

Université de Montréal

Effet des agents immunosuppresseurs et du rejet aigu sur la fonction  
endothéliale des artères coronaires

Par

Hugues Jeanmart

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

En Sciences biomédicales

Décembre , 2001

© Hugues Jeanmart, 2001



W  
4  
U58  
2002  
v.043

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Effet des agents immunosuppresseurs et du rejet aigu sur la fonction endothéliale  
des artères coronaires

Présenté par :  
Hugues Jeanmart

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Denis Bouchard

Président-rapporteur

Raymond Cartier

Directeur de recherche

Louis P. Perrault

Co-directeur de recherche

Michel Pellerin

Membre du jury

Mémoire accepté le 25 mars 2002

## Résumé

La survie des patients post-transplantation cardiaque est limitée par l'apparition d'une forme d'athérosclérose accélérée au niveau des artères coronaires qui mène à des infarctus silencieux et une perte progressive de la fonction du greffon. L'apparition précoce d'une dysfonction endothéliale au niveau des artères coronariennes a été avancée comme un des facteurs contributoires. Parmi les facteurs impliqués dans l'apparition de cette dysfonction endothéliale on retrouve l'utilisation des agents immunosuppresseurs et l'activation de iNOS (la forme inducible de la NO synthase).

Le premier article rapporte l'effet de l'inhibition de iNOS, avec l'aminoguanidine (un bloqueur sélectif de l'iNOS), sur la fonction endothéliale de coronaires épocardiques dans un modèle de rejet aiguë canin. Les résultats obtenus ont démontré l'apparition d'une dysfonction endothéliale sélective associée à l'utilisation de la thrombine dans le groupe traité et non-traité par rapport au groupe contrôle, et ce malgré un blocage efficace de l'iNOS. Ces résultats suggèrent que l'activation de iNOS n'est pas responsable de la dysfonction endothéliale retrouvée dans les premiers moments d'un épisode de rejet aiguë.

Le deuxième article rapporte l'effet de l'exposition de différents agents immunosuppresseurs, soit la cyclosporine A, le FK506, le MMF et la Rapamycine, sur la fonction endothéliale de coronaires épocardiques de porc. Les résultats obtenus avec un modèle d'incubation *in vitro* ont démontré une dysfonction endothéliale avec l'utilisation de tout les agents étudiés, par contre l'exposition à la cyclosporine A et au MMF ont provoqué une dysfonction endothéliale plus sélective alors que le FK506 et la Rapamycine furent associés à une atteinte généralisée de la fonction endothéliale.

Mots clés : endothélium, immunosuppression, athérosclérose précoce, iNOS, greffe cardiaque

## Summary

Survival after heart transplantation is limited by the appearance of an accelerated form of atherosclerosis in the coronary arteries that leads to silent infarct and progressive loss of graft function. Early appearance of coronary arteries endothelium dysfunction has been associated as a contributing factor. Among the factors incriminated as the cause of this dysfunction, there are the use of immunosuppressive agents and the activation of iNOS (the inducible form of the NO synthase).

The first article presented report the effect of iNOS inhibition, with the use of aminoguanidine, on the epicardial coronary endothelial function in a canine model of acute heart rejection. The results demonstrated an impaired endothelium function limited to the thrombin pathway in the treated and non-treated group compared to the control group, in spite of an effective iNOS inhibition. These data suggest that the endothelial function seen in the first phase of acute rejection is not mediated by iNOS activation.

The second article presented report the effect of the exposition of different immunosuppressive agents, cyclosporine A, FK-506, MMF and Rapamycin, on the endothelial function of porcine epicardial coronary arteries in an *in vitro* model of incubation. The results demonstrated an impaired endothelial function with all the immunosuppressive agent used. The exposition to cyclosporine and MMF was associated with a selective endothelial dysfunction, limited to the Gi-protein mediated pathway, in comparison to FK-506 and Rapamycin were responsible for a generalized endothelium dysfunction (Gi and Gq mediated pathway).

Key words : Endothelium, immunosuppression, atherosclerosis, iNOS, heart transplantation

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
PAGE TITRE	I
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY	II
RÉSUMÉ (FRANÇAIS)	III
RÉSUMÉ (ANGLAIS)	IV
CONTENU	
Liste des figures	VI
Liste des abréviations	VII
REMERCIEMENTS	IX
INTRODUCTION	
Fonction endothéliale normale	1
Endothélium régénéré	7
Athérosclérose précoce du greffon et dysfonction endothéliale	8
Dysfonction endothéliale et iNOS	11
Dysfonction endothéliale et agents immunosuppresseurs	13
ARTICLE 1	18
The effect of iNOS inhibition on endothelial function of coronary artery in acute rejection	
ARTICLE 2	41
Comparative study of cyclosporin A and Tacrolimus versus newer immunosuppressants MMF and Rapamycin on coronary endothelial function	
CONCLUSION	69
BIBLIOGRAPHIE	74

## LISTE DES FIGURES

## Introduction

- FIGURE 1 Relation entre l'EDRF et les augmentations de calcium cytosolique
- FIGURE 2 Médiateurs neurohumoraux
- FIGURE 3 Postulat du signal de transduction dans une cellule endothéliale normale
- FIGURE 4 Interaction plaquette, thrombine et endothélium
- FIGURE 5 Mécanismes d'action des agents immunosuppresseurs

## Article 1

- FIGURE 1 Courbe dose-réponse thrombine
- FIGURE 2 Courbe dose-réponse L-arginine
- FIGURE 3 Courbe dose-réponse acétylcholine

## Article 2

- FIGURE 1 Courbe dose-réponse 5HT - CSA
- FIGURE 2 Courbe dose-réponse 5HT- FK506
- FIGURE 3 Courbe dose-réponse 5HT- MMF
- FIGURE 4 Courbe dose-réponse 5HT-RAPA
- FIGURE 5 Courbe dose-réponse BK - CSA
- FIGURE 6 Courbe dose-réponse BK - FK506
- FIGURE 7 Courbe dose-réponse BK - MMF
- FIGURE 8 Courbe dose-réponse BK -RAPA
- FIGURE 9 Courbe dose-réponse A23187- CSA
- FIGURE 10 Courbe dose-réponse A23187- FK506
- FIGURE 11 Courbe dose-réponse A23187 - MMF
- FIGURE 12 Courbe dose-réponse A23187-RAPA

## Liste des abréviations

5HT	Sérotonine
A	Adénosine
AA	Acide arachidonique
Ach	Acétylcholine
ADP	Adénosine diphosphate
AMG	Aminoguanidine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclase
ANOVA	Analyse de variance
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine vasopressine
B	Bradykinine
BH <sub>4</sub>	Tétra-hydrobioptéine
CSA	Cyclosporine A
EDCF	Endothelium derived contracting factor
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
ET-1	Endothéline-1
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FK506	Tacrolimus
H	Histamine
IL-2	Interleukine-2
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
LAD	Left anterior descending artery
L-arg	L-arginine
LCX	Left circumflex artery
M	Muscarinique



MA	Mycophenolic acid
MMF	Mycophenolate mofetil
NA	Noradrénaline
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaF	Fluorure de sodium
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
P	Purinergique
PDGF	Platelet derived growth factor
PGF2 $\alpha$	Prostaglandine F2 alpha
PGI2	Prostaglandine I2 (Prostacycline)
Protéine Gi	Protéine de couplage Gi (GTPase binding protein)
Protéine Gq	Protéine de couplage Gq
RAPA	Rapamycine
SEM	Standard error of the mean
SNP	Sodium nitroprussiate
T	Thrombine
TCAD	Transplant coronary artery disease
TNF	Tumor necrosis factor
TOR	Target of rapamycine
TXA2	Thromboxane A2
UK14304	Agoniste alpha2-adrénergique
vWF	Von Willbrand factor

## Remerciements

J'aimerais commencer par remercier mes directeurs de recherche, Dr Louis P. Perrault et Dr Raymond Cartier qui m'ont fait confiance dans cette entreprise de longue haleine. Merci pour leur support et le temps qu'ils ont consacré à me guider et me corriger.

Je ne peux passer sous silence l'extraordinaire relation de travail et d'amitié que j'ai eu avec Caroline Nickner (matante) qui m'a pris sous son aile pour m'apprendre les principes de base de la recherche fondamentale. Je ne te dirais jamais assez merci Caroline, sans toi, mon séjour au laboratoire aurait été très différent.

Merci aussi à toi Josie, ma super assistante de salle d'op et de chambre d'organe. Merci pour ta patiente et ton expérience malgré mes délires.

Merci à Nathalie et à Valérie pour leur aide lors de mes transplantations et de mes manipulations. Je vous garde une place spéciale dans ma mémoire.

Un gros merci à tous ceux qui m'ont rendu visite, entre deux chambres d'organe, pour m'encourager. Surtout la maîtresse des chats qui par ses sourires et son rire communicatif a su remonter le mien durant mes traversés du désert. Sans oublier le gros loup mélomane qui se terre dans les bas fonds du centre de recherche sans qui je n'aurais pas dit et fait autant de folles !

Merci pour la danse Julie, ma chef perfusionniste ! A charge de revanche !

En terminant, je laisse mes derniers remerciements à mes parents, ma sœur et Isabelle qui m'ont toujours encouragé dans mes longues études. Merci de tout cœur pour votre patience et votre amour. Je vais finir par avoir un vrai travail papa, ne t'inquiète pas.

## **Introduction**

### Fonction endothéliale normale

L'endothélium normal contribue à la régulation du tonus vasomoteur et au maintien d'une surface non thrombogénique, agit en tant que barrière sélective contrôlant la perméabilité et le transport des solutés et des macromolécules pour aider au métabolisme de plusieurs facteurs circulants dans le sang ou générés au niveau local et contribue au contrôle de la prolifération du muscle lisse sous-jacent et à la régulation de l'adhésion et de l'extravasation des neutrophiles, monocytes et lymphocytes. Ces propriétés sont dues à la capacité des cellules endothéliales de recevoir les stimuli hormonaux et hémodynamiques et sont soutenus par trois mécanismes de base : la sécrétion de facteurs dépendants de l'endothélium, l'expression à la surface membranaire des récepteurs de protéines de couplage, de molécules d'adhésion, et d'enzymes (enzyme de conversion) et les changements morphologiques. La découverte par Furchgott et Zawadzki du rôle obligatoire joué par les cellules endothéliales dans la relaxation d'organes isolés en réponse à l'acétylcholine a initié une quête scientifique majeure quant au rôle central de l'endothélium dans la fonction physiologique normale de la paroi vasculaire. Rapidement, il est devenu évident que la réactivité endothéliale était médiée par la libération de substances diffusibles (facteurs relaxants dépendants de l'endothélium, endothelium-derived relaxing factor [EDRF] et facteurs contractants [EDCF] ) par les cellules endothéliales. Parmi les substances vasoactives sécrétées par les cellules endothéliales qui entraînent des modifications aiguës du tonus des cellules

musculaires lisses, on retrouve le monoxyde de carbone, la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium.

### 1) Monoxyde d'azote

La substance labile et diffusible, non prostanoloïde, qui médie la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine décrite par Furchgott et Zawadzki (1) a été identifiée comme étant le monoxyde d'azote (NO). Celui-ci est formé à partir de la portion guanidine azote terminale de la L-arginine par une enzyme appelée NO synthase, qui est constitutive chez les cellules endothéliales normales. L'activation de cette enzyme dépend de la concentration intracellulaire d'ions calciques dans les cellules endothéliales, de la calmoduline, et requiert du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH4) pour son activité optimale. En plus de cette NO synthase constitutive ou endothéliale (eNOS), deux autres isoformes de cette enzyme sont connues : une forme inducible (iNOS) et une forme neuronale (nNOS). Ces enzymes peuvent être inhibées de façon compétitive par des analogues de la L-arginine tel que le N<sup>G</sup>-monométhyl. Le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine permet une inhibition sélective de la cNOS, alors que l'aminoguanidine inhibe de façon sélective la iNOS.

Le NO relâché diffuse vers le muscle lisse vasculaire et stimule une enzyme cytosolique, la guanylate cyclase soluble, qui entraîne une augmentation de la production de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Cette dernière est associée à l'inhibition de l'appareil contractile (Fig 1). La production de NO contribue de façon importante aux relaxations endothélium-dépendantes dans les grandes artères

isolées, incluant les artères coronaires, systémiques, mésentériques, pulmonaires et cérébrales. Sa contribution significative *in vivo* est suggérée par l'observation selon laquelle les inhibiteurs de la NO synthase causent une vasoconstriction dans la plupart des lits vasculaires et causent une augmentation de la pression artérielle systémique à la fois chez les animaux et les humains (3).

La cellule endothéliale sécrète le NO non seulement vers le muscle lisse vasculaire mais aussi dans la lumière du vaisseau sanguin. Dans des circonstances normales, la présence d'oxyhémoglobine dans les érythrocytes neutralise immédiatement le NO, qui a seulement un rôle physiologique à l'interface entre les cellules endothéliales et le sang. De ce fait, le NO inhibe l'adhésion plaquettaire à l'endothélium. Il agit (en synergie avec la prostacycline) afin d'inhiber l'aggrégation plaquettaire (3-7). Le NO inhibe également la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (8,9).

La production de NO est modulée par des stimuli humoraux et physiques. Parmi ces stimuli physiques, les forces de cisaillement causées par l'écoulement du sang le long des parois du vaisseau sont parmi les facteurs principaux qui régissent la production locale de NO. En effet, la vasodilatation secondaire au flot est dépendante de l'endothélium *in vivo* (10,11). Des études de bioassay ont démontré qu'une augmentation du débit et la pulsatilité stimulent la production de NO et de prostacycline par l'endothélium des vaisseaux perfusés (12). La vasoconstriction d'artères perfusées induites par l'élévation de la pression endoluminale peut être évitée par la production de NO, par contre, en présence d'une artère dénudé de son endothélium, celle-ci ne peut être évitée (production diminuée de NO) (13,14).

De nombreux médiateurs neurohumoraux peuvent entraîner la libération de NO par une activation de récepteurs endothéliaux spécifiques (Fig 2). Ces substances endogènes capables de stimuler cette relâche sont soit des hormones circulantes (cathécolamines, vasopressine), des autacoïdes générés au niveau de la paroi vasculaire (bradykinine, histamine) ou des médiateurs produits par les plaquettes (sérotonine, adénosine diphosphate [ADP] ), ou formés lors de la coagulation (thrombine) (4-6,15-21). Les récepteurs pour ces composés sont en relation avec la production de NO par différentes protéines de couplages (Fig 3). Les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, sérotoninergiques et thrombinergiques sont couplés à des protéines  $G_i$  sensibles à la toxine de la coqueluche, alors que pour l'ADP et la bradykinine, ces récepteurs médient la production de NO par l'activation de protéines  $G_q$  qui ne sont pas sensibles à la toxine de la coqueluche (22,23).

Du point de vue physiologique, ces substances produites durant l'aggrégation plaquettaire sont d'importants producteurs de NO. Lors de l'aggrégation plaquettaire, une relaxation dépendante de l'endothélium est induite, de plus, la présence d'endothélium inhibe de façon substantielle la vasoconstriction induite par le thromboxane A<sub>2</sub> et la sérotonine dérivée des plaquettes. Il existe deux médiateurs majeurs de la réponse endothéliale aux plaquettes : la sérotonine et l'adénosine diphosphate (ADP), qui agissent respectivement sur les récepteurs 5-HT<sub>1D</sub>-sérotoninergiques et Py-purinergiques (Fig 4). L'action endothéliale de la thrombine et des produits plaquettaires est cruciale pour le rôle protecteur joué par l'endothélium normal contre une coagulation inappropriée. De ce fait, l'aggrégation plaquettaire locale avec sa relâche inévitable de sérotonine et d'ADP, en plus de la production de thrombine

(reliée à l'activation locale de la cascade de la coagulation ) entraîne une libération locale de NO, qui diffuse vers le muscle lisse sous jacent, induit sa relaxation et donc la dilatation de l'artère. Cette réaction aide à éliminer les microaggrégats. La libération de NO dans la lumière du vaisseau inhibe également l'adhésion plaquettaire au niveau de l'interface endothélium-sang et, en synergie avec la prostacycline, et rétroagit négativement sur l'aggrégation plaquettaire, éliminant le danger d'occlusion vasculaire. Par ailleurs, la barrière endothéliale prévient le contact direct entre les substances vasoconstrictrices dérivées des plaquettes (surtout la thromboxane A2 et la sérotonine) et le muscle lisse vasculaire. Par conséquent si la barrière endothéliale est supprimée, suite à un traumatisme à titre d'exemple, il y a interruption de la rétroaction négative sur l'aggrégation plaquettaire par le NO (et la prostacycline). L'aggrégation plaquettaire se poursuit par la libération constante de sérotonine et de thromboxane A2, qui vont toutes deux, en l'absence d'endothélium, avoir un accès illimité au muscle lisse vasculaire. Le muscle lisse se contracte et le vaisseau s'occlut pour constituer la phase vasculaire de l'hémostase (4,6,18,24).

## 2) Prostacycline

La prostacycline, qui est un des principaux dérivés de la cyclooxygénase vasculaire, est formée principalement au niveau des cellules endothéliales mais peut aussi être produite par la média et l'adventice en réponse aux forces de cisaillement, à l'hypoxie et à plusieurs médiateurs qui entraîne la libération de NO. La prostacycline provoque une relaxation du muscle lisse vasculaire en activant l'adénylate cyclase et en augmentant la production de 3'-5' adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Dans la plupart des vaisseaux, la contribution de la prostacycline à la relaxation dépendante de

l'endothélium est négligeable, et ses effets sont essentiellement additifs à ceux du NO. Cependant, les deux substances agissent en synergie pour inhiber l'aggrégation plaquettaire. (7,25)

### 3) Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Des études électrophysiologiques de diverses artères, incluant les coronaires humaines, ont démontré que l'acétylcholine et d'autres dilatateurs dépendants de l'endothélium causent une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium qui est dûe à un facteur diffusible dérivé de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarizing factor [EDHF] ) qui est différent du NO et de la prostacycline (26-29). La nature chimique de l'EDHF demeure matière à spéculation. Dans certains vaisseaux, les acides époxyeicosatriénoïques, formés par l'acide arachidonique sous l'action du cytochrome P-450 pourraient correspondre à l'EDHF (27,30).

L'hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire induite par l'EDHF est médiée par une augmentation de mouvement des ions potassiques. Le type exact de canaux potassiques impliqué dans ce phénomène reste indéterminé mais ces canaux sont probablement plus du type calcium-dépendants qu'ATP dépendants (31). Libération d'EDHF, comme celle du NO, requiert une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium au niveau des cellules endothéliales.

La contribution de l'hyperpolarisation à la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium varie en fonction de la taille de l'artère et est plus importante dans les vaisseaux de résistance (29,30). Dans les artères de grand calibre, les deux médiateurs contribuent aux relaxations dépendantes de l'endothélium, mais le NO prédomine dans en situation normale. Néanmoins, dans ces artères, l'EDHF peut médier des relaxations



dépendantes de l'endothélium quasi normales lorsque la synthèse de NO est inhibée (32). Cette préservation peut être importante pour la régulation du tonus vasculaire en situation pathologique lorsque la production de NO ou son activité sont diminuées.

#### 4) Facteurs contractant dérivés de l'endothélium

Dans certaines circonstances, l'endothélium peut initier une vasoconstriction par la libération de substances diffusibles (33-36). Les contractions dépendantes de l'endothélium peuvent s'expliquer par le retrait de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) ou par la libération de substances diffusibles vasoconstrictrices (EDCF). Les EDCF identifiés jusqu'à présent incluent l'anion superoxide (qui agirait en neutralisant le NO (37)), les endoperoxides, la thromboxane A2 et l'endothéline-1. Ce dernier est plus susceptible de jouer un rôle important dans la modulation à long terme du tonus vasculaire et de la structure plutôt que dans la régulation momentanée du degré de vasoconstriction du muscle lisse (38-42). Les stimuli pour la vasoconstriction dépendante de l'endothélium incluent l'hypoxie, les stimuli physiques tels que la pression et l'étirement ainsi que de nombreux médiateurs neurohumoraux.

#### Endothélium régénéré

Le processus normal de vieillissement induit une destruction puis une régénération des cellules endothéliales, phénomène qui altèrera la fonction endothéliale. Ces cellules régénérées ont perdu une partie de leur capacité à libérer des EDRF en particulier en réponse à l'aggrégation plaquettaire et à la thrombine. Cette conclusion repose sur des études animales *in vivo* dans lesquelles la régénération et les caractéristiques des réponses dépendantes de l'endothélium ont été évaluées après la

dénudation de celui-ci (43-44). La régénération de l'endothélium est satisfaisante mais l'endothélium régénéré n'est plus capable de prévenir les contractions induites par l'aggrégation plaquettaire. En effet, l'endothélium régénéré a une réponse altérée à la sérotonine et à d'autres substances utilisant la voie sensible à la toxine de la coqueluche (protéine Gi) qui contrôle la libération d'EDRF. Dans les cellules endothéliales régénérées en culture, l'expression des protéines Gi est normale mais leur activité réduite. La perte de cette réponse sensible à la toxine de la coqueluche est sélective et ne s'applique pas aux réponses dépendantes de l'endothélium à l'ADP ou à la bradykinine. La zone d'endothélium régénérée devient un site de prédilection pour l'amorce de vasoconstriction exagérée en réponse à la sérotonine (45).

La perte de la protection normale de vaisseaux par l'endothélium provoque la perte de la capacité de se protéger contre les produits des plaquettes qui a pour effet de favoriser un épaississement de l'intima secondairement à la prolifération des cellules musculaires lisses par la perte de l'action inhibitrice du NO et la présence de facteurs de croissance plaquettaires (platelet-derived growth factor [PDGF]). Cet épaississement de l'intima a pour effet d'augmenter la distance à parcourir pour le NO pour rejoindre les muscles lisses, ce qui diminue davantage son effet protecteur. De plus, la diminution de production de NO favorise l'adhésion des monocytes, qui sont des composants importants des plaques athéromateuses (source de facteurs de croissance).

Dans les pages qui vont suivre une description de l'athérosclérose précoce de greffon cardiaque et de sa relation avec la dysfonction endothéliale sera discutée. Divers facteurs ont été impliqués dans le développement de cette atteinte vasculaire. Une description plus détaillée de deux facteurs étudiés dans le cadre de ce projet de maîtrise,

soit l'activation de iNOS lors des épisodes de rejet aigu et le rôle des agents immunosuppresseurs dans la dysfonction endothéliale, suivra pour compléter cette introduction.

### Athérosclérose précoce du greffon cardiaque et dysfonction endothéliale

La transplantation cardiaque reste la solution ultime à l'insuffisance cardiaque terminale avec une survie à 5 ans de 70 %. La survie prolongée après transplantation cardiaque reste limitée par la survenue d'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque qui demeure la première cause de mortalité au delà de la première année après la greffe. Cette maladie du greffon se manifeste par une forme unique et accélérée de la maladie coronarienne touchant les artères épicaudiques et intramyocardiques. Cette maladie vasculaire touche sélectivement le greffon, les vaisseaux natifs du receveur sont épargnés. Le développement rapide ou fulminant de cette forme d'athérosclérose à au cours de la première année post-greffe est associé à un mauvais pronostic de survie (46). Malgré une réinnervation partielle du greffon cardiaque, la plupart des receveurs ne peuvent ressentir des douleurs angineuses typiques associées avec l'ischémie et l'infarctus du myocarde. Les premières manifestations cliniques sont souvent des arythmies ventriculaires, de l'insuffisance cardiaque congestive, ou une mort subite. À 1, 2 et 4 ans, la survenue actuarielle de lésions coronariennes visibles à la coronarographie est de 11 %, 22 % et 45 % respectivement. L'épaississement intimal est détectable avec l'aide de l'échographie intravasculaire chez 75 % des greffons 1 an après la transplantation.

Les changements histologiques qui caractérisent l'athérosclérose précoce du greffon ne sont pas uniformes. L'examen pathologique d'artère coronarienne provenant de greffons cardiaques humains a démontré un spectre large d'anomalie, allant d'un épaissement intimal fibrotique et concentrique jusqu'à des plaques athérosclérotiques excentriques ressemblant à celle de la maladie coronarienne athérosclérotique secondaires aux facteurs de risques conventionnels, soit l'hyperlipidémie, l'hypertension artérielle, le diabète, le tabagisme (47). Il a été démontré que la prolifération intimale précoce progresse avec le temps et avec une augmentation progressive des dépôts lipidiques et des calcifications des vaisseaux coronariens (48). On retrouve souvent des dépôts d'athéromes et des accumulations intra et extracellulaires de lipides au niveau de l'intima et de la média (49). La lame élastique interne reste presque intacte à l'exception de quelques bris mineurs (48). Une évolution temporelle de cette atteinte a été décrite (50). Peu de temps après la transplantation un épaissement intimal fibreux diffus ou une vasculite prédominant. Par la suite, des plaques athérosclérotiques focales, un épaissement intimal diffus ou un mélange de ces deux lésions prédominent. Les petites branches sont souvent occluses avant celles de plus gros calibre, résultant en de petits infarctus disséminés (50). Malgré cette prolifération intimale, la média des vaisseaux est rarement épaissie. L'infiltrat cellulaire des lésions intimales est composé de cellules musculaires lisses, des macrophages/monocytes et de lymphocytes T (52).

L'apparition de cette forme particulière d'athérosclérose est d'origine multifactorielle. Le rejet chronique, l'hyperlipidémie, l'âge avancé du donneur, l'infection au cytomégalovirus, l'hypertension artérielle systémique et les agents immunosuppresseurs sont parmi les facteurs contributoires dans la période post-

opératoire. Une des hypothèses de recherche sur la pathophysiologie de cette atteinte implique une lésion endothéliale au cours de la préservation des greffons et de son implantation, ce qui amène une perte de la protection naturelle de la paroi vasculaire par l'endothélium.

La dysfonction endothéliale est un élément précoce dans le développement de l'athérosclérose accélérée du greffon (53-57). Le traumatisme chirurgical lors du prélèvement (58), les lésions d'ischémie-reperfusion des cellules endothéliales (59), l'agression immunologique du rejet aigu et chronique (58-60) et l'utilisation de la cyclosporine A ont tous été incriminés dans la dysfonction endothéliale survenant après la transplantation cardiaque. Dans les modèles porcins de rejet chronique, cette dysfonction débute par une atteinte de la biodisponibilité du NO utilisant la voie de transduction intracellulaire associée aux protéines de couplage Gi et progresse éventuellement vers une atteinte généralisée de la production de NO (53,54). Cette atteinte primaire de la voie des protéines Gi est identique à celle décrite dans l'hyperlipidémie et l'athérosclérose dans la population normale. La progression de l'hyperplasie intimale parallèle l'altération de la fonction endothéliale suggérant un rôle permissif de cette dysfonction dans le développement de la maladie du greffon. Une diminution de la production de EDRF favorise l'adhésion des leucocytes, des monocytes et l'aggrégation plaquettaire sur la paroi vasculaire. Ceci peut mener à des thromboses et accélérer l'apparition de l'athérosclérose. Les plaquettes activées, lors de l'aggrégation, sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines qui augmentent la prolifération des cellules musculaires lisses et leur migration, l'étape initiale dans le développement de l'hyperplasie intimale. L'effet mitogénique des facteurs de croissance plaquettaires sur

les cellules musculaires lisses est normalement contrebalancé par le NO, mais avec la diminution de la relâche de NO cet effet protecteur est perdu.

### Dysfonction endothéliale et iNOS

Le NO est synthétisé, tel que décrit plus haut, par l'enzyme de synthèse constitutive du NO (NO synthase (NOS)) présente dans toutes les cellules endothéliales. Trois isoformes de cette enzyme existent : NOS endothéliale (eNOS, constitutive), NOS inductible (iNOS) et NOS neuronale (nNOS). La forme endothéliale et constitutive sont normalement exprimés dans certaines cellules mais reste inactive tant que la concentration intracellulaire de calcium n'augmente pas. Les propriétés vasculaires du NO produit par la forme endothéliale ont été décrites plus haut. Le NO produit par la forme neuronale a des propriétés vasculaires mais aussi de neurotransmission. La forme inductible, par contraste, est absente dans les cellules au repos. Lorsqu'elle est activée, elle synthétise continuellement du NO et ce sans relation avec la concentration intracellulaire de calcium. L'iNOS peut être détectée dans de nombreux type cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, macrophages, neutrophiles) après exposition à des endotoxines, au facteur de nécrose tumoral (tumor necrosis factor) et d'autres cytokines (interféron-gamma, interleukine-2). La production de NO par iNOS est 100 fois plus élevée que celle de eNOS.

Plusieurs auteurs ont démontré que le NO produit, par l'expression de iNOS, lors du rejet cardiaque est un effecteur important dans le rejet aigu (61-63). Durant le rejet

aigu du greffon cardiaque, les cytokines relâchées peuvent induire la production de NO par l'iNOS.

L'ARN messager et la protéine sont induits durant les stades précoces du rejet et leur expression persistent pendant tout l'épisode de rejet non traité (61,64). En plus de l'induction de iNOS par les cytokines circulantes, il existe une autre voie d'activation via l'interaction entre la protéine de couplage CD40, présente à la surface des cellules présentatrices d'antigène (antigen presenting cell), des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, et le ligand de CD40 (gp39) exprimé par les lymphocytes T activés. Dès les premiers instants d'un épisode de rejet aiguë, l'iNOS est exprimée de façon prédominante dans les cellules inflammatoires infiltrantes qui envahissent les couches sous-endothéliales et périadventitielles. Cette expression est considérée comme un marqueur de l'activation des macrophages et du rejet aigu (65). Lors de l'apparition de la maladie athérosclérotique du greffon, l'expression iNOS est détectée dans les cellules musculaires lisses de la média et de la néointima (66). L'iNOS peut aussi être détectée dans les cellules endothéliales lors du rejet aigu (65).

Une interrogation persiste au niveau de l'effet d'une surproduction de NO. Le NO est une molécule effectrice produite par les macrophages activés (67); il peut agir comme agent cytotoxique et cytostatique en inhibant des enzymes cellulaires critiques à la respiration mitochondriale et à la synthèse d'ADN (3,67). Le NO peut se lier avec les anions superoxydes pour former des peroxy-nitrites (68), qui se décomposent à leur tour en différents réactifs, incluant les radicaux hydroxylés et le dioxyde d'azote, qui sont plus toxiques que le NO ou les anions superoxydes seuls (68). La production de peroxy-nitrites en relation avec la relâche excessive de NO et d'anions superoxydes peut donc être un facteur contribuant à la progression de la maladie vasculaire. Les lésions

cellulaires aux cellules endothéliales peuvent favoriser l'activation de l'endothélium et sa dysfonction, ce qui entraîne l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur la surface cellulaire, l'activation et la transmigration de leucocytes, ce qui favorise davantage les effets cytotoxiques du NO et du rejet aigu.

Un traitement continu avec l'aminoguanidine, un inhibiteur sélectif de iNOS, diminue significativement le rejet aigu des greffons cardiaques dans des modèles de greffe cardiaque chez le rat. L'inhibition de la production de NO par iNOS a prolongé la survie du greffon (61,63), a diminué la nécrose des myocytes et l'infiltration des cellules mononucléaires dans les stades plus avancés de rejet aigu (61), une prévention de la dysfonction contractile et électrophysiologique durant le rejet aigu (61,62) et une prévention de l'augmentation de la perméabilité de la microvascularisation dans le greffon cardiaque et le système vasculaire systémique (63). Ces données suggèrent un effet positif de l'inhibition de la surproduction de NO dans la phase aiguë de rejet.

Des études faites sur des modèles de rejet chronique avec des greffes aortiques suggèrent que l'inhibition de l'iNOS est associée avec une accélération du développement de l'hyperplasie intinale (69). Ces données furent confirmées en utilisant le même modèle de transplantation mais chez des souris knock-out déficientes en iNOS (70). Mise en commun, ces données suggèrent un rôle bénéfique de l'iNOS dans le rejet chronique pour la prévention de la progression de l'hyperplasie intinale. Par contre, puisque les études sur l'effet chronique de l'inhibition iNOS examinent seulement l'aspect intimal (fonction vasculaire) de la réponse à cette inhibition, aucune extrapolation de peut être faite au niveau de la fonction de l'organe (fonction parenchymateuse).



## Dysfonction endothéliale et agents immunosuppresseurs

Parmi les facteurs incriminés dans le développement de la dysfonction endothéliale post-transplantation cardiaque, on retrouve les agents immunosuppresseurs. Une description de quatre agents utilisés dans les régimes thérapeutiques actuels et leurs effets sur la fonction endothéliale suivront dans les prochaines pages.

### 1) Cyclosporine A

Avec l'introduction de la cyclosporine A (CSA) dans le régime immunosuppresseur, les résultats de transplantations d'organes se sont grandement améliorés. Par contre l'incidence de l'athérosclérose précoce du greffon n'a pas changé. La CSA est un peptide provenant du champignon *Beauveria nivea*, qui en liant la cyclophiline (un membre de la famille des *immunophilin-binding proteins*) mène à l'inhibition de la transcription du gène codant pour l'interleukine-2 (IL-2) en bloquant le signal de transduction, calcium-dépendant, via la calcineurine (Fig 5). La CSA inhibe aussi l'expression des récepteurs IL-2 sur la surface des lymphocytes T-helper et cytotoxiques. Ces deux actions mènent à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (71). Une des complications majeures associées à l'utilisation de CSA est l'hypertension artérielle. Différents mécanismes ont été suggérés pour expliquer cette complication. Elle pourrait être secondaire à une dysfonction vasculaire causée par un effet cytotoxique direct sur la cellule endothéliale (72,73), un effet contractile direct sur les cellules musculaires lisses (74-76), une atteinte de la relâche des EDRF (77-82), et une augmentation de la production d'endothéline-1 (73,83,84). Tous ces mécanismes peuvent favoriser le développement de l'athérosclérose précoce du greffon en favorisant

la vasoconstriction du vaisseau et en diminuant la protection de la paroi vasculaire contre l'agrégation plaquettaire.

## 2) Tacrolimus (FK506)

Le tacrolimus est un antibiotique de la famille des macrolides qui a été isolé du *Streptomyces tsukubaensis* qui partage plusieurs caractéristiques pharmacologiques avec la CSA. Il exerce ses propriétés immunosuppressives en se liant avec la protéine de liaison FK (FK-binding protein) pour former un complexe qui inhibe l'activité de la calcineurine comme la CSA (85,86) (Fig 5). Le FK506 est un immunosuppresseur plus puissant que CSA et cause moins de néphrotoxicité et d'hypertension artérielle (87). Différentes études ont examiné l'effet du FK506 sur la paroi vasculaire. Lorsque comparé à CSA, FK506 n'induit pas la relâche d'endothéline-1 par des cellules endothéliales en culture et n'a pas d'effet cytotoxique direct sur les cellules (73). Par contre, l'exposition à la CSA et le FK506 provoque une diminution significative de la relâche de prostacycline par des cellules endothéliales en culture. Weis et al. ont comparé l'effet de CSA et FK506 sur la fonction endothéliale de coronaires humaines après la transplantation cardiaque (88). Un an après la transplantation, une incidence augmentée de dysfonction endothéliale était notée chez les patients traités avec le FK506 comparativement à ceux traités avec la CSA, malgré que les patients du groupe CSA aient subi plus d'épisodes de rejet. Autre élément intéressant, une étude prospective a démontré l'absence de différence statistiquement significative dans l'incidence de lésions athérosclérotiques visibles à la coronarographie 4 ans après la transplantation entre un groupe de patient traité avec le FK506 et un autre traité avec la CSA (89).

### 3) Mycophénolate mofetil (MMF)

L'acide mycophénolique (MA) a été découvert en 1896 à partir d'une culture de *Penicillium* par Gosio. Le MA est un inhibiteur réversible, sélectif et noncompétitif de la voie de synthèse des purines de novo (Fig 5). Son effet final est d'inhiber la synthèse d'ADN (90-92). Au cours des années, des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antinéoplasiques et finalement immunosuppressives lui furent allouées. Le MMF est un composé semisynthétique qui fut développé pour avoir obtenu une forme plus biodisponible de MA, qui est rapidement hydrolysé in vivo pour former le MA. La plupart des lignées cellulaires sont capables d'utiliser la voie de recyclage des purines (salvage pathway) pour synthétiser de l'ADN, les lymphocytes, par contre, utilisent de façon préférentielle la voie de synthèse des purines de novo (93-94). Le MMF bloque la réponse lymphoproliférative aux agents mitogènes et aux alloantigènes, in vitro et in vivo, à des concentrations qui n'affectent pas de façon substantielle la prolifération des autres lignées cellulaires ou tissus non lymphoïdes (95-97). Dans différents modèles animaux et humains, le MMF prolonge la survie du greffon (98-101) et renverse le rejet aigu (100-104). Il inhibe également la prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales induites par des facteurs de croissance in vivo (105). Grogery et al. (106) ont démontré une régression de l'épaississement artériel avec l'utilisation du MMF chez le rat dans un modèle de lésion artérielle induite par le passage intraluminal d'un ballonnet. Cet effet antiprolifératif direct sur les cellules musculaires lisses in vivo pourrait retarder le développement de l'athérosclérose précoce du greffon. Dans une étude faite sur des préparations de cellules endothéliales de souris et de rats, l'exposition au MMF n'a pas affecté la production basale de NO mais a inhibé celle induite par l'exposition à diverses cytokines.

#### 4) Sirolimus (Rapamycine)

Le Sirolimus est un antibiotique similaire au FK506, qui est produit par le *Streptomyces hygroscopicus*, un streptomyces isolé d'un échantillon de terre provenant des Eastern Islands (Rapa Nui) (107-108). Il agit en se liant aux protéines de liaison FK, tout comme le FK506, pour former un complexe actif qui se lie au TOR (target of rapamycin) pour interrompre la voie de signalisation entre le récepteur de surface pour les cytokines et le cycle cellulaire (Fig 5). Ceci a pour effet de causer un arrêt du cycle cellulaire lors de la transition du stade G1 vers S. L'intérêt de la rapamycine dans un régime immunosuppresseur provient de son mécanisme d'action unique, son profil d'effets secondaires différents des agents précédents qui ne provoque pas de toxicité pour les différents organes, et son synergisme possible avec d'autres agents sans provoquer un recoupement des effets toxiques (109,110). Différentes études ont souligné les effets antiprolifératifs du sirolimus sur les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire (105,111-113) et son effet protecteur sur l'athérosclérose précoce du greffon au long terme dans des modèles de greffe cardiaque chez le rat (114). Peu de données existe sur l'effet du sirolimus sur la fonction endothéliale. Une étude rapporte une augmentation de la production de prostacycline par des cellules endothéliales en culture lorsque exposées au sirolimus (115). Un autre groupe a évalué l'effet aigu du sirolimus sur la réponse vasomotrice d'anneau aortique de rat (116). Une réponse vasodilatatrice, dépendante de l'endothélium, fut démontrée de façon dose-dépendante avec l'exposition aiguë au sirolimus.

**THE EFFECT OF iNOS INHIBITION ON ENDOTHELIAL  
FUNCTION OF CORONARY ARTERY IN ACUTE REJECTION**

H. JEANMART, P. DEMERS, L. P. PERRAULT AND R. CARTIER

*Research Center, Department of Surgery , Montreal Heart Institute, and  
Department of Pharmacology, University of Montreal, Quebec, Canada*

## Abstract

**Background:** During acute cardiac rejection, the inducible form of nitric oxide synthase, iNOS, is activated. The massive nitric oxide produced by iNOS has been associated with structural lesions to the myocardium and the vascular endothelium. Few data exist on the effect of iNOS inhibition on the endothelial function during acute rejection. This study evaluates the effect of iNOS inhibition on coronary endothelium function during acute rejection.

**Methods:** Using a model of canine heterotopic cardiac transplantation, we evaluated the effect of iNOS inhibition by aminoguanidine, a specific iNOS inhibitor, during the first 24 hours of reperfusion after heart transplantation. Coronary endothelial function was studied in standard organ chamber after heart explantation. Three groups of dogs were used, one group of dogs served as control, one group was transplanted and treated for 24 hours by continuous infusion of aminoguanidine and one group was transplanted but not treated.

**Results:** Immunohistochemistry revealed the presence of iNOS in the endothelial cell in the two groups after transplantation. After 24 hours of acute rejection, there was a statistically significant decrease in endothelium-dependent coronary relaxation to thrombin compared to the control group in the treated and non-treated group. There was a statistically significant increase in relaxation to l-arginine in the non-treated group but not in the control and treated group confirming the efficacy of iNOS inhibition.

**Conclusion:** iNOS inhibition does not affect the endothelial function of epicardial coronary arteries during the first phase of acute rejection. The presence of iNOS could compensate for a deficient constitutive nitric oxide synthase.

Heart transplantation remains the preferred treatment of terminal cardiac failure with a 5-year survival rate of 70% because of the development of graft coronary artery vasculopathy which eventually leads to silent infarcts, graft failure and sudden death with no efficacious treatment currently available (1, 2). Coronary endothelial dysfunction, as seen in peripheral vascular disease and hypertension, contributes to the development of atherosclerosis and is a precursor in humans of the development of intimal hyperplasia and is associated with an adverse outcome (3). Numerous factors may trigger the endothelial dysfunction (4, 5) after transplantation, including cellular and humoral rejection, hyperlipidemia, cytomegalovirus reactivation, the exposure to cardioplegic arrest (7), cold ischemia (6), preservation solutions (8), reperfusion at the time of implantation (9-12) and the use of immunosuppressive drugs. These injurious agents may cause a pathological activation of the endothelium with an attendant loss of its regulatory properties on the homeostasis of the vascular wall which is achieved, under normal conditions, by the release of endothelium-derived relaxing factors (EDRF) such as nitric oxide (NO), prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Under pathological conditions, the endothelium may also release endothelium-derived constricting factors (EDCF) such as the superoxide anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), endoperoxides, thromboxane  $\text{A}_2$  and endothelin-1 which may contribute to the development of atherosclerosis by inactivating EDRFs or by a direct effect on the vascular wall.

NO is produced by nitric oxide synthase (NOS). Three isoforms of NOS exist: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), and inducible NOS (iNOS). The constitutive isoforms eNOS and nNOS are normally expressed in certain cells but are

inactive until calcium concentrations rise. In contrast, iNOS is normally absent from resting cells, but when it is induced, it continually synthesizes large amounts of NO. During acute cardiac allograft rejection, cytokines are released that could induce iNOS. Cells that express iNOS during acute rejection include cardiac myocytes, inflammatory cells and endothelial cells. (13-15). NO produced in large amount by iNOS can become cytotoxic when combining with superoxide anion to form peroxynitrite (16), a strong oxidant that damage cellular proteins by nitration of tyrosine residues to form nitrotyrosine (17). Cellular damage to endothelial cells can further promote endothelial activation and dysfunction, leading to the expression of adhesion molecules, activation and transmigration of leukocytes, further promoting the cytotoxic effect of NO and acute rejection. Ischemia and reperfusion-induced activation of endothelial cells can also induce the expression of adhesion molecules on the endothelial cells and the expression of iNOS. Aminoguanide (AMG), a selective iNOS inhibitor (18), significantly attenuates acute rejection, prolongs graft survival (19), prevents the increase in microvascular permeability and the decrease in contractile function of the allograft heart (18-21), reduces myocyte necrosis and the mononuclear cellular infiltrate in the later stages of acute rejection (19).

Previous studies from our laboratory have demonstrated induction of iNOS in a model of canine heart transplantation after 24 hours. This study was designed to evaluate the effect of early iNOS inhibition on the endothelial function of epicardial coronary arteries in a canine heterotopic heart transplantation model.



## MATERIAL AND METHODS

**Animal care.** Experiments were performed with heartworm-free mongrel dogs of either gender (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). The Montreal Heart Institute ethical committee on animal care approved all procedures used in this study.

**Heterotopic heart transplantation technique.** Donors and recipients were anaesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg iv). 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 iv), the distal innominate artery was clamped and the proximal portion was cannulated with a catheter positioned in the ascending aorta for perfusion of the cardioplegic solution. Then, the aortic arch was clamped between the innominate artery and the left common carotid artery; rapid diastolic arrest was achieved with the administration of cold (4°C) crystalloid cardioplegic solution (Na<sup>+</sup> 130 mmol/L; Cl<sup>-</sup> 129 mmol/L; K<sup>+</sup> 24 mmol/L; Ca<sup>++</sup> 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 re-established with direct defibrillation (10 to 20 Joules) as needed. At the time of reperfusion, aminoguanidine (AMG) was given, following the dosage used by Oyama et al (22), at 100 mg/kg over 15 minutes intravenously and then in perfusion at 10 mg/kg/kg for 24 hours. Meticulous haemostasis was achieved and a subcutaneous pocket was dissected to place the allograft. The wound was then closed in two layers using nonabsorbable sutures.

*Postoperative.* After extubation, the animals were left to recover in a temperature-controlled room and their diet resumed with standard dog chow ad libitum.

At the end of the experiment, transplanted animals were anaesthetized 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; MgSO<sub>4</sub> 1.2; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.22; CaCl<sub>2</sub> 1.3; NaHCO<sub>3</sub> 25; and dextrose 15. In the control dogs, after anaesthesia 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.

*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 the first phase of acute rejection on the endothelial function of epicardial coronary arteries. In the second group (n=7), the animals underwent heterotopic heart transplantation and were treated with aminoguanidine for 24 hr. After 24 hr, the animals were sacrificed and endothelial function studies were done. A group of unoperated dogs (n=7) was used as control group.

*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. 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% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. 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<sup>-5</sup> 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 contraction with prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L) to achieve a contraction averaging 50 to 80% of the maximal contraction. Responses to acetylcholine ( $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  mol/L) and substance P ( $10^{-12}$  to  $10^{-9}$  mol/L) both receptor-dependent agonists and the calcium ionophore A23187 ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  mol/L), a receptor-independent endothelium-dependent agonist, were compared between the groups to evaluate the in vitro activity of the endothelial constitutive NO synthase. 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-HT<sub>2</sub> receptors, UK14304 ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  mol/L) an  $\alpha_2$ -adrenergic agonist, thrombin ( $10^{-3}$  to 1 unit/ml), and bradykinin ( $10^{-10}$  to  $10^{-7}$  mol/L) were compared between the groups to evaluate the intracellular G-protein mediated signalling pathways. Response to L-arginine ( $10^{-7}$  to  $10^{-3}$  mol/L) was compared between the groups to evaluate the presence of iNOS. At the end of the experiments, endothelium-independent relaxations were studied using sodium nitroprusside (SNP  $10^{-5}$  mol/l, a NO donor). 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, the right and left ventricles were fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. 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 using a monoclonal anti-vonWillebrand factor (vWF) antibody (Vector Laboratories). After deparaffinization and blockade of endogenous peroxidase activity, the primary antibody was applied for 60 minutes with 1% goat serum in phosphate-buffered saline as diluent. An equivalent concentration of non-specific mouse IgG (bio/can scientific) was used as control. Then, a biotinylated goat anti-mouse (Vector Laboratories) 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 (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 and rinsed in distilled water.

*Statistical analysis.* Contractions to PGF $2\alpha$  are expressed as a percentage of the maximal contraction to potassium chloride (60 mmol/liter) for each group and expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM); "n" refers to the number of animals studied. Relaxations are expressed as a percentage of the maximal contraction to PGF $2\alpha$  for each ring. ANOVA studies were performed to compare concentration-response curves. Differences were considered to be statistically significant when  $P < 0.05$ .

*Drugs.* All solutions were prepared daily with nanopure water except indomethacin, which was initially dissolved in NaHCO $_3$  ( $10^{-5}$  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, substance P, serotonin, ketanserin, UK14304, thrombin, bradykinin, prostaglandin F<sub>2α</sub>, sodium nitroprussiate and indomethacin were all purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

## **Results**

### **Histologic studies**

After 24 hours of reperfusion, focal ischemic necrosis and rare perivascular lymphocytes were found in allografted hearts. All the allografts showed a grade I or II rejection according to the International Society for Heart and Lung Transplantation classification. There was no difference between the two transplanted groups.

### **Immunohistochemical studies**

Immunoperoxidase studies showed preserved endothelium lining expressing vWF, used as a marker for endothelial cell coverage, in the control group. However, zones of endothelial denudation were observed in all allografts with residual endothelial cells expressed vWF on their surface (data not shown).

The endothelial cells of coronary arteries of the two transplanted group showed expression of iNOS. No iNOS expression was found in myocytes. iNOS was not expressed in endothelial cells and myocytes in the control group.

## **In vitro studies**

### *Endothelium-independent contractions*

There were no statistically significant differences in maximal contractions to potassium chloride between the control group and the allografted hearts. Similarly, maximal contractions to prostaglandin F<sub>2α</sub> were not statistically significant in the three groups (data not shown).

### *Endothelium-dependent relaxations*

Relaxations to serotonin and UK, both agonists binding to the receptors coupled to the Gi-proteins, were not different between the three groups. Relaxations to thrombin, another agonist binding to the Gi-proteins, were impaired in the two groups of allografts. This difference between the two groups and the control group was statistically significant. (Fig 1)

Relaxation to BK and SP, both agonists binding to the Gq-proteins, were not statistically significant in the three groups.

There was no relaxation associated with L-arginine in the control group and in the AMG group, suggesting an efficacious inhibition of iNOS in our model. Relaxations to L-arginine were statistically significantly enhanced in the untreated group demonstrating the presence of a functional iNOS in the allograft (Fig 2).

There was no statistically significant difference between relaxations to acetylcholine in the three groups, but, there was a trend toward an impairment of relaxations to acetylcholine in the AMG group (Fig 3).

Relaxations to calcium ionophore A23187 were statistically significantly enhanced in the AMG group but not in the two other groups.

#### *Endothelium-independent relaxations*

No impairment in the relaxation to sodium nitroprussiate was seen in the three groups.

## **Discussion**

Heart transplantation is still the preferred treatment for end-stage cardiac failure yielding excellent early survival and improved functional status of patients. The major limiting factor to long-term survival is the development of graft coronary atherosclerosis. The pathogenesis of this accelerated form of coronary atherosclerosis is multifactorial. Chronic rejection, hyperlipidemia, advanced donor age, cytomegalovirus infection and immunosuppressive drugs are among the contributing factors in the postoperative period.

The central role of the endothelial cell in the regulation of arterial tone and vascular wall homeostasis has been known since 1980 (3). Relaxation of coronary arteries occurs through both endothelium-dependent and endothelium-independent pathways (4, 5). The release of endothelium-derived relaxing factors is activated by receptors linked to NO synthase by either pertussis toxin-sensitive ( $G_i$ ) and insensitive ( $G_q$ ) G-proteins pathways (8, 9). Endothelium-dependent relaxation requires both the presence and functional integrity of the endothelial cells. This endothelial cell monolayer is easily



damaged by mechanical manipulation. Removal or damage of the endothelial cells has been shown to impair or obliterate endothelium-dependent arterial relaxations, and promote the development of intimal hyperplasia since the regenerated endothelium is dysfunctional with impaired relaxations, affecting initially the Gi-protein pathway leading to a decrease in NO release (6). NO has an inhibitory effect on platelets and leukocyte adhesion to the endothelium and acts synergically with prostacyclin to inhibit platelets aggregation to prevent thrombosis (23-26).

Endothelial dysfunction is an early event in the development of transplant coronary artery disease (TCAD) (10, 27-30). Mechanical trauma during harvesting, cardiac preservation solutions (31), ischemia-reperfusion injury of the endothelial cells (24), the use of CSA and rejection have all been incriminated in the endothelial dysfunction occurring after heart transplantation (24, 31, 32). This dysfunction begins with a malfunction of the signal transduction pathway involving the Gi-protein dependent pathway and later progresses to a generalized loss of NO activity (10, 27). This dysfunction of the Gi-protein pathway is similar to the one associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. Progression of the associated intimal hyperplasia parallels the alteration in endothelial dysfunction suggesting a permissive role of the dysfunction for the development of this accelerated form of coronary atherosclerosis. A decreased production of EDRF promotes the adhesion of leukocytes and monocytes and aggregation of platelets on the vascular wall. This can lead to thrombosis and accelerate the appearance of atherosclerosis. The aggregating platelets secrete growth factors and cytokines that enhance smooth vascular muscle cell proliferation and migration, the initial step in the development of intimal hyperplasia.

Several authors have demonstrated that NO produced by expression of iNOS in the rejecting heart, is an important effector molecule in acute cardiac allograft rejection (19-21).

iNOS mRNA and protein are induced during the early stages of acute rejection and expression persists throughout the unmodified rejection process (19,33). Induction of iNOS is secondary to cytokines such as TNF-alpha, interleukin-1, interferon-gamma, which are present in the rejecting heart (34) and induce iNOS expression in other models (35). Another immunologically mediated pathway might play an important role in the induction of iNOS in the cardiac allograft, namely the interaction between CD40, present on the surface of antigen presenting cells, endothelial cells, and SMCs, and the CD40 ligand (gp39) expressed by activated T-lymphocytes. Early on, iNOS is expressed predominately in the infiltrating inflammatory cells that invade the subendothelial and periadventitial layers, and is considered to be a marker of both macrophage activation and acute cellular rejection (36). In the later stage of graft coronary vasculopathy, iNOS expression can be detected in the VSMC of the medial and neointimal layers (37). iNOS can also be found in endothelial cells during acute cardiac allograft rejection (36).

The question that arises is whether the potentially cytotoxic actions of NO or its secondary reaction products perpetuate the pathogenesis of allograft arteriosclerosis or whether the antiatherogenic properties of NO can suppress the development of neointimal hyperplasia and impede the development of chronic rejection in cardiac allografts (38). NO is a primary effector molecule produced by activated macrophages (39), it can act as a cytotoxic and cytostatic agent through the nitrosylation and inhibition of cellular enzymes critical to mitochondrial respiration and DNA synthesis (35,39). NO can react with superoxide to form peroxynitrite, which in turn decomposes

into various reactive species, including hydroxyl radical and nitrogen dioxide, that are more toxic than NO or superoxide alone (16). The generation of large amount of peroxynitrites consequent to increased levels of NO and superoxide in atherosclerotic lesions might therefore be a factor contributing to the progression of the disease.

Maintenance treatment of cardiac allograft recipients with aminoguanidine, a selective inhibitor of iNOS, significantly attenuated acute rejection of cardiac allografts. Inhibition of NO production by iNOS resulted in prolonged graft survival (19,40), reduced myocyte necrosis and mononuclear cellular infiltrate in the later stages of acute rejection (19), prevention of myocardial contractile and electrical dysfunction during early rejection (19,20), and prevention of increased microvascular permeability in the allograft heart and systemic vasculature (21). These data suggest a positive effect of the inhibition of iNOS in the early phase of acute rejection.

Chronic studies done in a chronic setting suggest that inhibition of iNOS is associated with an acceleration of the development of intimal hyperplasia (38) in a model of rat aortic allograft transplantation. These data were confirmed in the same model of transplantation done with knock-out mice for iNOS (41). Taken together these data suggest a beneficial role of iNOS in chronic rejection for the prevention of intimal hyperplasia. Since the effect of chronic iNOS inhibition were only studied on the intima, these findings cannot be extrapolated to the actual function of the organ.

Few data exist on the effect of iNOS inhibition on the endothelial function. The data obtained in this study suggest that in the first phase of acute rejection, the inhibition of iNOS was effective in our model since no endothelium-dependent relaxation were associated with the exposure to L-arginine in the treatment group. The iNOS expressed is functionally active since a relaxation was induced in the group without treatment with

AMG. An impaired response to thrombin was seen in the two transplant groups, without impairment of the others agonists associated to the Gi-protein pathway, suggesting a dysfunction of the thrombin receptor or its intracellular transduction pathway, or a down regulation of the receptor. The Gq-protein pathway wasn't affected in this setting suggesting a selective endothelial dysfunction. Inhibition of iNOS in the first phase of acute rejection does not impair the endothelial function of epicardial coronary arteries, although a trend was seen in the study with acetylcholine towards an impaired response in the treatment group versus the control. This could suggest a transitional endothelial stunning after heart transplantation that is compensated by the function of iNOS since the relaxation to acetylcholine in the non-treated group was similar to the control group and since AMG is a selective inhibitor of iNOS and has no effect on the constitutive NOS. Taken together, these data suggest that iNOS is not responsible for the selective endothelial dysfunction seen in the first hours after transplantation and could even be associated with a better endothelial function. A longer period of observation is warranted to evaluate the effect of chronic iNOS inhibition on the endothelial function and on the progression of intimal hyperplasia.

The selective inhibition of iNOS could become a part of the therapeutic arsenal in case of acute rejection to prevent the toxic effect of the surproduction of NO without affecting the normal endothelial function. The effect of this short term treatment on the development of graft coronary artery vasculopathy would have to be evaluated. The selective inhibition of iNOS could also be useful in the case of establish rejection episode, as demonstrated earlier in animal model, to reverse the toxic effect of rejection.

## References

1. Billingham ME. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc* 1987;19(suppl5):19-25
2. Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, Charbonneau F, Ganz P, Selwyn AP, Anderson TJ. et al. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant; *Circulation* 1996; 93:457-462
3. Drexler H, Fischell TA, Pinto FJ, Chenzbraun A, Botas J, Cooke JP, Alderman EL. Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients. Relation to vessel wall morphology. *Circulation* 1994;89:1615-1623
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Eng J Med* 1986; 314: 488-500
5. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376
6. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3:2007-18
7. Lüscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990:1-228
8. Dolphin AC. Nucleotide binding proteins in signal transduction and disease. *Trends Neurosc* 1987;10:53-57
9. Flavahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations to certain agonists in porcine coronary arteries. *J Physiol* 1989;408:549-560
10. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8:28S-41S
11. Mugge A, Brandes RP, Heublien B, Nolte C, Haverich A, Lichtlen PR. Endothelial dysfunction in heart transplanted patients with graft vasculopathy. *Eur. Heart J* 1995; 16 (SupplJ):78-83
12. Rickenbacher PR, Pinto FJ, Lewis NP, Hunt SA, Alderman EL, Schroeder JS, Stinson EB, Brown BW, Valentine HA. Prognostic importance of intimal

- thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation. *Circulation* 1995;92:3445-3452
13. Hruban RH, Beschoner WE, Baumgartner WA. Accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients is associated with a T-lymphocyte mediated endotheliatis. *Am J Pathol* 1992; 137: 871-882
  14. Yang X, Chowdhury N, Cai B, Brett J, Marboe C, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection *J Clin Invest* 1994; 714-721
  15. Lancaster JR, Langrehr JM, Bergonia HA, Murase N, Simmons RL, Hoffman RA. EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. *J Biol Chem* 1992; 267: 10994-10998
  16. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-24
  17. Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woerd M, Smith C, Chen J, Harrison J, Martin JC, Tsai M. Kinetics of superoxide dismutase and iron catalysed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 438-445
  18. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J pharmacol* 1993; 223: 119-25
  19. 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
  20. Worrall NK, Pyo RT, Alexander DG, Misko TP, Lazenby WD, Ferguson TB. Nitric oxide mediates myocardial contractile and electrophysiological dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Surg Forum* 1995; 46: 239-41
  21. 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

22. Oyama Ji, Shimokawa H, Momii H, Cheng X, Fukuyama N, Arai Y, Egashira K, Nakazawa H, Takeshita A. Role of nitric oxide and peroxynitrite in the cytokine-induced sustained myocardial dysfunction in dogs. *J Clin Invest* 1998; 101 (10): 2207-14
23. Madsen JC, Sachs DH, Fallon JT, Weissman NJ. Cardiac allograft vasculopathy in partially inbred miniature swine. I. Time course, pathology, and dependence on immune mechanisms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:1230-1239
24. Gaudin PB, Ryburn BK, Hutchins et al. Peritransplant injury to the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1994; 18:338-346
25. Veinot JP, Walley VM. Cardiac transplant arteriopathy. *Am J Surg Pathol* 1995;19:727-734 (Letter).
26. Anderson TJ, Meredith IT, Uehata A, Mudge GH, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC. Functional significance of intimal thickening as detected by intravascular ultrasound early and late after cardiac transplantation. *Circulation* 1993;88:1093-1100
27. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of the endothelial pertussis toxin-sensitive G-protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83: 652-60
28. Sabate M, Manito N, Cequier A, et al. Acute rejection, cytomegalovirus infection and endothelial dysfunction early after heart transplantation. *Transplant Proceed* 1995; 27: 2346-8
29. Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, Carrier M, Leung M. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 404-8
30. Hruban RH, Kasper EK, Gaudin PB, et al. Severe lymphocytic endothelialitis associated with coronary artery spasm in heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 42-7
31. Drinkwater DC, Rudis E, Laks H et al. University of Wisconsin versus Stanford Cardioplegic solution and the development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 891-896

32. Fullerton DA, Mitchell MB, McIntyre RC Jr., et al. Mechanisms of coronary vasomotor dysfunction in the transplanted heart. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 86-92
33. Worrall NK, Misko T, Sullivan PM, Hui JJ, Ferguson TB. Inhibition of inducible oxide synthase attenuates establish acute cardiac allograft rejection *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 378-85
34. Wu CJ, Lovett M, Wong-Lee J et al. Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts. *Transplantation* 1992; 54: 326-32
35. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
36. Yang X, Chowdhury N, Cai B, Brett J, Marboe C, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection *J Clin Invest* 1994; 714-721
37. Russell ME, Wallace AF, Wyner LR, Newell JB, Karnovsky MJ. Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation* 1995; 92: 457-64
38. Shears LL, Kawarahada N, Tzeng E, Billiar TR, Watkins SC, Kovesdi I, Lizonova A, Pham SM. Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis. *J Clin Invest* 1997; 100: 2035-42
39. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169: 1543-55
40. 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
41. Koglin J, Troels GJ, Mudgett JS, Russell ME. Exacerbated transplant arteriosclerosis in inducible nitric oxide-deficient mice. *Circulation* 1998; 97: 2059-65



## Figures legends

Figure 1 : Cumulative concentration-response curve to thrombin in rings of canine coronary arteries with endothelium. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 2 : Cumulative concentration-response curve to L-arginine in rings of canine coronary arteries with endothelium. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 3 : Cumulative concentration-response curve to acetylcholine in rings of canine coronary arteries with endothelium. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

FIGURE 1

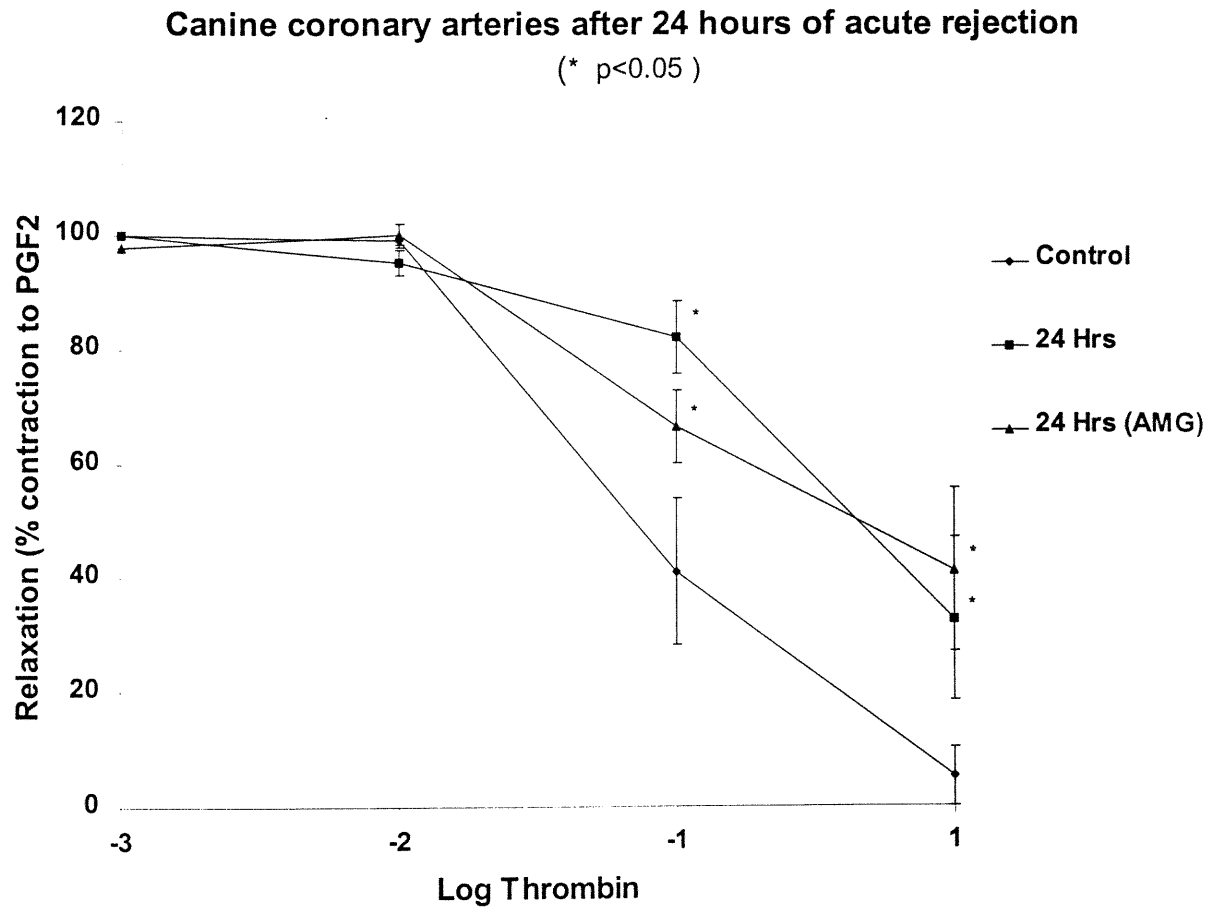


FIGURE 2

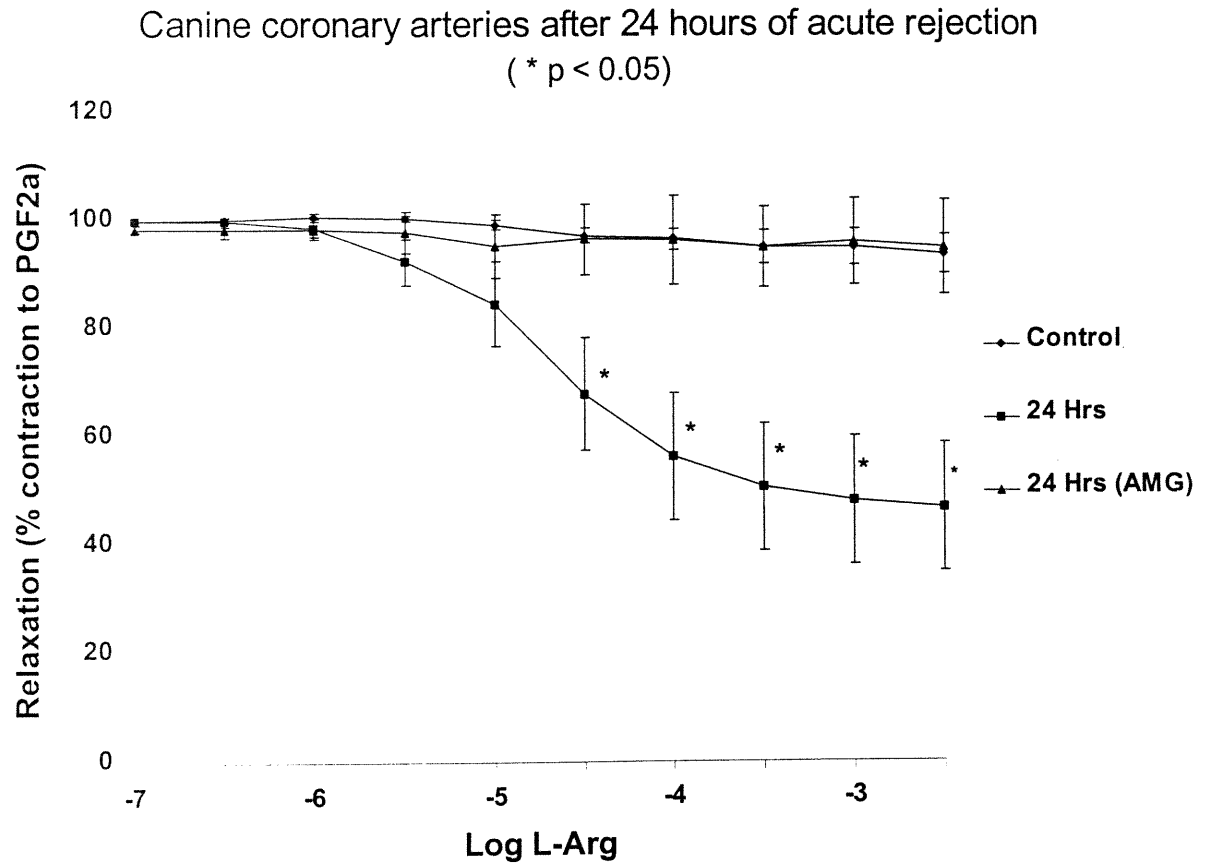
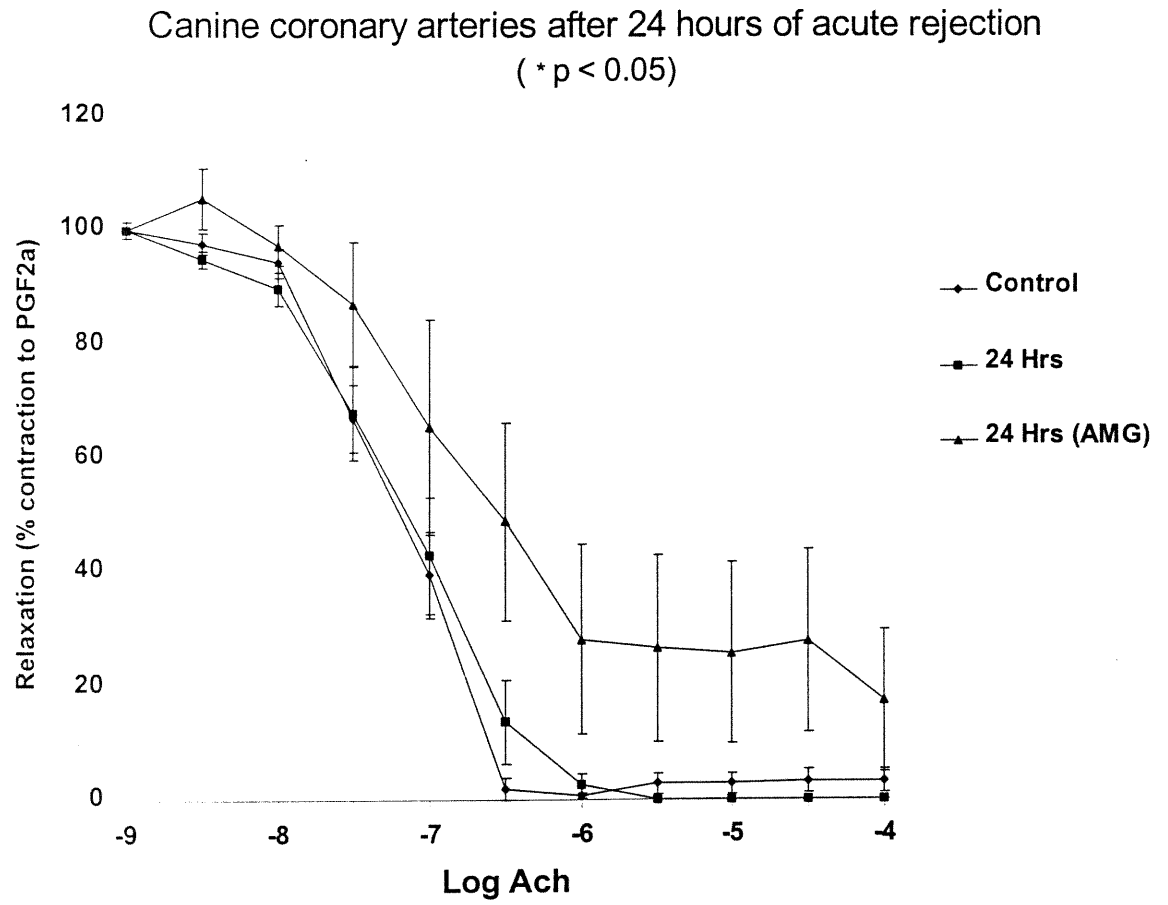


FIGURE 3



**COMPARATIVE STUDY OF CYCLOSPORIN A AND  
TACROLIMUS VERSUS NEWER IMMUNOSUPPRESSANTS MMF  
AND RAPAMYCIN ON CORONARY ENDOTHELIAL FUNCTION**

HUGUES JEANMART<sup>1</sup>, CAROLINE NICKNER<sup>1</sup>, NATHALIE DESJARDINS<sup>1</sup>, OLIVIER MALO<sup>1</sup>,  
MICHEL CARRIER<sup>1</sup>, LOUIS P. PERRAULT<sup>1-2</sup>

*Research Center, Department of Surgery , Montreal Heart Institute, and  
Department of Pharmacology, University of Montreal, Quebec, Canada*

---

<sup>1</sup> Research Center, Department of Surgery , Montreal Heart Institute.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, University of Montreal.

## Abstract

**Background:** Endothelial dysfunction contributes to the development of intimal hyperplasia in transplanted hearts by decreasing the protective effects of endothelial-derived nitric oxide (NO). Immunosuppressive drugs may increase the dysfunction caused by rejection and further accelerate the development of graft coronary vasculopathy. This study compared the effect of Cyclosporin A and Tacrolimus vs two newer immunosuppressive drugs, mycophenolate mofetil (MMF) and sirolimus, on coronary endothelial function.

**Methods:** An in vitro model of drug incubation in Krebs-bicarbonate solution (4°C, 48 hours) with porcine epicardial coronary arteries was developed. Coronary endothelial function studies were performed in organ chamber experiments after incubation with cyclosporin A, tacrolimus, MMF ( $10^{-4}$ ,  $10^{-7}$  mol/liter), sirolimus ( $10^{-7}$ ,  $10^{-11}$  mol/liter), and their vehicles to assess their effect on the G-protein mediated vasorelaxations leading to the release of NO.

**Results:** Exposure to cyclosporin and MMF was associated with a dose-dependent decrease in endothelium-dependent relaxations to serotonin (an agonist that binds to receptors coupled to Gi-protein) but no impairment of relaxations to bradykinin (an agonist that binds to receptors coupled to Gq-proteins). Exposure to tacrolimus and sirolimus caused a severe impairment of relaxations to serotonin and a lesser one to bradykinin. Alterations of relaxations to the calcium ionophore A23187 were observed after exposure to MMF and RAPA.

**Conclusions:** These results suggest that cyclosporin and MMF induce a dysfunction of the vasorelaxing properties of the endothelium that may lead to a decrease in the protective effects of NO on the vascular wall but still have a more favorable vascular profile than tacrolimus and sirolimus.

Key words: Endothelium, transplantation, immunosuppressants

Heart transplantation remains the preferred treatment of terminal cardiac failure with a 5-year survival rate of 70% because of the development of graft coronary vasculopathy which leads to silent infarcts, graft failure and sudden death with no efficacious treatment currently available (1, 2). Coronary endothelial dysfunction, as endothelial dysfunction in peripheral vascular disease and hypertension, contributes to the development of atherosclerosis and is predictive in humans of the development of intimal hyperplasia and an adverse outcome (3). Numerous factors may trigger the endothelial dysfunction (4, 5) after transplantation, including cellular and humoral rejection, hyperlipidemia, cytomegalovirus reactivation, the exposure to cardioplegic arrest (6), cold ischemia (7), preservation solutions (8), reperfusion at the time of implantation (9 -12) and the use of immunosuppressive drugs. These injurious agents may cause a pathological activation of the endothelium with an attendant loss of its regulatory properties on the homeostasis of the vascular wall which is achieved, under normal conditions, by the release of endothelium-derived relaxing factors (EDRF) such as nitric oxide (NO), prostacycline (PGI<sub>2</sub>) and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Under pathological conditions, the endothelium may also release endothelium-derived constricting factors (EDCF) such as the superoxide anion (O<sup>2-</sup>), endoperoxydes, thromboxane A<sub>2</sub> and endothelin-1 which may contribute to the development of atherosclerosis by inactivating EDRFs or by a direct effect on the vascular wall. Numerous studies have described the toxic effect of cyclosporine A (CSA) on the vasomotor tone of coronary arteries in different species. Few data are available on the effects of other immunosuppressive agents on the vascular wall. The objective of the current study was to compare the effect of cyclosporin A, tacrolimus (FK506), and newer immunosuppressive drugs mycophenolate mofetil (MMF) and

sirolimus (RAPA) on coronary endothelial function. A model of endothelial dysfunction, without the need to apply a mechanical stress to create an area of denudation, was previously described by Villeneuve and al. (13). Their data showed an endothelial dysfunction in porcine coronary artery after a period of storage of 22 hours at 27<sup>0</sup> C but a normal endothelial function after 24 hours of storage at 4<sup>0</sup> C. Based on these data, an in vitro model of drug incubation in a Krebs-bicarbonate solution at 4°C for 48 hr with porcine epicardial coronary arteries was developed to study the effect of the different immunosuppressive drugs. Pilot studies done in our laboratory showed that the period of storage of normal porcine coronary artery could be extended to 48 hours at 4°C without affecting the endothelial function but a longer period of storage was detrimental (72 hours). Exposure to CSA for 24 hours at 4°C had no effect on the coronary endothelial function but when the exposure was prolonged to 48 hours an impairment in the endothelial function was seen, without a similar impairment of the endothelial function of the control group. The use of this incubation model allowed to isolate the effect of the immunosuppressive drugs on the endothelial function. The pig is also a well known valid model for most cardiovascular related studies.

## **MATERIAL AND METHODS**

*Animals.* Twenty-eight Landrace swine with a mean weight of 18.4±0.5 kg (range 14.7 to 24.1 kg) were used for investigation of the effects of the exposure to immunosuppressive drugs. Four groups were used, one for each drug (CSA, FK506, MMF and RAPA). All animals received humane care in compliance with the recommendations of the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by



the Canadian Council on Animal and the guidelines of the Animal Care, and were approved by a local committee.

*Anesthesia and surgical technique.* Anesthesia was induced with intramuscular mixture injection of ketamine (20 mg/kg; Rogarsetic, Montreal, QC, Canada) and xylazine (2 mg/kg; Rompun, Toronto, ON, Canada). Swines were artificially ventilated with an O<sub>2</sub>/air mixture (3:2). Light anesthesia was supported by halothane 1% v/v (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ). Hair was shaved off the operative field and the skin was surgically disinfected. A midline cervical incision was used to isolate the internal jugular vein and the carotid artery on both sides. Sacrifice was achieved by exsanguination under anesthesia. A median sternotomy and pericardial incision was then performed. No cardioplegia was used. The heart was excised from the thorax using a standard cardiotomy incision. The left anterior descending, left circumflex and the right coronary arteries were removed from the myocardium and dissected free from adventitial tissue.

*Incubation period.* On the morning of the surgery, a standard Krebs-bicarbonate solution glucose-free (composition in mmol/liter: NaCl 118.3, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25 and calcium ethylenediaminetetraacetic acid 0.026) was prepared. For each set of experiment four beakers were prepared (control, vehicle, low and high-dose of immunosuppressive drugs). The control group was incubated in the Krebs-bicarbonate solution only. Two beakers were used for each drug, one with a low concentration and one with a high concentration of the immunosuppressive drugs (10<sup>-4</sup> mol/liter and 10<sup>-7</sup> mol/liter for CSA, FK506 and MMF, 10<sup>-7</sup> mol/liter and 10<sup>-11</sup> mol/liter for RAPA). The different drugs were diluted to the desired concentration on the morning of the surgery. The vehicle group contained Krebs-bicarbonate with

cremophor for CSA and FK506 and ethanol for MMF and RAPA in the same concentration to the one used with the different immunosuppressants at low concentration. The left anterior descending, left circumflex and the right coronary arteries were randomly assigned to each beaker. The four beakers were then placed at 4°C for 48 hr.

*Vascular reactivity.* The left anterior descending, left circumflex and the right coronary arteries were divided in 4 mm wide rings 48 hr after incubation at 4°C.

The endothelial function of control and arterial rings submitted to immunosuppressive drugs and storage was studied in organ chambers filled with Krebs-bicarbonate solution (20 ml at 37°C). Oxygenation was insured using a 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> gas mixture. The rings were suspended between two metal stirrups, one of which was connected to an isometric force transducer. Data were collected with a data acquisition software (IOS3, Emka Inc., Paris, France). Response to 5-HT creatinine sulfate (serotonin, 5HT), bradykinin (BK) and the calcium ionophore A23187 were compared. All studies were performed in the presence of indomethacin (10<sup>-5</sup> mol/liter, to exclude the production of endogenous prostanoids), propranolol (10<sup>-7</sup> mol/liter, to prevent the activation of β-adrenergic receptors), and ketanserin (incubated 40 min before the addition of serotonin: 10<sup>-6</sup> mol/liter, to block serotonin 5HT-2 receptors). Each preparation was stretched to the point of its active length curve (usually 3.5 g), as determined by measuring the contraction to potassium chloride (KCl, 30 mmol/liter) at different levels of stretch, and then stabilized for 30 min. The maximal contraction was determined with potassium chloride (60 mmol/liter) and rings were excluded if they failed to contract to potassium chloride (exclusion rate <5%).

After washing and 45 min of stabilization, prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PGF $2V$ ) (range,  $2 \times 10^{-6}$  to  $10^{-5}$  mol/liter) was added to achieve a contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl (60 mmol/liter). Endothelium-dependent relaxations to serotonin ( $10^{-10}$  to  $10^{-5}$  mol/liter) and the calcium ionophore A23187 were determined. After the completion of the serotonin study, the rings were allowed to recontract to a plateau and endothelium-dependent relaxations to BK ( $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  mol/liter) were determined. It was previously shown that the use of serotonin before bradykinin did not affect the endothelium-dependent relaxation induced by BK (data not shown). At the end of the experiments, endothelium-independent relaxations were studied using sodium nitroprusside (SNP,  $10^{-5}$  mol/liter, a NO donor).

*Drugs.* All solutions were prepared daily. BK, 5-HT creatinine sulfate (serotonin), the calcium ionophore A23187, indomethacin, ketanserin and sodium nitroprusside were purchased from Sigma Chemical Co. (Oakville, ON, Canada). Propranolol was purchased from Biomol Research Laboratories Inc. (USA) and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). The immunosuppressive drugs were purchased from Novartis (Mississauga, ON) (CSA), Fujisawa Canada (Markham, ON) (FK506) and Hoffmann-La Roche (Mississauga, ON) (MMF and RAPA).

*Statistical analysis.* Contractions to PGF $2\alpha$  are expressed as a percentage of the maximal contraction to potassium chloride (60 mmol/liter) for each group and expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM); "n" refers to the number of animals studied. Relaxations are expressed as a percentage of the maximal contraction to PGF $2\alpha$  for each ring and as the percentage of the maximal contraction to serotonin for

the BK studies. ANOVA studies were performed to compare concentration-response curves. Differences were considered to be statistically significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

*Vascular reactivity.* Contraction. There were no significant differences in the amplitude of the contraction to potassium chloride (60 mmol/liter) between all groups (range of 7.7 g to 14.1 g). Contraction with PGF2 $\alpha$  (range  $2 \times 10^{-6}$  to  $10^{-5}$  mol/liter) averaged 72% the amplitude of contraction to potassium chloride (60 mmol/liter) and were not significantly different between groups. In the MMF  $10^{-4}$  group, the contraction obtained with KCl was too small to perform the endothelial study.

### Endothelium-dependent relaxations.

1) Relaxations to serotonin. CSA caused a dose-dependent decrease of the relaxation to serotonin that reached statistical significance for the CSA  $10^{-4}$  group compared to the control group. RAPA and FK506 caused a statistically significant decrease of relaxations at both concentration (which was dose-dependent for FK506). There was no statistically significant difference between the cremophor and MMF group when compared to the control group. Exposure to ethanol (MMF and RAPA vehicle) caused a statistically significant decrease of the relaxation to serotonin (Fig. 1,2,3,4).

2) Relaxations to BK. There was no statistically significant impairment of relaxation to BK exposure to CSA, MMF and cremophor. Exposure to FK506 caused a decrease of relaxation to bradykinin which was not statistically significant (except for two doses).

Ethanol caused a statistically significant decrease of the relaxation. Exposure to RAPA also caused a statistically significant decrease of the relaxation (Fig. 5,6,7,8).

3) Relaxations to the calcium ionophore A23187. Exposure to ethanol, RAPA, MMF and FK506 caused a statistically significant decrease of the relaxation to calcium ionophore A23187. There was a rightward shift of the concentration response curve to the calcium ionophore A23187 after exposure to CSA, that reached a statistically significant value for two doses of calcium ionophore A23187 (Fig. 9,10,11,12).

*Endothelium-independent relaxations.* There were no statistically significant differences in maximal relaxations to sodium nitroprusside (SNP;  $10^{-5}$  mol/liter) in all groups (data not shown).

## DISCUSSION

Heart transplantation is still the preferred treatment for end-stage cardiac failure yielding excellent early survival and improved functional status of patients. The major limiting factor to long-term survival is the development of graft coronary atherosclerosis. The pathogenesis of this accelerated form of coronary atherosclerosis is multifactorial. Chronic rejection, hyperlipidemia, advanced donor age, cytomegalovirus infection and immunosuppressive drugs are among the contributing factors in the postoperative period.

The central role of the endothelial cell in the regulation of arterial tone and vascular wall homeostasis has been known since 1980 (3). Relaxation of arteries such as coronary arteries occurs through both endothelium-dependent and endothelium-

independent pathways (4, 5). The release of endothelium-derived relaxing factors is activated by receptors linked to NO synthase by either pertussis toxin-sensitive (Gi) and insensitive (Gq) G-proteins pathways (8, 9). Endothelium-dependent relaxation requires both the presence and functional integrity of the endothelial cells. This endothelial cell monolayer is easily damaged by mechanical manipulation. Removal or damage of the endothelial cells has been shown to impair or obliterate endothelium-dependent arterial relaxations, and promote the development of intimal hyperplasia since the regenerated endothelium is dysfunctional with impaired relaxations, affecting initially the Gi-protein pathway leading to a decrease in NO release (6). NO has an inhibitory effect on platelets and leukocyte adhesion to the endothelium and acts (synergically with prostacycline) to inhibit platelet aggregation to prevent thrombosis (14-17).

Endothelial dysfunction is an early event in the development of transplant coronary artery disease (TCAD) (10, 18-21). Mechanical trauma, cardiac preservation solutions (22), ischemia-reperfusion injury of the endothelial cells (15), the use of CSA and rejection have all been incriminated in the endothelial dysfunction occurring after heart transplantation (15, 22, 23). This dysfunction begins with a malfunction of the signal transduction pathway involving the Gi-protein dependent pathway and later progresses into a generalized loss of NO activity (10, 18). This dysfunction of the Gi-protein pathway is similar to the one associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. Progression of the associated intimal hyperplasia parallels the alteration in endothelial dysfunction suggesting a permissive role of the dysfunction for the development of this accelerated form of coronary atherosclerosis. A decreased production of EDRF promotes the adhesion of leukocytes and monocytes and aggregation of platelets on the vascular wall. This can lead to thrombosis and accelerate the appearance of

atherosclerosis. The aggregating platelets secrete growth factors and cytokines that enhance smooth vascular muscle cell proliferation and migration, the initial step in the development of intimal hyperplasia.

With the introduction of cyclosporine as part of the immunosuppressive regimen, the results of organ transplantation have greatly improved, however the incidence of graft coronary vasculopathy has remained despite the use of different dosages. CSA causes inhibition of the activation and proliferation of T lymphocytes (25). One of the major complications associated with the use of CSA is hypertension. Different mechanisms have been suggested to explain this complication. It may be secondary to vascular dysfunction caused by a direct cytotoxic effect on endothelial cells (26, 27), a direct contractile effect on vascular smooth muscle cells (28-30), an impairment of endothelium-derived relaxing factor releases (31-36) and an augmented production of endothelin-1 (ET-1) (27, 37, 38). All those mechanisms could promote the development of TCAD. Our data support the theory of a CSA-mediated endothelium injury leading to a decreased release of NO and a loss of its protective effects. This endothelial dysfunction is dose-dependent, mandating a close monitoring of the CSA level to minimize the toxic effect of the drug. Preservation of the Gq-protein pathway of NO production suggests a direct effect of CSA in the first step of the Gi-protein pathway at the receptor or intracellular messenger level since the function of the NO synthase is intact.

Although sharing many pharmacological characteristics with CSA, FK506 is a more potent immunosuppressive agent and may induce less nephrotoxicity and hypertension (39). Different studies have examined the effect of FK506 on the vascular wall. When compared to CSA, FK506 does not induce production of ET-1 by endothelial cells in

culture and has no direct cytotoxic effect on endothelial cells (27). When exposed to FK506, there is a significant decrease in the release of prostacyclin by endothelial cells (39), like with CSA. Weis et al. compared the effect of CSA and FK506 on the coronary endothelial function after cardiac transplantation in human subjects (40). One year after transplantation, there was a higher incidence of coronary endothelial dysfunction in patients treated with FK506 compared to those treated with CSA, although the CSA group had more rejection episodes. Interestingly, in a prospective clinical trial in heart transplantation, after a 4-year follow-up, there was no significant difference in actuarial freedom from angiographically visible TCAD in patients treated with either FK506 or CSA (41). Our study supports the hypothesis that FK506 causes a more severe endothelial dysfunction than CSA. This impairment is generalized and affects both Gi and Gq-protein mediated pathways which usually leads to a more severe impairment of endothelial function. The site of the dysfunction may be located at the beginning of the common final pathway of NO production upstream from the NO synthase since its function is not impaired as shown by the experiments with calcium ionophore.

MMF blocks lymphoproliferative responses to mitogens and alloantigens, both in vitro and in vivo, at concentrations that do not substantially affect proliferation of other cell lines or nonlymphoid tissues (42-44). In different animal models and in human studies, MMF prolongs graft survival (45-48) and reverses ongoing acute rejection (47-51). MMF has been shown to inhibit growth factor-induced proliferation of smooth muscle and endothelial cells in vivo (52). Grogery et al. (53) have demonstrated a regression in arterial thickening by MMF using a balloon-catheter arterial injury model in rats. This direct antiproliferative action on smooth muscle cells, in vivo, may delay the development of TCAD. MMF did not affect the basal production of NO but



suppressed the cytokine-induced NO production of mouse and rat brain endothelial cells in culture. In the current study, MMF has a vascular profile almost similar to CSA, although inducing a more severe impairment of endothelial function. This more severe impairment could be caused by the dysfunction associated with the exposure to ethanol (MMF's vehicle) and does not exclude a possible protective effect of MMF at lower doses. Higher doses of MMF were associated with a contractile dysfunction that rendered the interpretation of the endothelial function studies impossible. The precise mechanism of this dysfunction remains to be determined. A direct cytotoxic effect of the ethanol could be incriminated.

Sirolimus (rapamycin) interrupts the signaling pathway between cytokine receptors and cell cycling, causing cells to arrest at the G1-to-S transition in their cell cycle. Different studies have underlined the antiproliferative effect of sirolimus (52, 54-56) and a protective effect on TCAD in long-surviving rat heart allograft has been reported (57). Few data exist on the effect of sirolimus on endothelial function. One study reported an increase production of prostacyclin by cultured endothelial cells when exposed to rapamycin (58). Another study investigated the acute effect of rapamycin on vasomotion of rat aortic rings (59). Their data showed a vasodilating property of sirolimus in a dose-dependent fashion that was endothelium-dependent. In the present study, the data suggest a severe impairment of the endothelial function when coronary arteries are exposed to sirolimus. Two major differences might explain the conflicting data; the vehicle used (ethanol) was different and the incubation time was much longer (48 vs. 2 hr). Endothelial dysfunction associated with the exposure to ethanol alone (vehicle group) was even greater in the RAPA group, suggesting a direct negative effect of RAPA on the endothelial function.

For the first time, to our knowledge, the direct effect of a prolonged exposure of the different immunosuppressive agents currently used on the endothelial function of intact coronary arteries was evaluated. When taken together, our data suggest that all immunosuppressive drugs currently used for heart transplantation may contribute to the endothelial dysfunction found in the grafted heart, when the coronary arteries are exposed to high doses of immunosuppressive drugs. This may lead to a decrease in the protective effects of NO on the vascular wall and promote the development of intimal hyperplasia. At lower doses, CSA and MMF offer a more favorable vascular profile, leading to less impairment of the vasorelaxing properties of the endothelium. FK506 and RAPA, often used for rescue therapy, may aggravate this impairment. The precise mechanism of this endothelial dysfunction is still unknown.

*Limitations of the study.* This model gave us the opportunity to screen immunosuppressive drugs for their effect on the endothelial function. The limitations associated with the use of an in vitro model of observation warrant the continuation of this study in an in vivo model. This would allow us to have a longer time of exposure as well as metabolism of the drugs and permit observation for the effect of chronic exposure to the immunosuppressive drugs. It will be interesting to see the effect of diurne variation in the concentration of the drug on the endothelial function. Since this model exposes the coronary arteries to a constant concentration, a short exposure at higher concentration on a regular basis may have a different effect on the endothelial function than the one we observed.

**REFERENCES**

1. Billingham ME. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc* 1987; 19(suppl 5): 19.
2. 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.
3. Drexler H, Fischell TA, Pinto FJ, et al. Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients. Relation to vessel wall morphology. *Circulation* 1994; 89: 161
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med* 1986;314: 488.
5. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373
6. Lüscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of cardiovascular function. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990: 1.
7. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3: 2007.
8. Dolphin AC. Nucleotide binding proteins in signal transduction and disease. *Trends Neurosci* 1987; 10: 53.
9. Flavahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations to certain agonists in porcine coronary arteries. *J Physiol* 1989; 408: 549.
10. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8: 28S.

11. Mugge A, Brandes RP, Heublien B, Nolte C, Haverich A, Lichtlen PR. Endothelial dysfunction in heart transplanted patients with graft vasculopathy. *Eur Heart J* 1995; 16(suppl J): 78.
12. Rickenbacher PR, Pinto FJ, Lewis NP, et al. Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation. *Circulation* 1995; 92: 3445.
13. Villeneuve N, Marteau V, Jacquemin C, et al. An in vitro model of selective endothelial dysfunction. *J Vasc Res* 1997; 34: 151.
14. Madsen JC, Sachs DH, Fallon JT, Weissman NJ. Cardiac allograft vasculopathy in partially inbred miniature swine. I. Time course, pathology, and dependence on immune mechanisms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 1230.
15. Gaudin PB, Rayburn BK, Hutchins GM, et al. Peritransplant injury to the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 338.
16. Veinot JP, Walley VM. Cardiac transplant arteriopathy (Letter). *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 727.
17. Anderson TJ, Meredith IT, Uehata A, et al. Functional significance of intimal thickening as detected by intravascular ultrasound early and late after cardiac transplantation. *Circulation* 1993; 88: 1093.
18. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of the endothelial pertussis toxin-sensitive G-protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83: 652.

19. Sabate M, Manito N, Cequier A, et al. Acute rejection, cytomegalovirus infection and endothelial dysfunction early after heart transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27: 2346.
20. Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, Carrier M, Leung M. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 404.
21. Hruban RH, Kasper EK, Gaudin PB, et al. Severe lymphocytic endothelialitis associated with coronary artery spasm in heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 42.
22. Drinkwater DC, Rudis E, Laks H, et al. University of Wisconsin versus Stanford Cardioplegic solution and the development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 891.
23. Fullerton DA, Mitchell MB, McIntyre RC Jr, et al. Mechanisms of coronary vasomotor dysfunction in the transplanted heart. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 86.
24. Mugge A, Heublein B, Kuhn M, et al. Impaired coronary dilator responses to substance P and impaired flow-dependent dilator responses in heart transplant patients with graft vasculopathy. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 163.
25. Kobashigawa JA. Advances in immunosuppression for heart transplantation. *Advances in Cardiac Surgery* 1998;10:155.
26. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, Zilio P, Benigni D, Remuzzi G. Cyclosporine-induced endothelial cell injury. *Lab Invest* 1986; 55: 455.
27. Benigni A, Morigi M, Perico N, et al. Acute effect of FK506 and cyclosporine on endothelial function and renal vascular resistance. *Transplantation* 1992; 54: 775.

28. Xue H, Bukoski RD, McCarron DA, Bennett WM. Induction of contraction in isolated rat aorta by cyclosporine. *Transplantation* 1987; 43: 715.
29. Rego A, Vargas R, Foegh ML, Ramwell PW. Effect of cyclosporine: a treatment on vascular reactivity of the rat thoracic aorta. *Transplant Proc* 1988; 20: 572.
30. Rosenthal AR, Chukwuogo NA, Ocasio VH, Khang KU. Cyclosporine inhibits endothelial cell prostacyclin production. *J Surg Res* 1989; 46: 593.
31. Voss BL, Hamilton KK, Samara ENS, McKee PA. Cyclosporine suppression of endothelial prostacyclin generation. *Transplantation* 1988; 45: 793.
32. Brown Z, Neild GH. Cyclosporine inhibits prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Transplant Proc* 1987; 19: 1178.
33. Rego A, Vargas R, Wroblewska B, Foegh ML, Ramwell PW. Attenuation of vascular relaxation and cyclic GMP responses by cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 165.
34. Diederich D, Yang Z, Buhler FR, Luscher TF. Cyclosporine therapy impairs endothelial-dependent relaxations in the renal circulation (Abstract). *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 83A.
35. Xuan ATD, Fan TPD, Higenbottam TW, Wallwork J. Cyclosporine in vitro reduces endothelium-dependent relaxation to acetylcholine but does not affect relaxation to nitrovasodilators. *Transplant Proc* 1990; 22: 1723.
36. Stroes ESG, Luscher TF, de Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ. Cyclosporin A increases nitric oxide activity in vivo. *Hypertension* 1997; 29: 570.
37. Bunchman TE, Brookshire CA. Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultures human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; 88: 310.

38. Lamb FS, Webb RC. Cyclosporin augments reactivity of isolated blood vessels. *Life Sci* 1987; 40: 2571.
39. Yatscoff RW, Fryer J, Thliveris JA. Comparison of the effect of rapamycin and FK506 on release of prostacyclin and endothelin in vitro. *Clin Biochem* 1993; 5: 409.
40. Weis M, Wildhirt SM, Schulze C, et al. Impact of immunosuppression on coronary endothelial function after cardiac transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30: 871.
41. Pham SM, Kormos RL, Hattler BG, et al. A prospective trial of tacrolimus (FK506) in clinical heart transplantation: intermediate-term results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 764.
42. Allison AC, Almquist SJ, Muller CD, Eugui EM. In vitro immunosuppressive effects of mycophenolic acid and ester prodrug, RS-61443. *Transplant Proc* 1991; 23(suppl 2): 10.
43. Eugui EM, Mirkovish A, Allison AC. Lymphocyte-selective anti-proliferative and immunosuppressive activity of mycophenolic acid and its morpholinoethyl ester (RS-61443) in rodents. *Transplant Proc* 1991; 23(suppl 2): 15.
44. Eugui EM, Mirkovish A, Allison AC. Lymphocyte-selective anti-proliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 1991; 33: 175.
45. Hao L, Lafferty KJ, Allison AC, Eugui EM. RS-61443 allows islet allografting and specific tolerance induction in adult mice. *Transplant Proc* 1990; 22: 876.
46. Platz KP, Sollinger HW, Hullett DA, Eckhoff DE, Eugui EM, Allison AC. RS-61443- a new potent immunosuppressive agent. *Transplantation* 1991; 51: 27.

47. Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM, Allison AC. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990; 22: 1659.
48. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethylester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* 1991; 23(suppl 2): 19.
49. Platz PK, Bechstein WO, Eckhoff DE, Suzuki Y, Sollinger HW. RS-61443 reverses acute allograft rejection in dogs. *Surgery* 1991; 110: 736.
50. Ensley RD, Bristow MR, Olsen SL, et al. The use of mycophenolic mofetil (RS-61443) in human heart transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56: 75.
51. Kobashigawa J, Miller L, Renlund D, et al. A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. Mycophenolate Mofetil Investigators. *Transplantation* 1998; 6: 507.
52. Mohacsi PJ, Tuller D, Hulliger B, Wijngaard PL. Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aorta smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant* 1997; 5: 484.
53. Gregory CR, Huang X, Pratt RE, et al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995; 59: 655.
54. Gregory CR, Huang X, Pratt RE, et al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995; 59: 655.



55. Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. *Transplantation* 1993; 55: 1409.
56. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor B-stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. *Transplant Proc* 1991; 23: 2833.
57. Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Rapamycin inhibits transplant vasculopathy in long-surviving rat heart allografts. *Transplantation* 1995; 60: 729.
58. Yatscoff RW, Fryer J, Thliveris JA. Comparison of the effect of rapamycin and FK506 on the release of prostacyclin and endothelin in vitro. *Clin Biochem* 1993; 5: 409.
59. Corbin F, Blaise GA, Parent M, Chen H, Daloz PM. Effect of rapamycin on rat aortic ring vasomotion. *J Cardiovasc Pharm* 1994; 24: 813.

## Figures legends

Figure 1 : Cumulative concentration-response curve to serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with cyclosporine A. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 2 : Cumulative concentration-response curve to serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with FK506. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 3 : Cumulative concentration-response curve to serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with MMF. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 4 : Cumulative concentration-response curve to serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with Rapamycine. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 5 : Cumulative concentration-response curve to bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with cyclosporine A. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 6 : Cumulative concentration-response curve to bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with FK506. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 7 : Cumulative concentration-response curve to bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with MMF. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 8 : Cumulative concentration-response curve to bradykinin (BK)) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with Rapamycine. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 9 : Cumulative concentration-response curve to calcium ionophore (A23187) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with cyclosporine A. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 10 : Cumulative concentration-response curve to calcium ionophore (A23187) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with FK506. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 11 : Cumulative concentration-response curve to calcium ionophore (A23187) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with MMF. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

Figure 12 : Cumulative concentration-response curve to calcium ionophore (A23187) in rings of porcine coronary arteries with endothelium after incubation with Rapamycine. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF2 $\alpha$ . Results are presented as mean $\pm$  standard error of the mean (\* p < 0.05 vs control)

FIGURE 1

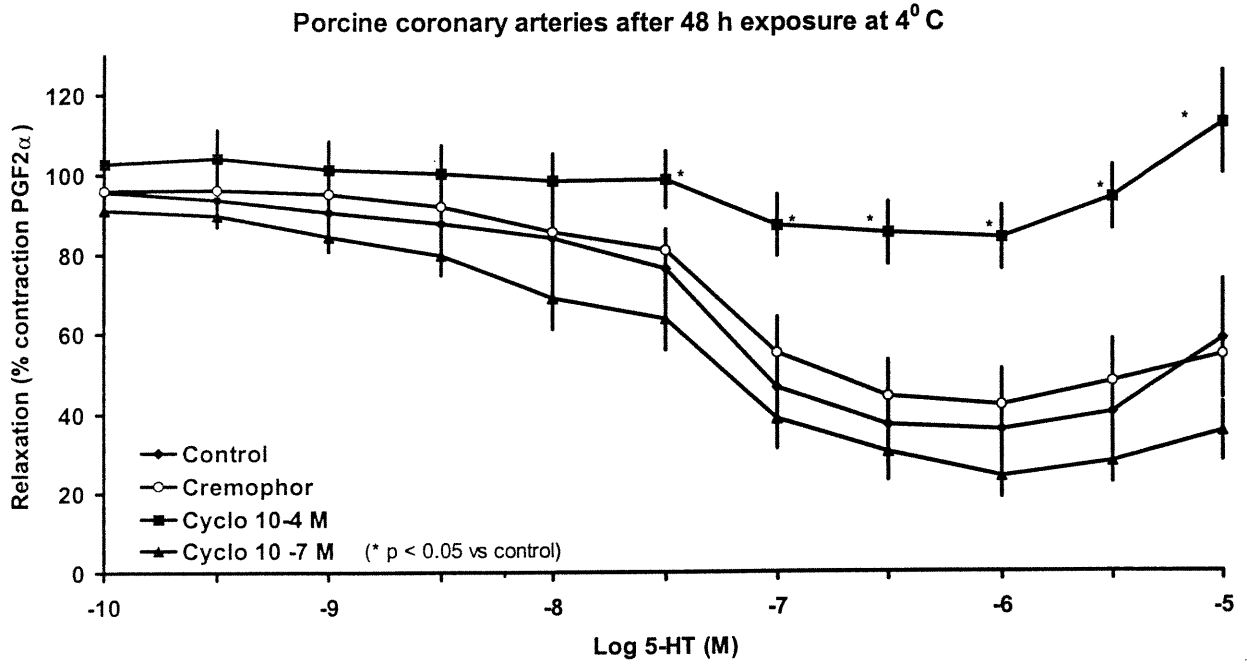


FIGURE 2

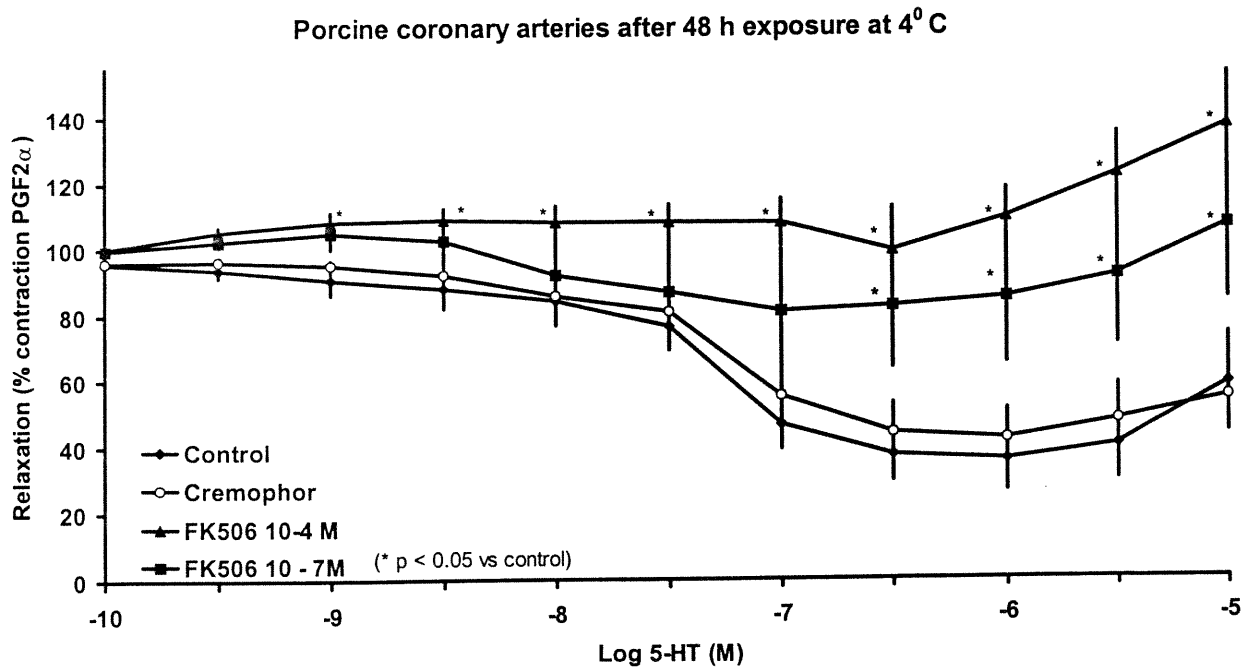


FIGURE 3

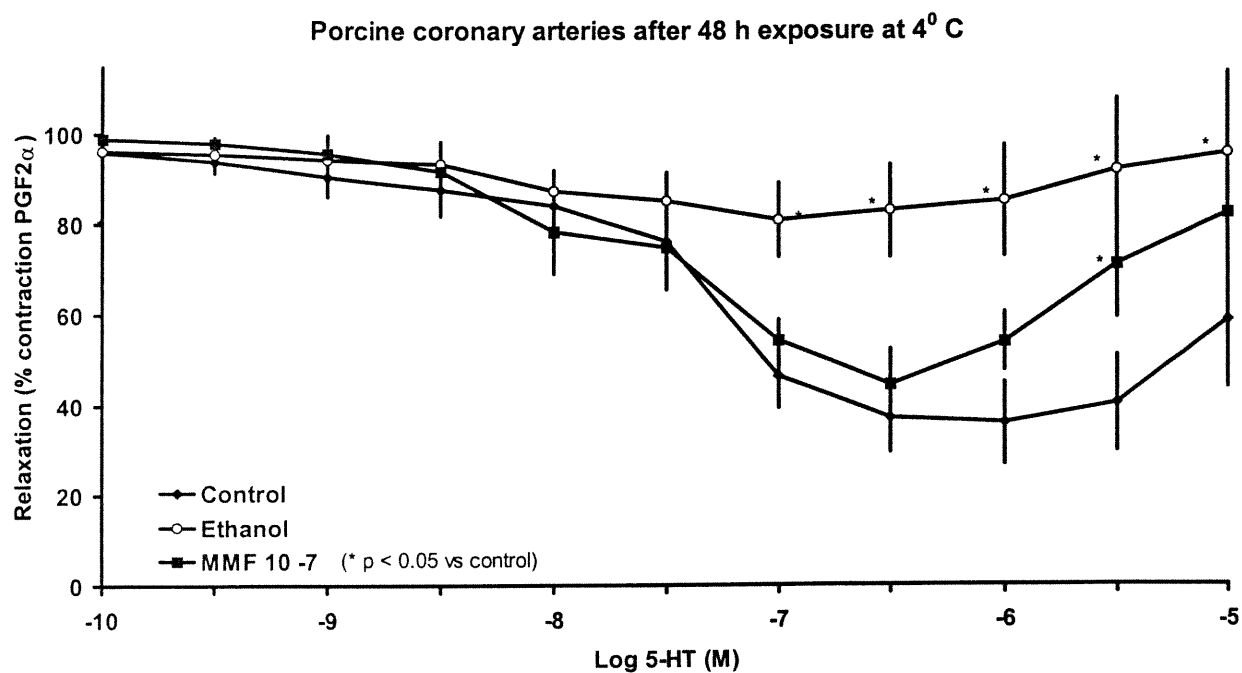


FIGURE 4

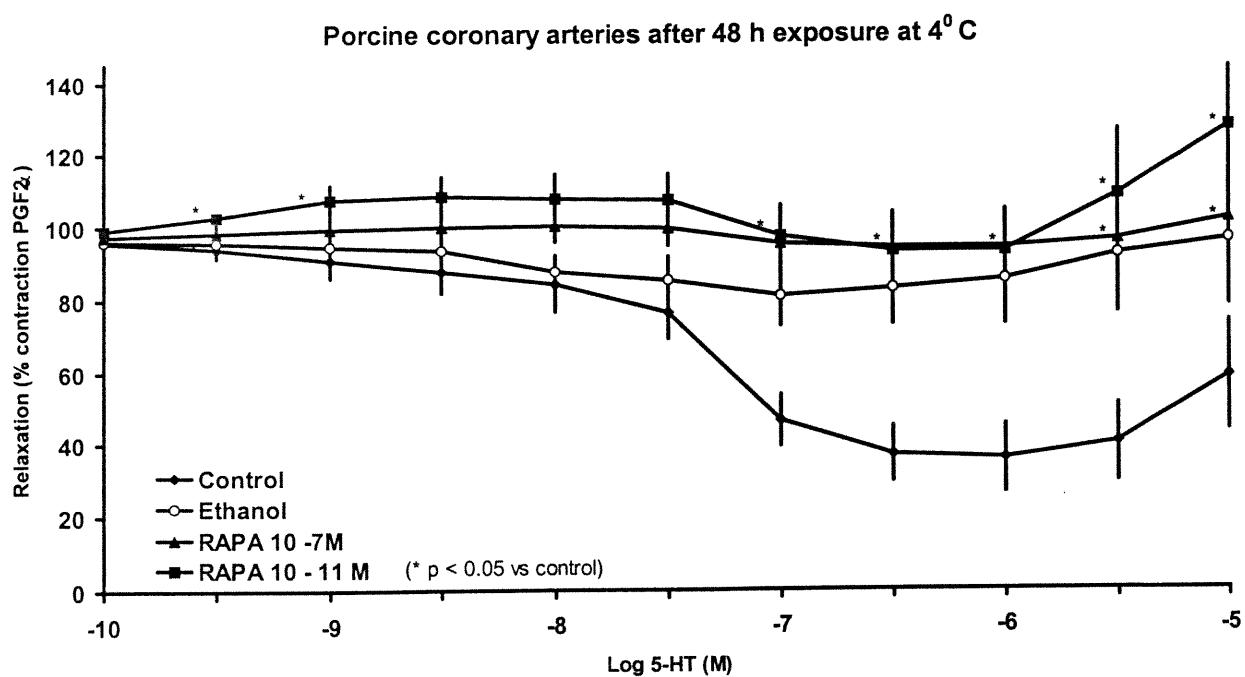


FIGURE 5

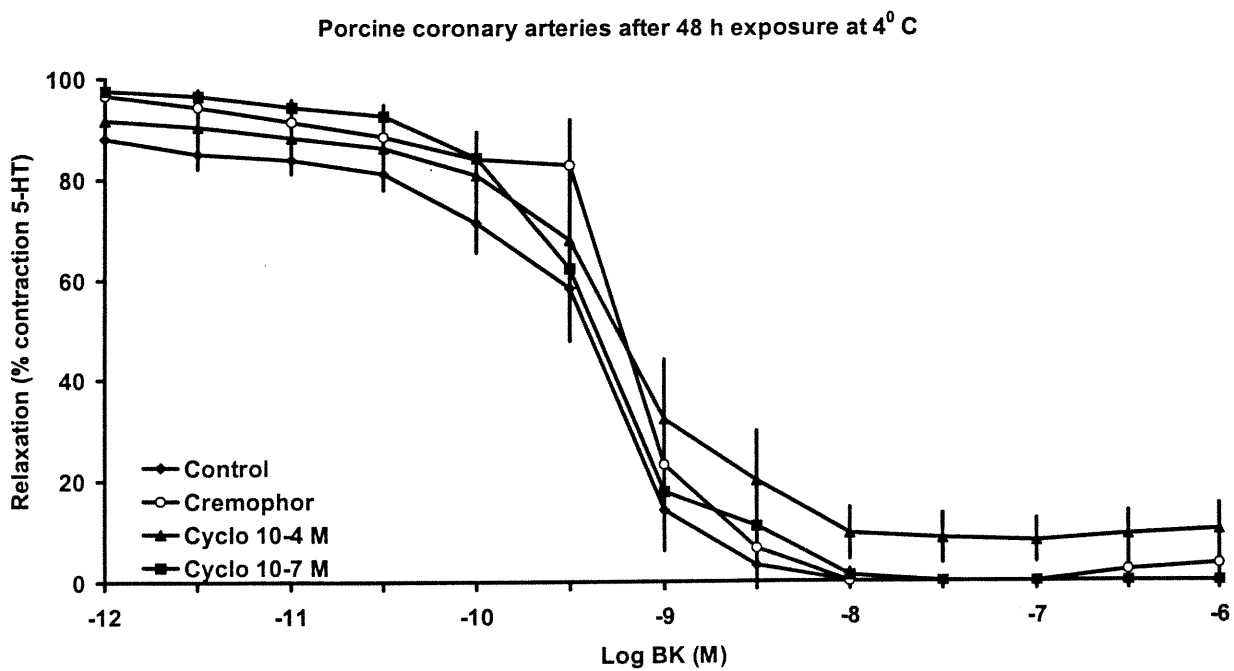


FIGURE 6

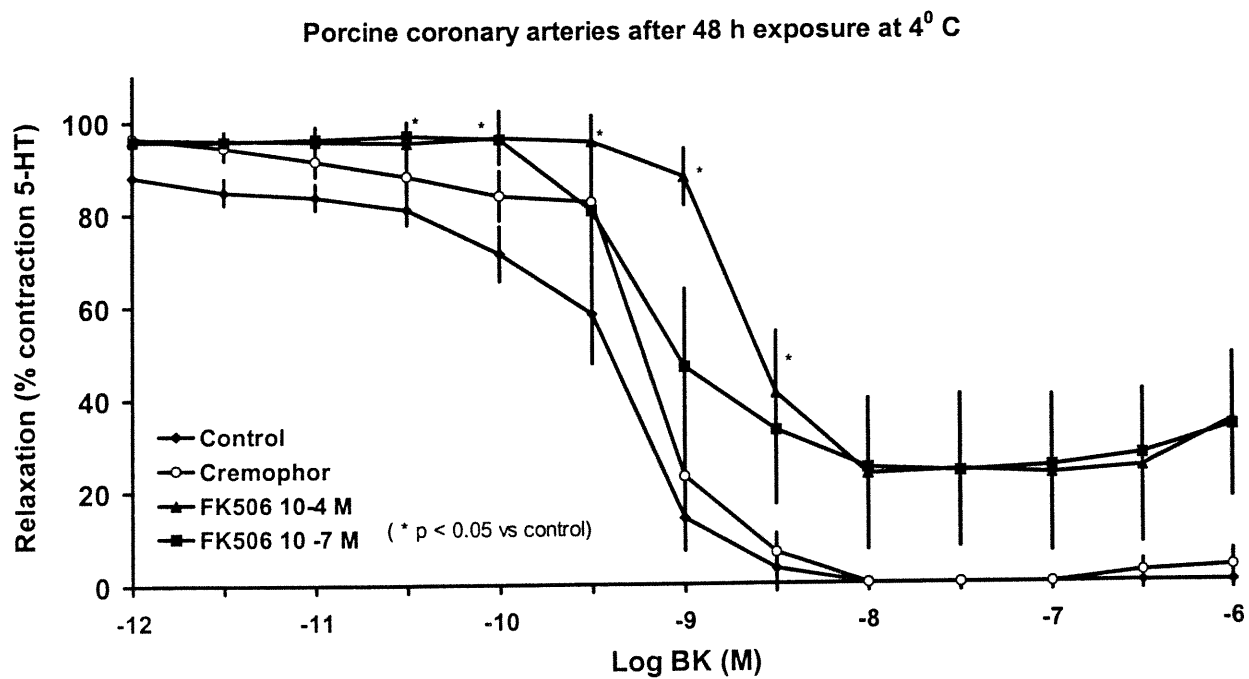


FIGURE 7

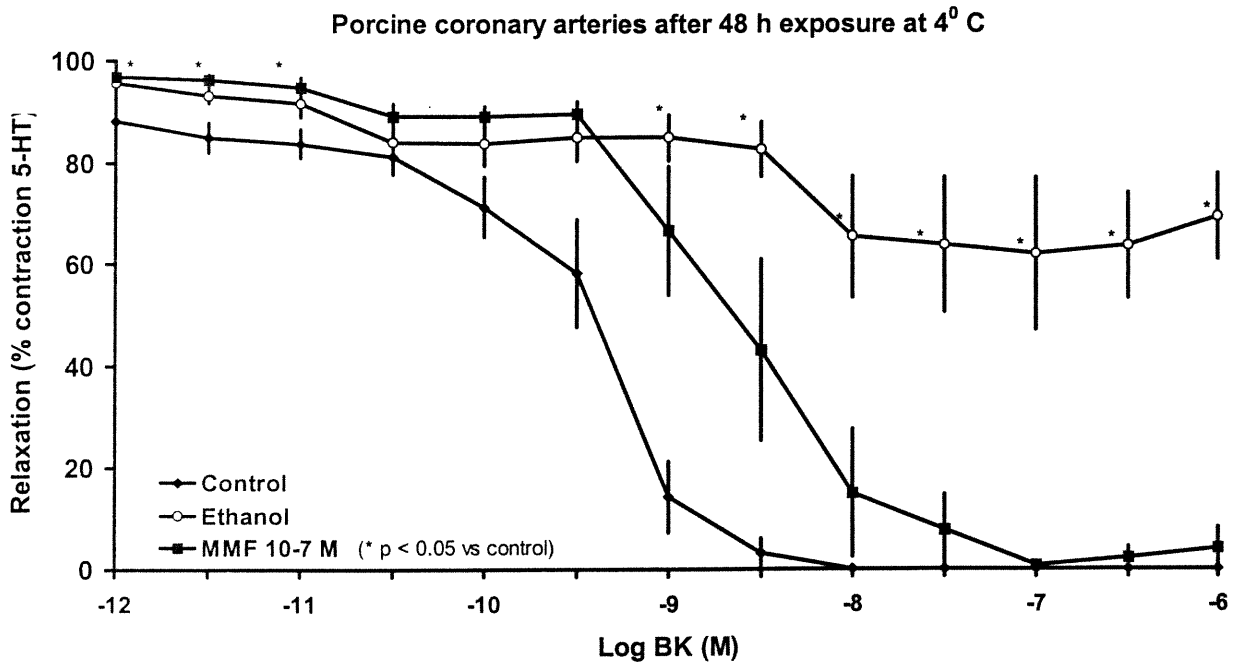


FIGURE 8

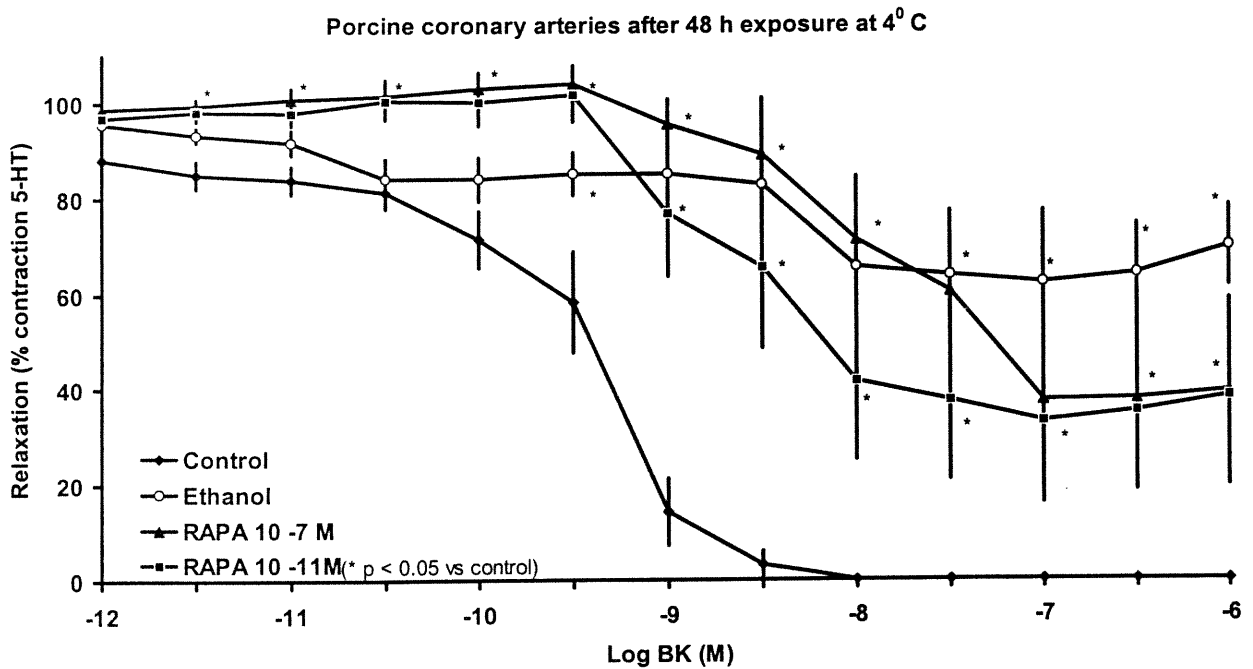


FIGURE 9

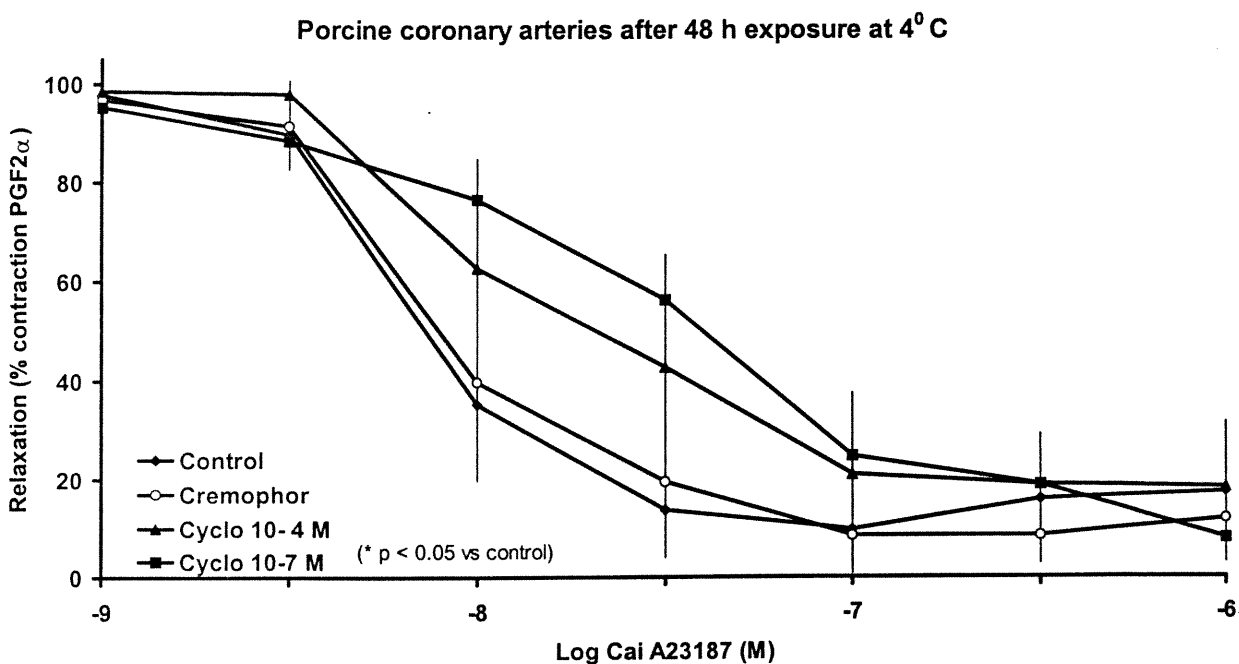


FIGURE 10

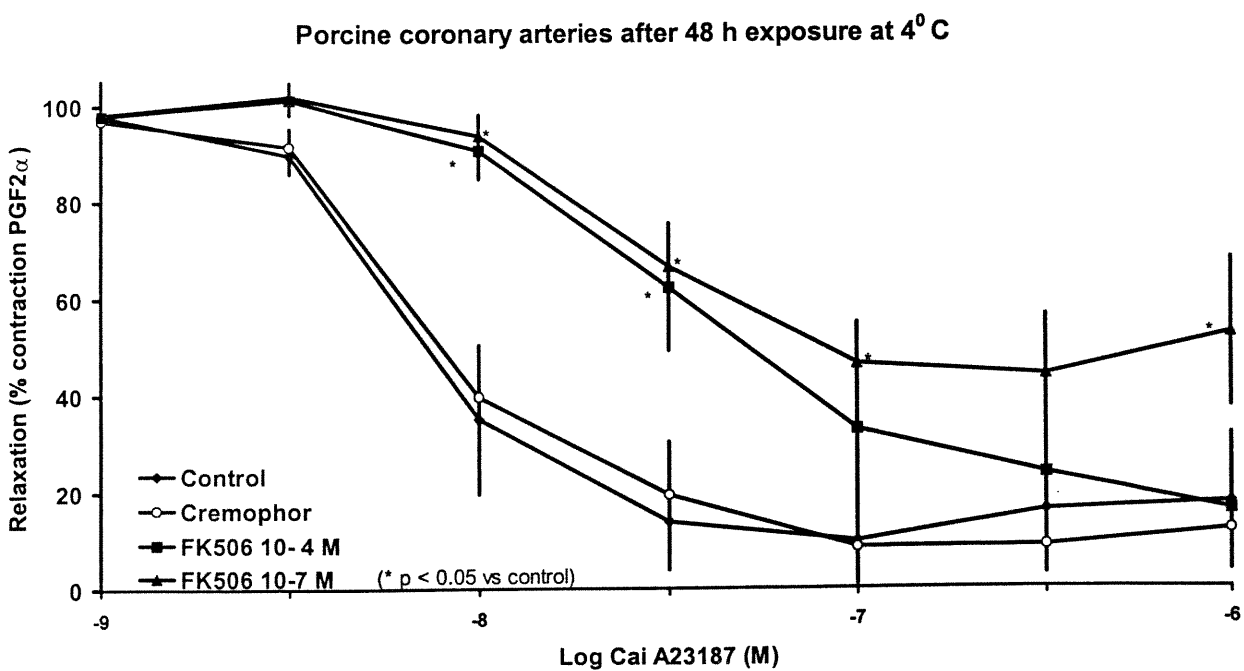




FIGURE 11

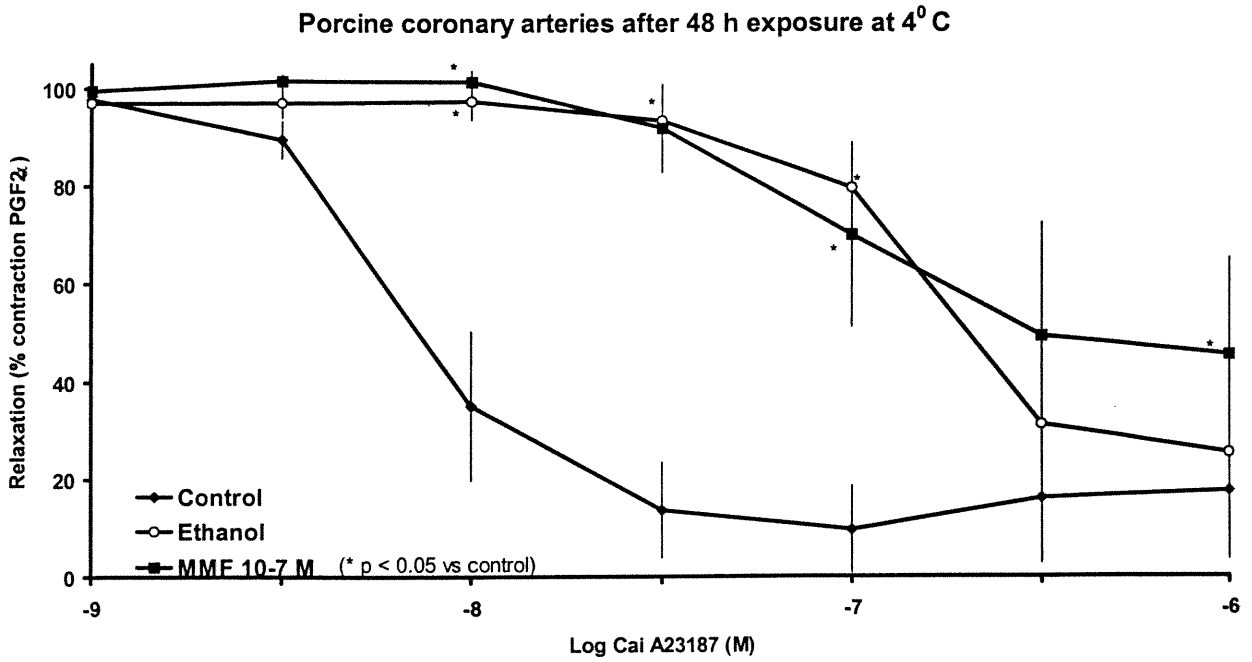
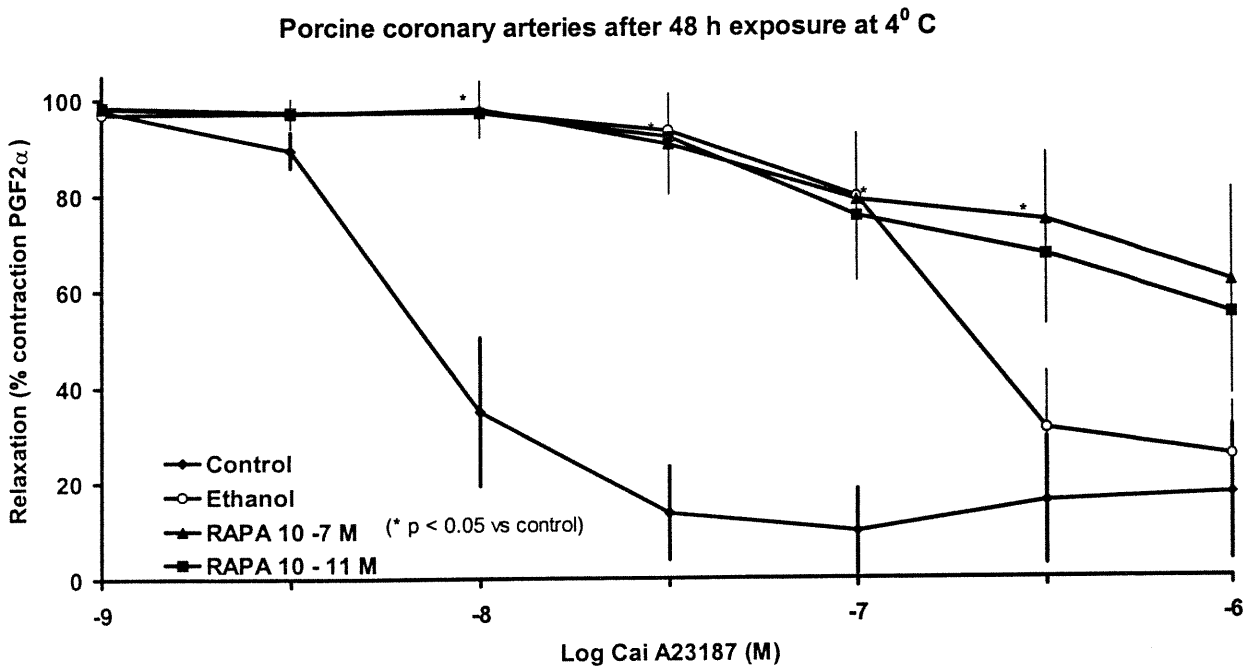


FIGURE 12



## Conclusion

La transplantation cardiaque reste le traitement de choix dans l'insuffisance cardiaque terminale. Cette option thérapeutique reste limitée par le nombre de donneurs disponibles et par les complications associées à celle-ci. Au-delà de la première année de vie après la greffe cardiaque, l'apparition d'une forme accélérée d'athérosclérose coronarienne devient la cause de décès première chez ces patients. Aucun traitement actuel ne permet de prévenir ou ralentir de façon constante et prolongée l'apparition et le développement de cette maladie vasculaire. De nombreux facteurs ont été impliqués dans la pathogenèse de cette atteinte, tel les épisodes répétés de rejet et physiologie interne sont mis de l'avant pour tenter d'expliquer cette dysfonction. Selon les données actuellement disponibles, une origine multifactorielle semble être à la cause de cette dysfonction. Une approche globale de la question est difficile étant donné le nombre de facteurs possible impliqués. Dans les études présentées dans le cadre de ce mémoire, nous avons tenté d'adresser deux branches de ce treillis d'hypothèse, soit le rôle des différents agents immunosupresseurs utilisés dans l'arsenal thérapeutique actuel et celui de iNOS dans l'apparition de cette dysfonction endothéliale. Un facteur contributif ou obligatoire se retrouve dans plusieurs hypothèses : l'apparition d'une dysfonction endothéliale avant la présence de lésions vasculaires visibles à la coronarographie. L'origine de cette dysfonction reste aussi sujette à discussion. Une lésion directe de la cellule endothéliale, de façon mécanique ou immunologique, ou une atteinte de sa capacité de travail pourraient expliquer cette forme particulière d'athérosclérose.

Peu de données existent dans la littérature sur l'effet de l'inhibition de l'iNOS sur la fonction endothéliale, la majorité des études faites sur l'effet de l'inhibition de l'iNOS étaient destinées à évaluer la survie et la fonction du greffon cardiaque lors du rejet aigu et chronique. Celles-ci ont démontrées un bénéfice de l'utilisation d'un inhibiteur de l'iNOS pour prolonger la survie du greffon et préserver sa fonction, par contre l'inhibition au long terme de iNOS fut associée à une progression des lésions athérosclérotiques coronariennes. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de iNOS dans l'arsenal thérapeutique pourrait être utile dans la phase aiguë du rejet pour diminuer les effets néfastes de la surproduction de NO, cette inhibition serait limitée aux épisodes aigus de rejet pour garder l'effet bénéfique de l'iNOS à long terme.

Les données rapportées sont les premières à avancer une dysfonction transitoire de la NO synthase constitutive dans le rejet aigu avec un effet bénéfique limité de la présence de iNOS pour suppléer à la fonction endothéliale normale.

Notre modèle reste limité par la durée d'observation. Une partie de la dysfonction endothéliale observée dans ce modèle est probablement reliée au traumatisme opératoire et à la technique de cardioplégie. Différentes études ont démontré une dysfonction endothéliale transitoire associée à ces deux étapes qui persistent dans les heures suivant le traumatisme et qui récupèrent spontanément. Notre période d'observation ne nous permet pas de faire la différence entre l'effet de ce traumatisme et celui du rejet. Un complément à notre étude serait de poursuivre l'inhibition sélective de iNOS sur une plus longue période pour évaluer son effet à plus long terme durant un épisode de rejet. De plus, l'utilisation concomitante d'agents immunosuppresseurs classiques pourraient influencer de façon significative les réponses observées car l'inhibition de iNOS n'influence pas la durée et l'intensité d'un

épisode de rejet, ni la fonction endothéliale normale (comparativement aux agents immunosuppresseurs classiques). La présence de iNOS pourrait être bénéfique de façon transitoire pour prendre la relève de la NO synthase constitutive dans cette situation tout en limitant sa durée d'action pour éviter les effets toxiques de la surproduction de NO.

La deuxième étude présentée examine l'effet des différents agents immunosuppresseurs couramment utilisés sur l'apparition de la dysfonction endothéliale coronarienne. L'arrivée de la cyclosporine a prolongé la survie des greffons mais n'a pas diminué l'apparition ou la progression de l'athérosclérose précoce du greffon malgré une diminution des épisodes de rejet. Les différentes études faites sur la cyclosporine ont démontré un effet néfaste de cet agent sur la fonction endothéliale, soit par lésion directe, soit en stimulant la production d'agents constricteurs, tel ET-1, ou en sensibilisant le muscle lisse à ceux-ci. Les profils endothéliaux des autres agents est moins bien connu. Cette étude a permis de démontrer, *in vitro*, une similitude dans la réponse endothéliale à l'exposition à la cyclosporine et au MMF. Par contre, l'exposition au FK506 et à la Rapamycine fut plus néfaste pour la fonction endothéliale des coronaires épocardiques de porc utilisées. Tous les agents utilisés sont associés à une diminution de la production de NO par l'endothélium, par contre la différence provient du type d'atteinte retrouvé selon l'agent utilisé. Dans le cas de la cyclosporine et du MMF la dysfonction endothéliale est limitée à la voie des protéines Gi, tandis que pour les deux autres agents on retrouve une atteinte généralisée de la fonction endothéliale, étant donné l'atteinte des voies médiées par les protéines Gi et Gq. Cette étude ne permet pas de déterminer avec précision la pathogenèse de cette atteinte. Par contre, une remarque peut être faite concernant la dose utilisée : lorsque l'agent étudié est utilisé à

forte dose, l'effet néfaste sur la fonction endothéliale tend à être plus marqué, surtout dans le cas du MMF. Lorsque celui fut utilisé à forte dose, une absence de contraction fut observé, suggérant un effet toxique direct de la molécule. De plus, différents véhicules furent utilisés dans cette étude; le crémophor , le véhicule de la CSA et du FK506, a un effet endothéliale similaire à celui du groupe contrôle, tandis que l'exposition à l'éthanol, le véhicule du MMF et de la Rapamycine, provoque une dysfonction endothéliale généralisée. Ces données suggèrent un rôle contributif de l'éthanol dans la dysfonction endothéliale associée à l'exposition au MMF et à la Rapamycine. Les données obtenues lors de l'utilisation d'un faible dose de MMF et de Rapamycine suggèrent même une protection relative de ces agents face à l'effet néfaste de l'éthanol étant donné la diminution moins importante de la réponse endothéliale voire une réponse similaire à celle du groupe contrôle lors de l'utilisation de la bradykinine. L'utilisation d'un véhicule différent dans une étude faite sur la Rapamycine a démontré un effet vasodilatateur endothélium dépendent de celle-ci, nous ne pouvons donc éliminer ce facteur confondant dans notre étude étant donné l'utilisation de véhicules différents pour les différents agents.

Les limitations de ce modèle sont celles reliées à l'utilisation des modèles in vitro. Nous ne pouvons évaluer la capacité de l'endothélium à se protéger contre ces agents et son potentiel de régénération. La présence de mécanisme de protection dépendant d'une activité enzymatique normale ne peut être évalué, que ce soit au niveau de l'élimination d'agent intra-cellulaire néfaste ou de produit de dégradation toxique. Par contre, on ne peut exclure non plus une exacerbation de la réponse néfaste des différents agents sur la fonction endothéliale coronarienne dans un contexte in vivo. Les doses évaluées représentent une dose thérapeutique et une dose toxique lorsqu'elles

sont utilisées chez l'humain. Ce modèle ne tient pas compte des variations individuelles au niveau de la pharmacocinétique des agents immunosuppresseurs mais seulement de l'effet cellulaire direct.

L'ensemble des données recueillies durant ces deux études ne permettent pas d'expliquer totalement l'apparition et le développement de l'athérosclérose précoce du greffon, par contre elles suggèrent des éléments de réponse. Une modification de l'arsenal thérapeutique pour faire place à des agents moins nocifs pour l'endothélium ou une surveillance accrue des niveaux toxiques des agents immunosuppresseurs pour éviter une atteinte directe de l'endothélium tout en préservant la fonction du greffon et en le protégeant des atteintes immunologiques serait souhaitable. De plus, l'utilisation d'agents synergiques pourraient limiter le dosage des agents utilisés pour tenter d'éviter une détérioration plus marquée de la fonction endothéliale. Développer un axe de recherche pour exploiter au maximum les fonctions physiologiques normales, tel l'induction de iNOS, pourrait être une autre option à envisager pour limiter les agressions externes sur l'endothélium. Toutes ces hypothèses restent à être démontré tant dans des modèles animaux qu'en transplantation cardiaque clinique humaine.

## 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. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3:2007-18
3. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
4. Lüscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990:1-228
5. Vanhoutte P.M. The endothelium – modulator of vascular smooth-muscle tone. *New Engl J Med* 1988; 319 (August 25): 512-513
6. Vanhoutte PM. Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets *Eur Heart J* 1991; 12 (Suppl. E): 25-32
7. Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium : maestro of the blood circulation. *Phil Trans R Soc Lon B* 1994; 348 : 225-246
8. Scott-Burden T and Vanhoutte PM. Regulation of smooth-muscle growth by endothelium-derived factors. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1): 91-97
9. Scott-Burden T and Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87 (Suppl V): V51-55
10. Holtz F, Fostermann U, Pohl U et al. Flow dependent. Endothelium-mediated dilatation of epicardial coronary arteries in conscious dogs : effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6: 1161-69
11. Bassenge E, Heuch G. Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116: 79-163
12. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H1145-49

13. Rubanyi GM. Endothelium-dependent pressure-induced contraction of isolated canine carotid arteries. *Am J Physiol* 1988; 255: H783-88
14. Rubanyi GM, Freay AD, Johns A et al. Elevated transmural pressure inhibits the release of EDRF by mechanism(s) similar to high K and barium. In : Mulvany MJ ed. *Resistance arteries, structure and function*. New-York: Elsevier 1991; 226-232
15. Vanhoutte P.M. The other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993; 87 (suppl V): V9-17
16. Vanhoutte P.M., and Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertension Research – Clinical and Experimental* 1995; 18: 87-98
17. Vanhoutte PM and Scott-Burden T. The endothelium in Health and Disease. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1): 62-67
18. Vanhoutte PM and Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factors and coronary vasospasm. *Circulation* 1989; 80 (1): 1-9
19. Vanhoutte PM, Gräser T and Lüscher TF. Endothelium-derived contracting factor. In : *Endothelin*, Ed. Gabor Rubanyi, Oxford University Press, 1992; 3-16
20. Vanhoutte PM. State of the art lecture: Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989; 13 (6, part 2): 658-667
21. Vanhoutte PM, Boulanger CM, and Mombouli JV. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76: E3-12
22. Flavahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations to certain agonists in porcine coronary arteries. *J Physiol* 1989; 408: 549-560
23. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8: 28S-41S
24. Houston DS, Vanhoutte PM. Platelets and endothelium-dependent responses. In : Vanhoutte PM. Ed. *Relaxing and contracting factors : Biological and clinical research*. Humana Press, Clifton, NJ, 1988: 425-449



25. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979; 30: 293-331
26. Feletou M and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 515-524
27. Komori K and Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels* 1990; 27: 238-245
28. Nagao T and Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1993; 8: 1-6
29. Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 1993; 92: 2867-71
30. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* 1996; 78: 415-23
31. Taylor SG and Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor : a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 272-74
32. Kilpatrick EV and Cocks TM. Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium-dependent relaxation of pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol* 1994; 112 (2):557-565
33. De Mey JG and Vanhoutte PM. Heterogenous behavior of the canine arterial and venous wall : importance of the endothelium. *Circ Res* 1982; 5: 439-447
34. Lüscher TF, Vanhoutte PM. Dysfunction of the release of endothelium-derived relaxing factor. In : *Endothelial cell dysfunction* Ed. Simionescu N, Simionescu M. Plenum Press, New York; 1992: 65-102
35. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Hypoxemia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364: 45-56
36. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS. Modulation of smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986; 48: 307-320

37. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H822-27
38. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yasaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332 : 411-15
39. Masaki T, Yanagisawa M, Goto K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 1992; 12(4): 391-421
40. Sakurai S and Goto K. Endothelins. *Vascular Actions and Clinical Implications. Drugs* 1993; 46(5): 795-804
41. Schini VB and Vanhoutte PM. Endothelin-1: A potent vasoactive peptide. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69: 1-7
42. Vanhoutte PM. Is endothelin involved in the pathogenesis of hypertension ? *Hypertension* 1993; 21: 747-751
43. Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 1987; 61: 256-270
44. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Natural course of impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelial removal in porcine coronary arteries. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circ Res* 1989; 65: 740-753
45. Shimokawa H, Vanhoutte PM. Angiographic demonstration of hyperconstriction induced by serotonin and aggregating platelets in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 1197-1202
46. Gao SZ, Hunt SA, Schroeder JS, Alderman E, Hill IR, Stinson EB. Does rapidity of development of transplant coronary artery disease portend a worse prognosis ? *J Heart and Lung Transplant* 1994; 13: 1119-1124
47. Pucci AM, Forbes RDC, Billingham ME. Pathologic features in long-term cardiac allograft. *J Heart Transplant* 1990; 9: 339-345
48. Billingham ME. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: S38-44

49. McManus BM, Horley KJ, Wilson JE, Malcom GT, Kendall TJ, Miles RR, Winters GL, Constanzo MR, Miller LL, Radio SJ. Prominence of coronary wall lipids in human heart allografts. *Am J Pathol*. 1995; 147: 293-308
50. Johnson DE, Gao SZ, Schroeder JS, DeCampi WM, Billingham ME. The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. *J Heart Transplant* 1989; 8: 349-59
51. Neish AS, Loh E, Schoen FJ. Myocardial changes in cardiac transplant-associated coronary arteriosclerosis: potential for timely diagnosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 586-92
52. Billingham ME. Pathology of graft vascular disease after heart and heart-lung transplantation and its relation to obliterative bronchiolitis. *Transplant Proc* 1995; 27: 2013-16
53. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8:28S-41
54. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of the endothelial pertussis toxin-sensitive G-protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83: 652-6
55. Sabate M, Manito N, Cequier A, et al. Acute rejection, cytomegalovirus infection and endothelial dysfunction early after heart transplantation. *Transplant Proceed* 1995; 27: 2346-8
56. Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, Carrier M, Leung M. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 404-8
57. Hruban RH, Kasper EK, Gaudin PB, et al. Severe lymphocytic endothelialitis associated with coronary artery spasm in heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 42-7
58. Drinkwater DC, Rudis E, Laks H et al. University of Wisconsin versus Stanford Cardioplegic solution and the development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 891-896

59. Gaudin PB, Ryburn BK, Hutchins et al. Peritransplant injury to the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1994; 18:338-346
60. Fullerton DA, Mitchell MB, McIntyre RC Jr., et al. Mechanisms of coronary vasomotor dysfunction in the transplanted heart. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 86-92
61. 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
62. Worrall NK, Pyo RT, Alexander DG, Misko TP, Lazenby WD, Ferguson TB. Nitric oxide mediates myocardial contractile and electrophysiological dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Surg Forum* 1995; 46: 239-41
63. 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
64. Worrall NK, Misko T, Sullivan PM, Hui JJ, Ferguson TB. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute cardiac allograft rejection. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 378-85
65. Yang X, Chowdhury N, Cai B, Brett J, Marboe C, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 1994; 714-721
66. Russell ME, Wallace AF, Wyner LR, Newell JB, Karnovsky MJ. Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation* 1995; 92: 457-64
67. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169: 1543-55
68. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-24

69. Shears LL, Kawarahada N, Tzeng E, Billiar TR, Watkins SC, Kovesdi I, Lizonova A, Pham SM. Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis. *J Clin Invest* 1997; 100: 2035-42
70. Koglin J, Troels GJ, Mudgett JS, Russell ME. Exacerbated transplant arteriosclerosis in inducible nitric oxide-deficient mice. *Circulation* 1998; 97: 2059-65
71. Kobashigawa JA. Advances in immunosuppression for heart transplantation. *Advances in Cardiac Surgery*; 10 : 155-74
72. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, Zilio P, Benigni D, Remuzzi G. Cyclosporine-induced endothelial cell injury. *Lab Invest* 1986; 55: 455-62
73. Benigni A, Morigi M, Perico N, Zoja C, Amuchastegui CS, Piccinelli A, Donadelli R, Remuzzi G. Acute effect of FK506 and Cyclosporine on endothelial function and renal vascular resistance
74. Xue H, Bukoski RD, McCarron DA, Bennett WM. Induction of contraction in isolated rat aorta by cyclosporine. *Transplantation* 1987; 43: 715-718
75. Lamb FS, Webb RC. Cyclosporine augments reactivity of isolated blood vessels. *Life Sci* 1987; 40: 2571-78
76. Rego A, Vargas R, Foegh ML, Ramwell PW. Effect of cyclosporine : A treatment on vascular reactivity of the rat thoracic aorta. *Transplant Proc* 1988; 20: 572-77
77. Rosenthal AR, Chukwuogo NA, Ocasio VH, Khang KU. Cyclosporine inhibits endothelial cell prostacyclin production. *J Surg Res* 1989; 46: 593-96
78. Voss BL, Hamilton KK, Samara ENS, McKee PA. Cyclosporine suppression of endothelial prostacyclin generation. *Transplantation* 1988; 45: 793-96
79. Brown Z, Neild GH. Cyclosporine inhibits prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Transplant Proc* 1987 ; 19: 1178-80
80. Rego A, Vargas R, Wroblewska B, Foegh ML, Ramwell PW. Attenuation of vascular relaxation and cyclic GMP responses by cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 165-170

81. Diederich D, Yang Z, Buhler FR, Luscher TF. Cyclosporine therapy impairs endothelial-dependent relaxations in the renal circulation (abstract) *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 83A
82. Xuan ATD, Fan TPD, Higenbottam TW, Wallwork J. Cyclosporine in vitro reduces endothelium-dependent relaxation to acetylcholine but does not affect relaxation to nitrovasodilators. *Transplant Proc* 1990; 22: 1723-25
83. Stroes ESG, Luscher TF, de Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ. Cyclosporin A increases nitric oxide activity in vivo. *Hypertension* 1997; 29: 570-575
84. Bunchman TE, Brookshire CA. Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultures human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; 88 (1): 310-4
85. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, et al. X-ray structure of calcineurine inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 1995; 82: 507-22
86. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, et al. Crystal structure of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 1995; 378: 641-644
87. Yatscoff RW, Fryer J, Thliveris JA. Comparison of the effect of Rapamycin and FK506 on release of prostacyclin and endothelin in vitro. *Clin Biochem* 1993; 5: 409-14
88. Weis M, Wildhirt SM, Schulze C, Pehlivanli S, Meisner BM, Uberfuhr P, von Scheidt W. Impact of immunosuppression on coronary endothelial function after cardiac transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30; 871-72
89. Pham SM, Kormos RL, Hattler BG, et al. A prospective trial of tacrolimus in clinical heart transplantation : intermediate results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 11: 764
90. Sweeney MJ, Hoffman, Esterman MA. Metabolism and biochemistry of mycophenolic acid. *Cancer Res* 1972; 32: 1803
91. Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* 1969; 113: 515

92. Lowe JK, Brox L, Henderson JF. Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazole. *Cancer Res* 1977; 37: 736
93. Allison AC, Hovi T, Watts RWE, Webster ADB. Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 1985; ii: 1179
94. Allison AC, Hovi T, Watts RWE, Webster ADB. The role of 'de novo' purine synthesis in lymphocyte transformation. *Ciba Found Symp* 1977; 48: 207
95. Allison AC, Almquist SJ, Muller CD, Eugui EM. In vitro immunosuppressive effects of mycophenolic acid and ester prodrug, RS-61443. *Transplant Proc* 1991; 23(suppl 2): 10
96. Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective anti-proliferative and immunosuppressive activity of mycophenolic acid and its morpholinoethyl ester (RS-61443) in rodents. *Transplant Proc* 1991; 23 (suppl 2): 15
97. Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective anti-proliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 1991; 33: 175
98. Hao L, Lafferty KJ, Allison AC, Eugui EM. RS-61443 allows islet allografting and specific tolerance induction in adult mice. *Transplant Proc* 1990; 22: 876
99. Platz KP, Sollinger HW, Hullett DA, Eckhoff DE, Eugui EM, Allison AC. RS-61443- a new potent immunosuppressive agent. *Transplantation* 1991; 51: 27
100. Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM, Allison AC. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990; 22: 1659
101. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethylester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* 1991; 23 (suppl 2): 19
102. Platz PK, Bechstein WO, Eckhoff DE, Suzuki Y, Sollinger HW. RS-61443 reverses acute allograft rejection in dogs. *Surgery* 1991; 110: 736

103. Ensley RD, Bristow MR, Olsen SL, Taylor DO, Hammond EH, O'Connell JB, Dunn D, Osburn L, Jones KW, Kauffman RS, Gay WA, Renlund DG. The use of Mycophenolic mofetil (RS-61443) in human heart transplant recipients. *Transplantation*; 1993; 56: 75- 82
104. A randomized active-controlled trial of Mycophenolate Mofetil in heart transplant recipients. The Mycophenolate Mofetil Investigators. *Transplantation* 1998 ; 6(4): 507- 515
105. Mohacsi PJ, Tuller D, Hulliger B, Wijngaard PL. Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aorta smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelets-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant* 1997; 5: 484-92
106. Gregory CR, Huang X, Pratt RE et al. *Transplantation* 1995; 59: 655
107. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 1975; 28 : 721-6
108. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989) a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot* 1975; 28: 727-32
109. Longoria J, Roberts R, Marboe CC, Stouch BC, Starnes VA, Barr ML. Sirolimus (Rapamycin) potentiates cyclosporine in prevention of acute lung rejection. *The Journal of Thoracic and Cardiovasc Surgery* 1999, 117, 714-18
110. Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, Dumont L, Busque S, Daloze P, Chen H. Tacrolimus (FK506) and Sirolimus (Rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997; 64(12): 1853-56
111. Gregory CR, Huang X, Pratt RE, Dzau VJ, Shorthouse R, Billingham ME, Morris RE. Treatment with Rapamycin and Mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995; 59(5): 655-61



112. Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. *Transplantation* 1993; 55(6): 1409-18
113. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor B-stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. *Transplant Proc* 1991; 23: 2833-6
114. Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Rapamycin inhibits transplant vasculopathy in long-surviving rat heart allografts. *Transplantation* 1995; 60(7): 729-33
115. Yatscoff RW, Fryer J, Thliveris JA. Comparison of the effect of rapamycin and FK506 on the release of prostacyclin and endothelin in vitro. *Clin Biochem* 1993; 5: 409
116. Corbin F, Blaise GA, Parent M, Chen H, Daloz PM. Effect of Rapamycin on rat aortic ring vasomotion. *J of Cardiovasc Pharm* 1994; 24: 813-17

FIGURE 1

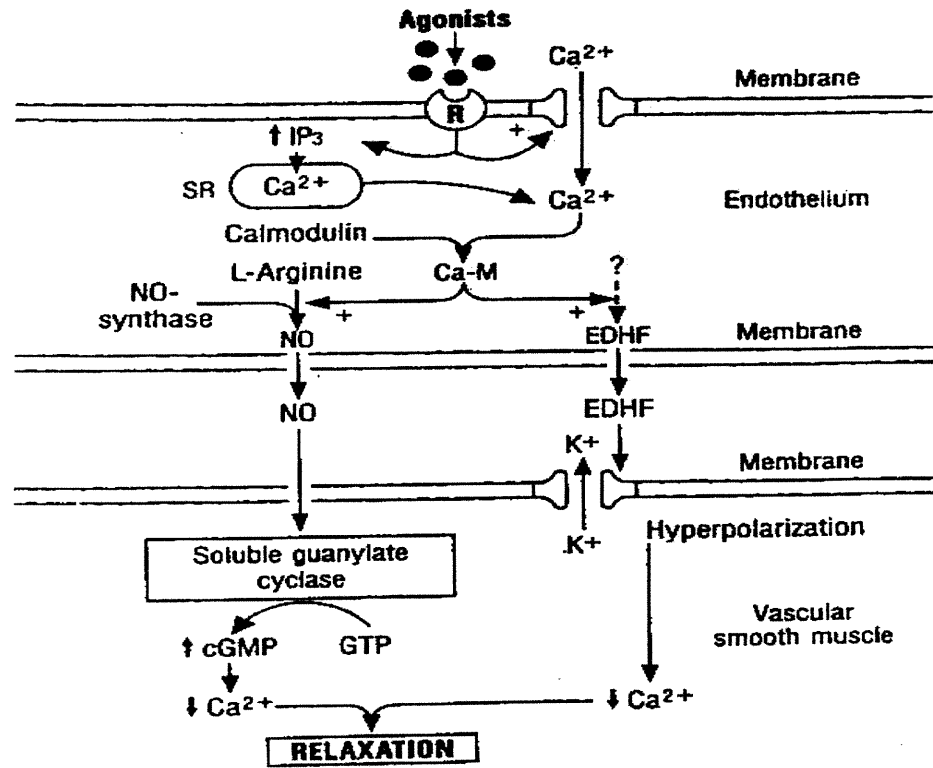


FIGURE 2

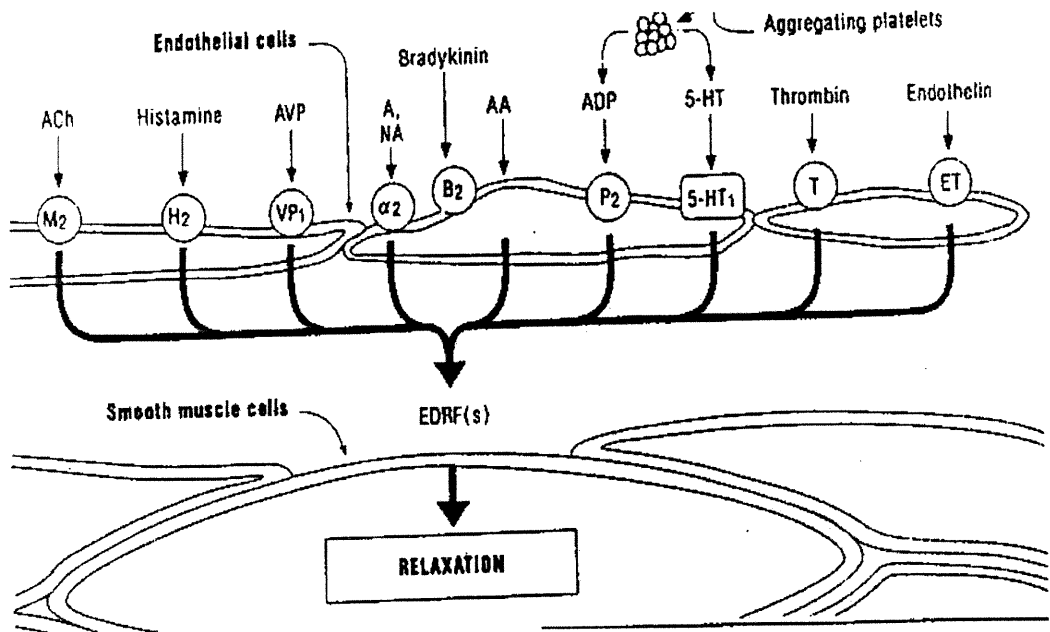


FIGURE 3

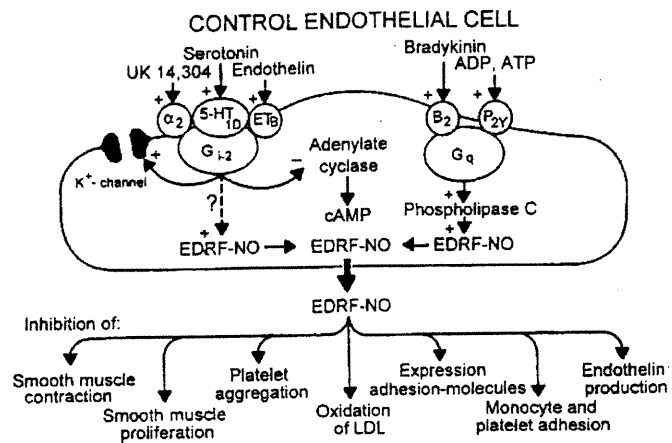


FIGURE 4

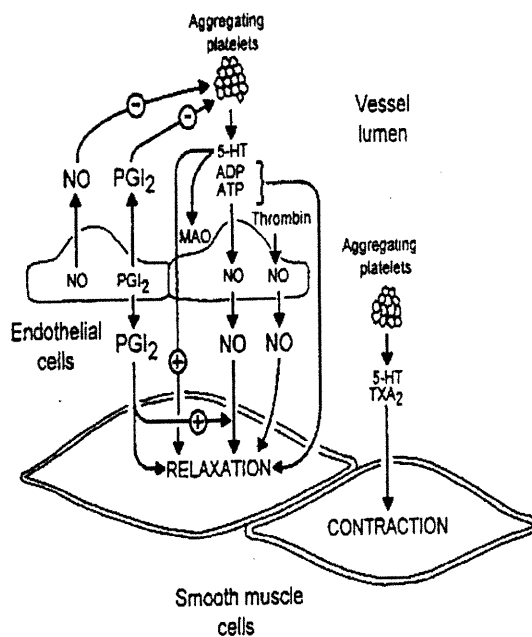


FIGURE 5

