

Université de Montréal

Effets de la dénudation endothéliale et de la tétrahydrobioptérine sur la  
fonction endothéliale des artères coronaires épocardiques porcines après  
transplantation cardiaque

Par

Ismail El-Hamamsy, MD

Département de Chirurgie

Faculté de Médecine

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

Août, 2004

© Ismail El-Hamamsy, 2004



W

4

U58

2005

V. 119

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**

**Effets de la dénudation endothéliale et de la tétrahydrobioptérine sur la  
fonction endothéliale des artères coronaires épocardiques porcines après  
transplantation cardiaque**

**Présenté par :**

**Ismaïl El-Hamamsy, MD**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Philippe Demers, MD**

**Président-rapporteur**

**Louis P. Perrault, MD, Phd**

**Directeur de recherche**

**Jean-François Tanguay, MD**

**Membre du jury**

## RÉSUMÉ

La transplantation cardiaque constitue la procédure de choix chez les patients en défaillance cardiaque terminale, mais la survie à long terme demeure limitée par l'apparition d'une forme précoce d'athérosclérose des artères coronaires du greffon menant au décès. Cette vasculopathie du greffon est précédée d'une dysfonction endothéliale des artères coronaires prédisant sa survenue. Celle-ci est due à plusieurs facteurs per- et post-opératoires dont l'agression immunologique contre l'endothélium, les lésions mécaniques de l'endothélium ainsi que les agents immunosuppresseurs dont la cyclosporine.

Le premier article se rapporte aux propriétés antigéniques de l'endothélium qui ont été incriminées antérieurement dans la pathogénèse de la vasculopathie du greffon. L'effet de la dénudation endothéliale au moment de la transplantation cardiaque hétérotopique chez le porc sur la fonction endothéliale et l'hyperplasie intimale un mois après la transplantation a donc été étudié. Les résultats obtenus soulignent l'importance de préserver l'intégrité de la couche endothéliale lors de la transplantation cardiaque malgré le rôle antigénique inhérent de l'endothélium.

Le deuxième article se concentre sur l'effet de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), un cofacteur dans la synthèse du monoxyde d'azote (NO) et un anti-oxydant puissant, sur la fonction endothéliale d'artères coronaires porcines exposées à la cyclosporine A in vitro. Tel que soupçonné, une protection significative de la fonction endothéliale a été observée suite à l'addition de BH<sub>4</sub>. Plusieurs hypothèses pouvant expliquer cet effet protecteur sont discutées.

Nombre de mots : 222

Mots-clés : Transplantation cardiaque, endothélium, hyperplasie intimale, immunosuppression, tétrahydrobioptérine, rejet chronique

## SUMMARY

Cardiac transplantation remains the solution of choice for patients with terminal heart failure. However, the long term survival of patients is limited by an accelerated form of coronary artery atherosclerosis termed coronary allograft vasculopathy (CAV). This form of atherosclerosis is preceded by the occurrence of a coronary endothelial dysfunction early after heart transplantation which is predictive of CAV and death. Many factors occurring during and following transplantation have been incriminated including the antigenic properties of the endothelium, mechanical damage to the endothelium and the use of immunosuppressants, most notably of cyclosporine A.

The first article studies the effects of the antigenic role of the coronary endothelial layer which is thought by some groups to be responsible for a destruction of the endothelium leading to “endothelial dysfunction” and subsequently CAV. Therefore, the effects of porcine coronary endothelial denudation at the time of implantation on endothelial function and intimal hyperplasia one month following heterotopic heart transplantation were studied. Our results underline the importance of preserving the integrity of the endothelium at the time of graft harvest despite its potential antigenic role in the host.

The second study examines the role of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), an essential cofactor in the synthesis of nitric oxide donor and a powerful anti-oxidant, on porcine coronary endothelial function following exposure to cyclosporine A in vitro. As hypothesized, the addition of BH<sub>4</sub> reduced the endothelial dysfunction observed following exposure of coronary arteries to cyclosporine A. Several explanatory mechanisms are analyzed and discussed.

Word count: 243

**Keywords:** Cardiac transplantation, endothelium, intimal hyperplasia, immunosuppression, tetrahydrobiopterin, chronic rejection.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>PAGE TITRE</b> .....	<b>i</b>
<b>PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY</b> .....	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ (FRANÇAIS)</b> .....	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ (ANGLAIS)</b> .....	<b>iv</b>
<b>CONTENU</b> .....	<b>v</b>
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des abréviations .....	xi
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xiii</b>
 <b>INTRODUCTION</b>	
Transplantation cardiaque : Rôle et Limites .....	2
Endothélium .....	6
Endothélium et Immunogénicité .....	13
Effet de la Cyclosporine A .....	15
Rôle de 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH <sub>4</sub> ) .....	18
Transplantation cardiaque hétérotopique .....	18
Objectifs de travail .....	20
<b>ARTICLE 1</b> .....	<b>23</b>
Injury of the Coronary Endothelium at Implantation Increases Endothelial Dysfunction and Intimal Hyperplasia After Heart Transplantation	

**ARTICLE 2** ..... **49**  
Cyclosporin-Induced Coronary Endothelial Dysfunction: Is Tetrahydrobiopterin the  
Solution?  
**DISCUSSION** ..... **68**  
**BIBLIOGRAPHIE** ..... **75**



## LISTE DES TABLEAUX

### Article 1

**TABLEAU I** Contraction maximale des artères coronaires natives, dénudées et non-dénudées en réponse au chlorure de potassium (KCl, 60 mol/L) et au PGF2 $\alpha$  1 mois après transplantation cardiaque.

### Article 2

**TABLEAU I** Contraction maximale des artères coronaires en réponse au chlorure de potassium (KCl, 60 mol/L) et au PGF2 $\alpha$

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

- FIGURE 1            Survie après transplantation cardiaque selon le registre du International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) – 2004.
- FIGURE 2            Relation entre le NO et le calcium intracellulaire et la 3'-5' guanylate cyclase.
- FIGURE 3            Médiateurs neurohumoraux de la synthèse de monoxyde d'azote (NO).
- FIGURE 4            Postulat du signal de transduction dans une cellule endothéliale normale.
- FIGURE 4            Interaction entre plaquettes, thrombine et endothélium.
- FIGURE 5            (a) Représentation schématique du rôle de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) dans la biosynthèse du NO lorsque "couplée" à la NO synthase endothéliale (eNOS)  
 (b) Un déficit qualitatif ou quantitatif de BH<sub>4</sub> entraîne un "découplage" de la NO synthase (eNOS) avec production subséquente de radicaux libres: anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxy-nitrites (OONO<sup>-</sup>) et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
 L-Arg, L-arginine; L-Cit, L-citrulline; CsA, cyclosporine A; EC, cellule endothéliale.
- FIGURE 6            Mode d'action de la cyclosporine A.
- FIGURE 7            Représentation schématique du modèle expérimental de transplantation cardiaque hétérotopique rétro-péritonéale chez le porc.  
 Ao, aorte; Aao, aorte abdominale; IVC, veine cave inférieure; LA, oreillette gauche; LV; ventricule gauche; PA, artère pulmonaire; RA, oreillette droite; RV, ventricule droit

## Article 1

- FIGURE 1 (a) Représentation schématique du site de dénudation endothéliale au niveau de l'artère coronaire droite du greffon cardiaque au moment de l'implantation  
(b) Cathéter utilisé pour la dénudation.
- FIGURE 2 Courbe concentration-réponse cumulative d'artères coronaires porcines natives, dénudées (D) et non-dénudées (ND) en réponse à la sérotonine (5HT) 1 mois après transplantation cardiaque. Les réponses sont exprimées en pourcentage par rapport à la contraction maximale à la prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ).  
*\*p* < 0.05
- FIGURE 3 Courbe concentration-réponse cumulative d'artères coronaires porcines natives, dénudées (D) et non-dénudées (ND) en réponse à la bradykinine (BK) 1 mois après transplantation cardiaque. Les réponses sont exprimées en pourcentage par rapport à la contraction maximale à la sérotonine (5HT).  
*\*p* < 0.05
- FIGURE 4 Incidence d'hyperplasie intimale sévère (grade 3+ - 4+) dans les artères coronaires dénudées versus non-dénudées 1 mois après transplantation cardiaque.  
*\*p* < 0.05
- FIGURE 5 Cross-sectional view of a denuded coronary artery 1 month after heterotopic heart transplantation showing 3+ intimal hyperplasia.

## Article 2

- FIGURE 1 Courbe concentration-réponse cumulative d'artères coronaires porcines en réponse à la sérotonine (5HT), un vasodilatateur

dépendant de l'endothélium. Les réponses sont exprimées en pourcentage par rapport à la contraction maximale à la prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ).

\* $p < 0.05$  vs contrôle, \*\* $p < 0.05$  vs CsA 10<sup>-4</sup>, + $p < 0.05$  vs CsA 10<sup>-4</sup> + BH<sub>4</sub>

FIGURE 2

Courbe concentration-réponse cumulative d'artères coronaires porcines en réponse à la bradykinine (BK), un vasodilatateur dépendant de l'endothélium. Les réponses sont exprimées en pourcentage par rapport à la contraction maximale à la sérotonine (5HT).

\* $p < 0.05$

FIGURE 3

(a) Représentation schématique du rôle de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) dans la biosynthèse du NO lorsque "couplée" à la NO synthase endothéliale (eNOS)

(b) Un déficit qualitatif ou quantitatif de BH<sub>4</sub> entraîne un "découplage" de la NO synthase (eNOS) avec production subséquente de radicaux libres: anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxydites (OONO<sup>-</sup>) et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

L-Arg, L-arginine; L-Cit, L-citrulline; CsA, cyclosporine A; EC, cellule endothéliale

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

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
BK	Bradykinine
BH4	5,6,7,8-tétrahydrobioptérine
CAV	Coronary allograft vasculopathy
CsA	Cyclosporine A
EC	Cellules endothéliales
EDCF	Endothelium derived contracting factor
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EET	Acide epoxyeicosaténoïque
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ET-1	Endothéline-1
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FK506	Tacrolimus
GMPc	3'-5'-guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
H	Histamine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
IL-2	Interleukine-2
iNOS	Inducible nitric oxide synthase

IP3	Inositol triphosphate
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
IVUS	Intravascular ultrasound
KCl	Chlorure de potassium
LAD	Left anterior descending artery
L-Arg	L-arginine
L-Cit	L-citrulline
LCX	Left circumflex artery
LDH	Lactate déhydrogénase
MMF	Mycophenolate mofetil
NA	Noradrénaline
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxide synthase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anions superoxyde
OONO <sup>-</sup>	Peroxynitrite
PDGF	Platelet derived growth factor
PGF2 $\alpha$	Prostaglandine F2 $\alpha$
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
Protéine Gi	Protéine de couplage Gi (GTPase binding protein)
Protéine Gq	Protéine de couplage Gq
SEM	Standard error of the mean
SLA	Swine Lymphocyte Alloantigen
SNP	Sodium nitroprussiate
SOD	Superoxyde dismutase
T	Thrombine
TNF	Tumor necrosis factor
vWF	Von Willebrand factor

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de chirurgie expérimentale de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Marie-Pierre Mathieu, technicienne de formation, assistante chirurgicale, archiviste, secrétaire sans limites, voire même entrepreneur de pompe funèbre au début de ce périple, un gros merci pour ta patience, ton efficacité et ta bonne humeur. Fanny Desjardins, ma tutrice infatigable des chambres d'organe, l'experte dans la dissection abdominale, je t'en suis bien reconnaissant et j'espère que mes heures d'écoute de tes nombreuses présentations compensent.

A mon partenaire de recherche, le Dr Louis-Mathieu Stevens, ce fut une année exceptionnelle. Des heures de plaisir, nombres de déceptions, nombres d'heures à cogiter sur la voie la plus directe vers un prix Nobel. Si tu ne l'obtiens pas en chirurgie, les statistiques sont à ta merci. Merci pour ton assistance inconditionnelle, ta patience exemplaire et ton admirable rigueur.

Au Dr Louis P. Perrault, merci de la confiance que vous m'avez témoignée. Vous avez établi un barème par votre efficacité et votre omniprésence malgré votre horaire bien chargé. Surtout, un grand merci pour m'avoir montré la lumière sur le monde de la recherche, pour nous avoir fait croire en notre potentiel et pour nombre de leçons qui défient le temps et qui transgressent la médecine.

A Lou, Nicolas, Youssef, et Foufi.

A ma famille.

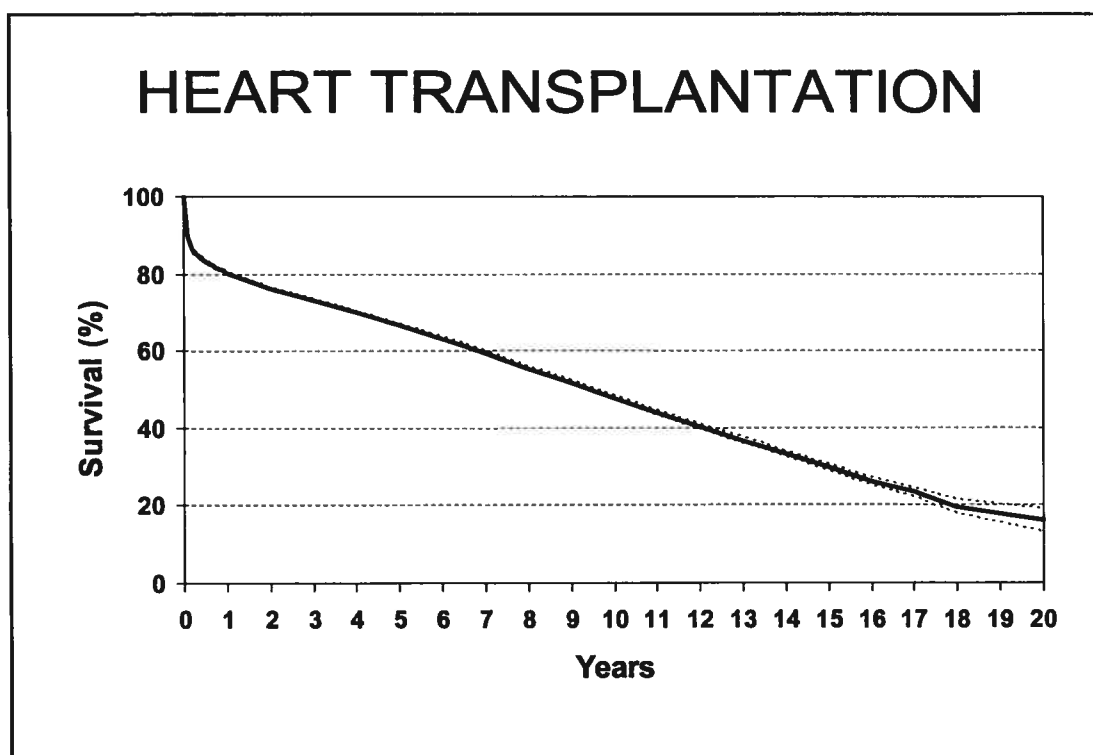
Merci!

# Introduction



## Transplantation cardiaque: Rôle et Limites

La transplantation cardiaque demeure le traitement de choix pour les patients en insuffisance cardiaque terminale. Toutefois, les taux de survie actuellement rapportés 5 ans après transplantation cardiaque sont de 70% (Figure 1).<sup>1</sup>



**Figure 1.** Survie après transplantation cardiaque selon le registre du International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) - 2004

Alors que le facteur limitant majeur dans l'expérience initiale, suivant la première transplantation par Christian Barnard en 1969, était un rejet aigu dû au manque d'arsenal immunosuppresseur, de nos jours la cause principale de décès au-delà de la première année après la greffe cardiaque est le rejet chronique.<sup>1</sup> Ce dernier se manifeste par une forme progressive et accélérée d'athérosclérose diffuse, concentrique des artères

coronaires épiscopardiques et sous-endocardiques, encore dénommée «cardiac allograft vasculopathy» (CAV) ou vasculopathie du greffon. Cliniquement, cette pathologie se manifeste par de l'ischémie silencieuse, des arythmies ventriculaires, de l'insuffisance cardiaque et des morts subites. Quoique des lésions coronaires visibles soient notées chez seulement 11% des patients à 1 an à la coronarographie, des lésions d'épaississement intimal sont notées chez 75% de ces greffons à 1 an à l'aide de l'échographie intravasculaire (intravascular ultrasound ou IVUS).

Du point de vue histologique, ces changements se manifestent par une atteinte évolutive pouvant atteindre tous les segments de l'arbre artériel coronaire. Les artères épiscopardiques de grand et de petit calibre ainsi que les artères de résistance intramyocardiques sont touchées. L'apparence microscopique la plus caractéristique est celle d'une prolifération marquée de cellules myointimales. Celle-ci s'effectue de façon concentrique dans les artères intramyocardiques mais peut prendre une allure excentrique dans les artères épiscopardiques, et s'accompagner de dépôts lipidiques. Ces changements histologiques s'effectuent de façon progressive, débutant par un épaississement fibreux intimal dû à la prolifération de cellules riches en myofilaments (cellules myointimales). La matrice extracellulaire contient un mélange de tissu fibreux ou de collagène, de fibrine et de débris nucléaires. Par la suite, se développent des plaques formées d'une couche fibreuse recouvrant des dépôts lipidiques et cellules spongieuses. Ces plaques ressemblent aux plaques d'athérosclérose observées dans la maladie coronarienne athérosclérotique classique. La dernière étape est celle de la progression de ces lésions d'hyperplasie intimale fibreuse au niveau de tout l'arbre coronaire. L'atteinte des microvaisseaux intramyocardiques explique l'incidence de microinfarctus du myocarde chez ces patients.

Ces changements morphologiques sont précédés d'une altération des propriétés de relaxation dépendantes de l'endothélium des artères coronaires.<sup>2</sup> En effet, la dysfonction endothéliale coronaire précoce est prédictive de l'apparition d'hyperplasie intimale 1 an après la transplantation, d'événements cardiaques et de décès.<sup>3</sup> En effet, l'endothélium contient des propriétés vasorelaxantes et vasoprotectrices qui seront discutées ultérieurement. Cette dysfonction endothéliale est initialement sélective touchant la voie des récepteurs couplés aux protéines Gi (insensible à la toxine de la coqueluche).<sup>4</sup> Par la suite, la dysfonction devient globale atteignant les récepteurs couplés aux protéines Gq (sensibles à la toxine de la coqueluche).<sup>5</sup> Les protéines G sont des protéines membranaires qui se couplent au GTP (guanosine triphosphate) permettant la transduction de signaux de la membrane vers le cytoplasme, le transport nucléaire ou encore la synthèse de protéines. Au niveau de la paroi endothéliale, ces protéines G sont reliées à des récepteurs transmembranaires formés de sept domaines hélicoïdaux. Deux types de protéines G se retrouvent au niveau des cellules endothéliales tel que mentionné précédemment : les protéines Gi et Gq. Les protéines Gi (non-sensibles à la toxine de la coqueluche) sont liées au récepteur 5HT<sub>1D</sub> sensible à la sérotonine (5HT). Les protéines Gq (sensibles à la toxine de la coqueluche) sont liées au récepteur B<sub>2</sub> sensible à la bradykinine (BK). Les deux récepteurs lorsque stimulés sur les cellules endothéliales porcines entraînent une relaxation vasculaire endothélium-dépendante. Cette chronologie dans l'évolution de la dysfonction endothéliale (atteinte des récepteurs couplés aux protéines Gi suivie des récepteurs liés aux protéines Gq) est semblable à celle observée dans multiples pathologies menant à une atteinte de l'endothélium vasculaire telles le diabète,<sup>6</sup> l'hyperlipidémie,<sup>7</sup> le tabagisme<sup>8</sup> et l'hypertension artérielle.<sup>9</sup> L'atteinte endothéliale favorise ainsi l'adhésion et la transmigration des cellules inflammatoires vers

la paroi vasculaire, l'agrégation plaquettaire et les phénomènes de thrombose et d'occlusion des artères coronaires intramyocardiques d'abord et épocardiques par la suite, entraînant de multiples petits infarctus disséminés.

Divers facteurs ont été incriminés dans l'étiopathogénèse de la dysfonction endothéliale et subséquemment de la vasculopathie du greffon après transplantation cardiaque, notamment le temps d'ischémie du greffon,<sup>10</sup> les solutions de cardioplégie<sup>11</sup> et de préservation,<sup>12</sup> l'ischémie-reperfusion,<sup>13</sup> l'infection au cytomégalovirus (CMV),<sup>14</sup> l'agression immunologique suivant la transplantation<sup>15</sup> et même les agents immunosuppresseurs telle la cyclosporine A (CsA).<sup>16</sup> La multitude d'événements contributaires permet d'expliquer l'incidence toujours élevée de la vasculopathie du greffon après transplantation cardiaque malgré les progrès dans les domaines de la préservation cardiaque et de l'immunosuppression. De multiples approches doivent donc être exploitées pour tenter de palier à ce problème. Au cours de ce travail, nous tenterons d'examiner deux volets, en l'occurrence l'agression immunologique contre l'endothélium suivant la transplantation cardiaque et le rôle de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), un agent antioxydant, sur la dysfonction endothéliale secondaire à la CsA.

Toutefois, nous aborderons d'abord le rôle et la physiologie de l'endothélium dans l'homéostasie des structures vasculaires, puis nous aborderons plus précisément les propriétés immunogènes de l'endothélium et finalement nous examinerons le rôle de la CsA sur l'endothélium et le rôle potentiel du BH<sub>4</sub>.

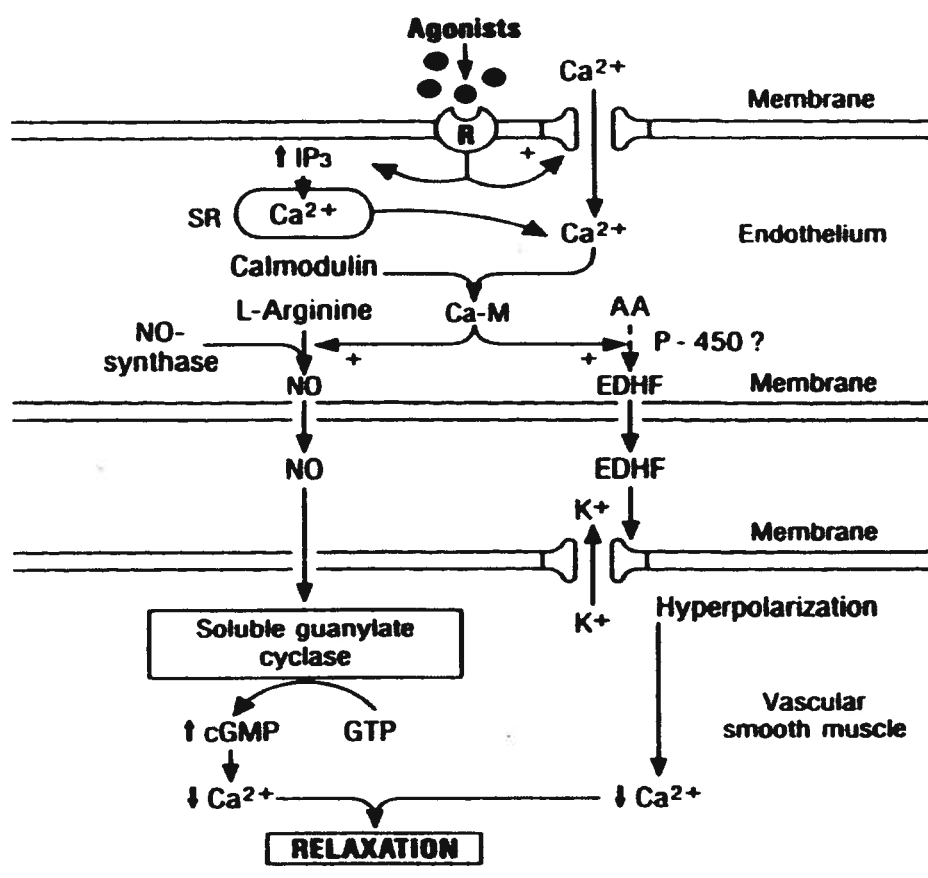
## **Endothélium**

L'endothélium, initialement considéré comme une barrière inerte séparant les milieux intravasculaires et extravasculaires, est en réalité une entité physiologique complexe qui régit les multiples composantes circulantes dans le milieu sanguin. Il contribue à la régulation du tonus vasomoteur, au maintien d'une surface antithrombogénique, au contrôle de la prolifération du muscle lisse et de l'adhésion des cellules inflammatoires en circulation. Le rôle central de l'endothélium dans la régulation de l'hémostase vasculaire a été initialement décrit par Furchgott et Zawadski en 1980.<sup>17</sup> Ceux-ci ont en effet pour la première fois démontré le rôle obligatoire des cellules endothéliales dans la relaxation des vaisseaux en réponse à l'acétylcholine, un agent relaxant. Ce qui était connu comme le « endothelium-derived relaxing factor » ou EDRF s'est révélé être de le monoxyde d'azote (NO), agent diffusible sécrété par les cellules endothéliales jouant un rôle central dans la relaxation médiée par l'endothélium. Par la suite, plusieurs autres facteurs dépendants de l'endothélium furent identifiés<sup>18</sup> affectant de façon directe les propriétés ci-haut mentionnées des vaisseaux, notamment la prostacycline, l'endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (tous deux des agents relaxants) et l'endothéline (agent contractant).

### ***1- Monoxyde d'azote (NO)***

C'est en 1980 que Furchgott et Zawadski ont inauguré l'ère moderne de la recherche sur les propriétés vasomotrices des artères grâce à la découverte de la substance labile et diffusible, non prostanoïde médiant la relaxation dépendante de l'endothélium en

réponse à l'acétylcholine: le monoxyde d'azote (NO).<sup>17</sup> Le NO est formé dans les cellules endothéliales normales à partir d'une enzyme constitutive: la NO synthase (NOS III). L'activation et le bon fonctionnement de cette enzyme requièrent la présence intracellulaire de calcium, de calmoduline, de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>). Le NO ainsi produit, diffuse vers le muscle lisse entraînant une relaxation de celui-ci par le biais d'une enzyme cytosolique, la guanylate cyclase soluble qui mène à une augmentation de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) intracellulaire. Cette dernière contribue à l'inhibition de l'appareil contractile des cellules musculaires lisses (Figure 2).

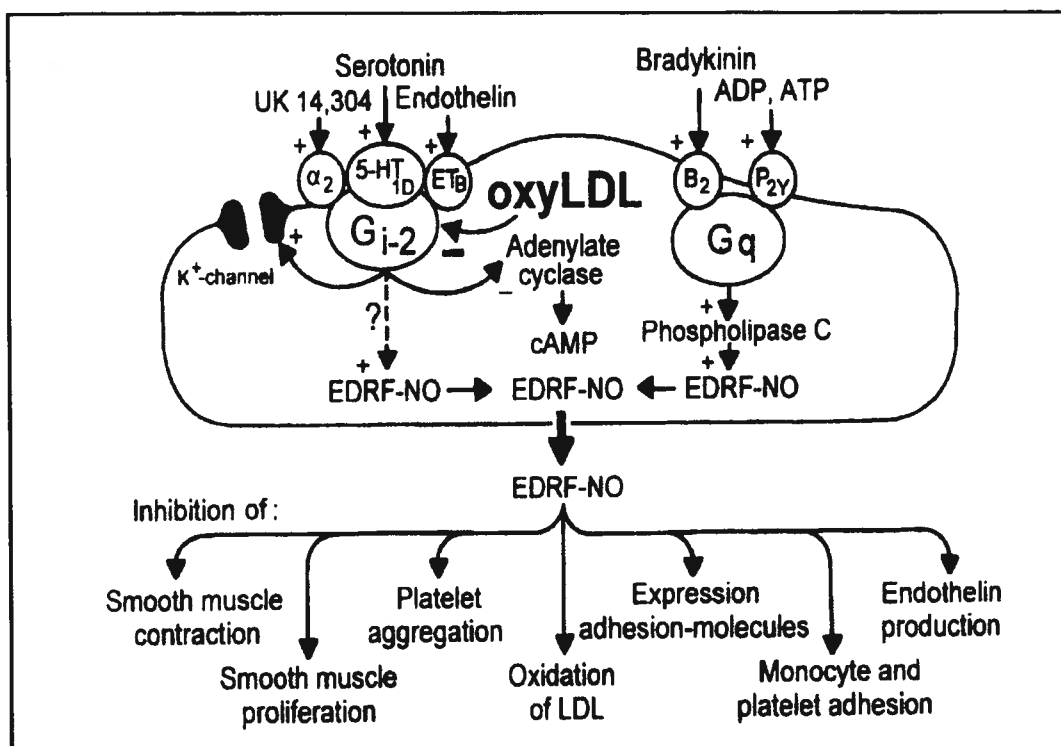


**Figure 2.** Relation entre le NO et le calcium intracellulaire et la 3'-5' guanylate cyclase

Deux autres isoformes de NO synthase ont été identifiées, en l'occurrence une forme neuronale (type I) et une forme inductible (type II).<sup>21</sup> Cette dernière est indépendante du calcium et peut être retrouvée dans plusieurs types de cellules, incluant les cellules musculaires lisses vasculaires. Son expression est favorisée par divers stimuli incluant l'exposition à des endotoxines. Le rôle vasorelaxant attribué au NO<sup>19,20</sup> est fortement suggéré par la vasoconstriction observée au niveau des divers lits vasculaires *in vivo* suite à l'inhibition de la NO synthase, causant une augmentation de la pression artérielle autant dans des modèles animaux que chez les humains.<sup>21-23</sup>

Outre son rôle sur la relaxation du muscle lisse vasculaire, le NO, par le fait de sa diffusion vers la lumière des vaisseaux sanguins, contribue à protéger et à préserver l'homéostasie de la couche endothéliale. Ainsi, le NO inhibe (de concert avec la prostacycline) l'agrégation plaquettaire<sup>24</sup> et l'adhésion leucocytaire à l'endothélium.<sup>25</sup> Le NO inhibe également la prolifération de cellules musculaires lisses vasculaires.<sup>26-28</sup>

La libération de NO est médiée par de nombreux signaux neurohumoraux qui activent des récepteurs endothéliaux spécifiques (Figure 3).<sup>29</sup>



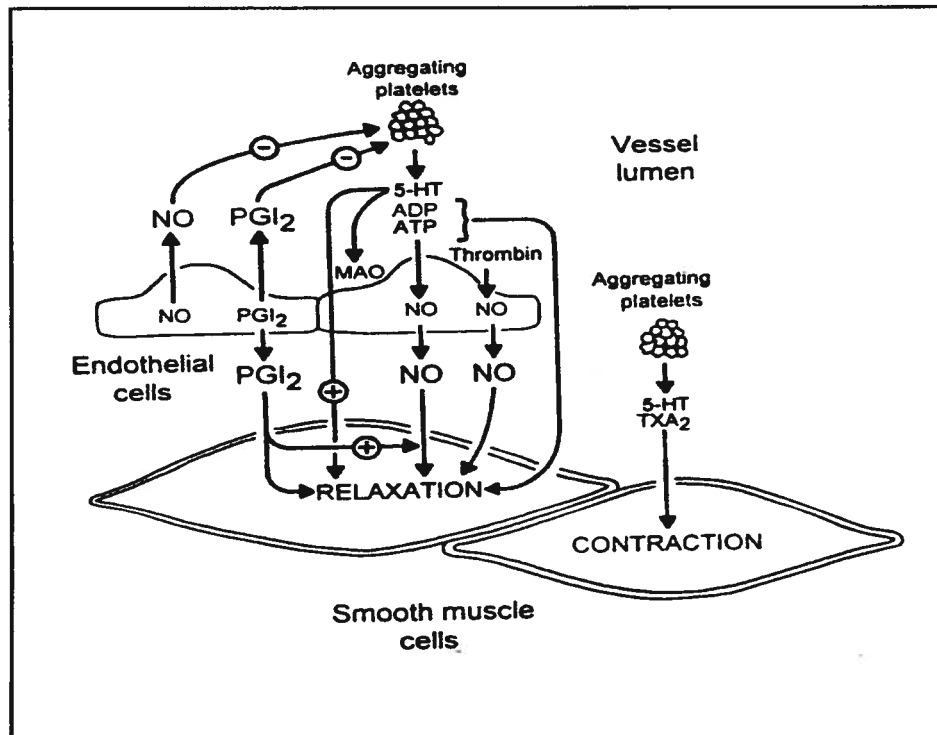
**Figure 3.** Médiateurs neurohumoraux de la synthèse de monoxyde d'azote (NO)

Ces récepteurs répondent à divers modes de signalisation (des hormones circulantes, des autacoïdes ou des substances libérées par les plaquettes). Ainsi, les cellules endothéliales porcines possèdent deux types de récepteurs endothéliaux responsables de la libération de NO. Ces deux types de récepteurs se distinguent par les protéines de couplage auxquelles ils sont liés. Les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, sérotoninergiques et thrombinergiques sont couplés à des protéines Gi sensibles à la toxine de la coqueluche, alors que les récepteurs à l'adénosine diphosphate (ADP) et à la bradykinine sont couplés à des protéines Gq qui ne sont pas sensibles à la toxine de la coqueluche.<sup>30</sup>



## 2- Prostacycline

La prostacycline, un produit majeur de la cyclooxygénase vasculaire, est formée au niveau des cellules endothéliales, dans la média et dans l'adventice des vaisseaux en réponse à divers stimuli dont l'hypoxie et les forces de cisaillement exercées par le flot sanguin pulsatile et non laminaire au niveau du système artériel.<sup>31,32</sup> La prostacycline agit de deux façons au niveau des vaisseaux sanguins. Elle possède un rôle vasorelaxant sur les cellules musculaires lisses par la production de 3'-5'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique) via l'activation de l'adénylate cyclase. Ces propriétés vasorelaxantes sont toutefois peu importantes comparées à l'effet du NO. Le deuxième rôle, plus significatif, est son rôle synergique avec le NO dans la prévention de l'agrégation plaquettaire au niveau de l'endothélium (Figure 4).<sup>33-35</sup>



**Figure 4.** Interaction entre plaquettes, thrombine et endothélium.

### 3- **Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)**

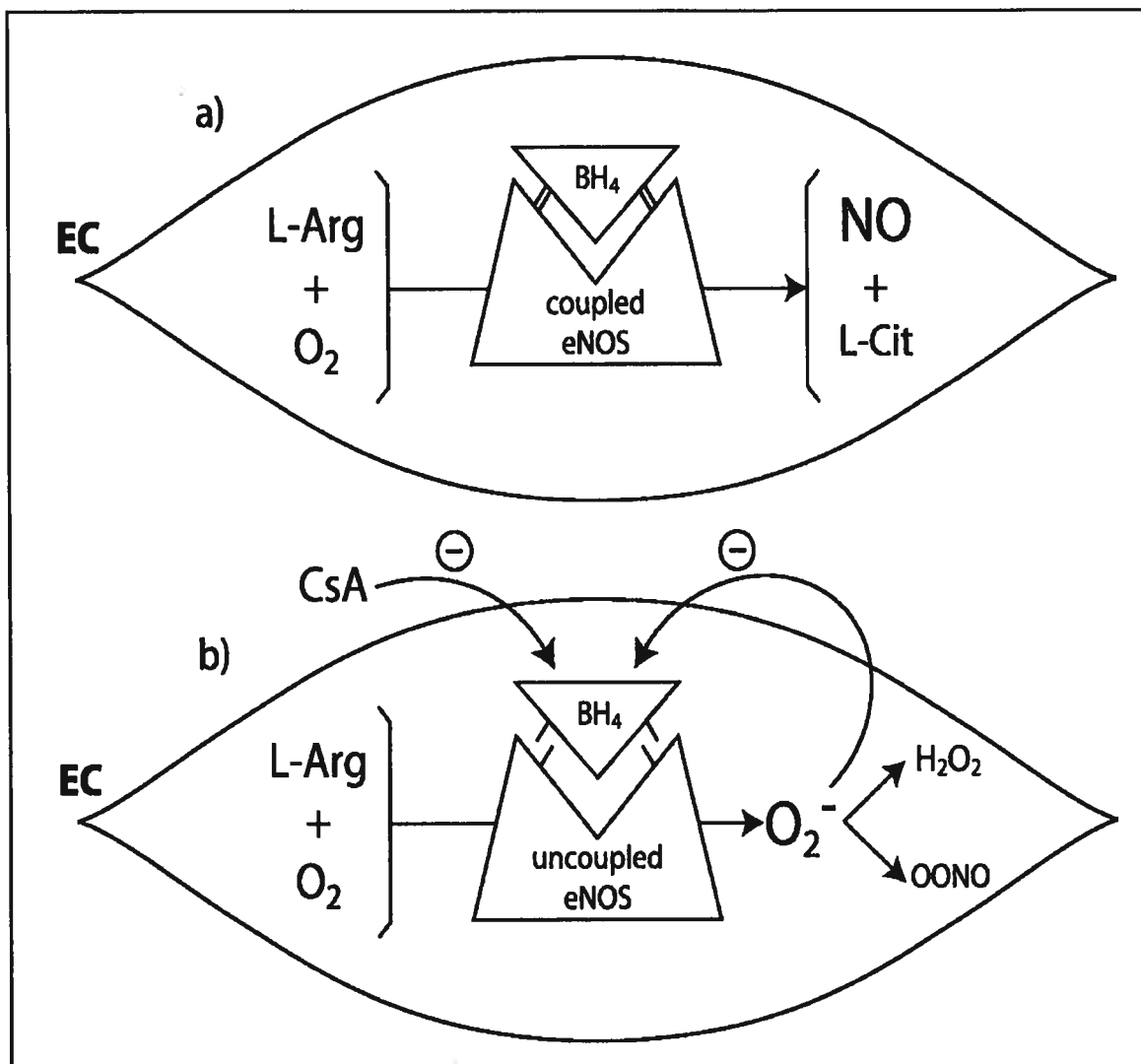
L'endothélium sécrète un autre facteur avec des propriétés vasorelaxantes, plus connu pour ses propriétés électrophysiologiques que pour sa composition chimique. En effet, cet agent, qui est différent du NO et de la prostacycline, entraîne une hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire dépendante de l'endothélium,<sup>36-38</sup> d'où son appellation : «endothelium-derived hyperpolarizing factor» (EDHF). Plusieurs hypothèses ont été soulevées quant à la nature chimique de l'EDHF, le liant entre autres à l'acide epoxyeicosaténoïque (EET) dans certains modèles.<sup>36,39</sup> L'EDHF agit en augmentant le mouvement des ions potassiques au niveau de la paroi membranaire du muscle lisse, un phénomène qui requiert une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium au niveau des cellules endothéliales.

La contribution de l'EDHF à la relaxation vasculaire est variable selon la taille des vaisseaux ainsi que le contexte pathologique associé. Ainsi, l'EDHF est plus physiologiquement actif dans les vaisseaux de résistance et dans les situations où le NO est inhibé.<sup>40,41</sup>

### 4- **Facteurs contractants dérivés de l'endothélium**

Parallèlement à ses propriétés vasorelaxantes, l'endothélium possède des propriétés vasoconstrictrices significatives. Il agit ainsi via la libération de substances diffusibles. Celles-ci sont nombreuses et incluent les radicaux libres tels l'anion superoxyde et le peroxy-nitrite, la thromboxane A2 et l'endothéline. Cette dernière détient des propriétés vasoconstrictrices puissantes et joue un rôle important dans la pathogénèse de plusieurs processus pathologiques. Les radicaux libres qui sont sécrétés dans des situations pathologiques entraînent une vasoconstriction de plusieurs façons, entre autres,

en inhibant de façon quantitative et qualitative la  $BH_4$ , mais également en diminuant la quantité de NO sécrété par l'endothélium et en piégeant le NO sécrété par les cellules endothéliales (Figure 5).<sup>42-44</sup>



**Figure 5.** (a) Représentation schématique du rôle de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine ( $BH_4$ ) dans la biosynthèse du NO lorsque "couplée" à la NO synthase endothéliale (eNOS) (b) Un déficit qualitatif ou quantitatif de  $BH_4$  entraîne un "découplage" de la NO synthase (eNOS) avec production subséquente de radicaux libres: anions superoxydes ( $O_2^-$ ), peroxynitrites ( $OONO$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

*L-Arg, L-arginine; L-Cit, L-citrulline; CsA, cyclosporine A; EC, cellule endothéliale*

## **Endothélium et immunogénicité**

Au cours des dernières années, plusieurs études se sont penchées sur les propriétés immunogènes de l'endothélium qui furent bien établies par la démonstration par différentes techniques (Enzyme Linked Immunosorbent Assay [ELISA], radioimmunoassay) de la présence d'anticorps anti-endothéliaux en circulation suite à une transplantation cardiaque.<sup>45</sup> Ces anticorps s'attaquent spécifiquement à l'endothélium des artères coronaires du greffon et initient une cascade d'évènements menant à l'hyperplasie intinale, à l'athérosclérose accélérée du greffon et à la thrombose.<sup>46</sup> Ces anticorps sont produits en réponse à un passage de composantes normalement intraendothéliales vers le milieu extracellulaire suite aux lésions subies par les cellules endothéliales lors de l'implantation.<sup>47</sup> Ces lésions sont de diverses natures : ischémiques, barométriques ou mécaniques, fragilisant la paroi des cellules endothéliales qui perdent ainsi leurs propriétés de barrières semi-imperméables. Par exemple, la vimentine, un filament intermédiaire des cellules endothéliales exclusivement retrouvé dans le milieu intracellulaire en temps normal, migre vers le milieu extracellulaire suite à une transplantation cardiaque.<sup>48-51</sup> Cette protéine intracellulaire obligatoire est reconnue comme étrangère par le système immunitaire entraînant la formation d'anticorps anti-vimentine dont la présence chez l'humain est corrélée avec le développement de maladie du greffon post-transplantation cardiaque.<sup>52-55</sup> En effet, ces anticorps s'attaquent aux cellules endothéliales, les détruisant et déclenchant une cascade inflammatoire importante menant à la formation d'hyperplasie intinale et au développement de la vasculopathie du greffon cardiaque.

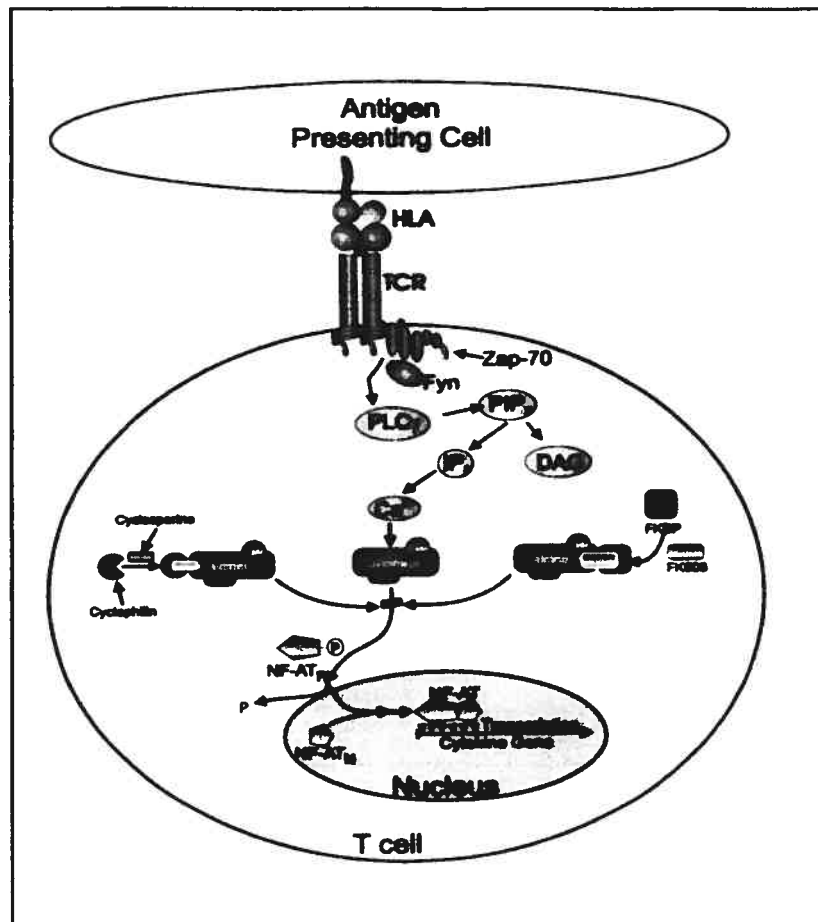
Une altération spécifique des récepteurs à la surface des cellules endothéliales a également été identifiée suite à une transplantation cardiaque menant à une dysfonction endothéliale et des épisodes de rejet subaigu.<sup>56,57</sup> Fait intéressant, certaines de ces altérations de la fonction endothéliale sont réversibles suite au traitement du rejet ce qui suggère que l'endothélium peut récupérer sa capacité fonctionnelle si l'insulte immunologique est enrayée à temps. Cette observation est concordante avec celle du groupe de Anderson qui a démontré que des altérations de la fonction endothéliale se manifestant tôt après la greffe pouvaient récupérer même en présence de changements modérés au niveau de l'intima, suggérant que l'état de la fonction endothéliale peut varier au gré de la nature épisodique de l'agression immunologique.<sup>58</sup>

Ces observations ont mené certains groupes à se questionner sur les avantages présumés de l'endothélium post-transplantation compte tenu de ses propriétés immunogènes qui semblent comporter des conséquences néfastes sur la paroi vasculaire. Peu de rapports sont disponibles dans la littérature à ce sujet. Toutefois, un groupe en particulier s'y est attardé. Ainsi, Galumbeck et al. ont suggéré que la dénudation endothéliale mécanique au moment de l'implantation améliorerait la perméabilité de greffons artériels fémoraux 5 et 120 jours suite à leur implantation chez des rats non-identiques.<sup>59,60</sup> Ces résultats étaient, selon les auteurs, attribués à une diminution de l'agression immunologique contre la paroi endovasculaire de greffons dénués d'endothélium, éliminant ainsi le facteur déclencheur de la réaction de rejet à l'origine de la dysfonction endothéliale et de l'hyperplasie intimale observée sur les greffons malades à long terme. Le but de notre première étude était donc de vérifier la fonction endothéliale ainsi que le degré d'hyperplasie intimale sur des artères coronaires dénudées de leur endothélium 1 mois après transplantation cardiaque chez le porc. L'hypothèse de travail

était que le rôle protecteur de l'endothélium sur l'intégrité de la paroi vasculaire primait sur les effets néfastes associés à son pouvoir immunogène, imposant ainsi de préserver l'intégrité de cette couche cellulaire par tous les moyens possibles lors de l'implantation.

### **Effet de la Cyclosporine A**

Tel que mentionné précédemment, parmi les facteurs incriminés dans le développement de la dysfonction endothéliale suivant la transplantation cardiaque, on retrouve les agents immunosuppresseurs dont la cyclosporine A (CsA). L'introduction de la CsA dans le régime immunosuppresseur au début des années 1980s a permis une nette amélioration des taux de survie post-transplantation permettant l'essor de l'ère moderne de la transplantation cardiaque. Toutefois, l'incidence de l'athérosclérose accélérée du greffon n'a pas changé et les études démontrent que la CsA en est partiellement responsable. La CsA est un polypeptide composé de 11 acides aminés dérivés de 2 souches fongiques: *Cylindrocapsa lucidum* Booth et *Tolypocladium inflatum* Gams. La CsA agit en se liant à des protéines cellulaires, principalement la cyclophiline (un membre de la famille des *immunophilin-binding proteins*), permettant ainsi d'inhiber l'activité de la calcineurine (une phosphatase dépendante de la calmoduline), qui mène à l'inhibition de la transcription du gène codant pour l'interleukine-2 (IL-2), et à l'expression des récepteurs IL-2 à la surface des lymphocytes T-helper et cytotoxiques (Figure 6).



**Figure 6.** Mode d'action de la cyclosporine A

Ces deux actions mènent à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T.<sup>61</sup> Une des complications majeures associées à l'utilisation de la 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.<sup>62-67</sup> En effet, Zoja et al.<sup>62</sup> ont démontré que l'exposition de cellules endothéliales bovines à la CsA in vitro entraînait un détachement des cellules du milieu de culture ainsi qu'une augmentation des concentrations de lactate déshydrogénase (LDH), témoignant ainsi d'une lyse cellulaire. Cet effet, qui était temps et dose-dépendant, démontre le rôle cytotoxique direct de la CsA sur les cellules

endothéliales. Par ailleurs, la CsA exerce un effet contractile direct sur les cellules musculaires lisses.<sup>68-72</sup> Ainsi, Berkenboom et al.<sup>72</sup> ont objectivé la présence d'une réponse contractile accrue à la sérotonine d'aortes de rats exposées à la CsA desquelles les cellules endothéliales étaient mécaniquement supprimées. Cette réponse était augmentée par rapport à des aortes dénudées sans exposition à la CsA, reflétant ainsi l'effet procontractile de la CsA sur les cellules musculaires lisses vasculaires. L'effet de la CsA se manifeste en outre par une atteinte de la libération des EDRF<sup>73,74</sup> ainsi qu'une augmentation de la production d'endothéline-1<sup>75-77</sup> tel que démontré par Kocik et al.<sup>77</sup> sur une cohorte de patients transplantés cardiaques recevant de la CsA. Toutefois, le mécanisme principalement suggéré implique un stress oxydatif secondaire à la formation de radicaux libres cytotoxiques au niveau de l'endothélium.<sup>78-80</sup> Dans une étude sur le rôle de la CsA sur les cellules endothéliales bovines, Lopez-Ongil et al.<sup>80</sup> ont démontré la synthèse augmentée de radicaux libres suite à l'exposition à la CsA de façon dose-dépendante, plus particulièrement les anions superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. La présence de ces radicaux libres entraîne une diminution des relaxations endothélium-dépendantes.<sup>78</sup> 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. Ces effets dépendent en grande partie des concentrations sériques de CsA,<sup>81,82</sup> indépendamment de la durée d'administration de l'immunosuppression.<sup>83</sup>



## **Rôle de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>)**

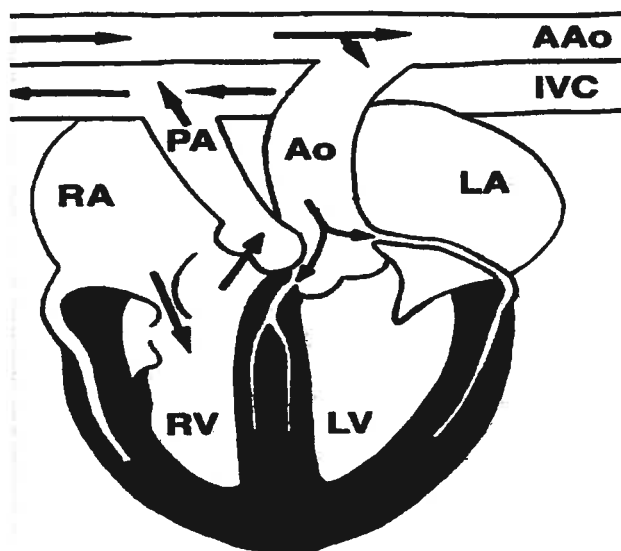
La tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) est un cofacteur essentiel de la NO synthase (NOS),<sup>84,85</sup> l'enzyme responsable de la production de NO (Figure 5). Une réduction des taux de BH<sub>4</sub> limite la production de NO et entraîne un découplage de la NO synthase avec, conséquemment, une production préférentielle de peroxynitrite (OONO<sup>•</sup>) et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),<sup>86</sup> deux radicaux libres ayant des effets cytotoxiques directs sur l'endothélium.<sup>68</sup> L'administration de BH<sub>4</sub> dans différentes situations pathologiques entraîne une amélioration de la réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium via son effet sur la production de NO et son effet antioxydant. Ceci est démontré dans les contextes de maladie coronarienne primaire,<sup>87</sup> d'hypercholestérolémie,<sup>88</sup> d'ischémie-reperfusion<sup>89</sup> ou de diabète.<sup>90</sup>

Ainsi, compte tenu du fait que l'atteinte endothéliale secondaire à l'administration de CsA est inextricablement liée à un stress oxydatif, nous avons opté d'étudier l'effet de l'administration de BH<sub>4</sub> suite à l'exposition d'artères coronaires porcines à la CsA en utilisant un modèle *in vitro* précédemment développé dans notre laboratoire.<sup>16</sup>

## **Transplantation cardiaque hétérotopique**

Le rejet chronique survenant après une transplantation cardiaque se manifeste initialement par une dysfonction endothéliale des artères coronaires tel que mentionné

précédemment. Dans la première étude *in vivo*, nous avons utilisé un modèle bien établi de transplantation cardiaque hétérotopique rétropéritoneale chez des porcs (Figure 7).



**Figure 7.** Représentation schématique du modèle expérimental de transplantation cardiaque hétérotopique rétropéritoneale chez le porc  
*Ao*, aorte; *Aao*, aorte abdominale; *IVC*, veine cave inférieure; *LA*, oreillette gauche; *LV*; ventricule gauche; *PA*, artère pulmonaire; *RA*, oreillette droite; *RV*, ventricule droit

L'intérêt de ce modèle porte sur ses propriétés hémodynamiques ainsi que ses propriétés immunologiques. Ainsi, au niveau hémodynamique, il s'agit d'un modèle de cœur battant mais non-travaillant. Ceci dit, l'apport sanguin artériel se fait via l'anastomose de l'aorte ascendante du greffon à l'aorte abdominale du receveur. Le sang ainsi oxygéné circule via les artères coronaires du greffon, est consommé et se déverse via le réseau veineux cardiaque dans l'oreillette droite. Celui-ci est ensuite retourné dans la circulation «systémique» (celle du receveur) en se déversant dans la veine cave inférieure via l'artère pulmonaire du greffon. Ainsi, le cœur greffé demeure bien perfusé permettant aux 2 ventricules de se contracter de façon régulière sans toutefois être mis en charge. Par ailleurs, ce modèle de transplantation cardiaque hétérotopique

rétropéritonéale permet d'étudier les phénomènes immunologiques de rejet aigu et chronique après une transplantation cardiaque puisque dans le cas présent, nous avons opté pour des porcs immunotypés pour les anticorps de type SLA (Swine Lymphocyte Alloantigen). Ceci avait pour but d'une part d'éliminer toute possibilité de rejet aigu chez les receveurs, et d'autre part d'éviter l'utilisation d'immunosuppresseurs qui sont, en soi, dommageables pour l'endothélium<sup>16</sup> constituant ainsi une source potentielle de biais dans l'évaluation de la fonction endothéliale un mois après la transplantation. Il s'agit donc d'un modèle mimant de façon optimale la cinétique de rejet chronique suite à une transplantation cardiaque.

### **Objectifs de travail**

A partir des données précédemment mentionnées, nous retenons les hypothèses suivantes. Tout d'abord, il semble sans équivoque que l'endothélium joue un rôle central dans l'homéostasie mais aussi dans la pathophysiologie du rejet chronique suite à une transplantation cardiaque. Ses propriétés immunogènes sont également clairement établies. Il demeure à déterminer si les effets néfastes secondaires à la genèse de cette réaction antiendothéliale suite à une transplantation cardiaque surplombent les effets protecteurs de l'endothélium sur l'homéostasie vasculaire. Le but de la première étude est donc de comparer la fonction endothéliale et l'hyperplasie intinale suite à une transplantation cardiaque sur des artères coronaires intactes et sur des artères coronaires mécaniquement dénuées de leur endothélium.

Par ailleurs, il est bien établi que la CsA possède des effets néfastes au niveau de l'intégrité fonctionnelle et même structurelle de l'endothélium. De tous les modes d'action, l'effet pro-oxydant par la formation de radicaux libres entraînant une dysfonction endothéliale semble être le facteur prépondérant. Le but de la deuxième étude est donc d'évaluer le rôle d'une molécule encore peu connue dans le domaine de la transplantation cardiaque (le BH4) sur la fonction endothéliale des artères coronaires suite à l'exposition à la CsA. Le choix du BH4 est fondé sur ses propriétés antioxydantes et sur son rôle de base comme cofacteur dans la production de NO.

**Contributions**

**Originales**

## Injury of the Coronary Endothelium at Implantation Increases Endothelial Dysfunction and Intimal Hyperplasia After Heart Transplantation

Ismail El-Hamamsy<sup>1</sup>, MD, Louis-Mathieu Stevens<sup>1</sup>, MD, Paul M. Vanhoutte<sup>2</sup> MD, Ph.D  
and Louis P. Perrault<sup>1</sup>, MD, PhD.

<sup>1</sup>Research Center and Department of Surgery, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger east, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada.

<sup>2</sup>Institut de Recherches Servier, 11 rue des Moulineaux, Suresnes, 92150, France.

*J Heart Lung Transplant* 2005;24:251-8.

---

Address for reprints to: Louis P. Perrault<sup>1</sup>, MD, PhD, <sup>1</sup>Research Center and Department of Surgery, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger east, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8, [REDACTED]

**ABSTRACT**

**Background:** Coronary endothelial dysfunction occurs early after heart transplantation and predicts the development of intimal thickening characteristic of cardiac allograft vasculopathy.

**Objective:** To assess the effects of removal of the endothelium by balloon injury of coronary arteries of allografts without rupture of the internal elastic lamina at the time of implantation, on coronary endothelial dysfunction and the development of accelerated atherosclerosis after heart transplantation.

**Methods:** A porcine model of heterotopic heart transplantation with preoperative immunologic typing, enabling progressive rejection without immunosuppression, was used to study the effect of endothelial removal on these two end-points. Endothelium-dependent relaxations of epicardial coronary arteries from allografts submitted to endothelial denudation after harvest, arteries from allografts not undergoing denudation and native coronary arteries were compared 30 days after graft implantation using standard organ chamber experiments. Intimal thickening was measured by light microscopy examination using a semiquantitative scale (0 to 4+ grading).

**Results:** Relaxations to serotonin and to bradykinin were significantly decreased in denuded arteries compared with non-denuded allograft arteries. There was a significant increase in the incidence of severe intimal hyperplasia in denuded arteries compared to non-denuded arteries, which were both significantly increased compared to native coronary arteries.

**Conclusions:** Endothelial injury at implantation worsens the endothelial dysfunction due to rejection after heart transplantation and compounds the intimal thickening leading to CAV. All efforts should be deployed to maintain a morphologically intact and functional coronary endothelium at the time of graft implantation.

**Keywords:** Endothelium, Neointimal hyperplasia, Heart transplantation, Chronic rejection.



Although heart transplantation remains the treatment of choice of medically unresponsive terminal heart disease with a 5-year survival of 70%, cardiac allograft vasculopathy (CAV) develops in a majority of transplant recipients and is the main cause of death beyond the first year after transplantation.<sup>91</sup> The appearance of accelerated atherosclerosis is preceded by an early endothelial dysfunction which is predictive of the development of CAV 1 year after graft implantation and of the occurrence of cardiac events and death.<sup>3</sup> A selective endothelial dysfunction occurs early after heart transplantation even in patients without overt acute rejection since patients studied one to five months after graft implantation have decreased endothelium-dependent dilatations to acetylcholine (ACh) while dilatations to bradykinin (BK) are maintained.<sup>92</sup> Several noxious stimuli may impair endothelial function in the course of transplantation including exposure to depolarizing cardioplegic solutions,<sup>93</sup> preservation solutions,<sup>11</sup> ischemia-reperfusion injury during implantation,<sup>94</sup> immunological aggression by rejection, immunosuppressive drugs such as cyclosporine A<sup>16</sup> and cytomegalovirus infections. These factors contribute to a state of increased oxidative stress after heart transplantation leading to damaging effects on the vascular wall and enabling the development of CAV. In a prior study, acute rejection caused coronary endothelial dysfunction involving G-protein mediated relaxations through progressive destruction of the endothelial lining.<sup>4</sup> Progressive rejection of the vascular endothelium mimicking the phenomenon of chronic rejection also causes a selective endothelial dysfunction in a porcine model of heterotopic heart transplantation without ischemia-reperfusion injury or use of immunosuppressive drugs.<sup>5</sup> This dysfunction is associated with a decreased basal release of cyclic GMP with no decrease in the expression of endothelial NO synthase 60 days after transplantation.<sup>5</sup> The

importance of the NO pathway in the endothelial function of porcine coronary arteries has been further established with intracoronary infusion of L-NAME, an inhibitor of NO synthesis, in normal and in transplanted coronary arteries.<sup>95</sup>

At the time of reperfusion, the endothelium of coronary arteries of the allograft is the first barrier exposed to blood elements and effectors of the recipient immune response after the cold and warm ischemia cycle of preservation and implantation. This interaction leads presentation of the endothelial antigens to the recipients' lymphocytes inducing a pathological activation of the endothelium, eventually leading to graft destruction and thrombosis. In a rat model, Galumbeck et al. suggested that denudation of the endothelium at the time of implantation improved patency of rat femoral artery allografts compared to non-denuded grafts.<sup>59</sup> This positive result was speculatively explained on the basis of a decrease in the immunologic aggression of the vascular wall of endothelium-free aortic allografts thereby decreasing the initial step in the cascade of events leading to overt neointimal hyperplasia and CAV. The present study was designed to assess the effects of denudation of the coronary endothelium of cardiac allografts on endothelial function and on the development of intimal hyperplasia following heart transplantation.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and Immunologic Studies**

Twenty six Large-White swine of either sex, aged  $10 \pm 0.6$  weeks and weighing  $20.9 \pm 1.1$  kg were used for a total of 13 pairs of donor / recipient swine. The experiments were performed in compliance with the «Guide for the care and Use of Laboratory Animals» published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1985).

All procedures used in this study were approved by the local institutional committee on animal care. Preoperative blood samples were drawn for determination of blood type and the class I antigen of the Swine Lymphocytes Alloantigen system (SLA) by the microlymphocytotoxicity technique on swine from the same litter to ensure a rate of recombination between the class I and class II region of the major histocompatibility complex of <1%. Transplantations were performed between animals compatible for blood type and for the SLA class I antigen. The serum typing was performed at the "Institut National de Recherches Agronomiques" (INRA, Jouy-en Josas, France).

### **Anesthesia**

Sedation was achieved with a mixture of tiletamine and zolazepam (15 mg/kg) and atropine sulfate (0.04 mg/kg) injected intramuscularly. Anesthesia was obtained with thiopental sodium given intravenously by continuous perfusion in the donors (8 mg/kg/h) and initial perfusion followed by bolus administration in recipient swine ( $15.3 \pm 1$  mg/kg).

Ventilatory support was established by tracheotomy and intubation in the donor and orotracheal intubation with a cuffed tube in the recipient. Ventilation was maintained with a respirator (Mark 8, Bird Co.; Palm Springs, CA, U.S.A) with oxygen supplementation to maintain an arterial oxygen saturation of 95%. Venous access was obtained through the left saphenous vein and the left internal jugular vein for volume replacement with Ringer's lactate. Venous blood samples were taken for complete hematological and biochemical profiles and for lipid analysis in both donor and recipients. Arterial cannulation was performed through the left internal carotid artery for blood pressure monitoring and arterial gas analysis. The pH was maintained between 7.35 and 7.45 by adjustment of the ventilatory rate and intravenous administration of

sodium bicarbonate as needed. A rectal probe was used for monitoring of the temperature. Antibiotic prophylaxis was provided with a single intravenous dose of teramycine (10 mg/kg) prior to the incision and intramuscular injection for 7 days postoperatively.

## **Surgical Technique**

### **Cardioplegia**

Donor blood (12 ml/kg) was sampled during the initial phase of anesthesia in a 450 ml bag with 63 ml of citrate dextrose phosphate and kept normothermic. Ringer's Lactate (3 ml/kg) was added to the donor blood for a final blood cardioplegia solution composition of 4:1 blood/cristalloid ratio. Potassium chloride (KCl) was then added through a Y-tubing to achieve cardioplegia (mean  $12 \pm 3$  mEq).

### **Heterotopic Heart Transplantation**

**Donor.** After median sternotomy and pericardial incision, the heart was prepared by dissection and suture control without ligation of the superior and inferior vena cave, the right and left superior and inferior pulmonary veins and the left hemi-azygous vein (which enters the coronary sinus in the swine). After systemic heparinization (3 mg/kg, heparin sodium), the distal right innominate artery was ligated and the proximal portion cannulated with a polyvinyl chloride catheter positioned in the ascending aorta for administration of cardioplegia. After clamping of the aortic arch between the two innominate arteries, asystole was induced through injection of the normothermic blood cardioplegia solution in the ascending aorta at a maximal pressure of 60 mm Hg. The heart was vented by incision of the right and left atrial appendages and the blood vessels

controlled previously were ligated. Local hypothermia was added by flooding the pericardium with cold physiological salt solution (4°C). After excision, the heart was prepared for implantation by ligation of the atrial incisions and dissection of the adventitial tissue between the ascending aorta and the main pulmonary artery.

### **Injury of the Right Coronary Artery at the Time of Implantation**

During the cold ischemic phase before implantation of the graft, a Swan-Ganz catheter (1 mm internal luminal diameter) with an inflatable balloon 3 mm in diameter was inserted 10 cm into the proximal right coronary artery and the balloon was inflated to a point of snugness in the artery and slowly pulled back to the aorta over a 30-second period. This soft balloon denudation was repeated a total of three times (Figure 1). This model of soft balloon denudation is a replica of previous work by Borg-Capra et al.<sup>96</sup> which, using a similar porcine heart model, demonstrated complete absence of endothelium 1 day following balloon denudation without interruption of the internal elastica lamina layer, which is followed by endothelial regeneration as early as 8 days after denudation.

**Recipient.** After a left subcostal transverse incision, the infrarenal abdominal aorta and vena cava were approached retroperitoneally and dissected free of lymphatic tissue. After systemic heparinization (3 mg/kg), the infrarenal aorta was controlled by application of a side clamp. End-to-side anastomosis was performed between the donor ascending aorta and recipient abdominal aorta using a running suture of 5-0 polypropylene. After clamping of the donor aorta to avoid immediate reperfusion, the side-clamp was released and hemostasis secured. Using the same technique, an end-to-side anastomosis was

performed between the donor main pulmonary artery and the inferior vena cava (6-0 polypropylene). After reperfusion, air was removed by needle insertion into the apex and left atrial decompression as needed and normal sinus rhythm re-established with direct defibrillation as needed.

### **Experimental Groups**

Seven of the 13 transplanted animals survived one month after transplantation. No studies were performed on swine that did not survive to one month. Each recipient swine provided three groups of vessels for this study. The three groups of vessels were:

- 1) Native group: Coronary arteries from the recipient swine's native orthotopic heart were removed and examined one month after transplantation.
- 2) Non-denuded group: Intact coronary arteries from the recipient swine's heterotopically transplanted heart were removed and studied one month after transplantation.
- 3) Injury group: Ballooned coronary arteries from the recipient swine's heterotopically transplanted heart were removed and studied one month after transplantation.

### **Postoperative Care**

After standard ventilatory weaning, the animals were left to recover in temperature controlled quarters. The preoperative diet were resumed and water *ad libitum*. No immunosuppressive drugs were used. The recipients were sacrificed electively 30 days after transplantation.

### **Explantation Protocol and Experimental Groups**

Anesthesia, venous access, volume replacement and ventilatory support were established as described above. The abdomen was reentered and complete mobilization of the

allograft was performed taking care not to injure the epicardial surface of the heart. After clamping of the abdominal aorta, the transplanted hearts were excised rapidly. Native hearts were excised through a median sternotomy and arrested in the same fashion. Native hearts were used as control since no differences were observed between the endothelial function of native and control hearts on the same model in previous experiments (data not shown).<sup>5</sup>

### **Vascular Reactivity**

The native and allograft hearts were placed in a modified Krebs-bicarbonate solution (composition in mM/L: NaCl 118.3, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 11.1, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25 and calcium ethylenediaminetetraacetic acid 0.026; control solution). Oxygenation was insured using a 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> gas mixture. The epicardial coronary arteries of the native heart and allografts were dissected free from the epicardium, myocardium and from adventitial tissue and divided in rings (4 mm wide; 20 rings from the allograft and 20 rings from the native heart). Rings from the left anterior descending, left circumflex and right coronary arteries were used randomly but matched between native and allograft preparations in all experiments. The segments through which the balloon had been inserted were easily identifiable by the thickening at the site of injury.

The vascular reactivity of denuded, non denuded transplanted and native coronary arteries was studied in organ chambers filled with control solution (20 ml) at 37°C. 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). All studies were performed in the presence of indomethacin

( $10^{-5}$  mol/L; to exclude production of endogenous prostanoids) and propranolol ( $10^{-7}$  mol/L; to prevent the activation of beta-adrenergic receptors).

Each preparation was stretched to the optimal point of its active length-tension curve (approximately 4 g) as determined by measuring the contraction to KCl (30 mM/L) at different levels of stretch and then stabilized for 90 minutes. A maximal contraction was determined with KCl (60 mM/L). Rings were excluded if they failed to contract to KCl (exclusion rate less than 5%). After washing and thirty minutes of stabilization, endothelium-dependent relaxations were studied in preparations contracted with prostaglandin F<sub>2</sub>α (range  $2 \times 10^{-6}$  to  $10^{-5}$  mol/L) to achieve a contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl (60 mM/L). Responses to serotonin (5HT  $10^{-10}$  to  $10^{-5}$  mol/L; an agonist that binds to 5HT<sub>1D</sub> receptors coupled to Gi-proteins, in the presence of  $10^{-6}$  mol/L ketanserin; incubated 40 minutes before the addition of serotonin to block serotonin 5HT<sub>2</sub> receptors), BK ( $10^{-10}$  to  $10^{-5}$  mol/L, an agonist that binds to receptors coupled to Gq-proteins) were compared between native, and allograft coronary rings from denuded and control hearts 30 days after transplantation. No rings were exposed to more than one agonist in the course of the experiments. At the end of the experiments, endothelium-independent relaxations were studied using Sin-1 ( $10^{-5}$  mol/L; 3-morpholino sydnonimine, a NO donor).

## **Histology**

### **Myocardial Biopsy and Grading of Rejection**

Surgical myocardial biopsies of allografts and native hearts were taken from the septum, the right and left ventricles of fresh specimens at the time of explantation in allografts and



native hearts and fixed in formaldehyde (10%). Hematoxylin eosin-safran staining was performed and the biopsies evaluated for rejection grade,<sup>97</sup> extent of necrosis and ischemic changes.

### **Coronary Artery Rings**

After each organ chamber experiments, coronary rings were fixed in 10% formaldehyde for twenty minutes at their optimal tension. All formalin-fixed tissue sections were embedded in paraffin and five micron sections were stained with orcein. Each section was examined for the presence, extent and distribution of intimal thickening, luminal narrowing, inflammatory infiltrates and disruption of the internal elastic lamina (IEL) by light microscopy. Grading the severity of intimal thickening was done using a semiquantitative scale ranging from 0 to 4+.<sup>5</sup> All histological studies were read in a blinded fashion by an independent observer.

### **Drugs**

All solutions were prepared daily. Bradykinin, 5-Hydroxytryptamine creatinine sulfate (serotonin), indomethacin, ketanserin, propranolol, prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ , were purchased from Sigma Chemical CO. (St-Quentin Falavier, France). Sin-1 (3-morpholino sydnonimine) was synthesized at the Servier Research Institute.

### **Statistical Analysis**

Relaxations and contractions are expressed as a percentage of the maximal contraction to KCl for each group and expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM); *n* refers to the number of animals studied. Student's *t*-test for paired/unpaired observations was used for statistical analysis. Differences were considered to be statistically significant

when  $p$  was less than 0.05. ANOVA studies were performed to compare dose-response curves. The Newman-Keuls test was used as the *post-hoc* test. Linear regression with repetition was performed for estimation of  $EC_{50}$  values. The Mantel-Haenszel  $\chi^2$  test was used for the comparison of the incidence of intimal hyperplasia between native, denuded and non-denuded allograft coronary arteries 30 days after transplantation. Armitage's linear trend test was used to compare the severity of intimal thickening between allograft coronary arteries from both groups 30 days after implantation.

## **RESULTS**

### **Vascular Reactivity**

#### **Contractions**

There were no statistically significant differences between contraction to KCl and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) in native arteries, denuded arteries or non-denuded allograft arteries (Table 1).

#### **Endothelium-Dependent Relaxations**

There was a significant decrease of relaxations to serotonin (5-HT) in denuded arteries compared with non-denuded allograft arteries which were decreased compared to native coronary arteries (Figure 2). Relaxations to BK were also significantly decreased by balloon denudation compared to non-denuded allograft arteries (Figure 3).

#### **Endothelium-Independent Relaxations**

There were no statistically significant differences of relaxation to Sin-1 between denuded arteries, non-denuded allograft arteries or native arteries (data not shown).

## **Histology**

### **Macroscopy**

There were dense peritoneal adhesions 30 days after transplantation. All coronary arteries studied were patent and there were no intracavitary thrombi in the hearts used for experiments. All grafts showed normal contractility at the time of explantation.

### **Myocardial Biopsies**

The myocardium from native hearts was normal. Allografted hearts 30 days after transplantation showed extensive lymphocytic infiltration with prominent fibrosis and moderate to severe amounts of necrosis all compatible with the ISHLT classification grade 3B rejection. There were no significant differences in the rejection grade between the denuded and control groups (data not shown). All native hearts were normal. There were no significant differences in ischemic times between both groups.

### **Histomorphometric Studies of Coronary Artery Rings**

There was a significant increase in the incidence of severe intimal hyperplasia (grade 3-4+) in denuded allograft coronary arteries ( $n = 15$ ) compared to non-denuded allografts ( $n = 18$ ) (57% vs 20%,  $p < 0.05$ ) which were both significantly increased compared to native coronary arteries (0%) ( $n = 21$ ) (Figure 4 and 5).

## **DISCUSSION**

The major findings of this study are that (1) removal of the coronary endothelium at the time of implantation significantly increases the endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries to both Gi-protein mediated relaxations (5-HT) and Gq-mediated

relaxations (BK) one month after porcine heterotopic heart transplantation and (2) that balloon denudation at implantation also increases the incidence of severe intimal hyperplasia supporting a protective effect of the endothelium and particularly NO release on the development of CAV following transplantation.

The endothelium exerts many functions to maintain vascular wall hemostasis including vasorelaxation through inhibition of smooth muscle cell contraction, inhibition of platelet and inflammatory cell aggregation and limitation of smooth muscle proliferation. These actions are achieved through the release of NO, EDHF and cAMP which are mainly dependent on G-protein mediated cGMP activation. Endothelial dysfunction has been documented in many pathological states including acute and chronic rejection<sup>4,5</sup> and predicts the development of CAV 1 year after transplantation. As shown in previous work, in the present model of heterotopic heart transplantation in SLA class I antigen-matched swine, a slower kinetic of rejection sets in without acute endothelial cell loss or ischemia-reperfusion injury as documented by normal relaxations 24 hours after implantation.<sup>5</sup> Therefore, this model constitutes an optimal experimental setting for the study of chronic rejection per se on cardiac allografts which is characterized by an initial selective endothelial dysfunction at 30 days after transplantation affecting Gi protein-mediated relaxations followed by a generalized dysfunction at 60 days involving Gq protein-dependent pathways.<sup>5</sup>

Many events contribute to cause endothelial dysfunction following heart transplantation including the immunogenicity of the graft's endothelium which may induce synthesis of antiendothelial antibodies triggering the cascade of events leading to intimal hyperplasia, CAV and graft thrombosis.<sup>98</sup> Based on these findings, Galumbeck et al. suggested that denudation of the endothelium at the time of implantation improved

patency of rat femoral artery allografts compared to non-denuded grafts at 5 and 120 days using non-MHC matched rats without immunosuppression.<sup>59</sup> This favorable result was speculatively explained on the basis of a decreased immunologic aggression on the vascular wall of endothelium-free vascular allografts. Using a similar model to study endothelial function of these vessels 4 months after implantation, no alterations in vascular responses to contracting agents were found.<sup>60</sup> However, relaxations to ACh were significantly decreased compared to controls in both MHC-matched and MHC-mismatched grafts (respectively 10% and 40% of controls) thereby demonstrating a clear endothelial dysfunction. Furthermore, since evaluation of the degree of intimal hyperplasia between denuded and non-denuded grafts was undertaken in that study, we choose to study a relevant model of heart transplantation mimicking the kinetics of chronic rejection.

In the present study, endothelium-dependent relaxations were decreased in allograft arteries denuded of endothelium at the time of implantation compared to non-denuded allograft coronary arteries. Moreover, only one month after transplantation, the dysfunction was already generalized to both Gi and Gq protein-mediated relaxations in the injured group. Therefore, the present observations demonstrate that endothelial denudation induces a more severe and markedly accelerated pattern of endothelial dysfunction compared to non-denuded allografts. Histomorphometric analysis of vascular rings showed a significantly increased incidence of severe intimal hyperplasia (grade 3-4+) in denuded arteries, supporting a protective role for the endothelium on the vascular wall and the importance of its preservation during graft implantation. Although removal of the allograft endothelium may initially limit the wave of allo-rejection by decreasing the surface antigen presenting cells upon reperfusion of the organ, detrimental effects were

obvious on both coronary endothelial function and development of intimal hyperplasia. Furthermore, the increased sensitivity to  $\text{PGF2}_\alpha$  in the denuded coronary allografts compared to the non-denuded allografts supports the hypothesis of a procontractile environment following removal of the NO-producing endothelial layer.

Denudation of the endothelial layer without disruption of the IEL, so called “soft denudation”, is usually followed by reendothelialization within 14 to 60 days with little functional consequences according to some reports.<sup>60,99</sup> Disruption of the IEL leads to prompt development of arterial intimal hyperplasia. In a hypercholesterolemic swine model of coronary endothelial denudation, coronary arteries with regenerated ECs showed a selective decrease of endothelium-dependent relaxations to  $\text{Gi}$ -protein mediated agonists compatible with a selective endothelial dysfunction 28 days after endothelial removal.<sup>96,100,101</sup>

### **Limitations**

The heterotopic non-working heart transplantation model does not reproduce the exact hemodynamic situation of the orthotopic “working” heart but the non working model has been validated as a model for the study of endothelial dysfunction and intimal hyperplasia.<sup>102</sup> Clinically relevant ischemic times and preservation conditions were not duplicated to minimize the influence of perioperative endothelial and myocardial injury on the subsequent development of endothelial dysfunction and to best isolate the effect of the mechanical removal of the endothelium and of the rejection process itself on vascular reactivity. Control non-injured coronary arteries from the same cardiac allograft containing the denuded right coronary artery were used in the present study. Complete isolation of the two processes could be suggested, however the demonstration of a significant difference between arteries of the same transplanted heart further supports the

significance of endothelial denudation in the pathogenesis of post-transplant CAV. Finally, no examination of the presence of an endothelial lining at 30 days was undertaken since partial responses to endothelium-dependent relaxing agents were obtained and an intact endothelium has been documented in the same model without balloon injury at 60 days<sup>95</sup> despite the observation of an endothelial dysfunction.

## **CONCLUSION**

In conclusion, coronary endothelial injury at the time of graft implantation compounds the endothelial function due to rejection and significantly increases the severity of neointimal hyperplasia one month after heart transplantation. The theoretical benefit of reducing the initial alloimmune response to antigenic ECs comes at the expense of its protective role on the vascular wall and the underlying vascular smooth muscle cell layer. Endothelial injury initiates a cascade of inflammatory events leading to greater damage to the cardiac allograft and an increase in coronary graft vasculopathy. Therefore, strategies designed to preserve endothelial integrity and function before, during and after graft implantation should be applied to prevent the complications of CAV.

## Legends

**Figure 1a.** Schematic representation of the site of balloon denudation on the right coronary artery in the allograft at the time of implantation.

**Figure 1b.** Catheter used for balloon denudation.

**Table I.** Contractions to potassium chloride (KCl, 60 mM/L) and prostaglandin  $F2_{\alpha}$  ( $PGF2_{\alpha}$ ) of native, denuded and non-denuded allograft porcine coronary arteries studied 30 days after heart transplantation.

**Figure 2.** Cumulative concentration-response curves to serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries from native hearts, non-denuded allograft coronary arteries and denuded allograft coronary arteries thirty days after heterotopic heart transplantation. Responses are given as percent of relaxation to the contraction induced by prostaglandin  $F2_{\alpha}$  ( $PGF2_{\alpha}$ ). Results are presented as means  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$  vs all groups, \*\*  $p < 0.05$  vs native hearts.

**Figure 3.** Cumulative concentration-response curves to bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries from native hearts, non-denuded allograft coronary arteries and denuded allograft coronary arteries thirty days after heterotopic heart transplantation. Responses are given as percent of relaxation to the contraction induced by prostaglandin  $F2_{\alpha}$  ( $PGF2_{\alpha}$ ). Results are presented as means  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$  vs all groups, \*\*  $p < 0.05$  vs native hearts.



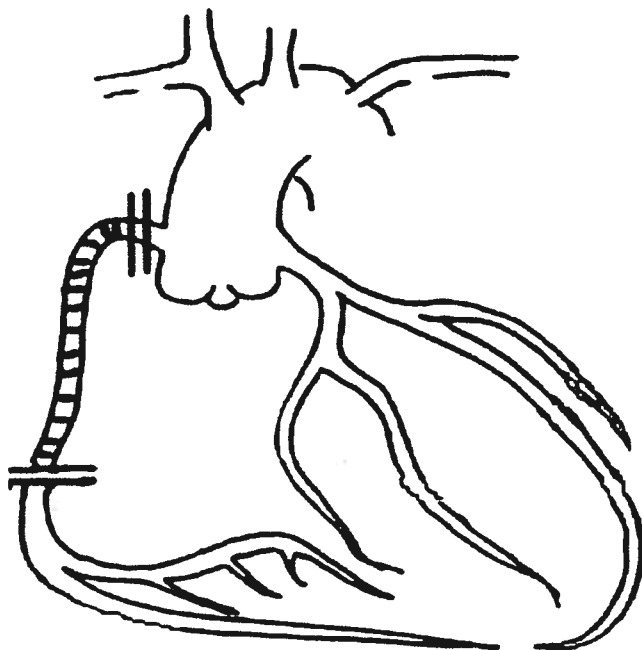
**Figure 4.** Histogram depicting the incidence of severe intimal hyperplasia (grade 3-4+) in non-denuded allograft coronary arteries and denuded allograft coronary arteries thirty days after heterotopic heart transplantation.

\*  $p < 0.05$

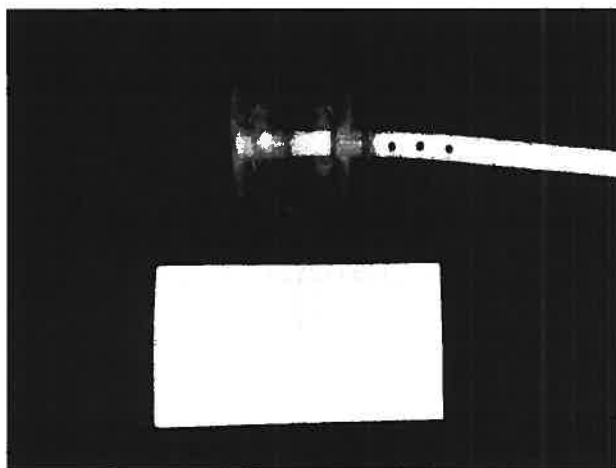
**Figure 5.** Cross-sectional view of a denuded coronary artery 1 month after heterotopic heart transplantation showing 3+ intimal hyperplasia.

**Figure 1.** (a) Schematic representation of the site of balloon denudation on the right coronary artery (dashed lines) in the allograft at the time of implantation; (b) Catheter used for balloon denudation.

(a)



(b)



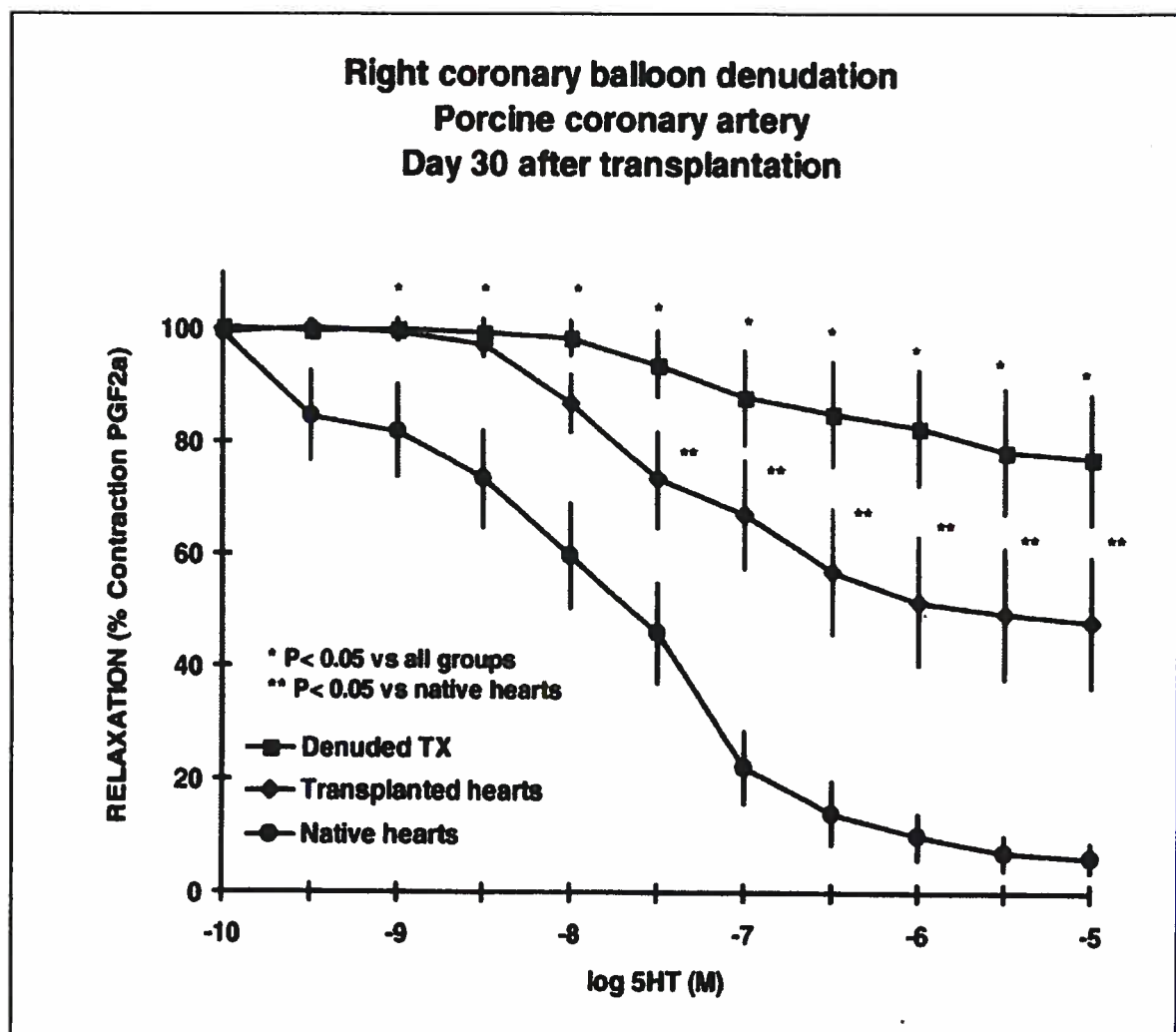
**Table I.** Contractions to potassium chloride (KCl, 60 mM/L) and prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) of native, denuded and non-denuded allograft porcine coronary arteries studied 30 days after heart transplantation.

Agonist	Native	Allograft		p-value
		Denuded	Non-denuded	
KCl 60mmol/L (g)	11.5 $\pm$ 1.0	10.3 $\pm$ 0.8	10.0 $\pm$ 0.8	NS
PGF2 $\alpha$ (g)	3.9 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.5	NS
PGF2 $\alpha$ (% 60mM KCl)	38 $\pm$ 9	40 $\pm$ 1	37 $\pm$ 5	NS

*Data shown as means  $\pm$  SEM . PGF2 $\alpha$ : Prostaglandin F2 $\alpha$*

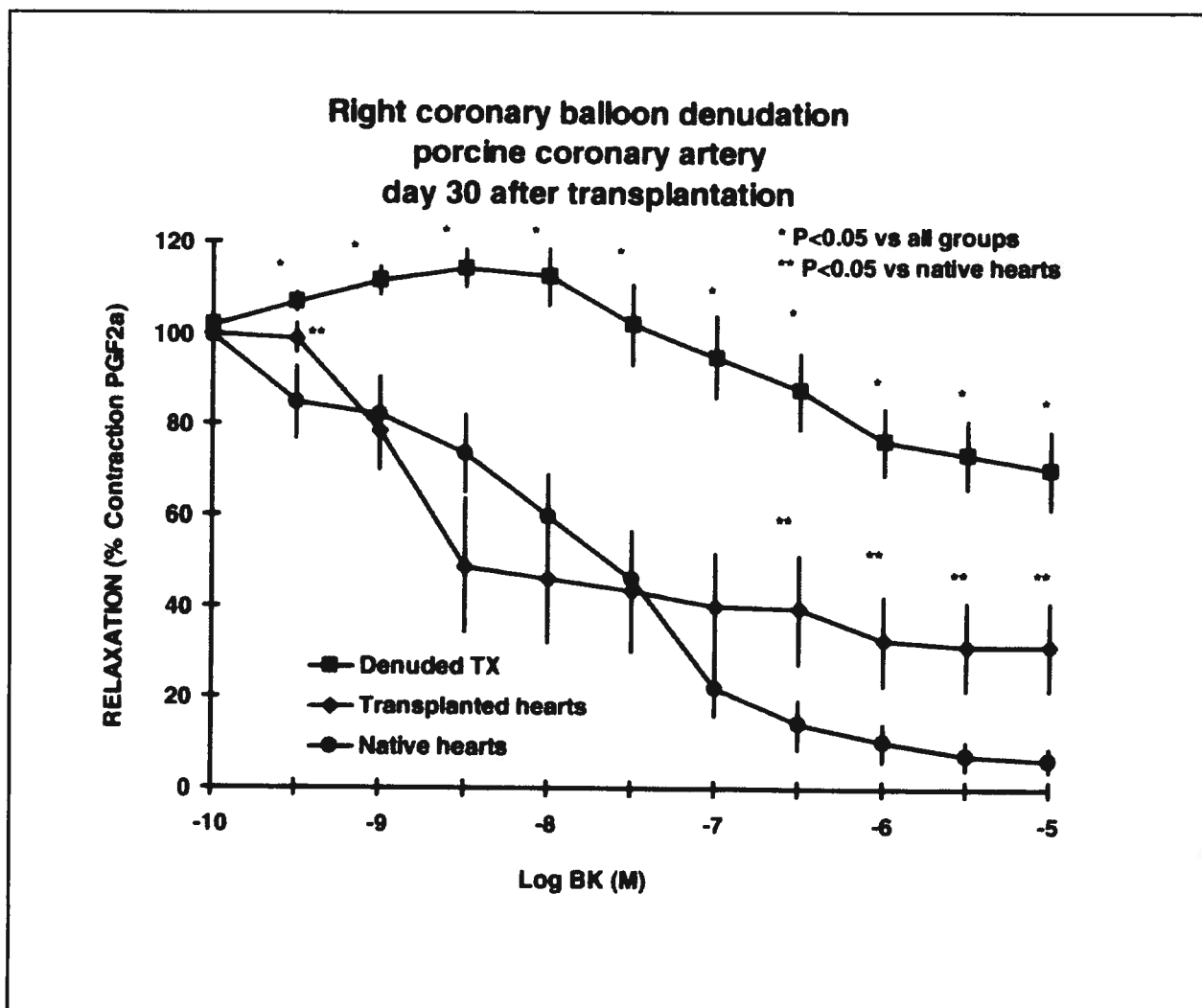
**Figure 2.** Cumulative concentration-response curves to serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries from native hearts, non-denuded allograft coronary arteries and denuded allograft coronary arteries thirty days after heterotopic heart transplantation. Responses are given as percent of relaxation to the contraction induced by prostaglandin F<sub>2α</sub>(PGF<sub>2α</sub>). Results are presented as means ± SEM.

\*p<0.05 vs all groups, \*\* p<0.05 vs native hearts.



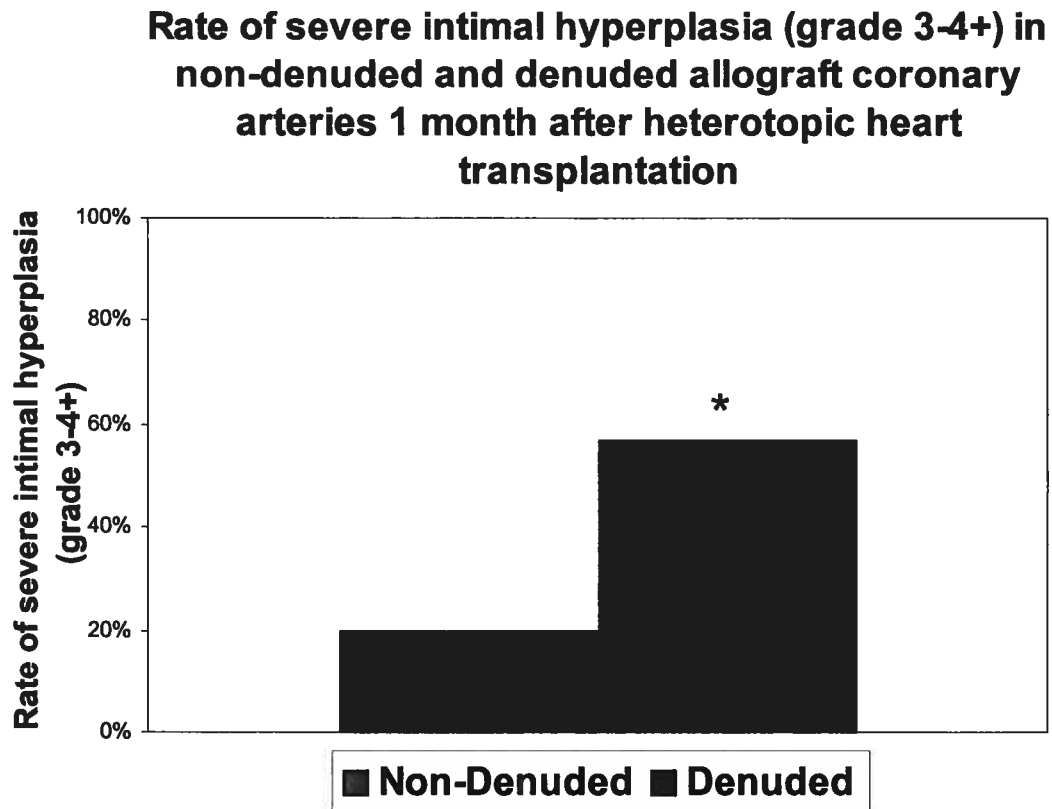
**Figure 3.** Cumulative concentration-response curves to bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries from native hearts, non-denuded allograft coronary arteries and denuded allograft coronary arteries thirty days after heterotopic heart transplantation. Responses are given as percent of relaxation to the contraction induced by prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ ). Results are presented as means  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$  vs all groups, \*\*  $p < 0.05$  vs native hearts.

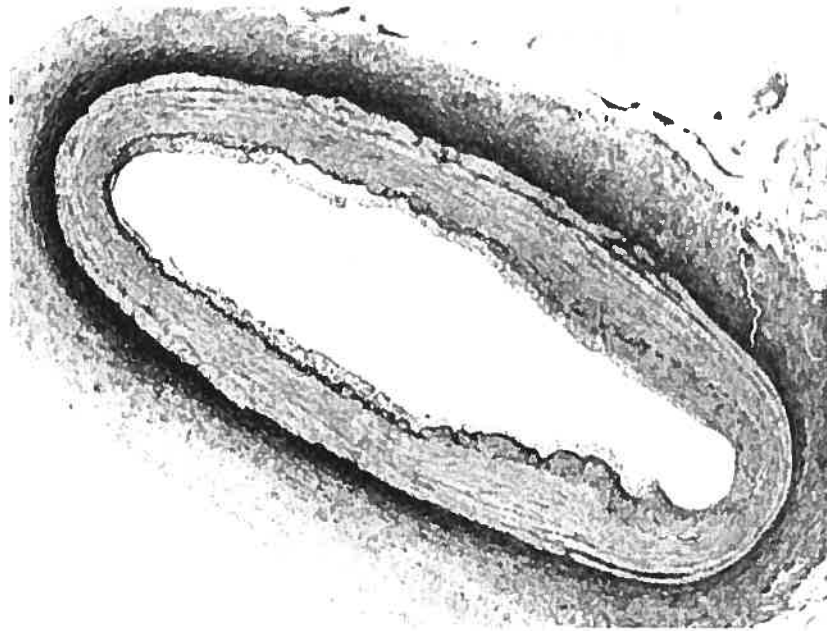


**Figure 4.** Histogram depicting the incidence of severe intimal hyperplasia (grade 3-4+) in non-denuded allograft coronary arteries and denuded allograft coronary arteries thirty days after heterotopic heart transplantation.

\*  $p < 0.05$



**Figure 5.** Cross-sectional view of a denuded coronary artery 1 month after heterotopic heart transplantation showing 3+ intimal hyperplasia.



Cyclosporin-Induced Coronary Endothelial Dysfunction: Is  
Tetrahydrobiopterin the Solution?

Ismail El-Hamamsy,<sup>a</sup> MD, Louis-Mathieu Stevens, MD,<sup>a</sup> Martin Grant,<sup>a</sup>  
Michel Carrier, MD<sup>b</sup> and Louis P. Perrault, MD, PhD<sup>a,b,c</sup>

*Transplant Proc 2005 (in press)*

---

From the <sup>a</sup>Research Center and the Departments of <sup>b</sup>Surgery and <sup>c</sup>Pharmacology,  
Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.  
Reprint requests: Louis P. Perrault, MD, PhD, Research Center, Montreal Heart Institute,  
5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada.  
Telephone: (514) 376-3330. Fax: (514) 376-1355. [REDACTED]  
[REDACTED]



**ABSTRACT**

**Background:** Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation is predictive of cardiac allograft vasculopathy. Immunosuppressive drugs, particularly cyclosporine A may contribute to this dysfunction by a direct cytotoxic effect on the endothelium. Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) is a potent antioxidant and an essential cofactor of nitric oxide biosynthesis. The purpose of the present study was to investigate if BH<sub>4</sub> could reverse the endothelial dysfunction induced by cyclosporine A.

**Methods:** A previously described in vitro model of drug incubation in Krebs-bicarbonate solution (4°C, 48 hours) of porcine epicardial coronary arteries was used. Coronary endothelial function studies were performed in organ chamber experiments after incubation with cyclosporine A (10<sup>-4</sup> mol/liter) in the presence or absence of 6-methyltetrahydropterin (MH<sub>4</sub> [0.1 mol/liter], a BH<sub>4</sub> analog) to assess its effect on the endothelial dysfunction induced by cyclosporine A.

**Results:** The average dose of PGF2 $\alpha$  required to reach 50% of the maximal contraction to KCl was significantly lower ( $p < 0.001$ ) in the cyclosporine A ( $8.6 \pm 1.94 \times 10^{-6}$  mol/liter) group compared to the control group ( $24.8 \pm 5.2 \times 10^{-6}$  mol/liter). Exposure to cyclosporine A induced a significant decrease in endothelium-dependent relaxations to serotonin (5HT) (% E<sub>max</sub> [5HT]:  $77\% \pm 4\%$ ;  $p < 0.05$ ). Addition of MH<sub>4</sub> significantly reversed this impaired response (% E<sub>max</sub> [5HT]:  $62\% \pm 4\%$ ;  $p < 0.05$ ). No alterations of relaxation were observed with bradykinin in both groups. Endothelium-independent relaxations to sodium nitroprussiate were fully preserved.

**Conclusions:** These results suggest a significant protective role of BH<sub>4</sub> on coronary endothelial function following exposure to cyclosporine A, which could reduce the incidence of endothelial dysfunction and cardiac allograft vasculopathy following cardiac transplantation.

Five-year survival following heart transplantation remains at 80% owing in great part to the development of cardiac allograft vasculopathy (CAV) which leads to silent infarcts, graft failure and sudden death with no efficacious treatment except retransplantation which remains a remote option in view of the paucity of donors.<sup>1</sup> Coronary endothelial dysfunction contributes to the development of atherosclerosis and is predictive of the development of intimal hyperplasia, of CAV and of adverse long-term outcome.<sup>3</sup> Numerous factors have been incriminated in the development of CAV, including cellular and humoral rejection,<sup>103</sup> hyperlipidemia,<sup>104</sup> cytomegalovirus infection,<sup>105</sup> cardioplegic and preservation solutions,<sup>11,12</sup> cold ischemia,<sup>10</sup> ischemia-reperfusion<sup>106</sup> and the use of immunosuppressive drugs,<sup>67</sup> namely cyclosporine A (CsA).<sup>16</sup> Several mechanisms have been suggested to explain the effect of CsA on endothelial function including a direct cytotoxic effect on endothelial cells, a stimulatory effect on the vascular smooth muscle cells and a significant oxidative stress.<sup>62,64,75,81</sup> CsA causes a decreased production of protective vasoactive substances, the most important of which being nitric oxide (NO) which has several protective effects on the vascular wall, namely as a potent vasodilator and inhibitor of platelet and leukocyte adhesion, of mitogen release and of vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation.<sup>24,26,107</sup> Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) is an essential cofactor of nitric oxide synthase (NOS),<sup>84</sup> the enzyme responsible for the production of NO. Reduced levels of BH<sub>4</sub> impede production of NO and provokes an uncoupling of NOS with a shift towards production of peroxynitrite (OONO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),<sup>86</sup> 2 free radicals with direct cytotoxic effects on the endothelium.<sup>68</sup> Administration of BH<sub>4</sub>, through NO-producing and antioxidant effects, improves endothelium-dependent vasomotion in a number of pathological states including coronary artery disease,<sup>87</sup> hypercholesterolemia,<sup>88</sup> ischemia-reperfusion<sup>89</sup> and diabetes.<sup>90</sup>

Using a previously described model of endothelial dysfunction induced by CsA on coronary vessels,<sup>16</sup> the purpose of the study was to investigate the effects of 6-methylhydropterin (MH<sub>4</sub>), a BH<sub>4</sub> analog, on endothelial function following exposure to CsA.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Six Landrace swine with a mean weight of  $25 \pm 5$  kg (range 21 to 33 kg) were used for investigation of the effects of MH<sub>4</sub> (Sigma Chemicals, Saint-Louis, MO), a BH<sub>4</sub> analog. Sixteen vascular segments were used from each animal using the left anterior descending, the circumflex and the right coronary arteries to study vascular reactivity. Vascular rings were divided into 3 groups: group 1 (control), group 2 (CsA) and group 3 (CsA + MH<sub>4</sub>). 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) and Xylazine (2 mg/kg; Rompun, Toronto, ON). Swine 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). Sacrifice was achieved by exsanguination under anesthesia. No cardioplegia was used. The heart was explanted and the left anterior descending, the 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. Two beakers were prepared. The rings from the control group were incubated in the Krebs-bicarbonate solution only. The other beaker contained the Krebs-bicarbonate solution along with CsA ( $10^{-4}$  mol/liter). The vascular segments were randomly assigned to each beaker. The 2 beakers were then placed at 4°C for 48 hours as previously described.<sup>16</sup>

### **Vascular Reactivity**

The vessels were cut into 4 mm rings 48 hours after incubation at 4°C and suspended between 2 metal stirrups connected to an isometric transducer. They were placed in isolated tissue baths containing oxygenated Krebs-bicarbonate solution (20 ml at 37°C) to record variations in isometric tensions. 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. Maximal contraction was determined with KCl (60 mmol/liter) incubation. After washing and stabilization for 45 minutes, prostaglandin-F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) ( $2 \times 10^{-6}$  to  $10^{-5}$  mol/liter) was added to achieve 50% of the maximal contraction to KCl. The vessels were stimulated in the presence and absence of MH<sub>4</sub> ( $10^{-1}$  mol/liter for 45 minutes) according to the following protocol: (1) cumulative dose-response curves to serotonin ( $10^{-10}$  to  $10^{-5}$  mol/liter, an agonist that binds to 5HT<sub>1D</sub> receptors coupled to Gi-proteins); (2) cumulative dose-response curves to bradykinin (BK) ( $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  mol/liter, an agonist that binds to

B<sub>2</sub> receptors coupled to Gq-proteins); and (3) response to single-dose sodium nitroprussiate (SNP, 10<sup>-5</sup> mol/liter). 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 45 minutes before the addition of serotonin: 10<sup>-6</sup> mol/liter, to block serotonin 5HT-2 receptors on smooth muscle cells).

### **Statistical Analysis**

Data were collected with a data acquisition software (IOS3, Emka Inc., Paris, France). Contractions to PGF2α are expressed as a percentage of the maximal contraction to KCl for each group and expressed as means ± SEM. Relaxations are expressed as a percentage of the maximal contraction to PGF2α (% E<sub>max</sub>) 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**

### **Contraction**

There were no significant differences in the amplitude of the contraction to KCl (60 mmol/liter) between all groups (Table I). Contractions to PGF2α (range 2 × 10<sup>-6</sup> to 10<sup>-5</sup> mol/liter) averaged 95% the amplitude of contraction to KCl and were not significantly different between groups. The average doses of PGF2α required to attain 50% of the

maximal contraction to KCl was significantly lower ( $p < 0.001$ ) in the CsA ( $8.6 \pm 1.94 \times 10^{-6}$  mol/liter) group compared to the control group ( $24.8 \pm 5.2 \times 10^{-6}$  mol/liter).

### **Endothelium-Dependent Relaxations**

The concentration-response curves to 5HT and BK are depicted in Figures 1 and 2, respectively. The control group (group 1) showed normal vascular relaxations to both agonists (%  $E_{\max}$  [5HT]: 24%; % 5HT [BK]: 36%). Group 2 (CsA alone) showed a significantly decreased response to 5HT compared to control (%  $E_{\max}$  [5HT]:  $77\% \pm 4\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 1). No impairment of relaxation to BK was noted (Figure 2). The addition of  $MH_4$  (group 3) produced a statistically significant improvement in the response to 5HT compared to group 2 (%  $E_{\max}$  [5HT]:  $62\% \pm 4\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 1). No differences were noted with BK (Figure 2).

### **Endothelium-Independent Relaxations**

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

## **DISCUSSION**

The present study demonstrates that acute administration of  $MH_4$ , a  $BH_4$  analog, following exposure to CsA significantly improves the endothelial function of epicardial coronary arteries (Figure 1). In the presence of  $MH_4$ , endothelial relaxations to 5HT improved by 28%, reflecting a restoration of the vasorelaxing properties of the endothelium, a critical factor in the evolution of patients following heart transplantation.

Indeed, coronary endothelial dysfunction following heart transplantation is predictive of cardiac allograft vasculopathy, cardiac events and death.<sup>3</sup> There was no impairment of BK-induced vasorelaxation, which concords with previous observations of an early alteration of pertussis-toxin sensitive Gi-protein-dependent relaxation after heart transplantation, later followed by involvement of the Gq-protein pathway.<sup>5</sup>

Although the potent immunosuppressive properties of CsA have been key to the development of heart transplantation and its widespread application in the 1980s, the incidence of CAV has remained constant since its introduction, although chronic immune injury is believed to be the major pathogenic mechanism. Therefore the mechanism and role of cyclosporin-induced endothelial dysfunction in the pathogenesis of CAV remains unresolved. Several mechanisms have been proposed but the most compelling evidence points to an impairment of the capacity of the endothelium to release NO,<sup>63</sup> a direct cytotoxic effect of CsA on endothelial cells<sup>62</sup> and an enhancement of oxidative stress by production of reactive oxygen species.<sup>69,78,80</sup> In fact, Lopez-Ongil et al.<sup>80</sup> showed that CsA induces a dose-dependent increase in oxygen free radical synthesis, an effect abrogated by the administration of the antioxidants superoxide dismutase (SOD) and catalase. Moreover, addition of oxidized low-density lipoprotein on rat aortic rings further deteriorates endothelial reactivity by increasing the oxidative stress.<sup>78</sup> Oxygen free radicals are highly damageable to endothelial cell function. Indeed, superoxide ( $O_2^-$ ) may react with SOD to form hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), or with NO to produce  $OONO^-$ , a compound highly toxic to the endothelium.<sup>68</sup> These reactive oxygen species affect endothelial cell reactivity and function in a number of different ways. First,  $O_2^-$  anions may exert exaggerated vascular contractility by a direct stimulatory effect on smooth muscle cells.<sup>68</sup> They can also act as scavengers of NO released from vascular endothelial



cells.<sup>79</sup> Moreover, BH<sub>4</sub> which is only active in its fully reduced form, becomes predominantly present in its oxidized form when surrounded by high concentrations of reactive oxygen species, making it functionally inactive as an antioxidant.<sup>108</sup> Hence, despite a possibly adequate concentration of BH<sub>4</sub>, its role as an antioxidant and NO-catalyst could be limited. Furthermore, OONO<sup>-</sup> at higher concentrations may be directly cytotoxic by nitrosylation of tyrosine residues and by donation of the hydroxyl radical.<sup>109,110</sup> In the physiological state, there is an equilibrium between the production of NO and oxygen-derived free radicals.<sup>86</sup> This equilibrium is in part sustained by the action of BH<sub>4</sub>.

BH<sub>4</sub> is an essential cofactor of NOS<sup>84</sup> and hence of NO production (Figure 3). BH<sub>4</sub> helps stabilize the active dimeric form of NOS increasing its affinity to L-arginine and directing the flow of electrons, within the enzyme, towards L-arginine.<sup>111</sup> However, in the presence of low levels or in the absence of BH<sub>4</sub>, the “uncoupled” form of NOS becomes a source of oxygen-derived free radicals at the expense of NO synthesis (Figure 3).<sup>111</sup> This is explained by the different physiological roles of BH<sub>4</sub> in the NO biosynthetic pathway. Wever et al.<sup>112</sup> demonstrated a direct dose-dependent antioxidative role of BH<sub>4</sub> through inactivation of the hypoxanthine/xanthine oxidase system thereby limiting the production of superoxide anions. Also, BH<sub>4</sub> has been shown to protect NOS from feedback inhibition by NO.<sup>113</sup> Moreover, BH<sub>4</sub> serves as a redox active group on NOS which could pass electrons to O<sub>2</sub>. During NO synthesis, oxygen activation by NOS heme involves a sequential transfer of 2 electrons to heme to form heme-oxo and heme-peroxy species responsible for catalyzing arginine hydroxylation.<sup>114</sup> BH<sub>4</sub> is kinetically the preferred source of electrons. However, in conditions of BH<sub>4</sub> depletion, those NOS heme-oxy species which are unstable, will release O<sub>2</sub><sup>-</sup> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> if electrons are not

delivered at a sufficient rate. For this reason, our main hypothesis was that supplementation of the BH<sub>4</sub> pathway would limit the deleterious effects of cyclosporin on coronary endothelium-dependent relaxations.

The significant improvement in endothelial function following acute administration of BH<sub>4</sub> suggests different possible effects of cyclosporin on coronary arteries. Since the dysfunction in vascular reactivity following CsA exposure is due to diminished NO production,<sup>63</sup> BH<sub>4</sub> supplementation can counteract that effect despite the fact that basal BH<sub>4</sub> should suffice to accomplish that role. Some investigators have suggested that oxidative stress itself can induce a reduction and degradation of BH<sub>4</sub>.<sup>115,116</sup> Huisman et al.<sup>117</sup> in a recent paper on renal allografts suggested a functional deficiency of BH<sub>4</sub> in renal allografts. Hence, whether a quantitative or qualitative deficiency of BH<sub>4</sub> is operative, acute supplementation definitely improves the endothelial response to vasoactive substances. However, in light of the recent findings by Vejstrup et al.<sup>118</sup> of the quasi-absence (16% remaining) of endothelial NOS (eNOS) expression by immunohistochemistry in human heart allografts at 3 years posttransplantation, the NO-promoting contribution of BH<sub>4</sub> may be time-limited. Oxidative stress may uncouple NOS or degrade BH<sub>4</sub> leading to increased NO breakdown, which may be partially reversed by acute and long-term BH<sub>4</sub> supplementation.

The increased sensitivity to PGF<sub>2</sub>α observed in the CsA rings compared to control rings (Table I) supports the hypothesis of reduced NO release<sup>63</sup> and direct procontractile effects of O<sub>2</sub><sup>-</sup> on smooth muscle cells following CsA exposure.<sup>68</sup> These combined effects impair the physiological balance between contractile and relaxing forces and are manifested by an increased contractile response to PGF<sub>2</sub>α.

The newer generation of immunosuppressants also cause an endothelial dysfunction in coronary arteries.<sup>16</sup> In fact, FK-506 induced a more severe endothelial dysfunction to 5HT than CsA using the same experimental model. Studies on BH<sub>4</sub> supplementation following FK-506 exposure are currently under way in our laboratory. Results similar to the ones presented here would definitely warrant further *in vivo* studies and its application to human heart transplantation. In fact, very few reports to date have examined the role of BH<sub>4</sub> in the field of transplantation. The only study involving BH<sub>4</sub> in the setting of cardiac transplantation showed improvement in murine cardiac allograft survival<sup>119</sup>. That study however was not addressing the effects of BH<sub>4</sub> on endothelial function and consisted of a follow-up of only 7 days. Another study on rodent kidney transplant recipients suggested a potential therapeutic role for BH<sub>4</sub> in early allograft rejection<sup>117</sup>. Finally, a study by Schmid et al.<sup>120</sup> on lung transplantation in swine showed a decrease in ischemia-reperfusion injury. These studies all suggest a beneficial role to BH<sub>4</sub> in the perioperative management of transplant recipients, however they are sparse and need further experimental validation.

### **Limitations and Future Orientations**

To date, only one report had studied the effect of BH<sub>4</sub> on cyclosporin-induced endothelial dysfunction.<sup>121</sup> The findings of the present study opens the door to more research avenues in the field of transplantation. Several questions, which were not the scope of the present study, remain to be answered regarding the precise effect of CsA on BH<sub>4</sub> bioactivity, about the effect of chronic administration of BH<sub>4</sub> to transplant recipients and the possible additive effects of BH<sub>4</sub> with other antioxidants or NO-donors.

A few limitations about this study must be outlined. First, this is an *in vitro* model of CsA-induced endothelial dysfunction, but since CsA may act as an NO donor *in vivo*,<sup>122</sup> the model needs to be recreated in experimental heart transplant recipients. Second, the concentrations of cyclic guanylate monophosphate or of BH<sub>4</sub> were not measured in the vascular rings to determine whether these results are due to increased production of NO or compensatory increase in functional BH<sub>4</sub>. Finally, reactive oxygen species were not measured to assess the degree of oxidative stress in this model as this has been previously reported.<sup>121</sup>

In conclusion, we showed that acute administration of tetrahydrobiopterin significantly improves endothelial function following exposure to cyclosporine. Besides 3-hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors which may act as antioxidants, few pharmacological interventions have reduced the incidence of endothelial dysfunction and CAV following heart transplantation in recent years.<sup>104</sup> The dual role of BH<sub>4</sub> as a NO-producing cofactor and a potent antioxidant makes it a promising target in the field of heart transplantation. Further studies need to be undertaken so BH<sub>4</sub> can become an integral part of our therapeutic arsenal to improve coronary endothelial function and reduce the incidence of CAV following transplantation in the future.

### **Acknowledgments**

This work was supported through grants from the "Fonds de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal" (FRICM), the Department of Surgery of the "Université de Montréal". Dr. Louis P. Perrault is a scholar of the "Fonds de la recherche en santé du Québec" (FRSQ).

**FIGURE LEGENDS**

Table I        Maximal contraction responses to potassium chloride (KCl, 60 mol/liter), to PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and the maximal dose of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  required

Figure 1       Cumulative concentration-response curve of endothelium relaxation against serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (% E<sub>max</sub>). Results are presented as mean  $\pm$  SEM.

\**p* < 0.05 vs control, \*\**p* < 0.05 vs CsA 10<sup>-4</sup>, +*p* < 0.05 vs CsA 10<sup>-4</sup> + MH<sub>4</sub>.

Figure 2       Cumulative concentration-response curve of the endothelium against bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries. Responses are given as a percentage of maximal contraction to 5HT. Results are presented as mean  $\pm$  SEM.

\**p* < 0.05.

Figure 3       (a) Schematic representation of the role of tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) in the biosynthesis of NO along with “coupled” endothelial nitric oxide synthase (eNOS). (b) Reduced bioavailability or function of BH<sub>4</sub> induces “uncoupling” of NOS with resultant synthesis of oxygen free radicals superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and peroxynitrite (OONO<sup>-</sup>).

L-Arg, L-arginine; L-Cit, L-citrulline; CsA, cyclosporine A; EC, endothelial cells.

**TABLE I** Maximal contraction responses to potassium chloride (KCl, 60 mol/liter), to PGF<sub>2</sub>α and the maximal dose of PGF<sub>2</sub>α required

	Control	Cyclosporin
KCl maximal contraction	10.2 ± 2.2	6.7 ± 0.7
PGF <sub>2</sub> α maximal contraction (E <sub>max</sub> )	6.6 ± 0.5	6.2 ± 0.5
PGF <sub>2</sub> α dose (× 10 <sup>-6</sup> mol/liter)	24.8 ± 5.2	8.6 ± 1.9*

\**p* < 0.001.

Figure 1

Porcine coronary arteries after 48 h exposure to CsA at 4 °C

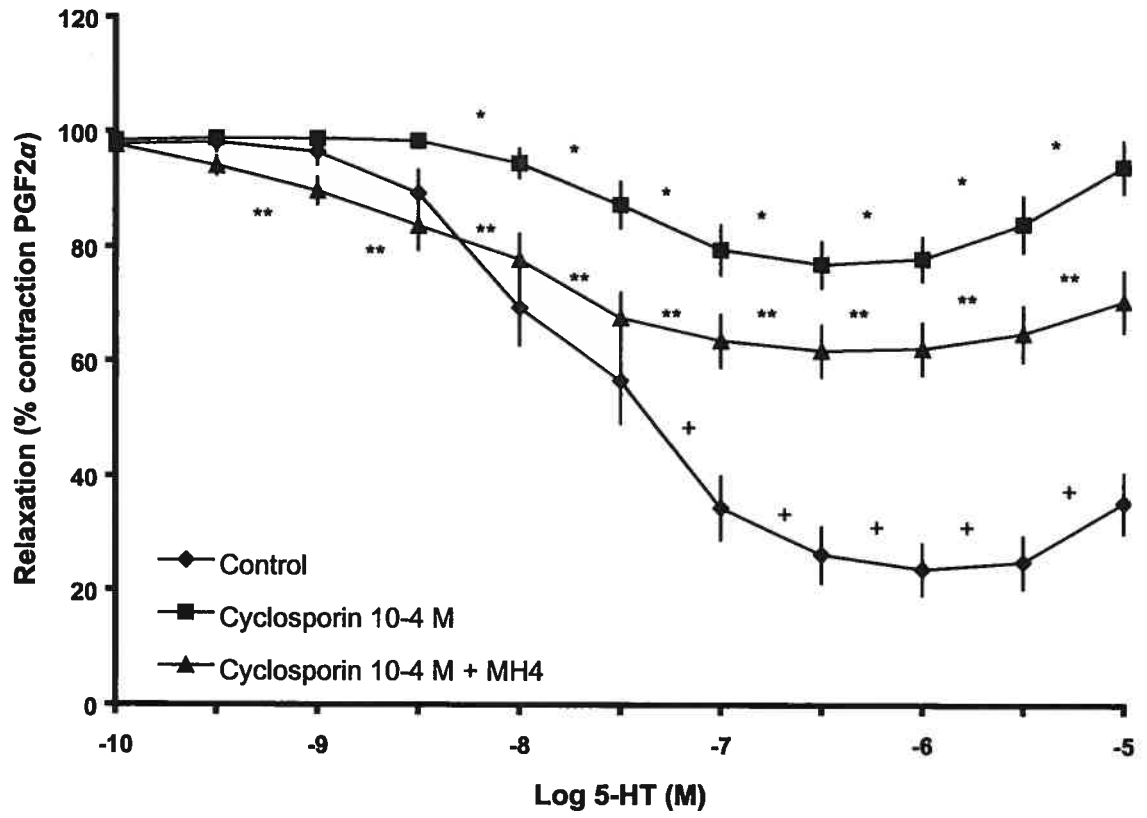


Figure 2

Porcine coronary arteries after 48 h exposure to CsA at 4 °C

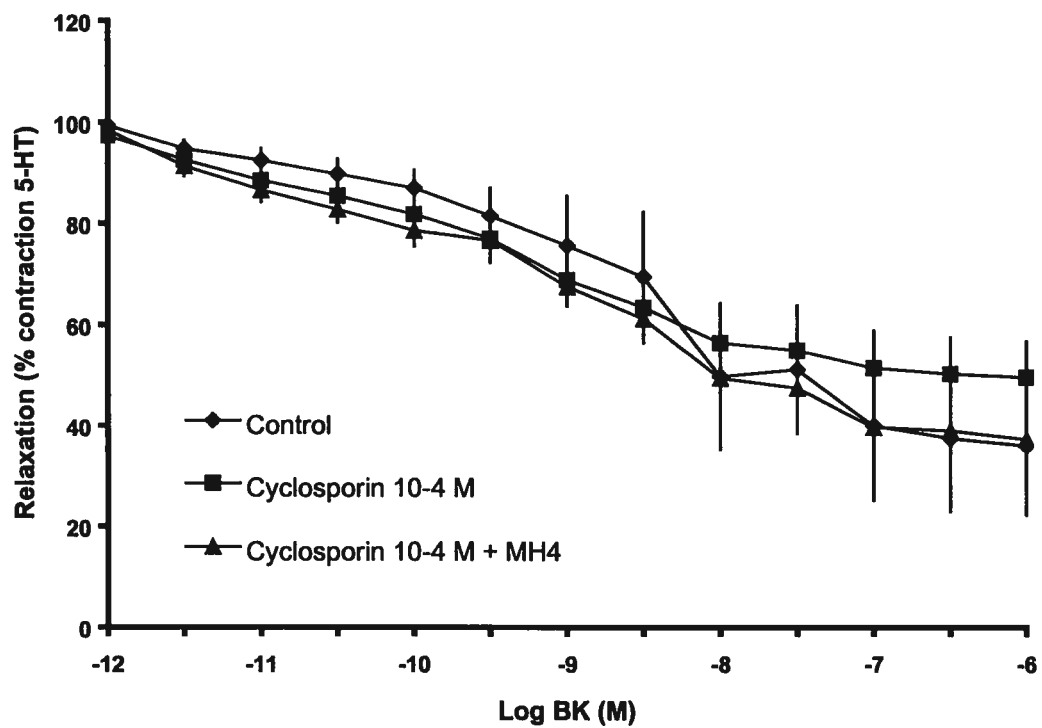
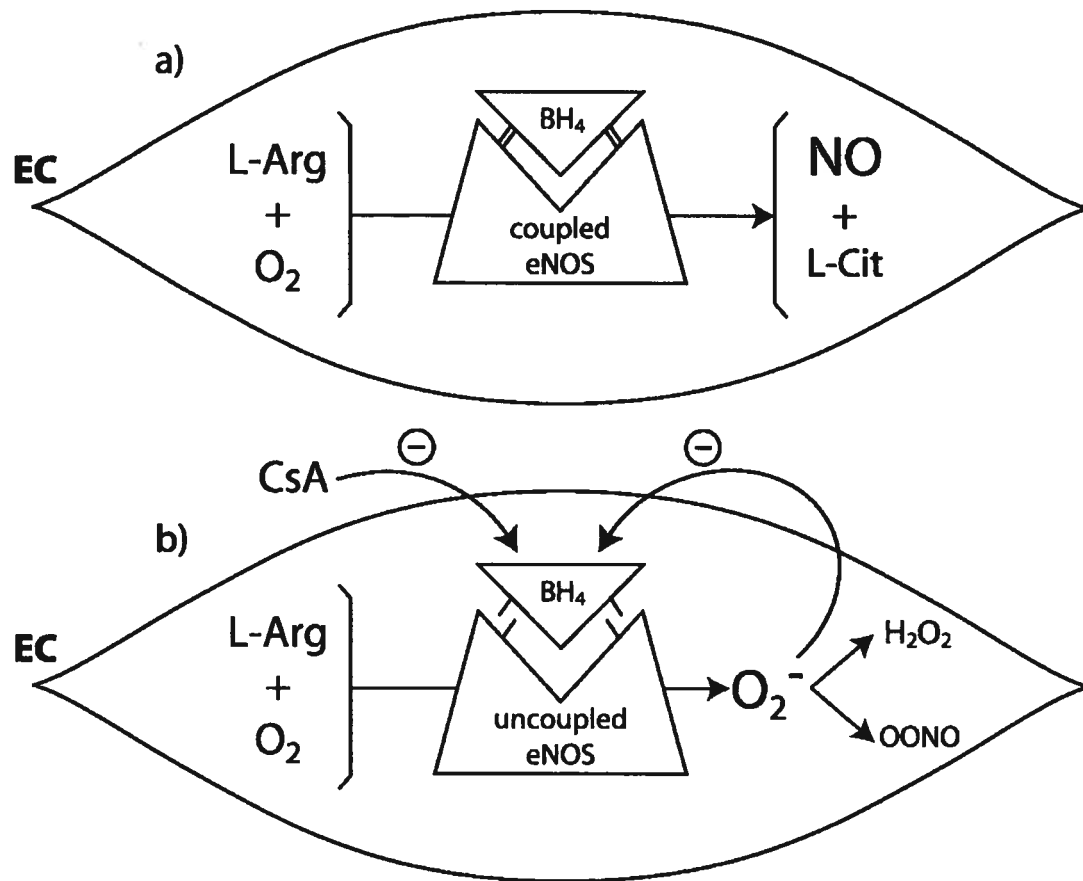




Figure 3



# Discussion

La transplantation cardiaque demeure l'option de choix pour le traitement des patients en insuffisance cardiaque terminale. Malgré les progrès accomplis durant les vingt dernières années dans la compréhension de la pathologie du rejet chronique et dans l'amélioration de la prise en charge pharmacologique des patients suite à une transplantation cardiaque, il n'en demeure pas moins que la physiopathologie de la coronaropathie du greffon reste encore mal comprise et que l'incidence de cette pathologie reste élevée et létale à long terme malgré tous les efforts déployés. Tel que cité précédemment, la physiopathologie de cette condition ne découle pas d'un facteur unique, mais constitue plutôt un treillis complexe de causes bien établies et d'hypothèses bien acceptées. Force est de constater qu'il existe néanmoins encore bien des inconnues à ce sujet qui exigent des réponses. Ceci explique donc l'importance d'explorer de nouvelles avenues pour tenter d'émettre de nouvelles hypothèses explicatives ainsi que l'importance de pallier aux causes déjà bien établies. Tel que mentionné précédemment dans le texte, la fonction endothéliale suite à une transplantation cardiaque constitue l'un des éléments centraux dans la physiopathogénèse de la maladie du greffon. Les travaux ci-présents sont donc principalement centrés sur la fonction endothéliale dans un modèle *in vivo* pour la première étude et un modèle expérimental *ex vivo* dans la deuxième étude. Suite aux travaux de Galumbeck et al.<sup>59,60</sup> qui soulevaient une hypothèse innovatrice sur l'étiologie de la dysfonction endothéliale assumant qu'elle était secondaire à l'agression immunologique visant l'endothélium immédiatement après implantation d'une allogreffe, il était important de vérifier ces hypothèses sur un modèle expérimental de transplantation cardiaque porcine. La seconde étude visait plutôt à contrer une source de dysfonction endothéliale bien établie : la CsA par le biais de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) qui

agit par différents mécanismes et qui s'est avérée efficace dans plusieurs contextes cliniques de dysfonction endothéliale acquise.

A partir de ces deux études, nous pouvons conclure que 1) la dénudation endothéliale au moment de l'implantation cardiaque entraîne une dysfonction endothéliale plus marquée et une hyperplasie intimale sévère après une transplantation cardiaque chez le porc et 2) que l'ajout de BH<sub>4</sub> permet de limiter la dysfonction endothéliale des artères coronaires épiscopales porcines suite à l'exposition à la CsA dans un modèle *ex vivo*. Compte tenu de l'importance accordée à l'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'endothélium suite à une transplantation cardiaque, tous les efforts doivent être faits pour tenter de les préserver. Ceci permettrait ainsi de limiter l'apparition de la coronaropathie du greffon qui est la cause principale de mortalité à long terme après transplantation cardiaque.

La première étude se penchait donc sur le rôle potentiel de la dénudation endothéliale lors de l'implantation cardiaque. Malgré la présence clairement démontrée d'anticorps anti-endothéliaux en circulation suite à une greffe cardiaque et malgré l'association établie entre ces anticorps et l'apparition de la maladie du greffon à long terme,<sup>53,54</sup> cette agression immunologique ne justifie pas pour autant de procéder à une dénudation de l'endothélium lors de l'implantation. Selon nos résultats, la dénudation de l'endothélium s'effectue au détriment de la fonction endothéliale à long terme, même après régénérescence de l'endothélium. Ces résultats fonctionnels observés sur l'endothélium se manifestent également de façon morphologique par la présence d'une incidence statistiquement plus élevée d'hyperplasie intimale dans les artères coronaires épiscopales de porcs subissant une dénudation endothéliale lors de l'implantation. L'utilisation de porcs immunotypés pour les anticorps de type SLA (Swine Lymphocyte

Alloantigen) nous a permis d'isoler l'effet du rejet chronique sur les greffons cardiaques puisque ces derniers ne sont pas sujets au rejet aigu. Ceci a été bien démontré dans des études antérieures avec le même modèle de transplantation cardiaque hétérotopique chez le porc.<sup>122</sup> En effet, dans ce modèle animal, une cinétique de rejet chronique manifestée par une dysfonction endothéliale des artères coronaires s'installe de façon lente et progressive, se traduisant par une atteinte des réponses de relaxation dépendantes de l'endothélium. Initialement, cette dysfonction n'affecte que la voie des récepteurs couplés aux protéines Gi (sensibles à la toxine de la coqueluche). Deux mois suivant la transplantation, cette dysfonction s'étend à la voie des récepteurs couplés aux protéines Gq (non-sensibles à la toxine de la coqueluche). Il est intéressant de noter que dans l'étude ci-présente, la dysfonction endothéliale affectait ces deux voies de signalisation de façon indiscriminée seulement un mois suivant la transplantation cardiaque. Cette atteinte généralisée, secondaire à l'insulte mécanique et immunologique, est si importante qu'elle potentialise la vitesse d'installation de la dysfonction endothéliale dans les artères coronaires. La différence significative du taux d'hyperplasie intinale sévère dans ces vaisseaux témoigne de l'ampleur de l'atteinte morphologique associée à cette atteinte fonctionnelle.

Aussi est-il impératif de préserver l'intégrité fonctionnelle et structurelle de l'endothélium coronaire au moment de la transplantation cardiaque. La dénudation de la couche de cellules endothéliales telle que décrite dans cette étude était induite mécaniquement de façon volontaire. Il est donc important d'éviter toute manipulation à l'intérieur de la lumière des artères coronaires des greffons cardiaques. Cette disruption peut toutefois s'observer même en l'absence de manipulation directe de l'endothélium coronaire. Ainsi, il est bien démontré que la pression de perfusion de la solution de

cardioplégie a un impact sur la fonction endothéliale des artères coronaires épiscopales avec une meilleure relaxation observée avec des pressions de 60 mmHg versus des pressions de perfusion de 120 mmHg. Ceci était présumément dû aux lésions d'étirement et de cisaillement subies par les cellules endothéliales. Egalement, les solutions trop riches en ions potassiques peuvent entraîner une cytolysse menant à une dysfonction observée suite à une transplantation cardiaque.

Quelques questions méthodologiques sont à souligner dans cette étude. Tout d'abord, il est important de noter que malgré le nombre limité de sujets dans cette étude, nous sommes tout de même parvenus à des différences statistiquement significatives au niveau de toutes les questions d'étude. Ceci souligne une fois de plus l'importance de la préservation de l'intégrité structurelle de l'endothélium. Par ailleurs, le choix de comparer des artères dénudées et non-dénudées au niveau du même greffon cardiaque peut paraître discutable. Néanmoins, la présence d'une dysfonction sélective dans les artères dénudées qui épargne les artères non-dénudées au sein du même greffon cardiaque permet d'isoler catégoriquement ce geste comme étant le facteur responsable de cette dysfonction endothéliale dans le modèle présenté. En outre, l'utilisation d'un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique avec coeur battant mais non-travaillant constitue un souci quant à la validité externe de cette étude et son applicabilité sur de modèles de greffons travaillants. Toutefois, il a été clairement établi dans le passé que la cinétique de rejet chronique et les changements morphologiques observés dans les deux cas sont parfaitement comparables permettant d'utiliser l'un ou l'autre modèle pour l'étude de la fonction endothéliale.<sup>122</sup>

La deuxième étude portait sur un problème majeur associé à l'utilisation des immunosuppresseurs après une transplantation cardiaque, en l'occurrence la cyclosporine

A (CsA). En effet, malgré l'effet permissif de la CsA sur l'essor de la transplantation cardiaque il y a plus de vingt ans, elle n'en demeure pas moins potentiellement toxique sur l'endothélium. Une étude provenant de notre laboratoire et utilisant le même modèle expérimental, antédantant celle ci-présentée, démontrait une dysfonction endothéliale significative au niveau des artères coronaires porcines après exposition à divers agents immunosuppresseurs, et plus particulièrement à la CsA.<sup>16</sup> Cette dysfonction endothéliale est secondaire à plusieurs facteurs dont un effet directement cytotoxique de la CsA sur les cellules endothéliales, une inhibition de la relâche de NO par l'endothélium et de façon plus importante la production dose-dépendante de radicaux libres induite par la CsA. Cet état de stress oxydatif augmenté possède nombre d'effets néfastes sur l'homéostasie vasculaire, entraînant notamment des contractions exagérées et parfois spontanées du muscle vasculaire lisse ainsi qu'une dégradation du NO libéré dans la lumière vasculaire. Par ailleurs, les radicaux libres tels le peroxy-nitrite ou les anions superoxyde induisent une oxydation du BH<sub>4</sub> qui perd alors ses propriétés antioxydantes.

Dans la présente étude, nous avons évalué si l'ajout de BH<sub>4</sub> atténuait la dysfonction endothéliale observée suite au contact avec la CsA. Ceci dit, sachant que le BH<sub>4</sub> entraîne effectivement une amélioration significative de la fonction endothéliale, il s'agit d'expliquer les mécanismes impliqués dans cette amélioration. En effet, deux hypothèses principales s'imposent. Tout d'abord, sachant que la présence de radicaux libres entraîne une destruction de BH<sub>4</sub>, l'effet observé peut être directement attribuable à la supplémentation quantitative en BH<sub>4</sub> dans un milieu qui en est anormalement dépourvu. Toutefois, il existe également une atteinte qualitative du BH<sub>4</sub> secondaire à cette agression oxydative qui vient s'ajouter à une simple réduction de la biodisponibilité de BH<sub>4</sub>. Ceci

dit, l'effet observé est probablement secondaire à la supplémentation physique en BH<sub>4</sub> fonctionnel.

Dans le futur, des études supplémentaires évaluant les concentrations de radicaux libres et de BH<sub>4</sub> dans la solution pourraient élucider ce phénomène. Par ailleurs, le même protocole d'étude devrait être appliqué aux autres agents immunosuppresseurs qui sont également toxiques pour l'endothélium. Finalement, l'application *in vivo* de la supplémentation en BH<sub>4</sub> chez les patients après transplantation cardiaque devrait être évaluée tel que déjà étudiée dans divers autres contextes pathologiques.



# Bibliographie

1. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Keck BM, Hertz MI. The Registry of the International society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report—2004. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:796-803.
2. Marti V, Romeo I, Ayant R et al. Coronary endothelial dysfunction as a predictor of intimal thickening in the long term after heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:1174-80.
3. 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;93:457-62.
4. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P et al. Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997;16:643-57.
5. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P et al. Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine coronary endothelium during rejection after heart transplantation. *Cardiovasc Res* 1999;43:257-70.
6. Matsumoto T, Wakabayashi K, Kobayashi T, Kamata K. Alterations in vascular endothelial function in the aorta and mesenteric artery in type II diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;82:175-82.
7. Shishido T, Tasaki K, Takeishi Y et al. Chronic hypotriglyceridemia in young watanabe heritable hyperlipidemic rabbits impairs endothelial and medial smooth muscle function. *Life Sci* 2004;74:1487-501.

8. Zeiher AM, Schachinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelial-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995;92:1094-100.
9. Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfroe KY, Calhoun DA. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. *Circulation* 2004;109:2857-61.
10. Knight RJ, Dikman S, Liu H, Martinelli GP. Cold ischemic injury accelerates the progression to chronic rejection in a rat cardiac allograft model. *Transplantation* 1997;64:1102-7.
11. Drinkwater DC, Rudis E, Laks H, et al. University of Wisconsin solution versus Stanford cardioplegic solution and the development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:891-6.
12. Perrault LP, Nickner C, Desjardins N, Dumont E, Thai P, Carrier M. Improved preservation of coronary endothelial function with Celsior compared with blood and crystalloid solutions in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:549-58.
13. Laude K, Richard V, Thuillez C. Coronary endothelial cells: a target of ischemia-reperfusion and its treatment. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004;97:250-4.
14. Koskinen PK, Nieminen MS, Krogerus LA. Cytomegalovirus infection and accelerated cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant* 1993;12:724-9.

15. Faulk WP, Rose M, Meroni PL et al. Antibodies to endothelial cells identify myocardial damage and predict development of coronary artery disease in patients with transplanted hearts. *Hum Immunol* 1999;60:826-32.
16. Jeanmart H, Malo O, Nickner C, Desjardins N, Carrier M, Perrault LP. Comparative study of cyclosporine and tacrolimus vs newer immunosuppressants mycophenolate mofetil and rapamycin on coronary endothelial function. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:990-8.
17. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
18. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3:2007-18.
19. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
20. Vanhoutte P.M. The endothelium – modulator of vascular smooth-muscle tone. *New Engl J Med* 1988; 319 (August 25): 512-513
21. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000;190:244-54.
22. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3375-8

23. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1990;15:486-92.
24. Riddel DR, Owen JS. Nitric oxide and platelet aggregation. *Vitam Horm* 1999;57:25-48.
25. Lüscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium: Modulator of Cardiovascular Function*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990:1-228
26. Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and vascular smooth cell proliferation. *Cardiovasc Res* 1999;43:658-65.
27. Scott-Burden T and Vanhoutte PM. Regulation of smooth-muscle growth by endothelium-derived factors. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1): 91-97
28. Scott-Burden T and Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87 (Suppl V): V51-55
29. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and vascular disease. In: Gupta SK ed. *Pharmacology and Therapeutics in the New Millenium*. Narosa publishing house, New Delhi, India 2001:1-17.
30. Vanhoutte PM. State of the art lecture: Endothelium and control of vascular function. *Hypertenstion* 1989; 13: 658-667
31. 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
32. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H1145-49
  33. Vanhoutte P.M. The other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993; 87 (Suppl V): V9-17
  34. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979; 30: 293-331
  35. Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium : maestro of the blood circulation. *Phil Trans R Soc Lon B* 1994; 348 : 225-246
  36. Komori K and Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels* 1990; 27: 238-245
  37. Feletou M and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 515-524
  38. Nagao T and Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1993; 8: 1-6
  39. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* 1996; 78: 415-23

40. 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
41. 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; 112:557-565
42. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 1994;23:229-35.
43. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-6.
44. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:681-4.
45. Jurcevic S, Dunn MJ, Crisp S et al. A new enzyme-linked immunosorbent assay to measure anti-endothelial antibodies after cardiac transplantation demonstrates greater inhibition of antibody formation by tacrolimus compared with cyclosporine. *Transplantation* 1998;65:1197-202.
46. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE et al. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation* 2001;104:3091-6.
47. Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC, Shumway NE. In: *Heart transplantation*. Churchill Livingstone, 1<sup>st</sup> edition, 2002:390-463.

48. Dunn MJ, Crisp SJ, Rose ML, Taylor PM, Yacoub MH. Anti-endothelial antibodies and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Lancet* 1992;339:1566-70.
49. Fredrich R, Toyoda M, Czer LS et al. The clinical significance of antibodies to human vascular endothelial cells after cardiac transplantation. *Transplantation* 1999;67:385-91.
50. Tixier D, Tusio P, Czer L et al. Characterization of antiendothelial cell and antiheart antibodies following heart transplantation. *Transplant Proc* 1993;25:931-4.
51. Ferry BL, Welsh KI, Dunn MJ et al. Anti-cell surface endothelial antibodies in sera from cardiac and kidney transplant recipients: association with chronic rejection. *Transplant Immunol* 1997;5:17-24.
52. Trento A, Hardesty RL, Griffith BP, Zerbe T, Kormos RL, Bahnson HT. Role of the antibody to vascular endothelial cells in hyperacute rejection in patients undergoing cardiac transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;5:37-41.
53. Jucevic S, Ainsworth ME, Pomerance A et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation* 2001;71:886-92.
54. Faulk WP, Rose M, Meroni PL et al. Antibodies to endothelial cells identify myocardial damage and predict development of coronary artery disease in patients with transplanted hearts. *Hum Immunol* 1999;60:826-32.



55. Crisp SJ, Dunn MJ, Rose ML, Barbir M, Yacoub MH. Antiendothelial antibodies after heart transplantation: the accelerating factor in transplant-associated coronary artery disease? *J Heart Lung Transplant* 1994;13:81-91.
56. Szabo G, Bahrle F, Fazekas L, Vahl CF, Hagl S. The role of endothelin-B receptors in myocardial and endothelial reperfusion injury after heart transplantation. *Thorac Cardiovasc Surg* 2001;49:167-71.
57. Yamani MH, Straling RC, Young JB et al. Acute vascular rejection is associated with up-regulation of vitronectin receptor (alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub>), increased expression of tissue factor, and activation of the extracellular matrix metalloproteinase induction system. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:983-9.
58. 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;88:1093-100.
59. Galumbeck MA, Sanfillipo FP, Hagen PO, Seaber AV, Urbaniak JR. Inhibition of vessel allograft rejection by endothelial removal. Morphologic and structural changes. *Ann Surg* 1987;206:757-64.
60. Galumbeck MA, Ratz PH. Functional integrity of vascular allografts after endothelial removal. *J Vasc Res* 1995;32:120-8.
61. Cohn LH, Edmunds LH. In: *Cardiac surgery in the adult*. McGraw-Hill, 2<sup>nd</sup> edition, 2003;59:1403-26.
62. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, Zilio P, Benigni A, Remuzzi G. Cyclosporin-induced endothelial cell injury. *Lab Invest* 1986;55:455-62.

63. Morris ST, McMurray JJ, Rodger RS, Farmer R, Jardine AG. Endothelial dysfunction in renal transplant recipients maintained on cyclosporine. *Kidney Int* 2000;57:1100-6.
64. Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, et al. Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* 1994;90:3018-23.
65. Cartier R, Carrier M, Dagenais F, Buluran J, Leclerc Y. Cyclosporine impedes endothelium-dependent coronary artery vasodilation in the isolated rat heart. *Transplant Proc* 1994;26:2877-9.
66. Mankad P, Spatenka J, Slavik Z, O'Neil G, Chester A, Yacoub M. Acute effects of cyclosporine and cremophor EL on endothelial function and vascular smooth muscle in the isolated rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992;6:77-83.
67. Weis M, Wildhirt SM, Schulze C, et al. Coronary vasomotor dysfunction in the cardiac allograft: impact of different immunosuppressive regimens. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:776-84.
68. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 1994;23:229-35.
69. Diedrich D, Skopec J, Diedrich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxyde. *Hypertension* 1994;23:957-61.

70. Epstein A, Beall A, Wynn J, Mulloy L, Brophy CM. Cyclosporine, but not FK 506, selectively induces renal and coronary artery smooth muscle contraction. *Surgery* 1998;123:456-60.
71. Khalil A, Carrier M, Latour JG, Pelletier LC. Cyclosporine A-induced coronary artery vasoconstriction through myogenic and endothelium-dependent mechanisms. *Circulation* 1996;94(9 Suppl):II308-11.
72. Berkenboom G, Brekine D, Unger P, Gulbis B, Fontaine J. Coronary vasomotor responses in cyclosporine-treated piglets. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996;10:17-22.
73. O'Neil GS, Chester AH, Rose M, Tadjkarimi S, Yacoub MH. The effect of cyclosporine on the release of endothelium-derived relaxing factor from isolated human epicardial coronary arteries. *Transplantation* 1991;51:736-8.
74. Braun-Dullaeus RC, Feussner M, Walker G et al. Cyclosporine-induced coronary artery constriction—dissociation between thromboxane release and coronary vasospasm. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:328-35.
75. Letizia C, De Biase L, Caliumi C, et al. Endothelin-1 circulating levels increase in patients with orthotopic heart transplantation and in chronic therapy with cyclosporine. *Minerva Cardioangiol* 2001;49:15-22.
76. Cauduro RL, Costa C, Lhulier F et al. Cyclosporine increases endothelin-1 plasma levels in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2004 ;36 :880-1.

77. Kocik M, Malek I, Glacolicova A, Pirk J. The effect of cyclosporine A on the level of big endothelin in patients one year after orthotopic heart transplantation. *Transplant Int* 2004;17:65-70.
78. Galle J, Lehmann-Bodem C, Hubner U, Heinloth A, Wanner C. CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of  $O_2^-$  formation. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:339-46.
79. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-6.
80. Lopez-Ongil S, Hernandez-Perera O, Navarro-Antolin J, et al. Role of reactive oxygen species in the signaling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1998;124:447-54.
81. Carrier M, Tronc F, Stewart D, Pelletier LC. Dose-dependent effect of cyclosporin on renal arterial resistance in dogs. *Am J Physiol* 1991;261:H1791-6.
82. Mercanoglu F, Turkmen A, Kocaman O et al. Endothelial dysfunction in renal transplant patients is closely related to serum cyclosporine levels. *Transplant Proc* 2004;36:1357-60.
83. Mercanoglu F, Oflaz H, Turkmen A et al. Does the endothelial function change in renal transplant patients with longer duration of exposure and with higher cumulative doses of cyclosporine? *Transplant Proc* 2004;36:1361-6.

84. Gross SS, Jones CL, Hattori Y, Raman CS. Tetrahydrobiopterin: an essential cofactor of nitric oxide synthase with an elusive role. In: *Nitric oxide biology and pathology*. San Diego, CA: Academic Press, 2000, 167-87.
85. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413-20.
86. Cosentino F, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 1999;43:274-8.
87. Setoguchi S, Mohri M, Shimokawa H, Takeshita A. Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in coronary microcirculation in patients without epicardial coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:493-8.
88. Fukuda Y, Teragawa H, Matsuda K, Yamagata T, Matsuura H, Chayama K. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia. *Heart* 2002;87:264-9.
89. Verma S, Maitland A, Weisel RD, et al. Novel cardioprotective effects of tetrahydrobiopterin after anoxia and reoxygenation: identifying cellular targets for pharmacologic manipulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:1074-83.
90. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43:1435-8.

91. Billingham M. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc* 1987;19 (suppl 5):19-25.
92. Aptecar E, Teiger E, Dupouy P, et al. Effects of bradykinin on coronary blood flow and vasomotion in transplant patients. *J Am Col Cardiol* 2000;35:1607-15.
93. He GW, Yang CQ. Hyperkalemia exposure impairs EDHF-mediated endothelial function in the human coronary artery. *Ann Thorac Surg* 1997;63:84-7.
94. Murphy CO, Pan-Chih, Gott JP, Guyton RA. Coronary microvascular reactivity after ischemic cold storage and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1997;63:20-7.
95. Perrault LP, Malo O, Bidouard JP, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Inhibiting the NO pathways with intracoronary L-NAME infusion increases endothelial dysfunction and intimal hyperplasia after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003;23:277-82.
96. Borg-Capra C, Fournet-Bourguignon MP, Janiak P, et al. Morphological heterogeneity with normal expression but altered function of G-proteins in

cultured regenerated coronary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1997;122:999-1008.

97. Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: heart rejection study group. *J Heart Lung Transplant* 1990;9:587-93.
98. Rose EA, Smith CR, Petrossian GA, et al. Humoral immune responses after cardiac transplantation: correlation with fatal rejection and graft atherosclerosis. *Surgery* 1989;106:203-8.
99. Thollon C, Bidouard JP, Cambarrat C, et al. Alteration of endothelium-dependent hyperpolarizations in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *Circ Res* 1999;84:371-7.
100. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelium removal in porcine coronary arteries: possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Circ Res* 1989;65:740-53.
101. Gohra H, McDonald TO, Verrier E, Aziz S. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 1995;60:96-102.

102. Perrault LP, Bidouard JP, Desjardins N, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Comparison of coronary endothelial dysfunction in the working and nonworking graft in porcine heterotopic heart transplantation. *Transplantation* 2002;74:764-72.
103. 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;111:1230-9.
104. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995;333:621-7.
105. Hosenpud JD. Coronary artery disease after heart transplantation and its relation to cytomegalovirus. *Am Heart J* 1999;138:S469-72.
106. Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* 1999;84:392-400.
107. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001;5:88-97.



108. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whitsett J, Joseph J, Kalyanaraman B. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin study. *Biochem J* 2002;15:733-9.
109. Moro MA, Darley-Usmar VM, Lizasoain I, et al. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol* 1995;116:1999-2004.
110. Ma XL, Lopez BL, Liu GL, et al. Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury. *Circ Res* 1997;80:894-901.
111. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol* 2001;281:H981-6.
112. Wever RMF, van Dam T, van Rijn HJM, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:340-4.
113. Mayer B, Werner ER. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995;351:453-63.

114. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 2001;276:14533-6.
115. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:681-4.
116. Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103:1282-8.
117. Huisman A, Vos I, van Fassen EE, et al. Anti-inflammatory effects of tetrahydrobiopterin on early rejection in renal allografts: modulation of inducible nitric oxide synthase. *FASEB J* 2002;16:1135-7.
118. Vejstrup NG, Andersen CB, Boesgaard S, Mortensen SA, Aldershvile J. Temporal changes in myocardial endothelial nitric oxide synthase expression following human heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:211-6.
119. Brandacher G, Zou Y, Obrist P, et al. The 4-amino analogue of tetrahydrobiopterin efficiently prolongs murine cardiac allograft survival. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:747-9.

120. Schmid RA, Hillinger S, Walter R, et al. The nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin reduces allograft ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:726-32.
121. Miriuka S, Rao V, Weisel RD, et al. Cyclosporin-induced endothelial dysfunction: effects of the nitric oxide cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:130.
122. Stroes ESG, Luscher TF, de Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ. Cyclosporin A increases nitric oxide activity in vivo. *Hypertension* 1997;29:249-56.