

ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Συμμετοχή του ανταλλάκτη Na^+/H^+ στο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει η AngII σε μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων*

Λ. Ριζέκ¹

Ξ. Σάιλερ¹

Μ. Σαρηγιάννη³

Γ. Κολιάκος²

Μ. Καλογιάννη¹

Κ. Παλέτας³

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αυξημένη δραστηριότητα του ιοντοανταλλάκτη Na^+/H^+ (NHE) έχει σχετισθεί με την παθογένεση διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της υπέρτασης, του διαβήτη και των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η αγγειοτενσίνη II (AngII) είναι ένα ολιγοπεπτίδιο που σχετίζεται με την αγγειοσύσπαση και την αυξημένη πίεση του αίματος. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ανιχνευθεί το σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει η AngII και οδηγεί στην παραγωγή των ROS σε μονοκύτταρα φυσιολογικών και υπερτασικών ατόμων, καθώς και να βρεθεί ο ρόλος της AngII στις ιδιότητες της αθηρωμάτωσης. Τα μονοκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της μελέτης αυτής έχουν απομονωθεί από συνολικά 17 δείγματα αίματος υπερτασικών ατόμων οι οποίοι δεν έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή, καθώς και φυσιολογικών ατόμων. Στα απομονωμένα μονοκύτταρα μετρήθηκε το ενδοκυτταρικό pH (pHi) μετά από επίδραση AngII και AngII μαζί με αναστολείς και ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα των ανιόντων υπεροξειδίου (O_2^-) με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας Dihydroethidium. Επίσης, μετρήθηκε η επίδραση της AngII στο βαθμό προσκόλλησης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη, καθώς και στην ικανότητα μετανάστευσης των μονοκυττάρων μέσω υποστρώματος λαμινίνης. Η προσθήκη AngII είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντικά υψηλότερη αύξηση του pHi σε μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων ($p < 0,001$), σε σχέση με τα υγιή άτομα ($p = 0,0164$). Η επίδραση των αναστολέων captopril, GF-109203X, Diphenylethiodonium chloride (DPI) και L-name, μαζί με AngII, προκάλεσε μείωση του pHi στα επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου. Τα μονοκύτταρα, τόσο των φυσιολογικών όσο των υπερτασικών ατόμων, μετά την επίδραση της AngII, παρουσίασαν σημαντική αύξηση της παραγωγής O_2^- , σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, ενώ τα μονοκύτταρα των υπερτασικών παρουσίασαν ακόμη υψηλότερη παραγωγή O_2^- σε σχέση με τα αυτά των φυσιολογικών. Επίσης, η προσθήκη AngII προκάλεσε υψηλότερη αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων κυττάρων στη λαμινίνη, καθώς και υψηλότερη αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των μονοκυττάρων που προέρχονται από υπερτασικά άτομα σε σχέση με τα υγιή. Η χρήση των αναστολέων ανέτρεψε τα αποτελέσματα της επίδρασης της AngII. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού pH που προκάλεσε η AngII πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση του NHE των μονοκυττάρων, μέσω ενός μονοπατιού στο οποίο συμμετέχουν η πρωτεϊνική κινά-

¹ Τμήμα Βιολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας, ΑΠΘ,

² Τμήμα Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ,

³ Β' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη

* Το σχετικό με την ανασκόπηση ερευνητικό πρωτόκολλο ενισχύεται οικονομικά από την Ελληνική Αντιυπερτασική Εταιρεία βάσει απόφασης του Δ.Σ. στις 10-4-2006.

ση C (PKC), η NADPH οξειδάση, καθώς και η NO συνθετάση. Η παραγωγή O_2^- που παρατηρήθηκε μετά από την επίδραση της AngII σε μονοκύτταρα υπερτασικών και φυσιολογικών ατόμων φαίνεται να ακολουθεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι με τη συμμετοχή των NHE, PKC, NADPH οξειδάσης και NO συνθετάσης. Τέλος, η προσκόλληση και η μετανάστευση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη βρέθηκε ότι ακολουθεί το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι με αυτό που παρατηρήθηκε ότι ακολουθούν τα O_2^- μετά την επίδραση AngII.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σταθερότητα του ενδοκυτταρικού pH (pHi) σε ένα ρυθμιζόμενο φυσιολογικό εύρος παίζει κρίσιμο ρόλο για τη σωστή λειτουργία του κυττάρου. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα των ενδοκυτταρικών ενζύμων, η αλληλεπίδραση των στοιχείων του κυτταροσκελετού, ο ρυθμός αύξησης και διαφοροποίησης του κυττάρου, εξαρτώνται από το pHi. Τα κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν το ενδοκυτταρικό pH μέσω αρκετών συστημάτων μεταφοράς H^+ . Το πιο γνωστό από αυτά αποτελεί η *οικογένεια των ιοντοανταλλακτών Na^+/H^+ (NHE)*, που ανταλλάσσει Na^+ για H^+ ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, ρυθμίζοντας έτσι το pHi.

Η λειτουργία, όμως, του NHE, δεν περιορίζεται μόνο στη ρύθμιση του pHi, αλλά φαίνεται ότι παίζει σπουδαίο ρόλο στην ομοιοστάση του κυτταρικού όγκου, καθώς και στο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται από ορμόνες και βαρέα μέταλλα¹. Ακόμη, ο NHE παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης, της επιβίωσης και της απόπτωσης². Επίσης, ο NHE συμμετέχει στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Ο NHE ως μεμβρανική πρωτεΐνη αποτελεί θέση πάνω στην οποία «αγκιστρώνονται» πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού². Μέσω της επίδρασης του στην ομοιοστάση του pHi και του κυτταρικού όγκου, καθώς και στον κυτταροσκελετό, ο NHE ρυθμίζει ένα αριθμό από κυτταρικές συμπεριφορές, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής προσκόλλησης, της μετανάστευσης, της έκφρασης του CD36, της σύνθεσης DNA και της απόπτωσης.

Η οικογένεια των ιοντοανταλλακτών NHE αποτελείται από 9 ισομορφές (NHE-1-NHE-9), οι οποίες διαφέρουν ως προς τη θέση, την ευαισθησία τους σε αναστολείς, καθώς και τη μεταγραφική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση, συμμετέχοντας έτσι σε διαφορετικές φυσιολογικές διεργασίες³.

Στη γένεση της αθηρωμάτωσης εμπλέκονται διάφοροι κυτταρικοί τύποι: ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, μονοκύτταρα, ου-

δετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια. Συγκεκριμένα, τα μονοκύτταρα φαίνεται να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην πρόκληση της αθηρωμάτωσης. Σήμερα, η αθηρωματική πλάκα θεωρείται ως το αποτέλεσμα μιας χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας, η οποία αρχίζει να εκδηλώνεται μετά από ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, από διάφορους παράγοντες, σε συγκεκριμένη περιοχή του αγγείου.

Ο όρος *δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS)* αναφέρεται στις ενώσεις που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου⁴. Συγκεκριμένα, στις ROS περιλαμβάνονται μόρια όπως H_2O_2 , ιόντα OCl^- , ONO_2^- , OH^- , O_2^- . Επίσης, στις δραστικές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνονται το μονήρες οξυγόνο (1O_2) και το όζον (O_3), επειδή μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι ROS παράγονται ως αποτέλεσμα φυσιολογικών μεταβολικών διαδικασιών του κυττάρου. Έτσι, μπορούν να δημιουργηθούν μέσω της αερόβιας αναπνευστικής αλυσίδας, μέσω της φαγοκυττάρωσης, μέσω της διάσπασης λιπαρών οξέων και μεμβρανικών δομών, μέσω της δράσης του κυτοχρώματος P450 που δρα ενάντια σε χημικά προϊόντα ή μέσω της ενεργοποίησης της οξειδάσης NAD(P)H⁵⁻⁹. Οι ROS παίζουν σπουδαίο ρόλο στη σηματοδότηση του κυττάρου. Όμως, σε περιπτώσεις περιβαλλοντικού στρες τα επίπεδα των ROS μπορεί να αυξηθούν δραματικά, με αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρής βλάβης στις κυτταρικές δομές. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό με τον όρο *οξειδωτικό στρες*. Οι ROS είναι ικανές να προκαλέσουν βλάβη στο DNA, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Τα κύτταρα, φυσιολογικά, είναι ικανά να υπερασπιστούν τους εαυτούς τους εναντίον της βλάβης που μπορεί να προκαλέσουν οι ROS, μέσω ενζύμων όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση.

Η αγγειοτενσίνη II είναι ένα σημαντικό πεπτιδίο του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, που έχει ορισμένες πολύ σημαντικές λειτουργίες, όπως είναι: 1) η διέγερση της έκκρισης αλδοστερόνης από τη φλοιώδη μούρα των επινεφριδίων, 2) η συστολή των αρτηριδίων και η αύξηση της πίεσης του αίματος, 3) η διέγερση της έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH) και 4) η αύξηση της επαναρρόφησης NaCl.

Στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν να ανι-

χνευθεί το σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει η AngII και οδηγεί στην παραγωγή των ROS σε μονοκύτταρα φυσιολογικών και υπερτασικών ατόμων, καθώς και να ερευνηθεί ο ρόλος της AngII στις ιδιότητες της αθηρωμάτωσης, προσκόλληση και μετανάστευση.

ΑΤΟΜΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Πληθυσμός της μελέτης

Τα μονοκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της μελέτης αυτής έχουν απομονωθεί από συνολικά 17 δείγματα αίματος νεοδιαγνωσμένων υπερτασικών ατόμων, οι οποίοι δεν έχουν λάβει ακόμη φαρμακευτική αγωγή. Οι 12 από αυτούς τους ασθενείς ήταν υπέρβαροι (Πίν. 1).

Εργαστηριακές μέθοδοι

Απομόνωση μονοκυττάρων από ολικό αίμα με τη μέθοδο διπλής πυκνότητας (Double Density method)

Η διαδικασία της απομόνωσης των μονοκυττάρων βασίστηκε στη μέθοδο των Seager-Danciger et al¹⁰, που αφορά στην απομόνωση μονοκυττάρων από μεγάλη ποσότητα ολικού αίματος (300-360 ml). Εδώ περιγράφεται η διαδικασία απομόνωσης μονοκυττάρων από 30 ml ολικού αίματος, η οποία διεξάγεται κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες.

Συγκεκριμένα, 30 ml αίματος τοποθετούνται σε ένα σωλήνα και προστίθεται PBS IX (PBS: Pho-

sphate Buffered Saline). Στη συνέχεια γίνεται επιστοίβαξη με Ficoll-Paque Plus και φυγοκέντρηση, με αποτέλεσμα την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των αιμοπεταλίων και επιστοίβαξη με 46% iso-osmotic Percoll για το διαχωρισμό των μονοκυττάρων από τα υπόλοιπα λευκά αιμοσφαίρια. Τέλος, φυγοκεντρείται και διαλύεται το ίζημα σε κατάλληλη ποσότητα παγωμένου μέσου, ανάλογα με τον αριθμό των μονοκυττάρων και των δειγμάτων που πρέπει να αποθηκευτούν. Τα δείγματα τοποθετούνται σε δοχείο με ισοπροπυλική αλκοόλη, στους -70°C για 3 ώρες, και στη συνέχεια μεταφέρονται σε υγρό άζωτο, όπου αποθηκεύονται μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Μέτρηση του ενδοκυτταρικού pH των μονοκυττάρων μετά από επίδραση της αγγειοτενσίνης II στη λειτουργία του NHE-1

Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στη μέθοδο των Incerpi et al¹¹. Τα μονοκύτταρα διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,3 που περιέχει Hepes, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, γλυκόζη και στη συνέχεια προστίθεται η φθορίζουσα ουσία BCECF-AM (10μM). Τα μονοκύτταρα αφήνονται στους 37°C στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Μετά την επώαση ακολουθούν 4 πλύσεις των κυττάρων με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, οι οποίες γίνονται για την απομάκρυνση από το διάλυμα της φθορίζουσας ουσίας BCECF-AM που δεν εισήλθε στα κύτταρα.

Πίνακας 1. Στοιχεία των ασθενών

A/A	Φύλο	Ηλικία	Βάρος	Ύψος	ΑΠ	Χοληστερίνη	Τριγλυκερίδια	HDL	LDL
1		63	73	1.6	140/69	223	117	58	142
2	Θ	53	79	1.6	143/95	255	132	51	167
3	Θ	70	82	1.53	139/78	244	98	70	155
4	Θ	62	90	1.58	159/98	220	126	52	139
5	Θ	52	82	1.6	142/95	196	122	50	121
6	Θ	54	75	1.57	153/95	303	86	75	211
7	Θ	59	74	1.56	136/93	229	78	65	152
8	Θ	58	71	1.55	135/78	266	185	49	180
9	A	37	105	1.7	144/93	197	48	52	135
10	Θ	59	63	1.5	145/81	281	76	75	191
11	Θ	56	78	1.69	131/79	214	119	46	140
12	Θ	50	95	1.68	137/93	201	95	64	118
13	Θ	51	71	1.63	158/95	197	70	37	146
14	Θ	42	94	1.7	154/103	233	109	44	167
15	Θ	52	116	1.5	141/91	229	212	45	142
16	Θ	58	83	1.7	157/92	238	75	69	154
17	A	60	91	1.75	156/93	234	144	43	150

Μετά την τελευταία πλύση προστίθεται τόση ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος pH 7,3 (το ίδιο που αναφέρουμε πιο πάνω) όσο είναι τα δείγματά μας και τα μονοκύτταρα μοιράζονται σε σωλήνες. Στους 3 σωλήνες της πρότυπης καμπύλης προστίθενται τα ρυθμιστικά διαλύματα pH 6,7, 7,0 και 7,3, αντίστοιχα, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,3 που περιέχει NaCl. Στη συνέχεια προστίθεται νιγερισίνη (13 μM) στους σωλήνες της πρότυπης καμπύλης και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση μετριέται ο φθορισμός των δειγμάτων της πρότυπης καμπύλης στο φασματοφθορισμόμετρο (Shimadzu RF-5000) (EX1 495 nm, EX2 440 nm και EM 530 nm). Στα υπόλοιπα δείγματα προστίθενται οι ουσίες ιωδοξικό νάτριο, DIDS, μεθαζολαμίδη, καθώς και οι αντίστοιχοι αναστολείς, και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 37°C. Μετά την επώαση με τους αναστολείς προστίθεται η AngII και τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C. Τέλος, γίνεται μέτρηση του φθορισμού των δειγμάτων.

Μέτρηση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με τη χρήση της ουσίας Dihydroethidium

Σύμφωνα με τη μέθοδο των Haugen et al¹², τα επίπεδα των ROS ανιχνεύονται ενδοκυτταρικά, με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας dihydroethidium, που ανιχνεύει τα ανιόντα υπεροξειδίου (O_2^-). Κατάλληλη ποσότητα μονοκυττάρων (περίπου 10^6 κύτταρα / ml) αναδιαλύεται σε PBS και επωάζεται με dihydroethidium (25 μM) για 20 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, ακολουθούν 2 πλύσεις με PBS για την απομάκρυνση της περίσσειας της φθορίζουσας ουσίας και τέλος τα κύτταρα αναδιαλύονται με PBS.

Ο φθορισμός μετριέται σε πλάκα ELISA με τη χρήση του φθορισμομέτρου LS55 (PerkinElmer) (excitation wavelength 392 nm και emission wavelength 410 nm για τη φθορίζουσα dihydroethidium).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τοις εκατό (%) των κυττάρων ελέγχου.

Προσκόλληση μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης

Μετά από χρήση αγγειοτενσίνης και αγγειοτενσίνης με αναστολείς

Η μέτρηση του βαθμού προσκόλλησης των μο-

νοκυττάρων στη λαμινίνη γίνεται μετά από λύση των προσκολλημένων κυττάρων και μέτρηση της δραστηριότητας της μυελοπεροξειδάσης (MPO) του κυτταρολύματος φασματοφωτομετρικά σε Elisa reader. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στη μέθοδο των Verdegaal et al¹³.

Περίπου 50 μl λαμινίνης (37 $\mu\text{g}/\text{ml}$), που έχει υποστεί διαπίδυση, τοποθετούνται σε πηγαδάκια (96 well polystyrene plate) και η πλάκα αφήνεται ακάλυπτη να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 100 μl μονοκυττάρων ($10^6/\text{ml}$) σε IMDM πλήρες. Επιπρόσθετα, τοποθετούνται 10^5 μονοκύτταρα σε 2 erpendorf, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια ως κύτταρα ελέγχου (100% MPO). Τα μονοκύτταρα επωάζονται με τους κατάλληλους αναστολείς για 15 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια με την AngII για 30 λεπτά στους 37°C. Τα μη προσκολλημένα κύτταρα απομακρύνονται με πλύση με PBS 1X. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης σε κάθε πηγαδάκι και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά για τη λύση των κυττάρων. Τέλος, προστίθεται στα πηγαδάκια 0,2 mg/ml Dianisidinedihydrochloride σε PBS pH 6 με 4mM H_2O_2 30% και η πλάκα επωάζεται για 15 λεπτά με ελαφριά ανάδευση. Μετράμε τη δραστηριότητα της μυελοπεροξειδάσης (MPO) του κυτταρολύματος φασματομετρικά στα 405 nm σε φωτόμετρο Elisa.

Μετανάστευση μονοκυττάρων μέσω λαμινίνης

Η μέτρηση της ικανότητας μετανάστευσης των μονοκυττάρων μέσω υποστρώματος λαμινίνης γίνεται μετά από μονιμοποίηση και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε φωτόμετρο Elisa των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στις μεθόδους των Haller et al¹⁴ και Duckworth¹⁵.

Φίλτρα διαμέτρου 6,5 mm με πόρους 5 mm (Transwell culture inserts) καλύπτονται το καθένα με 150 μl λαμινίνης (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) που έχει υποστεί διαπίδυση και η πλάκα αφήνεται στους 4°C για 12 ώρες. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με αναρρόφηση και προστίθεται 0,5% BSA. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε κάθε φίλτρο 250 μl μονοκυττάρων σε RPMI 1640 χωρίς FCS, ενώ κάτω από τα φίλτρα προστίθενται 500 μl RPMI 1640 10% FCS. Μετά προστίθενται οι αναστολείς και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ μετά την προσθήκη της AngII η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά, επί-

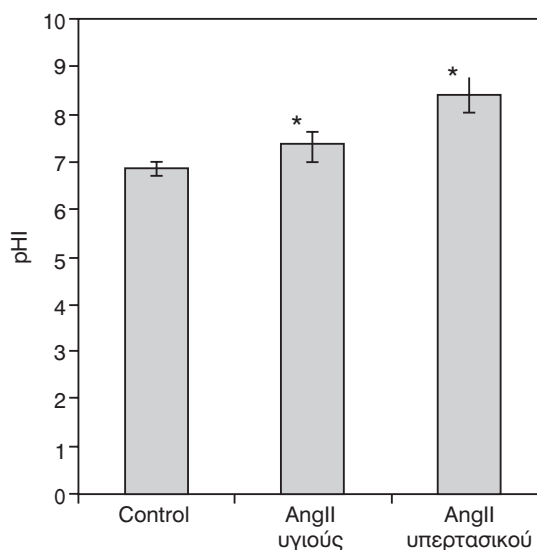
σης στους 37°C. Μετά την επώαση απομακρύνονται προσεκτικά τα κύτταρα που δεν έχουν μεταναστεύσει με cotton tips εμποτισμένα με αποστειρωμένο PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνται με το Hemacolor staining kit. Τοποθετούνται 200 μl οξικού οξέος 10% σε κάθε πηγαδάκι και ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά περίπου. Τέλος, απομακρύνουμε τα φίλτρα και μεταφέρουμε το περιεχόμενο από τα πηγαδάκια σε πλάκα Elisa. Μετρά την οπτική πυκνότητα στα 590 nm.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πακέτο GraphPad InStat 3.00 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (means \pm standard deviation) ανεξάρτητων πειραμάτων. Η σημαντικότητα των διαφορών ανάμεσα σε δύο διαφορετικά δείγματα υπολογίστηκε με το two-tailed test $p < 0,05$ ως επίπεδο σημαντικότητας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

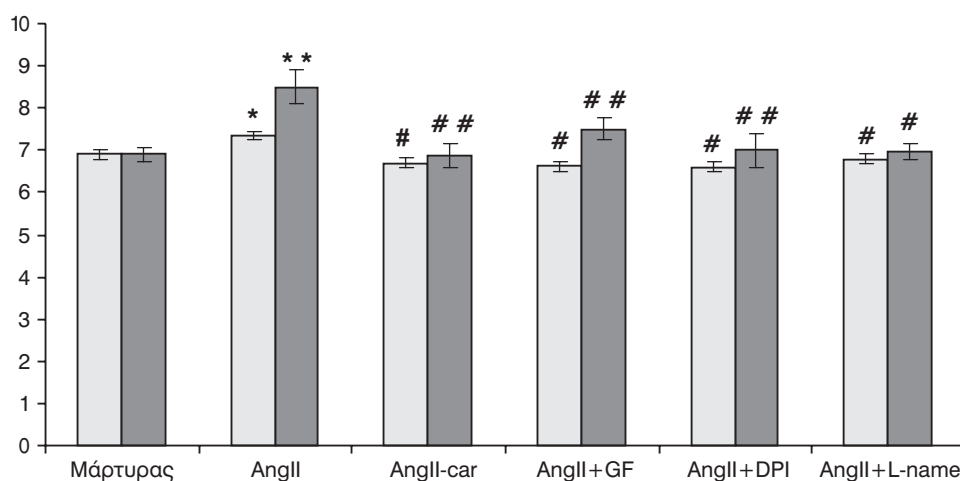
Η προσθήκη αγγειοτενσίνης II συγκέντρωσης 5 ng/ml έχει ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του ενδοκυτταρικού pH των μονοκυττάρων (pHi), τόσο σε υγιή ($p = 0,0164$) όσο και σε υπερτασικά άτομα ($p < 0,001$) (Εικ. 1).



Εικ. 1. Η επίδραση της αγγειοτενσίνης II στο pHi των μονοκυττάρων υγιών και υπερτασικών ατόμων (όπου * : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το μάρτυρα).

Η ενεργοποίηση του ιοντανταλλάκτη NHE-1 επιβεβαιώνεται με χρήση του ειδικού αναστολέα του, cariporide, σε συγκέντρωση 20 nM, όπου παρατηρείται μείωση της τιμής του pHi των μονοκυττάρων ($p < 0,001$) (Εικ. 2).

Για τη μελέτη του μονοπατιού μεταγωγής σήματος της AngII στον NHE-1 των μονοκυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Ο GF, ο οποίος είναι αναστολέ-



Εικ. 2. Η επίδραση της αγγειοτενσίνης II και της αγγειοτενσίνης II μαζί με αναστολείς, στο ενδοκυτταρικό pH των μονοκυττάρων υγιών και υπερτασικών ατόμων (pHi) (όπου άσπρο χρώμα: υγιή άτομα, μαύρο χρώμα: υπερτασικά άτομα, * και **: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το μάρτυρα, # και ##: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα που επωάστηκαν μόνο με αγγειοτενσίνη II).

ας όλων των ισομορφών της PKC, σε συγκέντρωση 200 μM μαζί με AngII προκαλεί σημαντική μείωση στη δραστηριότητα του NHE-1 σε σχέση με την επίδραση μόνο AngII ($p < 0,001$). Απ'αυτό φαίνεται ότι η AngII ενεργοποιεί τον NHE-1 μέσω του μονοπατιού της PKC. Επιπροσθέτως, η προσθήκη της αγγειοτενσίνης II μαζί με DPI (*diphenyleneiodonium*), που είναι αναστολέας της NADPH οξειδάσης, σε συγκέντρωση 200 μM και της αγγειοτενσίνης II μαζί με L-name, που είναι αναστολέας της NO συνθέσεως, σε συγκέντρωση 1mM, προκάλεσε αναστολή της δράσης του NHE1 και επαναφορά του ενδοκυτταρικού pH των μονοκυττάρων σχεδόν στα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου ($p < 0,001$) (Εικ. 2). Οι αποκρίσεις των μονοκυττάρων των υπερτασικών ατόμων ήταν υψηλότερες από αυτές των μονοκυττάρων των φυσιολογικών ατόμων.

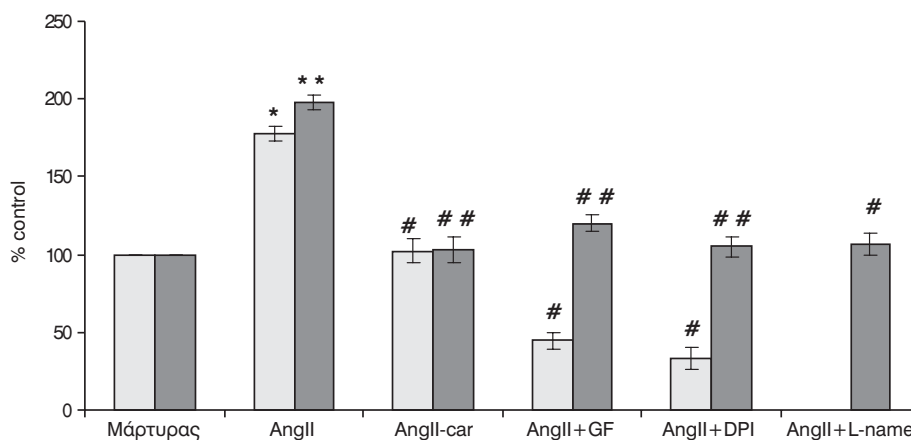
Επίσης, μελετήθηκε η παραγωγή ανιόντων του υπεροξειδίου (O_2^-) στα μονοκύτταρα υγιών και υπερτασικών ατόμων. Οι μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων ROS μελετήθηκαν σε συνδυασμό με τον ιοντοανταλλάκτη NHE-1, την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), καθώς επίσης την NADPH οξειδάση και την NO συνθέταση, λόγω του γεγονότος ότι αυτά συμμετέχουν σε σηματοδοτικούς μηχανισμούς του κυττάρου (Εικ. 3).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, αναφορικά με τον έλεγχο παραγωγής ελευθέρων ριζών O_2^- , τα μονοκύτταρα, τόσο από φυσιολογικά όσο και από υπερτασικά άτομα, μετά από επίδραση αγγειοτενσίνης II, παρουσίασαν σημαντική αύξηση της παραγωγής O_2^- , σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Ακόμη, με τη χρήση του ει-

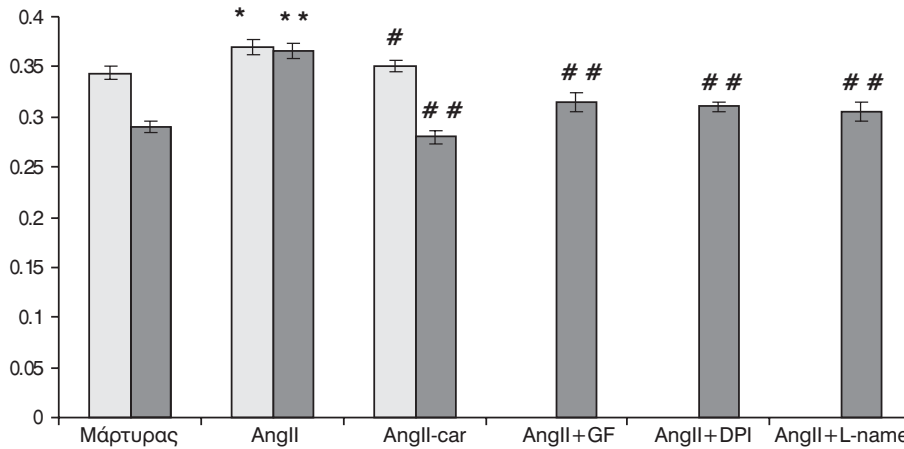
δικού αναστολέα του NHE-1, cariporide, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων O_2^- , γεγονός που δείχνει ότι ο NHE-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της παραγωγής O_2^- μετά από την επίδραση αγγειοτενσίνης II. Επιπλέον, αναστείλαμε σε μονοκύτταρα υγιών και υπερτασικών ατόμων τη δράση της PKC, με χρήση του αναστολέα GF, με αποτέλεσμα σημαντική μείωση των επιπέδων O_2^- . Τέλος, η αναστολή της NADPH οξειδάσης, με τη χρήση του αναστολέα DPI, καθώς και της NO συνθέσεως, με τη χρήση του αναστολέα L-name, έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που πήραμε με τη χρησιμοποίηση του GF. Οι αποκρίσεις των μονοκυττάρων των υπερτασικών ατόμων ήταν υψηλότερες από αυτές των μονοκυττάρων των φυσιολογικών ατόμων (Εικ. 3).

Ο βαθμός προσκόλλησης των μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης προσδιορίζεται με τη μέτρηση της δραστηριότητας της μυελοπεροξειδάσης (MPO) και έμμεσα υπολογίζεται ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων (Εικ. 4).

Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη AngII προκαλεί αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων κυττάρων, ενώ με τη χρήση του αναστολέα της NHE-1, cariporide, μαζί με την AngII, παρατηρήθηκε επαναφορά του αριθμού των προσκολλημένων κυττάρων σχεδόν στα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου, γεγονός που δείχνει ότι η αυξημένη προσκόλληση των μονοκυττάρων επηρεάζεται από τη δραστηριότητα της NHE-1. Επίσης, με την προσθήκη GF, DPI και L-name, μαζί με AngII, σε μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων, παρατηρήθηκε επίσης μείωση του αριθμού των προσκολλημένων κυττάρων, που έφτα-



Εικ. 3. Παραγωγή ανιόντων του υπεροξειδίου (O_2^-) σε μονοκύτταρα υγιών και υπερτασικών ατόμων, μετά από επίδραση AngII και AngII μαζί με αναστολείς (άσπρο χρώμα: υγιή άτομα, μαύρο χρώμα: υπερτασικά άτομα, * και **: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το μάρτυρα, # και ## : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα που επωάστηκαν μόνο με αγγειοτενσίνη II).

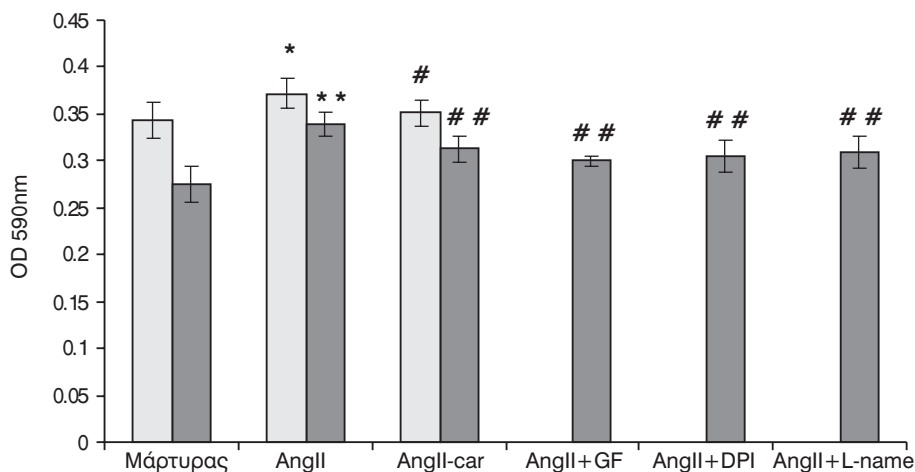


Εικ. 4. Ο αριθμός των προσκολλημένων μονοκυττάρων, που απομονώθηκαν από αίμα υγιών και υπερτασικών ατόμων, μετά από επίδραση αγγειοτενσίνης II και αγγειοτενσίνης II με αναστολείς (άσπρο χρώμα: υγιή άτομα, μαύρο χρώμα: υπερτασικά άτομα, * και **: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το μάρτυρα, # και ##: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα που επωάστηκαν μόνο με αγγειοτενσίνη II).

νε σχεδόν στα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου. Στα υπερτασικά άτομα η προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη που προκλήθηκε από την AngII ήταν 28%, ενώ η αντίστοιχη τιμή στα μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων ήταν 9% (Εικ. 4).

Η προσθήκη AngII έχει επίσης επίδραση στην ικανότητα μετανάστευσης των μονοκυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι μετά τη χρήση AngII η μεταναστευτική ικανότητα των μονοκυττάρων αυξάνεται, ενώ με χρήση cariporide μαζί με AngII παρατηρείται αναστολή του φαινομένου αυτού. Επίσης, με τη χρήση του αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης C

(PKC), GF (μαζί με AngII), παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή του φαινομένου της μετανάστευσης των μονοκυττάρων, σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα στα οποία προστέθηκε μόνο η AngII. Τέλος, έχει παρατηρηθεί αναστολή του φαινομένου και σε δύο άλλες περιπτώσεις: όταν τα μονοκύτταρα επωάστηκαν με AngII μαζί με DPI και μονοκύτταρα που επωάστηκαν με AngII μαζί με L-name. Στα υπερτασικά άτομα η μετανάστευση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη που προκλήθηκε από την AngII ήταν 26%, ενώ η αντίστοιχη τιμή στα μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων ήταν 9% (Εικ. 5).



Εικ. 5. Μετανάστευση των μονοκυττάρων υγιών και υπερτασικών ατόμων μετά από επίδραση αγγειοτενσίνης II και αγγειοτενσίνης II μαζί με αναστολείς (άσπρο χρώμα: υγιή άτομα, μαύρο χρώμα: υπερτασικά άτομα, * και **: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το μάρτυρα, # και ## : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα που επωάστηκαν μόνο με αγγειοτενσίνη II).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, φαίνεται ότι η αγγειοτενσίνη II επιδρά στο ενδοκυτταρικό pH (pHi) των μονοκυττάρων υπερτασικών ατόμων, προκαλώντας σημαντική αύξηση σε αυτό. Επίσης, η μελέτη της επίδρασης της αγγειοτενσίνης II σε μονοκύτταρα υγιών ατόμων έχει δείξει αύξηση του ενδοκυτταρικού pH των μονοκυττάρων, αλλά σε σημαντικά μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων (Εικ. 1). Η αύξηση αυτή του ενδοκυτταρικού pH φαίνεται να οφείλεται στη δράση του ιοντοανταλλάκτη NHE των μονοκυττάρων, αφού στα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς τη γλυκόλυσης, του ανταλλάκτη $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ και της καρβονικής ανυδράσης των μονοκυττάρων, ώστε να αποκλειστεί η συνεισφορά άλλων παραμέτρων στην αλλαγή του pH. Το τελευταίο επιβεβαιώνεται όταν με ταυτόχρονη χρήση του ειδικού αναστολέα του NHE-1, cariporide, μαζί με την αγγειοτενσίνη II, παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης του ενδοκυτταρικού pH. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η αγγειοτενσίνη II προκαλεί ενεργοποίηση του NHE-1.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η επίδραση του GF 109203X, του DPI και του L-name στο pHi των μονοκυττάρων υπερτασικών ατόμων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, βγαίνει το συμπέρασμα ότι η AngII ενεργοποιεί τον NHE-1 μέσω ενός μονοπατιού στο οποίο συμμετέχουν η PKC, η NADPH οξειδάση, καθώς και η NO συνθετάση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) μετά την επίδραση AngII σε μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων και παρατηρήθηκε ότι η αντλία NHE-1 εμπλέκεται στο μηχανισμό της παραγωγής ανιόντων του υπεροξειδίου (O_2^-). Συγκεκριμένα, μετά από επίδραση αγγειοτενσίνης II παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγής ανιόντων του υπεροξειδίου, ενώ μετά από ταυτόχρονη επώαση των μονοκυττάρων με cariporide και AngII, η αύξηση αυτή έχει αντισταλεί. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Sachse et al¹⁶, σύμφωνα με την οποία βρέθηκε ότι η AngII αυξάνει την παραγωγή ROS στα νεφρικά κύτταρα.

Η αύξηση της παραγωγής ROS που παρατηρήθηκε μετά από επίδραση αγγειοτενσίνης II σε μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Το γε-

γονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι ίσως η αυξημένη συγκέντρωση ROS σε υπερτασικά άτομα να είναι ένας από τους παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης στα άτομα αυτά.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε η ικανότητα των μονοκυττάρων υπερτασικών ατόμων να προσκολλώνται σε υπόστρωμα λαμινίνης μετά από επίδραση αγγειοτενσίνης II. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επίδραση της αγγειοτενσίνης II προκαλεί σημαντική αύξηση του αριθμού των μονοκυττάρων υπερτασικών ατόμων που προσκολλώνται σε υπόστρωμα λαμινίνης, σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα υγιή άτομα. Η αύξηση αυτή αναστέλλεται μετά από ταυτόχρονη χρήση του ειδικού αναστολέα του NHE-1, cariporide, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η προσκόλληση των μονοκυττάρων επηρεάζεται από τη δραστηριότητα του NHE-1. Επιπρόσθετα, με ταυτόχρονη χρήση των αναστολέων GF109203X και DPI μαζί με αγγειοτενσίνη II, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του αριθμού των προσκολλημένων μονοκυττάρων στη λαμινίνη. Τέλος, μετά από χρήση του αναστολέα της NO συνθετάσης, L-name, μαζί με αγγειοτενσίνη II, παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων μονοκυττάρων. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η αγγειοτενσίνη II επάγει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη μέσω ενός μονοπατιού στο οποίο συμμετέχουν οι PKC, NADPH οξειδάση, καθώς και η NO συνθετάση. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι τα μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης, καθώς και αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Ίσως η αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης των μονοκυττάρων υπερτασικών ατόμων σε σχέση με τα μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων να οφείλεται σε αυξημένη συγκέντρωση sICAM-1 ή MCP-1¹⁷.

Επίσης, ο ιοντοανταλλάκτης NHE παίζει σπουδαίο ρόλο σε μία ακόμη σημαντική ιδιότητα της αθηρωμάτωσης, την κυτταρική μετανάστευση. Μελετώντας την ικανότητα μετανάστευσης των μονοκυττάρων υπερτασικών ατόμων στη λαμινίνη βρέθηκε ότι η αγγειοτενσίνη II αυξάνει τη μεταναστευτική ικανότητα των μονοκυττάρων μέσω του NHE-1, σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η AngII επάγει τη μετανάστευση των μονοκυττάρων, μέσω κυρίως του AT(1) υποδοχέα (AngII type-1 receptor)¹⁸.

Επιπλέον, για τη μελέτη του μονοπατιού μεταγωγής σήματος που επάγεται από την AngII και οδηγεί στη μετανάστευση των μονοκυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί, ταυτόχρονα με την αγγειοτενσίνη II, ο αναστολέας της PKC, GF109203X, καθώς και οι αναστολείς DPI και L-name. Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η αγγειοτενσίνη II επάγει τη μετανάστευση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη μέσω ενός μονοπατιού στο οποίο συμμετέχουν οι PKC, NADPH οξειδάση και NO συνθετάση. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μια μελέτη, όπου προτείνεται ότι η αγγειοτενσίνη II σε υπερτασικούς ασθενείς αυξάνει την ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων των λείων μυϊκών ινών των αγγείων (VSMC), μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο εμπλέκεται η PKC¹⁹.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η αγγειοτενσίνη II και ο ιοντοανταλλάκτης NHE-1 παίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες των μονοκυττάρων που σχετίζονται με την αθηρωμάτωση. Συγκεκριμένα, ορισμένες συγκεντρώσεις αγγειοτενσίνης II μπορούν να επάγουν την έναρξή της, καθώς ενεργοποιούν ιδιότητες των μονοκυττάρων που σχετίζονται άμεσα με αυτή, όπως είναι η κυτταρική προσκόλληση και η μετανάστευση. Επίσης, με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το μονοπάτι που επάγεται από την αγγειοτενσίνη II είναι παρόμοιο σε φυσιολογικά και υπερτασικά άτομα. Όμως η ενεργοποίηση του NHE-1 και η ικανότητα προσκόλλησης και μετανάστευσης, καθώς και η παραγωγή ROS είναι σημαντικά υψηλότερα σε μονοκύτταρα υπερτασικών ατόμων σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα.

SUMMARY

Rizeq L, Sailer X, Sarrigianni M, Koliakos G, Kaloyianni M, Paletas K. Angiotensin II-induced NHE-1 activation of signal transduction pathway in monocytes of hypertensive patients. *Arterial Hypertension* 2008; 17: 153-162.

Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) overactivity is strongly implicated in the pathogenesis of various diseases, including hypertension, diabetes mellitus and cardiovascular diseases. Angiotensin II (AngII) is an oligopeptide that plays a critical role in vasoconstriction and arterial hypertension. Aim of the study was to investigate the intracellular signal transduction of AngII which activates ROS production in monocytes of normotensive and hypertensive subjects. It was also

investigated the potential role of AngII in atherosclerosis. Monocytes were isolated from 17 newly diagnosed hypertensive patients and from normotensive subjects. Intracellular pH (pHi) and superoxide (O₂⁻) level of isolated monocytes were assayed pre- and post in vitro stimulation with AngII and with both AngII and signalling inhibitors. Furthermore, it was assessed the effect of AngII in monocyte attachment to laminin and in monocyte migration through laminin. Treatment of monocytes with AngII caused a greater elevation of pHi in the monocytes of hypertensive patients (p<0,001) compared to the monocytes of normotensive subjects (p=0,0164). The addition of cariporide, GF-109203X, Diphenyleiiodonium chloride (DPI) και L-name, with AngII, resulted in decrease of pHi to the level of control samples. AngII increased O₂⁻ production in the monocytes of both hypertensive and normotensive subjects but the increase was more prominent in the group of hypertensive patients. Incubation with AngII resulted also in enhanced monocyte attachment to laminin and enhanced monocyte migration through laminin in hypertensive patients compared to normotensive subjects. Concurrent incubation with signaling inhibitors inhibited the phenomenon in all groups. Our data suggest that AngII elevates intracellular pH by activation of NHE of monocytes, through the signaling molecules protein kinase C (PKC), NADPH oxidase and NO synthase. It is also supported that the enhancing effect of AngII on O₂⁻ production is mediated by a signaling transduction that includes NHE, PKC, NADPH oxidase and NO synthase. Finally, monocyte migration and attachment to laminin seems to be mediated by the same signaling transduction.

BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

1. *Cala PM*. Cell volume regulation by Amphiuma red blood cells. The role of Ca²⁺ as a molulator of alkali metal/H exchange. *J Gen Physiol* 1983; 82: 761-84.
2. *Putney LK, Denker SP, Barber DL*. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 527-52.
3. *De Vito P*. The sodium/hydrogen exchanger: A possible mediator of immunity. *Cell Immunol* 2006; 240: 69-85.
4. *Halliwell B*. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989; 70(6): 737-57.
5. *Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM*. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(17): 7915-22.
6. *Bastian NR, Hibbs JB Jr*. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(1): 131-9.
7. *Finkel T*. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell*

- Biol 1998; 10(2): 248-53.
8. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the porcine NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. J Biol Chem 1999; 274(52): 37265-9.
 9. Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(14): 8010-4.
 10. Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, et al. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. J Immunol Methods 2004; 288(1-2): 123-34.
 11. Incerpi S, Spagnuolo S, Terenzi F, Leoni S. EGF modulation of Na⁺/H⁺ antiport in rat hepatocytes different sensitivity in adult and fetal cells. Amer J Physiol 1996; 270: C841-47.
 12. Haugen TS, Skjønberg OH, Kähler H, Lyberg T. Production of oxidants in alveolar macrophages and blood leukocytes. Eur Respir J 1999; 14(5): 1100-5.
 13. Verdegaal ME, Zegveld ST, van Furth R. Heat shock protein 65 induces CD62e, CD106, and CD54 on cultured human endothelial cells and increases their adhesiveness for monocytes and granulocytes. J Immunol 1996; 157(1): 369-76.
 14. Haller H, Drab M, Luft FC. The role of hyperglycemia and hyperinsulinemia in the pathogenesis of diabetic angiopathy. Clin Nephrol 1996; 46 (4): 246-55.
 15. Duckworth WC. Hyperglycemia and cardiovascular disease. Curr Atheroscler Rep 2001; 3(5): 383-91.
 16. Sachse A, Wolf G. Angiotensin II Induced Reactive Oxygen Species and the Kidney. J Am Soc Nephrol 2007; 18(9): 2439-46.
 17. Syrbe U, Moebes A, Scholze J, Swidsinski A, Dörffel Y. Effects of the angiotensin II type 1 receptor antagonist telmisartan on monocyte adhesion and activation in patients with essential hypertension. Hypertens Res 2007; 30(6): 521-8.
 18. Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathology. Clin Sci (Lond) 2007; 112(8): 417-28.
 19. Greene EL, Lu G, Zhang D, Egan BM. Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration. Hypertension 2001; 37(2): 308-12.