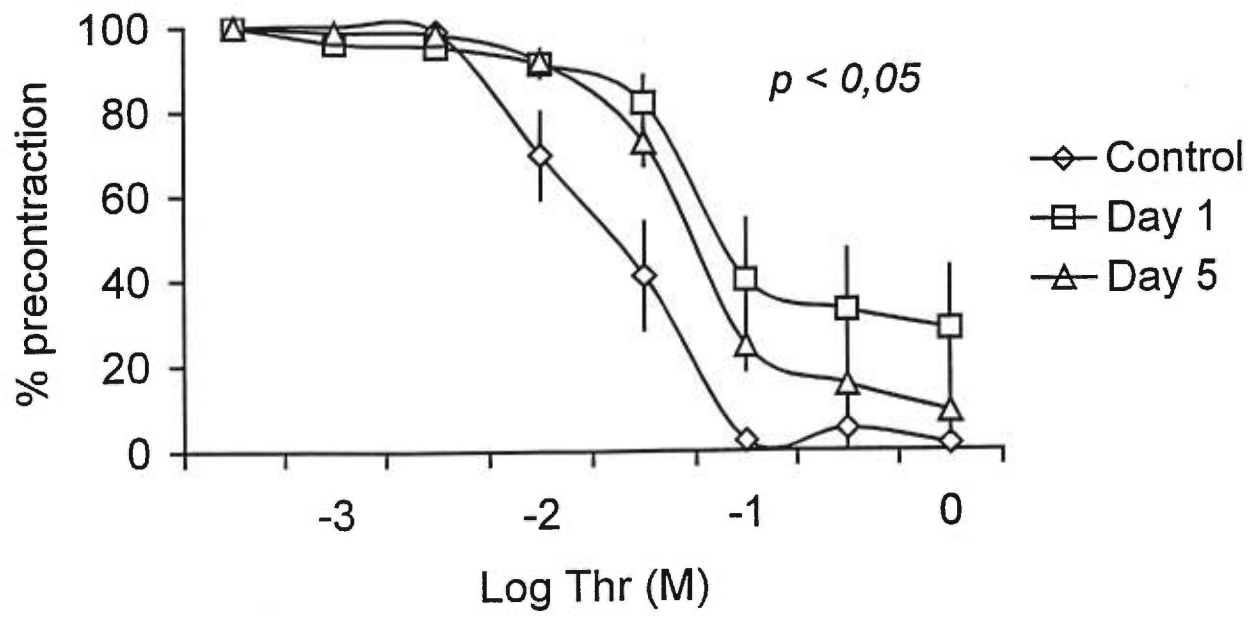


Figure 4



Discussion

Dans un modèle canin de transplantation cardiaque hétérotopique en position cervivale avec de courtes périodes d'ischémie froide sans utilisation d'immunosuppression, nous avons réussi à reproduire en partie la situation clinique humaine caractérisée par une période d'ischémie froide suivie d'une reperfusion, puis par l'apparition plus ou moins rapide du rejet cardiaque aigu. Dans ces conditions expérimentales, les études histologiques ont confirmé l'absence de rejet au jour 1 après la transplantation et la présence d'un rejet aigu de grade sévère au jour 5 après la greffe, avec l'apparition d'infiltration cellulaire diffuse, d'œdème, d'hémorragie et de nécrose myocytaire

Ces travaux ont permis l'identification des mécanismes spécifiques de la dysfonction endothéliale apparaissant après une transplantation cardiaque sans l'utilisation d'immunosuppression dans un modèle canin. Plus spécifiquement, nous avons observé que : l'activité de la NO synthase constitutive est maintenue tant au jour 1 qu'au jour 5 après la greffe; l'induction d'une NO synthase inductible endothéliale tel que démontré par immunohistochimie dès le jour 1 après la greffe et la présence d'une activité in vitro de cette enzyme seulement au jour 1; une dysfonction endothéliale spécifique au jour 1 impliquant à la fois une inhibition de la voie de signalisation dépendante des protéines G et du récepteur de la thrombine; et une dysfonction endothéliale spécifique au jour 5 impliquant une inhibition persistante du récepteur de la thrombine et une potentialisation de la voie de signalisation dépendante de la protéine Gi.

- *Relaxations dépendantes de l'endothélium au jour 1*

Initialement, les réponses médiées par le calcium ionophore A23187, un médiateur stimulant la NO synthase endothéliale constitutive sans l'intermédiaire des protéines G, n'étaient pas modifiées par l'ischémie froide suivie d'une reperfusion de 24 heures. Ces observations suggèrent qu'au jour 1 après la greffe, la capacité de la cellule endothéliale à produire du NO est intacte.

Les relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par le fluorure de sodium, un médiateur stimulant directement les protéines G sans l'intermédiaire d'un récepteur¹², étaient significativement diminuées au jour 1 par rapport au groupe contrôle. Toutefois, les réponses dépendantes de l'endothélium à la sérotonine et au UK 14304, deux agonistes utilisant de façon préférentielle la voie médiée par la protéine Gi¹¹, n'étaient pas modifiées. De plus, les réponses dépendantes de l'endothélium médiée par la bradykinine et l'acétylcholine étaient, quant à elles, maintenues, suggérant que la voie de signalisation médiée par la protéine Gq est intacte. Ainsi, la dysfonction initiale des protéines G semble légère et ne peut être mise en évidence qu'avec le fluorure de sodium. Par ailleurs, les relaxations médiées par la thrombine, un agoniste stimulant la NO synthase constitutive par l'intermédiaire de différentes protéines G¹², étaient significativement diminuées par rapport au groupe contrôle, ce qui pourrait représenter une dysfonction spécifique précédant les protéines de transmission du signal, soit au niveau du récepteur destiné à ce médiateur, tel que suggéré récemment⁴⁵⁻⁴⁶.

La réactivité endothéliale après une insulte ischémique suivie d'une reperfusion dépend de plusieurs facteurs, dont le type d'ischémie (globale versus régionale), la durée de l'ischémie, l'utilisation et le type de solution de cardioplégie (sanguine

versus crystalloïde), ainsi que la durée de la période de reperfusion. Récemment, dans un modèle canin d'ischémie globale suite à une cardioplégie, il a été démontré que l'administration intermittente de cardioplégie crystalloïde pendant 120 minutes suivie d'une reperfusion de 60 minutes était associée à une dysfonction sélective de la protéine Gi⁴⁸.

- *Relaxations dépendantes de l'endothélium au jour 5*

Cinq jours après la greffe, après le développement d'un rejet aigu de grade avancé, la dysfonction endothéliale se modifie. À ce moment, les réponses endothéliales médiées par l'acétylcholine, le calcium ionophore et la bradykinine étaient maintenues, suggérant la préservation de la fonction de la NO synthase constitutive et de la voie médiée par la protéine Gq même en rejet aigu sévère. Cependant, au jour 5 après la greffe, les réponses endothéliales au fluorure de sodium, à la sérotonine et au UK14304 étaient significativement plus grandes que celles du groupe contrôle, suggérant une potentialisation de la voie de signalisation dépendante de la protéine Gi lors du rejet aigu. Enfin, au jour 5 après la transplantation, la diminution significative des réponses endothéliales à la thrombine était toujours présente.

Des travaux récents de notre laboratoire avec des conditions expérimentales similaires ont démontré que le rejet aigu entraînait une dysfonction endothéliale spécifique impliquant une diminution des réponses à la thrombine et une augmentation des relaxations à la sérotonine avec une préservation des réponses à l'ADP et à l'acétylcholine. De plus, l'utilisation de la cyclosporine A était associée avec une potentialisation des réponses à la sérotonine⁴⁵⁻⁴⁶. Dans un

modèle porcin de greffe cardiaque, le rejet aigu était associé avec une atteinte précoce spécifique à la protéine Gi qui évoluait avec la progression du rejet aigu vers une atteinte globale de la fonction endothéliale⁴⁷. Enfin, dans un modèle canin de greffe pulmonaire, le rejet aigu était associé à une préservation de la réponse au calcium ionophore, à une diminution des réponses à la bradykinine et à une potentialisation des relaxations à l'histamine. De façon intéressante, ces changements étaient réversible avec le traitement de l'épisode de rejet aigu avec de la cyclosporine, de l'azathioprine et du méthylprednisolone, suggérant une réversibilité de la dysfonction endothéliale associée au rejet⁵⁰.

- *Réactivité vasculaire en présence de la L-arginine*

L'absence de relaxations indépendantes de l'endothélium à la L-arginine tant au jour 1 qu'au jour 5 après la greffe dans ces conditions expérimentales suggère l'absence d'une NO synthase inductible située au niveau du muscle lisse vasculaire, tel que démontré d'autres auteurs⁵¹. Cependant, la démonstration de relaxations dépendantes de l'endothélium à la L-arginine au jour 1 significativement plus grandes que dans les autres groupes et l'inhibition de cet effet par la présence de l'aminoguanidine, un inhibiteur spécifique de la NO synthase inductible, suggère fortement la présence d'une NO synthase inductible endothéliale précocément après la transplantation cardiaque. De plus, la mise en évidence de la NO synthase inductible au niveau de l'intima des artères coronaires des greffons au jours 1 et 5 confirme l'apparition de cette enzyme rapidement après la greffe.

Plusieurs études récentes confirment l'apparition de la NO synthase inductible après une ischémie-reperfusion et lors du rejet d'allogreffes, tant chez l'animal que chez l'humain³³⁻³⁵. Toutefois, la mise en évidence de l'activité de cette enzyme in vitro semble difficile, en particulier dans des modèles porcins de choc septique et de rejet cardiaque aigu^{47,51}.

- *Réponses indépendantes de l'endothélium*

La préservation des réponses indépendantes de l'endothélium au nitroprussiate de sodium tant au jour 1 qu'au jour 5 après la greffe suggère que la voie de la guanosine monophosphate cyclique au niveau du muscle lisse vasculaire est intacte. De plus, La préservation des réponses contractiles au chlorure de potassium et à la prostaglandine aux jours 1 et 5 laisse présumer que dans ces conditions expérimentales, le muscle lisse vasculaire n'est pas affecté par le processus inflammatoire et immunitaire, tel qu'observé par d'autres auteurs⁴⁵⁻⁴⁷.

- *Limitations*

Plusieurs limitations inhérentes à ce type de modèle expérimental doivent être mentionnées. Tout d'abord, le modèle de transplantation cardiaque hétérotopique ne reproduit pas parfaitement les conditions hémodynamiques du coeur transplanté en position orthotopique, surtout parce qu'il est perfusé et non travaillant, contrairement au greffon orthotopique. Ces conditions hémodynamiques peuvent influencer les forces de cisaillement qui peuvent elles-mêmes moduler la fonction endothéliale^{3,47}. Le modèle animal utilisé, soit le chien, constitue une autre limitation surtout parce que les systèmes d'histocompatibilité humain et canin présentent des différences pouvant

influencer la survenue du rejet aigu. De plus, l'extrapolation des résultats provenant d'un modèle canin à l'humain doit être fait avec prudence. Les temps d'ischémie froide, les solutions de cardioplégie et de préservation employées, la cinétique du rejet cardiaque, ainsi que l'absence de traitement immunosuppresseur ne reproduisaient pas parfaitement les conditions cliniques chez l'humain et doivent aussi être considérés comme des facteurs limitants.

Par ailleurs, le rôle spécifique du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) n'a pas été étudié dans le cadre de ce protocole. Il est connu que l'EDHF, relâché par la cellule endothéliale après stimulation par certains médiateurs, est capable d'entraîner des relaxations endothélium-dépendantes quasi normales lorsque la production de NO est inhibée³. La poursuite de ces travaux devra donc tenir compte du rôle de l'EDHF dans la dysfonction endothéliale après ischémie-reperfusion et lors du rejet aigu. Enfin, l'identification des mécanismes de la dysfonction endothéliale dans ces conditions expérimentales a été réalisée par études en chambres d'organes. Il s'agit donc d'observations in vitro qui devront être confirmées par études immunologiques quantitatives lors de la poursuite de ces travaux.

- *Conclusion*

En résumé, nous avons utilisé un modèle canin de transplantation cardiaque afin de caractériser la nature de la dysfonction endothéliale survenant précocément après une greffe cardiaque. Ceci nous a permis d'identifier que l'ischémie froide suivie d'une reperfusion tout comme le rejet aigu non traité activent l'endothélium en visant des mécanismes spécifiques, à savoir les protéines G, les récepteurs

thrombinergiques et la NO synthase inductible. L'extrapolation de ces résultats à l'humain et leurs implications cliniques restent à préciser et à définir. Cependant, il est connu que la dysfonction endothéliale survient précocément après une transplantation cardiaque chez l'humain⁵², lors des épisodes de rejet⁵³, et chez les patients présentant une athérosclérose accélérée du greffon cardiaque³¹. Il a aussi été démontré que la dysfonction précoce est prédictive du développement de l'athérosclérose accélérée du greffon³⁰. Nos résultats devraient donc stimuler la poursuite de la recherche afin de mieux comprendre la dysfonction endothéliale survenant après une transplantation cardiaque et son impact sur la survenue de l'athérosclérose accélérée du greffon, dans le but de développer des stratégies visant à moduler les agressions contre l'endothélium pendant et après la greffe et à retarder ou enrayer l'apparition de l'athérosclérose accélérée du greffon.

Bibliographie

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288 :373-376.
2. Lüscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium : Modulator of cardiovascular function. Boca Raton, Fla, CRC Press Inc., 1990, pp 1-228.
3. Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine JP. Endothelial dysfunction and vascular disease. In : *Endothelium in clinical practice*. Rubany GM, Dzau VM (eds). Marcel Dekker Inc. Publishers, New York, NY, 1997, pp 265-290.
4. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333 : 664-666.
5. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 1993; 329 : 2002-2012.
6. Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium : Vasoactive mediators. *Progr Cardiovasc Dis* 1996; 39 : 229-238.
7. Lüscher TF, Tanner FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens* 1993; 6 : 283S-293S.
8. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharm* 1993; 233 : 119-125.
9. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87(suppl V) : V51-V55.

10. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250 : H1145-H1149.
11. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8 : 28S-41S.
12. Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels* 1990; 27 : 217-228.
13. Komori K, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels* 1990; 27 : 238-245.
14. Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependant responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 1987; 61 : 256-270.
15. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Natural course of the impairment of endothelium-dependant relaxations after balloon endothelial removal in porcine coronary arteries. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circ Res* 1989; 65 : 740-753.
16. Shimokawa H, Vanhoutte PM. Impaired endothelium dependant relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res* 1989; 64 : 900-914.
17. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83 : 652-660.

18. Fostermann U, Mugge A, Alheid U, et al. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988; 62 : 185-190.
19. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Eng J Med* 1986; 315 : 1046-1051.
20. Reddy KG, Nair R, Sheehan HM, et al. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic evidence or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23 : 833-843.
21. Fullerton DA, Mitchell MB, McIntyre RC, Brown JM, Meng X, Campbell DN, Grover FL. Mechanisms of coronary vasomotor dysfunction in the transplanted heart. *Ann Thor Surg* 1994; 58 : 86-92.
22. Gaudin PB, Rayburn BK, Hutchins GM, Kasper EK, Baughman KL, Goodman, SN, Lecks LE, Baumgartner WA, Hruban RH. Peritransplant injury to the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipient. *Am J Surg Pathol* 1994; 18 : 338-346.
23. Yeung AC, Anderson T, Meredith I, Ueheta A, Ryan TJ, Selwyn AP, Mudge GH, Ganz P. Endothelial dysfunction in the development and detection of transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11 : S69-S73.
24. Seccombe JF, Schaff HV. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thor Surg* 1995; 60 : 778-788.

25. Nilsson FN, Miller VM, Vanhoutte PM, McGregor CGA. Methods of cardiac preservation alter the function of the endothelium in porcine coronary arteries. *J Thor Cardiovasc Surg* 1991; 102 : 923-930.
26. Gohra H, McDonald TO, Verrier ED, Aziz S. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 1995; 60 : 96-102.
27. Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, DeGroot CJM, Taylor RN, Chou TM, Yock PG, Chatterjee K. Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* 1994; 90 : 3018-3023.
28. Kerber S, Rahmel A, Heinemannvechtel O, Budde T, Deng M, Scheld HH, Breithardt G. Angiographic, intravascular ultrasound and functional findings early after orthotopic heart transplantation. *Int J Cardiol* 1995; 49 : 119-129.
29. Fish RD, Nabel EG, Selwyn AP, Ludmer PL, Mudge GH, Kirchenbaum JM, Schoen FJ, Alexander RW, Ganz P. Responses of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine. *J Clin Invest* 1988; 81 : 21-31.
30. Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, Charbonneau F, Ganz P, Selwyn AP, Anderson TJ. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant. *Circulation* 1996; 93 : 457-462.
31. Mugge A, Brandes AP, Heublein B, Nolte C, Haverich A, Lichtlen PR. Endothelial dysfunction in heart transplanted patients with graft vasculopathy. *Eur Heart J* 1995; 16 : 78-83.
32. Caracciolo EA, Wolford TL, Underwood RD, Donohue TJ, Bach RG, Miller LW, Kern MJ. Influence of intimal thickening on coronary blood flow responses in

- orthotopic heart transplant recipients. A combined intravascular doppler and ultrasound imaging study. *Circulation* 1995 (Suppl II) : II182-II190.
33. Akyurek LM, Fellstrom BC, Yan ZQ, Hansson GK, Fura K, Larsson E. Inducible and endothelial nitric oxide synthase expression during development of transplant arteriosclerosis in rat aortic grafts. *Am J Pathol* 1996; 149: 1981-1990.
34. Kuo PC, Alfrey EJ, Krieger NR, Abe KY, Huie P, Sibley RK. Differential localization of allograft nitric oxide synthesis: comparison of liver and heart transplantation in the rat model. *Immunology* 1996; 87: 647-653.
35. Lewis NP, Tsao PS, Rickenbacher PR, Xue C, Johns RA, Haywood GA, von der Leyen H, Trindade PT, Cooke JP, Hunt SA, Billingham ME, Valentine HA, Fowler MB. Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle. *Circulation* 1996; 93:720-729.
36. Ravalli S, Albala A, Ming M Szabolcs M, Barbone A, Michler RE, Cannon PJ. Inducible nitric oxide synthase expression in smooth muscle cells and macrophages of human transplant coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97 : 2338-2345.
37. Szabolcs M, Michler RE, Yang X, Aji W, Roy D, Athan E, Sciacca RR, Minanov OP, Cannon PJ. Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase. *Circulation* 1996; 94: 1665-1673.
38. Szabolcs M, Ravalli S, Minanov O, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1998; 27: 804-812.

39. Worrall NK, Chang K, Suau GM, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents myocardial and systemic vascular barrier dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Circ Res* 1996; 78: 769-779.
40. Worrall NK, Misko TP, Sullivan PM, Hui JJ, Ferguson TB. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates established acute cardiac allograft rejection. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 378-385.
41. Worrall NK, Lazenby WD, Misko TP, et al. Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995; 181: 63-70.
42. Lamas S, Michel T, Brenner BM, Marsden PA. Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF- α . *Am J Physiol* 1991; 261: C634-641.
43. Sabate M, Manito N, Cequier A, et al. Acute rejection, cytomegalovirus infection and endothelial dysfunction early after heart transplantation. *Transplant Proceed* 1995; 27 : 2346-2348.
44. Hruban RH, Kasper EK, Gaudin PB, Baughman KL, Baumgartner WA, Reitz BA, Huthins GM. Severe endothelialitis associated with coronary artery spasm in a heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* 1996; 11 : 42-47.
45. Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, Carrier M, Leung TK. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 404-408.
46. Bouchard D, Despatis MA, Buluran J, Cartier R. Vascular effects of cyclosporin A and acute rejection on coronary artery reactivity in a canine model of heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1325-30.

47. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Bruneval P, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Time course and mechanisms of coronary endothelial dysfunction during acute untreated rejection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16 : 643-657.
48. Chang CH, Lin PJ, Chu Y, Lee YS. Impaired endothelium-dependent relaxation after cardiac global ischemia and reperfusion: role of warm blood cardioplegia. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:681-687.
49. Kuroiwa M, Aoki H, Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H. Mechanisms of endothelium-dependent relaxation induced by substance P in the coronary artery of the pig. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2040.
50. Aarnio P, Schersten H, Tazelaar HD, Miller VM, McGregor CG. Effects of acute rejection and antirejection therapy on arteries and veins from canine single lung allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 1219.
51. Shibano T, Vanhoutte PM. Induction of NO production by TNF- α and lipopolysaccharide in porcine coronary arteries without endothelium. *Am J Physiol* 1993;264:H403-407.
52. Ryan TJ, Vekshein VI, Yeung AC, et al. Recovery of endothelial function in coronary arteries early after cardiac transplantation (Abstract). *Circulation* 1990;82(suppl III):III-256.
53. Chan SY, Kobashigawa J, Stevenson LW, Brownfield E, Brunken RC, Schelbert HR. Myocardial blood flow at rest and during pharmacological vasodilation in cardiac transplants during and after successful treatment of rejection. *Circulation* 1994;90:204-12.