

# Patophysiology of atherosclerosis based on research on *apoE-knockout* mice and their usefulness in checking new antiatherosclerotic agents

## Patofizjologia miażdżycy na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na myszach *apoE-knockout* i ich zastosowanie w badaniach nowych substancji przeciwmiażdżycowych

Jacek Jawień<sup>1</sup>, Marek Jawień<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Jagiellonian University School of Medicine, Krakow, Poland  
(Katedra Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie)

<sup>2</sup>Outpatient Cardiology Clinic, Krakow, Poland (NZOZ Poradnia Kardiologiczna Krowdrza w Krakowie)

---

### Abstract

Although atherosclerosis was previously thought to be primarily a degenerative disease, it is now well ascertained that its pathogenesis is inflammatory. This review describes the history of the new atherogenetic concept, including the pivotal role of *apoE-knockout* mice in understanding the inflammatory background of atherosclerosis.

The pivotal stage of atherogenesis is antigen presentation by macrophages to T lymphocytes. This antigen could be a fragment of oxidized LDL "digested" by macrophage, heat shock protein 60,  $\beta 2$  glycoprotein I, or fragments of bacterial antigens. During interaction between these cells, an immunological response of type T helper 1 (cellular) or T helper 2 (humoral) arises. Th1 response and its mediators: (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleukin 1, interleukin 12, and interleukin 18) increase atherogenesis, whereas Th2 response and its mediators: (interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10) decrease the development of atherosclerosis. The concept of atherosclerosis as an inflammatory disease is quite fresh; however, it is already considered an undisputable achievement of science, bringing particular therapeutic consequences.

Since inflammation plays an important role in atherogenesis, during recent years it has become apparent that the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway may play an important role in modifying the pathogenesis of atherosclerosis. These data raised the possibility that antileukotriene drugs may be an effective treatment regimen in atherosclerosis. In fact, we have found that among *apoE* and LDLR-double knockout mice the inhibition of FLAP, as well as cysteinyl leukotriene receptor blockade, was able to significantly prevent the development of atherosclerosis in gene-targeted mice.

**Key words:** atherosclerosis, gene-targeting, *apoE-knockout* mice, leukotrienes

### Streszczenie

Obecnie wiadomo, że miażdżycy jest chorobą o podłożu zapalnym. Długo brakowało jednoznacznego dowodu na istotny wpływ zapalenia na rozwój miażdżycy. Uzyskano go dzięki nowemu zwierzęcemu modelowi miażdżycy — myszy, u której zastosowano technikę celowania genowego (*apoE-knockout* mice). Kluczowym etapem rozwoju miażdżycy jest prezentacja limfocytom T antygeny przez komórki dendrytyczne. Antygenem tym może być fragment „strawionej” przez makrofag, utlenionej lipoproteiny o małej

---

### Address for correspondence:

Marek Jawień  
Katedra Farmakologii Collegium Medicum UJ  
ul. Grzegorzewska 16, 31–531 Kraków  
tel. + 48 (12) 421 11 68, fax: +48 (12) 421 72 17  
e-mail: krolik.mb@interia.pl

gęstości (LDL), białko szoku cieplnego 60 (HSP60),  $\beta 2$  glikoproteina I lub fragmenty antygenów bakteryjnych. W wyniku oddziaływania tych komórek następuje odpowiedź immunologiczna typu T helper 1 (komórkowa) lub typu T helper 2 (humoralna). Obecnie uważa się, że odpowiedź typu Th1 i jej mediatorzy: interferon  $\gamma$ , czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$ , interleukina 1, interleukina 12 oraz interleukina 18 działają przyspieszająco na rozwój miażdżycy, podczas gdy odpowiedź typu Th2 i jej mediatorzy: interleukina 4, interleukina 5, interleukina 10 oraz interleukina 13 hamują rozwój miażdżycy.

Koncepcja miażdżycy jako zapalenia ukształtowała się dopiero w ostatnich latach, lecz obecnie jej wartość jest niekwestionowana, co wiąże się z określonymi konsekwencjami terapeutycznymi. W ostatnich latach oczywiste stało się więc, że szlak produktów 5-lipooksygenazy może odgrywać istotną rolę patogenezie miażdżycy. Zaczęto rozważać leki przeciwleukotrienowe jako potencjalną terapię miażdżycy. W niniejszej pracy omówiono wyniki badań własnych przeprowadzonych na eksperymentalnym modelu miażdżycy: myszach z podwójnie wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E oraz dla receptora LDL. Wykazano, że inhibitory białka aktywującego 5-lipooksygenazę (FLAP) oraz bloker receptora dla leukotrienów cysteinylowych zmniejszają miażdżycę u zmienionych genetycznie myszy.

**Słowa kluczowe:** miażdżycy, celowanie genowe, myszy *apoE-knockout*, leukotrieny

Acta Angiol 2009; 15, 1: 1–9

Almost until the end of the nineties, atherosclerosis had been assumed to develop as a so-called chronic response to injury (response-to-injury hypothesis) which resulted in the loss of endothelial cells [1]. Thus, atherosclerosis had been considered primarily a degenerative disease [2–4]. However, approximately 20 years ago, trials started to focus on another pathogenic mechanism of atherosclerosis, not considered thus far: the inflammatory process.

In 1986, with the use of monoclonal antibodies, Hansson et al. discovered that the small cells with round nucleus present in the atheromatous plaque, known previously as “small monocytes”, were in fact T lymphocytes [5]. Several years later they showed that these lymphocytes “recognize” the oxidized molecules of low-density lipoproteins (LDL) — oxLDL — as antigens [6].

Moreover, the correlation between atherosclerosis and the presence of at least two types of infectious microorganisms, *Chlamydia pneumoniae* and the herpes simplex virus, was observed [7, 8]. This raised the question of whether the inflammatory process participates in atherosclerosis. Speculations of this kind were initially received with great scepticism because there was no spectacular, unequivocal evidence of the significant role of inflammation in atherosclerosis.

This evidence was delivered by a new technique: gene targeting, for the invention of which Mario R. Capecchi (USA), Martin J. Evans (United Kingdom), and Oliver Smithies (USA) received the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2007.

Since 1992 the mouse has become an excellent object for studies on atherosclerosis, replacing previous

Niemal do końca lat 90. zakładano, że miażdżycy rozwija się jako przewlekła odpowiedź na uraz, który powoduje utratę komórek śródbłonna [1]. Uznawano ją za chorobę zwyrodnieniową [2–4]. Około 20 lat temu badacze zaczęli w coraz większym stopniu skupiać się na innym, dotychczas nieuwzględnianym, aspekcie patogenetycznym miażdżycy — procesie zapalnym.

W 1986 roku Hansson i wsp. przy użyciu przeciwciał monoklonalnych odkryli, że małe komórki o okrągłym jądrze, obecne w blaszce miażdżycowej, które dotąd określano jako „małe monocyty”, są limfocytami T [5]. Kilka lat później stwierdzili oni, że limfocyty te jako antygen rozpoznają utlenione cząsteczki lipoprotein o małej gęstości (LDL) — oxLDL [6].

Ponadto w wielu oniesieniach raportowano o istnieniu korelacji pomiędzy miażdżycą a obecnością co najmniej 2 typów mikroorganizmów zakaźnych: *Chlamydia pneumoniae* i *herpes simplex virus* [7, 8]. Zaczęto się więc zastanawiać, czy proces zapalny nie bierze udziału w miażdżycy. Te rozważania początkowo jednak przyjmowano z dużym sceptycyzmem.

Brakowało bowiem jednoznacznego dowodu na istotny wpływ zapalenia na rozwój miażdżycy. Uzyskano go dzięki nowemu zwierzęcemu modelowi miażdżycy — myszy, u której zastosowano technikę celowania genowego (*gene-targeting*), za której wynalezienie Mario R. Capecchi (Stany Zjednoczone), Martin J. Evans (Wielka Brytania) oraz Oliver Smithies (Stany Zjednoczone) otrzymali w 2007 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny.

Od roku 1992 mysz *apoE-knockout* stała się znakomitym obiektem badań nad miażdżycą, zastępując do-

animal models [9–11], when the first line of mice with a switched-off gene for apolipoprotein E (*apoE-knockout*) was developed almost contemporaneously in two laboratories in United States [12, 13]. These mice were soon described as “reliable and useful. The best animal model of atherosclerosis in present times” [14]. During the breeding of *apoE-knockout* mice (known also as *apoE null* or *apoE deficient* mice), the normal gene coding apolipoprotein E is replaced by a mutated gene which does not produce this molecule. Such mice are called apoE-knockout because they have a knockout, switched-off, null, or inactivated gene coding apolipoprotein E. For clarity, in the following sections of this paper we will use the most popular name: *apoE-knockout* mice.

The *apoE-knockout* mice, in contrast to all other animal models, develop atherosclerosis spontaneously, without a high cholesterol diet [15]. The generation of such a model changed the nature of studies on the pathogenesis of atherosclerosis and enabled the investigators to formulate a new definition of atherosclerosis as a chronic inflammation [16].

The newest model of atherosclerosis has enabled investigators to create “double knockout” mice to test the influence of singular proteins participating in the inflammatory response on the development of atherosclerosis. These studies have shown, for example, that the absence of only one cytokine, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), reduced atherosclerosis by as much as 60% [17]. In *apoE-knockout* mice with severe combined immunodeficiency (SCID), atherosclerosis was reduced by 70% in comparison to the control group, due to a significantly lower number of lymphocytes in mice with SCID. It was demonstrated that the transfer of T cells to these mice aggravated atherosclerosis by as much as 164% [18].

These and other facts made investigators realize unequivocally that inflammation was essential for atherogenesis. Therefore, in 1999, Russell Ross officially proclaimed that atherosclerosis was an inflammatory disease [19].

Inflammation occurs in response to a factor that destabilizes local homeostasis. The factors that cause toll-like receptor dependent macrophage activation in the arterial wall include oxLDL, heat shock protein 60 (HSP60), and bacterial endotoxins [20].

The first stage of atherogenesis consists of endothelial dysfunction [19]. It involves first the regions of arterial bifurcations where the blood flow is not laminar. Hence, these localizations are prone to develop atherosclerosis. In such places, LDL is stored in the subendothelial space. Low-density lipoprotein accu-

tychczasowe modele zwierzęce [9–11]. Wówczas to niemal równocześnie w dwóch laboratoriach w Stanach Zjednoczonych stworzono pierwszą linię myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (*apoE-knockout*) [12, 13]. Myszy te wkrótce określono jako „wiarygodny i użyteczny, najlepszy obecnie model zwierzęcy miażdżycy” [14]. W procesie tworzenia myszy *apoE-knockout* (inne nazwy angielskie to: *apoE null* lub *apoE deficient*) następuje zastąpienie prawidłowego genu kodującego apolipoproteinę E przez zmutowany gen, który jej nie wytwarza. Taka mysz posiada gen kodujący apolipoproteinę E zgodnie z terminologią polską określaną jako „znokautowany”, wyłączony, zerowy lub zinktywowany. W dalszej części pracy dla ułatwienia zastosowano najpopularniejszą nazwę myszy — *apoE-knockout*.

U myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E, w przeciwieństwie do wszystkich innych modeli zwierzęcych, miażdżycy rozwija się spontanicznie, bez konieczności stosowania diety wysokocholesterolowej [15]. Dzięki stworzeniu tego właśnie modelu zweryfikowano badania nad patogenezą miażdżycy i umożliwiono między innymi powstanie nowej definicji miażdżycy jako przewlekłego procesu zapalnego [16].

Nowy model miażdżycy umożliwił bowiem stworzenie myszy „podwójnie znokautowanych”, na których badano wpływ odpowiedzi zapalnej na rozwój miażdżycy. Stwierdzono, że brak tylko jednej cytokiny — interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) zmniejsza akumulację lipidów w blaszkach miażdżycowych aż o 60% [17]. Natomiast u myszy *apoE-knockout* z równoczesnym zespołem ciężkiego złożonego niedoboru odporności (SCID) zredukowano wielkość zmian miażdżycowych o postaci „pasm tłuszczowych” o 73% w porównaniu z wynikiem uzyskanym w grupie kontrolnej. Myszy SCID posiadają bowiem znacznie obniżoną liczbę limfocytów. Okazało się, że ponowny transfer limfocytów T u tych myszy zwiększa wielkość zmian miażdżycowych aż o 164% [18].

Te oraz inne fakty uświadomiły badaczom w sposób jednoznaczny kluczową rolę zapalenia w patogenezie miażdżycy. Dlatego też w 1999 roku Russell Ross ogłosił, że miażdżycy jest chorobą zapalną [19].

Zapalenie występuje jako odpowiedź na czynnik destabilizujący miejscową homeostazę. Czynniki powodującymi aktywację makrofagów w ścianie tętnic poprzez receptor Toll-podobny (TLR) są: utlenione cząsteczki lipoprotein o małej gęstości LDL (oxLDL), białko szoku cieplnego 60 (HSP60) oraz endotoksyny bakteryjne [20].

Pierwszym etapem rozwoju miażdżycy jest dysfunkcja śródbłonna [19]. Dotyczy to przede wszystkim regionów rozgałęzień tętniczych, gdzie przepływ krwi często nie ma charakteru laminarnego. Stąd predylekcja do rozwoju miażdżycy w tych miejscach. Tu nastę-

mulation is increased if serum LDL levels are elevated. Low-density lipoprotein is transported by passive diffusion, and its accumulation in the vascular wall seems to depend on the interaction between apolipoprotein B from the LDL molecule and proteoglycans from the matrix [21].

There is evidence that unchanged LDL is "collected" by the macrophages too slowly to activate their transformation into foam cells. Therefore, it has been suggested that the LDL molecule is "modified" in the vascular wall. The most significant modification is lipid oxidation, resulting in the formation of so-called "minimally oxidized" LDL [22]. The generation of these "aliens" for the body molecules leads to the development of inflammatory response [23, 24].

Before the "minimally oxidized" LDL has been phagocytised by the macrophages, it has to be modified into "highly oxidized" LDL. The scavenger receptors are responsible for the rapid uptake of the modified LDL [25].

During the following phase, dendritic cells "present the antigen" to T lymphocytes. This antigen may be a fragment of oxidized LDL "digested" by the macrophages, HSP60,  $\beta$ 2 glycoprotein I, or fragments of bacterial antigens [26].

The reciprocal action of these cells produces the immunological response of type T helper 1 (cellular) or type T helper 2 (humoral). It is currently believed that the immunological response of Th1 type and its mediators: interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1, interleukin 12, and interleukin-18, accelerate atherosclerosis, whereas the response of Th2 type and its mediators: interleukin 4, interleukin 5, interleukin 10, and interleukin 13, inhibit the development of atherosclerosis [27].

A stable atheromatous plaque is most commonly covered with a somewhat thick fibrous layer, protecting the lipid nucleus from contact with the blood. In an unstable plaque there is a big lipid nucleus with a fairly thin fibrous layer. In atheromatous plaque, changed as described above, the proinflammatory factors produced by T lymphocytes (such as IFN- $\gamma$ ) seem to play a crucial role. They decrease production of the extracellular matrix by smooth muscles and at the same time increase production of the metalloproteinases by macrophages [28].

Therefore, atherosclerosis is a chronic inflammatory disease, in most cases initiated and aggravated by hypercholesterolaemia. Hypercholesterolaemia and inflammation have been described as "partners in crime" [29]. The inflammatory concept of atherosclerosis has been formulated only in recent years. However, it

puje odkładanie się cząsteczek LDL w przestrzeni podśródbłonkowej. Akumulacja LDL jest zwiększona, gdy stężenie LDL w surowicy krwi jest zwiększone. Cząsteczka LDL dyfunduje pasywnie i jej odkładanie się w ścianie naczynia wydaje się wynikać z interakcji pomiędzy apolipoproteina B cząsteczki LDL a proteoglikanami macierzy [21].

Udowodniono, że niezmienione cząsteczki LDL są zbyt wolno „pobierane” przez makrofagi, aby spowodować ich przekształcenie w komórki piankowate. Zaproponowano więc, że cząsteczka LDL zostaje „zmodyfikowana” w ścianie naczynia. Najbardziej znaczącą modyfikacją jest utlenienie (oksydacja) lipidów [22]. W jej wyniku powstaje tak zwana „minimalnie utleniona” cząsteczka LDL. W wyniku powstania tych cząstek jako „obcych” dla organizmu następuje reakcja zapalna [23, 24].

Zanim „minimalnie utleniona” cząsteczka LDL zostanie sfagocytowana przez makrofagi, musi ulec dalszej modyfikacji do „wysocze utlenionej” LDL. Szybki wychwyt tak zmienionych cząstek LDL przez makrofagi zachodzi poprzez receptory zmiatające [25].

Następnym etapem jest „prezentacja antygenów” limfocytom T przez komórki dendrytyczne. Antygenem tym może być fragment „strawionej” przez makrofag, utlenionej lipoproteiny LDL, białko szoku cieplnego 60 (HSP60),  $\beta$ 2 glikoproteina I lub fragmenty antygenów bakteryjnych [26].

W wyniku oddziaływania tych komórek następuje odpowiedź immunologiczna typu *T helper* 1 (komórkowa) lub typu *T helper* 2 (humoralna). Obecnie uważa się, że odpowiedź typu Th1 i jej mediatorzy: IFN- $\gamma$ , czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) interleukina 1, interleukina 12 oraz interleukina 18 działają przyspieszająco na rozwój miażdżycy, podczas gdy odpowiedź typu Th2 i jej mediatorzy: interleukina 4, interleukina 5, interleukina 10 oraz interleukina 13 hamują rozwój miażdżycy [27].

Stabilna blaszka miażdżycowa najczęściej posiada względnie grubą pokrywą włóknistą chroniącą jądro lipidowe przed zetknięciem z krwią. W niestabilnej blaszce obserwuje się duże jądro lipidowe ze względnie cienką pokrywą włóknistą. W obrębie tak zmienionej blaszki czynniki prozapalne produkowane przez limfocyty T (jak IFN- $\gamma$ ) wydają się odgrywać kluczową rolę, z jednej strony zmniejszając produkcję przez mięśniówkę gładką macierzy zewnątrzkomórkowej, z drugiej zaś — zwiększając produkcję metalloproteinaz przez makrofagi [28].

Miażdżycy jest zatem przewlekłą chorobą zapalną, w większości przypadków zapoczątkowaną i rozwijającą pod wpływem hipercholesterolemii. Hipercholesterolemię oraz zapalenie określono jako „wspólników przestępstwa” [29].

is currently an unquestionable achievement of science, which also has specific therapeutic implications [30].

Since inflammation plays an important role in atherogenesis, during recent years it has become apparent that the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway may play an important role in modifying the pathogenesis of atherosclerosis. Enzymes associated with the 5-lipoxygenase pathway are abundantly expressed in the arterial walls of patients afflicted with various lesion stages of atherosclerosis of the aorta and of coronary arteries. These have data raised the possibility that antileukotriene drugs may be an effective treatment regimen in atherosclerosis [31].

Lipoxygenases are enzymes that catalyze stereospecific dehydrogenation and subsequent dioxygenation of polyunsaturated fatty acids with a 1,4-cis-pentadiene structure [32]. Of special interest for atherosclerosis is the arachidonate 5-lipoxygenase, which was originally identified in polymorphonuclear leukocytes [33] but was recently demonstrated to be overexpressed in macrophages, dendritic cells, foam cells, mast cells, and neutrophils within atherosclerotic vessels. This enzyme generates an unstable epoxide intermediate, leukotriene  $A_4$  ( $LTA_4$ ), which is an important precursor of  $LTB_4$ ,  $LTC_4$ , and other cysteinyl leukotrienes. Initial observations, as well as use of drugs affecting 5-lipoxygenase metabolism, were mainly conducted on patients with asthma and other inflammatory diseases [34]. However, the increasing understanding of the role of inflammation in atherosclerosis has brought attention to the potential role of leukotrienes and their metabolism.

In 2002 Mehrabian et al. indicated 5-lipoxygenase as a crucial enzyme, contributing to atherosclerosis susceptibility in mice [31, 35]. This observation drew attention, after a long break [36], to the role of leukotrienes in the pathogenesis of atherosclerotic plaque [37]. Therefore, speculations has arisen that anti-asthmatic drugs could have a beneficial effect on atherogenesis [38].

Indeed, 5-lipoxygenase was recently acknowledged as playing an important role in atherosclerosis in both mouse models and humans [39, 40]. Subsequently, Aiello et al. showed that  $LTB_4$  receptor antagonism reduced monocytic foam cells in mice [41]. Lotzer et al. pointed out that macrophages-derived LTs differentially activate  $cysLT_2$ -Rs via paracrine stimulation and  $cysLT_1$ -Rs via autocrine and paracrine stimulation, during inflammation and atherogenesis [42].

Therefore, a hypothesis has been put forward that leukotriene-inhibiting drugs developed to treat asthma might protect the heart. Numerous potential targets could be useful in the intervention in leukotriene metabolism in atherosclerosis. Interestingly, an 18 kDa mi-

Koncepcja miażdżycy jako zapalenia ukształtowała się dopiero w ostatnich latach, lecz obecnie jej wartość jest niekwestionowana, co wiąże się z określonymi konsekwencjami terapeutycznymi [30].

Ponieważ zapalenie odgrywa znaczącą rolę w aterosogenezie, w ostatnich latach stało się oczywiste, że szlak produktów 5-lipooksygenazy może być istotny w patogenezie miażdżycy. Enzymy związane ze szlakiem 5-lipooksygenazy są licznie ekspresjonowane w ścianie naczyń pacjentów z różnymi stadiami miażdżycy aorty i naczyń wieńcowych. Te dane spowodowały, że zaczęto rozważać zastosowanie leków przeciwleukotriennych jako potencjalnie efektywną terapię miażdżycy [31].

Lipooksygenazy są enzymami katalizującymi stereoswoistą dehydrogenację i następową dioksygenację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o strukturze 1,4-cis-pentadienowej [32]. Szczególnie ważna jest 5-lipooksygenaza (5-LOX) arachidonowa, którą pierwotnie zidentyfikowano w leukocytach wielojądrzastych [33], lecz ostatnio wykazano jej nadekspresję w makrofagach, komórkach dendrytycznych, komórkach piankowatych, mastocytach i neutrofilach w obrębie naczyń z miażdżycą. Ten enzym generuje niestabilny epoksydowy związek przejściowy — leukotrien  $A_4$  ( $LTA_4$ ), który jest ważnym prekursorem  $LTB_4$ ,  $LTC_4$  i innych leukotrienów cysteinylowych. Początkowe obserwacje oraz użycie leków wpływających na 5-lipooksygenazę wiązano głównie z astmą i innymi chorobami zapalnymi [34]. Jednakże wraz z poznaniem roli zapalenia w rozwoju miażdżycy zwrócono uwagę na potencjalną rolę leukotrienów i ich metabolizmu w przebiegu tej choroby.

W 2002 roku Mehrabian i wsp. zidentyfikowali gen dla 5-lipooksygenazy jako główny gen decydujący o podatności na miażdżycę u myszy [31, 35]. Dzięki tej obserwacji podjęto ponownie po długiej przerwie [36] problem roli, jaką odgrywają leukotrieny w patogenezie blaszki miażdżycowej [37]. Zaczęto więc rozważać, czy leki przeciwastmatyczne mogłyby odgrywać pozytywną rolę w aterosogenezie [38].

Wykazano, że zarówno u myszy, jak i u ludzi, 5-lipooksygenaza współuczestniczy w znacznym stopniu w powstawaniu miażdżycy [39, 40]. Aiello i wsp. udowodnili, że blokowanie receptora dla  $LTB_4$  zmniejszało liczbę komórek piankowatych u myszy [41]. Zaś Lotzer i wsp. wykazali, że podczas aterosogenezy leukotrieny pochodzące z makrofagów aktywują receptory dla leukotrienów cysteinylowych typu 2 poprzez stymulację parakrynną, a typu 1 poprzez stymulację autokrynną i parakrynną [42].

Autorzy niniejszej pracy na podstawie własnych badań wysunęli hipotezę, że leki hamujące powstawanie i działanie leukotrienów mogłyby chronić przed roz-

osomal protein termed FLAP (5-lipoxygenase-activating protein) was found to be critical for the regulation of 5-LO activity and biosynthesis of leukotrienes within certain compartments of the plasma membrane. The role of FLAP in atherosclerosis was additionally confirmed in humans by Helgadottir et al. [43], who showed that genetic polymorphisms of FLAP are associated with myocardial infarction and stroke by increasing leukotriene production and inflammation in the arterial wall.

5-LO is abundantly expressed in atherosclerotic lesions of apoE- and LDLR-deficient mice, appearing to co-localize with a subset of macrophages but not with all macrophage-staining regions [31]. Indeed, we have found that the inhibition of FLAP by MK-886 or BAY  $\times$  1005 is able to prevent significantly the development of atherosclerosis in gene-targeted apoE/LDLR-double knockout mice. Moreover, in our studies we have shown that cysteinyl leukotriene receptor blocker montelukast decreases atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice [30, 44, 45]. Our results concerning MK-886 were soon confirmed by Bäck et al. on their model of transgenic apoE<sup>-/-</sup> mice with a dominant-negative transforming growth factor  $\beta$  type II receptor (dnTGFBRII) on T lymphocytes, which displays aggravated atherosclerosis [46].

We used female apoE/LDLR-DKO mice on a mixed C57BL/6j  $\times$  129/Svj background. At the age of 8 weeks, the mice were put on the Western diet (consisting of 21% fat by weight, 0.15% cholesterol by weight) for 4 months. All experimental groups (in each group  $n = 10$ ) received the same diet, mixed with MK-886 at a dose 30 mg per kg of body weight per day, BAY  $\times$  1005 at a dose 18.75 mg per kg of body weight per day, as well as montelukast at a dose 1.25 mg per kg of body weight per day.

At the age of 24 weeks, these mice were sacrificed and the plasma, hearts, and aortas were collected. Total cholesterol and triglycerides levels and cholesterol lipoprotein profile by FPLC were estimated, and using "en face" and "cross-section" methods, atherosclerotic lesions in the whole aorta and in the root of the aorta were measured. In addition, compositions of the plaques were estimated, by measuring the number of macrophages and T lymphocytes, as well as smooth muscle cells and collagen contents.

Ten micrometre-thick cryosections were cut from the aortic root using a standardized protocol [47]. Eight adjacent sections were collected at 100- $\mu$ m intervals starting at a 100- $\mu$ m distance from the appearance of the aortic valves. After fixation in 4% paraformaldehyde, sections were stained with haematoxylin and oil red O. Images of the aorta were recorded using a digital

wojem miazdżycy. Istnieje wiele potencjalnych celów, które mogłyby być użyteczne w leukotrienowej farmakoterapii miazdżycy. Jednym z najbardziej istotnych jest mikrosomalne białko o masie 18 kDa aktywujące 5-lipoxygenazę (FLAP). Wykazano, że jest to białko kluczowe dla regulacji aktywności 5-LOX i biosyntezy leukotrienów w obrębie określonych kompartmentów błony cytoplazmatycznej. Rolę FLAP w powstawaniu miazdżycy dodatkowo potwierdzili Helgadottir i wsp. w badaniach obejmujących ludzi [43]. Wykazano w nich, że polimorfizm genetyczny FLAP wiąże się z zawałem serca oraz udarem mózgu poprzez zwiększenie produkcji leukotrienów, a tym samym nasilenie procesu zapalnego w ścianie naczynia tętniczego.

Mehrabian i wsp. wykazali, że 5-LOX jest szeroko rozprzestrzeniona w zmianach miazdżycowych u myszy apoE/LDLR-DKO i jej ekspresja wykazuje współlokalizację z częścią choć nie ze wszystkimi makrofagami blaszki [31]. W badaniach autorów niniejszej pracy stwierdzono, że hamowanie FLAP przez związki MK-886 lub BAY  $\times$  1005 znacząco zmniejsza rozwój miazdżycy u zmienionych genetycznie myszy. Wykazano także, że blokowanie receptora dla leukotrienów cysteinylowych poprzez montelukast także powoduje zmniejszenie nasilenia miazdżycy u myszy apoE/LDLR-double knockout [30, 44, 45]. Wyniki dotyczące MK-886 potwierdzili Bäck i wsp. w badaniach nad własnym modelem, w którym wykorzystano transgeniczne myszy apoE-knockout z równoczesnym brakiem receptora dla transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  na limfocytach T, u których występuje bardzo nasiloną miazdżycę [46].

Autorzy niniejszej pracy w badaniach wykorzystali samice myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E i receptora LDL o mieszanym podłożu genetycznym C57BL/6j  $\times$  129/Svj. Myszom wieku 8 tygodni zmieniono dietę na typ „Western” (składającą się z 21% części wagowych tłuszczu oraz 0,15% części wagowych cholesterolu). U osobników z grupy eksperymentalnej (w każdej  $n = 10$ ) stosowano tę samą dietę zmieszaną z: MK-886 w dawce 30 mg/dzień/kg mc., BAY  $\times$  1005 w dawce 18,75 mg/kg mc. oraz również montelukast w dawce 1,25 mg/kg mc.

Wszystkie myszy w wieku 6 miesięcy uśmiercano: pobrano od nich osocze, serca i wypreparowane aorty. Metodą cieczowej chromatografii kolumnowej średniociśnieniowej zmierzono profil lipoproteinowy cholesterolu w osoczu, zaś metodami *en face* i *cross-section* zaawansowanie miazdżycy w aorcie i sercu. Badano także budowę płytek miazdżycowych, mierząc zawartość mięśniówki gładkiej, kolagenu, makrofagów i limfocytów T.

camera and stored as TIFF files. Total area of the lesion was measured semi-automatically in each slide using AnalySIS FIVE software. For each animal, a mean lesion area was calculated from eight sections, reflecting the cross-section area covered by atherosclerosis.

The aorta from arch to bifurcation was fixed in 4% formaldehyde, opened longitudinally, pinned onto black wax plates, and stained with Sudan IV. Aortic lesion area and total aortic area were calculated using LSM Image Browser software.

The aortas differed in the degree of atherosclerosis between the control group and the experimental groups. Measured by “en face” method, the percentage of Sudan IV-stained surfaces was:  $25.5 \pm 2\%$  in the control group, whereas in the MK-886-treated group it was  $11.16 \pm 0.7\%$ ; in the BAY  $\times$  1005 group it was  $15.16 \pm 1.4\%$ , and in the montelukast group it was  $17.23 \pm 1.8\%$ .

“Cross-section” of the aortic roots revealed the difference in atherosclerotic lesions. Measured in 8 consecutive sections, the mean surfaces  $\pm$  SEM, occupied by oil red-O stained changes were:  $455\,494 \pm 26\,477 \mu\text{m}^2$  in the control group versus  $263\,042 \pm 20\,736 \mu\text{m}^2$  in the MK-886-treated group,  $278\,107 \pm 21\,824 \mu\text{m}^2$  in the BAY  $\times$  1005 group, and  $299\,201 \pm 20\,373 \mu\text{m}^2$  in the montelukast group. All these differences were statistically significant.

Finally, it was shown that all the above drugs may increase plaque stability, by decreasing the number of macrophages and T lymphocytes and by increasing collagen and smooth muscle cells plaque content.

Our data showed that montelukast, the antagonist of cysteinyl leukotrienes receptor, also decreases atherosclerosis in gene-targeted mice, although, to a lesser extent than FLAP inhibitors. This could be due to the fact that FLAP inhibitors act “upstream” of leukotriene cascade, blocking both leukotriene B<sub>4</sub> and cysteinyl leukotrienes production. In contrast, montelukast inhibits the cascade “downstream” by blocking only the effect of cysteinyl leukotrienes and leaving LTB<sub>4</sub> untouched. Currently, the importance of the role of LTB<sub>4</sub> in atherogenesis is undisputable [33, 48–50].

Recently, Colin D. Funk’s group questioned the hypothesis concerning leukotrienes, 5-LO, and their role in atherogenesis in gene-targeted mice, stating that in mouse plaques there is no 5-LO overexpression detectable [51]. However, this still does not exclude the role of leukotrienes in human atherogenesis, since in human plaques there is abundant 5-LO expression [52], which even correlates with symptoms of plaque instability. Therefore, further research is still needed in this area, specifically clinical trials.

Skrawki kriostatowe o grubości dziesięciu mikrometrów ( $10 \mu\text{m}$ ) cięto z korzenia aorty zgodnie ze wystandardyzowanym protokołem [47]. Osiem sąsiednich skrawków gromadzono w odstępach  $100 \mu\text{m}$ , zaczynając od odległości  $100 \mu\text{m}$  od pojawienia się płatek zastawki aorty. Po utrwaleniu w 4-procentowym roztworze paraformaldehydu, skrawki barwiono hematoksyliną i czerwieni oleistą O. Obrazy skrawków gromadzono przy użyciu aparatu cyfrowego i przechowywano jako pliki TIFF. Całkowitą powierzchnię blaszki miażdżycowej mierzono półautomatycznie przy użyciu programu AnalySIS FIVE. Dla każdej myszy średnią wielkość powierzchni miażdżycy obliczano z 8 skrawków, co w najdokładniejszy sposób odzwierciedlało powierzchnię przekroju poprzecznego (metoda *cross-section*).

Aorty od łuku do rozdwojenia biodrowego utrwalano w 4-procentowym roztworze formaldehydu, otwierano nożyczkami wzdłużnie, przypinano do płytek woskowych i barwiono Sudanem IV. Powierzchnię zmian miażdżycowych i całkowitą powierzchnię aorty obliczano przy użyciu programu LSM Image Browser (metoda *en face*).

Aorty myszy z grupy kontrolnej i myszy, którym podawano leki, różniły się pod względem zaawansowania miażdżycy. Mierzony metodą *en face* odsetek całkowitej powierzchni aorty zajętej przez barwione Sudanem IV zmiany wynosił w grupie kontrolnej  $25,15 \pm 2,9\%$ , w grupie, w której podawano MK-886 —  $11,16 \pm 0,7\%$ , w grupie otrzymującej BAY  $\times$  1005  $15,16 \pm 1,4\%$ , a w grupie, gdzie stosowano montelukast —  $17,23 \pm 1,8\%$ .

Badanie korzeni aorty metodą *cross-section* ujawniło również różnicę w powierzchni zmian miażdżycowych. Liczona w 8 kolejnych skrawkach średnia zmian  $\pm$  SEM zajętych przez barwione ORO wynosiła  $455\,494 \pm 26\,477 \mu\text{m}^2$  w grupie kontrolnej,  $263\,042 \pm 20\,736 \mu\text{m}^2$  w grupie, w której podawano MK-886,  $278\,107 \pm 21\,824 \mu\text{m}^2$  u myszy otrzymujących BAY  $\times$  1005,  $299\,201 \pm 20\,373 \mu\text{m}^2$  w grupie, w której stosowano montelukast. Wszystkie te różnice były znamienne statystycznie.

Wykazano także, że wszystkie badane leki zwiększają stabilność płytki miażdżycowej, zmniejszając w niej zawartość makrofagów i limfocytów T, a zwiększając zawartość kolagenu i komórek mięśni gładkich.

Autorzy niniejszej pracy w swoich badaniach wykazali, że montelukast (antagonista receptorów dla leukotrienów cysteinylowych) również działa przeciwmiażdżycowo u myszy eksperymentalnych, jednakże w mniejszym stopniu niż inhibitory FLAP. Prawdopodobnie jest to spowodowane faktem, że inhibitory FLAP działają „wysoko” w łańcuchu leukotrienowym, bloku-

## References

1. Ross R, Glomset JA (1976) The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med*, 295: 369–377.
2. Ross R, Glomset J, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*, 86: 675–684.
3. Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E (1984) The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation*, 70: 77–82.
4. Ross R (1986) The pathogenesis of atherosclerosis — an update. *New Engl J Med*, 314: 488–500.
5. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 6: 131–138.
6. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK (1995) T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 3893–3897.
7. Thom DH, Wang SP, Grayston JT et al (1991) *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*, 11: 547–551.
8. Hendrix MG, Salimans MM, van Boven CP, Bruggeman CA (1990) High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol*, 136: 23–28.
9. Paigen B, Plump AS, Rubin EM (1994) The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol*, 5: 258–264.
10. Moghadasian MH (2002) Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci*, 70: 855–865.
11. Jawień J, Nastalek P, Korbut R (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*, 55: 503–517.
12. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N (1992) Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 4471–4475.
13. Plump AS, Smith JD, Hayek T et al (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71: 343–353.
14. Meir KS, Leitersdorf E (2004) Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. A decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 1006–1014.
15. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ (2002) Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*, 91: 281–291.
16. Savla U (2002) At the heart of atherosclerosis. *Nature Med*, 8: 1209.
17. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C (1997) IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*, 99: 2752–2761.
18. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK (2000) Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*, 102: 2919–2922.
19. Ross R (1999) Atherosclerosis — an inflammatory disease. *New Eng J Med*, 340: 115–126.
20. Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *New Engl J Med*, 352: 1685–1695.
21. Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL (1998) Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*, 101: 2658–2664.
22. Gaut JP, Heinecke JW (2001) Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 11: 103–112.
23. Fredrikson GN, Soderberg I, Lindholm M et al (2003) Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 879–884.
24. Pentikäinen MO, Öörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT (2000) Modified LDL-trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med*, 247: 359–370.
25. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M et al (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386: 292–296.
26. Hansson GK (2001) Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1876–1890.
27. Daugherty A, Rateri DL (2002) T lymphocytes in atherosclerosis. The Yin-Yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ Res*, 90: 1039–1040.
28. Shishehbor MH, Bhatt DL (2004) Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 6: 131–139.
29. Steinberg D (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med*, 8: 1211–1217.
30. Jawień J, Gajda M, Rudling M et al (2006) Inhibition of five lipoxygenase activating protein (FLAP) by MK-886 decreases atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *Eur J Clin Invest*, 36: 141–146.
31. Mehrabian M, Allayee H, Wong J et al (2002) Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res*, 91: 120–126.



32. Haeggstrom JZ, Samuelsson B. Overview of the 5-lipoxygenase pathway (1998) In: Drazen JM, Dahlen SE, Lee TH (eds) Five-lipoxygenase products in asthma. Twon, Marcel Dekker Inc: 1–6.
33. Borgeat P, Samuelsson B (1979) Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 3213–3217.
34. De Caterina R, Zampolli A (2004) From asthma to atherosclerosis — 5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. *N Engl J Med*, 350: 4–7.
35. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K et al (2003) Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 1238–1243.
36. De Caterina R, Mazzone A, Giannesi D et al (1988) Leukotriene B4 production in human atherosclerotic plaques. *Biomed Biochim Acta*, 47: S182–185.
37. Radmark O (2003) 5-lipoxygenase-derived leukotrienes. Mediators also of atherosclerotic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1140–1142.
38. Spanbroek R, Habenicht AJ (2003) The potential role of antileukotriene drugs in atherosclerosis. *Drug News Perspect*, 16: 485–489.
39. Mehrabian M, Allayee H (2003) 5-lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 14: 447–457.
40. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM et al (2004) Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*, 350: 29–37.
41. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S et al (2002) Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 443–449.
42. Lotzer K, Spanbroek R, Hildner M et al (2003) Differential leukotriene receptor expression and calcium responses in endothelial cells and macrophages indicate 5-lipoxygenase-dependent circuits of inflammation and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: e32–e36.
43. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G et al (2004) The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*, 36: 233–239.
44. Jawień J, Gajda M, Olszanecki R, Korbut R. BAY × 1005 attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR — double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2007, 58: 583–538.
45. Jawień J, Gajda M, Wolkow PP et al (2008) The effect of montelukast on atherogenesis in apoE/LDLR — double knockout mice. *J Physiol Pharmacol*, 59: 633–639.
46. Bäck M, Sultan A, Ovchinnikova O, Hansson GK (2007) 5-Lipoxygenase-Activating Protein. A potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ Res*, 100: 946–949.
47. Elhage R, Jawień J, Rudling M et al (2003) Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*, 59: 234–240.
48. Subbarao K, Jala VR, Mathis S et al (2004) Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 369–375.
49. Heller EA, Liu E, Tager AM et al (2005) Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation*, 112: 578–586.
50. Bäck M, Bu DX, Bränström R et al (2005) Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 17501–17506.
51. Cao YR, Amand TS, Grabner R et al (2008) Genetic and pharmacological inhibition of the 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in atherosclerotic lesion development in apoE deficient mice. *Atherosclerosis*, 15 (epub ahead of print).
52. Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE et al (2006) Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 8161–8166.