

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

**PAWEŁ ROMASZKO**

**METABOLIZM 1- $\beta$ -D-RYBOFURANOZYLO-  
4-PIRYDONO-3-KARBOKSYAMIDU  
I JEGO WPŁYW NA CZYNNOŚĆ UKŁADU  
SERCOWO – NACZYNIOWEGO**

Rozprawa doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Biochemii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

Dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński, prof. ndzw.

GDAŃSK 2016

# SPIS TREŚCI

<b>1. Wstęp</b>	<b>5</b>
1.1.1 Rola nukleotydów	6
1.1.2 Nukleotydy nietypowe	7
<b>1.2 Synteza i metabolizm NAD<sup>+</sup></b>	<b>8</b>
1.2.1 Rola NAD <sup>+</sup>	12
<b>1.3 1-β-D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamid (4PYR)</b>	<b>15</b>
1.3.1 Budowa chemiczna 1-β-D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamidu.	15
1.3.2 Metabolizm 4PYR i jego pochodne	16
1.3.3 Znaczenie 4PYR	17
<b>1.4 Endogenne czynniki toksyczne w układzie sercowo – naczyniowym</b>	<b>20</b>
1.4.1 Toksyny mocznicowe w układzie sercowo – naczyniowym.	20
<b>2. Cel pracy</b>	<b>23</b>
<b>3. Materiały i metody</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Zwierzęta laboratoryjne</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Metabolizm 4PYR w modelach eksperymentalnych in vitro.</b>	<b>25</b>
3.2.1 Inkubacja erytrocytów z 4PYR	25
3.2.2 Metabolizm 4PYR w tkankach zwierząt	26
<b>3.3 Metabolizm 4PYR oraz jego wpływ na układ sercowo – naczyniowy w eksperymentalnych modelach zwierzęcych.</b>	<b>27</b>
3.3.1 Farmakokinetyka 4PYR u myszy.	27
3.3.2 Zwierzęce modele długotrwałe podwyższonego stężenia 4PYR we krwi.	27
3.3.2.1 Infuzja dootrzewnowa 4PYR u szczura	27
3.3.2.2 Iniekcje podskórne 4PYR u myszy	28
3.3.3 Wpływ 4PYR na funkcję śródbłonka naczyniowego myszy.	28
3.3.3.1 Ocena funkcji śródbłonka naczyniowego w tętnicy udowej myszy in vivo	28
3.3.3.2 Ocena funkcji śródbłonka naczyniowego aorty zstępującej myszy ex vivo	29
3.3.4 Efekt krótkotrwałej infuzji 4PYR na funkcję układu sercowo – naczyniowego w modelu perfundowanego serca szczura.	30
3.3.4.1 Perfuzja serc szczura w układzie Langendorffa	30
3.3.4.2 Ocena funkcji mechanicznej oraz przepływu wieńcowego w modelu perfundowanego serca szczura	31
<b>3.4 Przygotowanie materiału biologicznego do analizy z wykorzystaniem HPLC</b>	<b>33</b>
3.4.1 Ekstrakcja tkanek zwierzęcych	33
3.4.2 Ekstrakcja pełnej krwi i osocza	34
3.4.3 Ekstrakcja płukanych erytrocytów	34
3.4.4 Ultrafiltracja moczu	35
<b>3.5 Metody analityczne</b>	<b>36</b>
3.5.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV	36
3.5.1.1 Analiza próbek materiału biologicznego	36
3.5.2 Izolacja i identyfikacja 4PYRAD	37
3.5.2.1 Izolacja 4PYRAD	37
3.5.2.2 Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją masową.	38
3.5.2.3 Analiza <sup>1</sup> H NMR	38
<b>3.6 Materiały i odczynniki</b>	<b>39</b>
<b>3.7 Metody statystyczne</b>	<b>40</b>
<b>4. Wyniki</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Identyfikacja i powstawanie 4PYRAD</b>	<b>41</b>
4.1.1 Identyfikacja 4PYRAD	41

4.1.2	Metabolizm 4PYRAD w ludzkich erytrocytach	46
<b>4.2</b>	<b>Metabolizm 4PYR</b>	<b>49</b>
4.2.1	Metabolizm 4PYR w homogenatach tkankowych szczura	49
4.2.2	Metabolizm 4PYR u gryzoni in vivo	52
4.2.2.1	Metabolizm 4PYR w tkankach szczura	52
4.2.2.2	Metabolizm 4PYR w tkankach myszy	56
<b>4.3</b>	<b>Ocena wpływu 4PYR na układ sercowo naczyniowy</b>	<b>59</b>
4.3.1	Wpływ długotrwałe podwyższonego stężenia 4PYR na funkcję śródbłonka naczyniowego myszy.	59
4.3.2	Wpływ krótkotrwałej perfuzji serc szczura roztworem 4PYR na funkcję śródbłonka naczyń wieńcowych oraz funkcję mechaniczną serca	62
4.3.2.1	Funkcja mechaniczna mięśnia sercowego i przepływ wieńcowy	62
<b>5.</b>	<b>Dyskusja</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>4PYRAD – nowy metabolit 4PYR</b>	<b>66</b>
5.1.1	Oczyszczanie i identyfikacja 4PYRAD	66
5.1.2	Metabolizm 4PYRAD w erytrocytach ludzkich	67
<b>5.2</b>	<b>Metabolizm 4PYR u gryzoni</b>	<b>68</b>
5.2.1	Szlak metaboliczny 4PYR	70
<b>5.3</b>	<b>Wpływ 4PYR na układ sercowo – naczyniowy.</b>	<b>72</b>
5.3.1	Toksyczność śródbłonkowa 4PYR	72
5.3.2	Wpływ 4PYR na serce w krótkiej perfuzji	74
<b>6.</b>	<b>Wnioski</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Streszczenie</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Abstract</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>78</b>

## Wykaz stosowanych skrótów

4PYR, PCNR	- 1- $\beta$ -D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamid
4PYMP	- monofosforan 1- $\beta$ -D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamidu
4PYTP	- trójfosforan 1- $\beta$ -D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamidu
4PYRAD	- dinukleotydy 1- $\beta$ -D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamidoadeninowy
NA	- nikotynamid
NaRib	- rybozyd nikotynamidu
NAD <sup>+</sup>	- dinukleotydy nikotynamidoadeninowy
NADP <sup>+</sup>	- fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NMN	- mononukleotydy nikotynamidu
ATP	- adenozylo 5' trójfosforan
ADP	- adenozylo 5' dwufosforan
AMP	- adenozylo 5' monofosforan
AOX	- oksydaza aldehydowa
5'NT	- 5' nukleotydydaza
PARP	- polimeraza poli(ADP-rybozy)
ADPR	- ADP-ryboza
ITU	- 5'-jodotubercydyna
EHNA	- erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenina
NO	- tlenek azotu
kg m.c.	- kilogram masy ciała
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa ( <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> )
LC/MS	- chromatografia cieczowa z detekcją masową ( <i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> )
TOF (LC/MS)	- detekcja masowa typu czasu przelotu ( <i>Time of Flight LC/MS</i> )
<sup>1</sup> H NMR	- spektrometria protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego ( <i>proton Nuclear Magnetic Resonance</i> )

## 1. WSTĘP

Nukleotydy są to związki organiczne składające się z zasady azotowej, pięciowęglowego cukru – pentozy oraz grupy fosforanowej. Zasadę azotową stanowią zwykle związki z grupy puryn lub pirymidyn. Purynami najczęściej wchodzącymi w skład nukleotydów są: adenina, guanina, ksantyna i hipoksantyna, natomiast pirymidynami: cytozyna, tymina oraz uracyl. Oprócz wymienionych związków występują również zasady azotowe o nietypowej budowie, najczęściej zmodyfikowane jedną lub większą ilością grup metylowych. Są to między innymi: N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-dimetyloadenina, N<sup>2</sup>N<sup>2</sup>-dimetyloguanina, N<sup>7</sup>-metyloguanina, 5-metylocytozyna, 5-hydroksymetylocytozyna<sup>[1]</sup>. Zasady azotowe, łącząc się z pentozą wiązaniem N-β-glikozydowym, tworzą związki zwane nukleozydami. Cukry, które wchodzą w skład nukleozydów to ryboza i deoksyryboza. Nukleotydy powstają poprzez połączenie wiązaniem estrowym jednej reszty kwasu ortofosforowego z węglem 5' pentozy wchodzącej w skład nukleozydu. Przyłączenie dwóch, lub trzech grup fosforanowych powoduje powstanie nukleotydu (odpowiednio) dwufosforanowego lub trójfosforanowego<sup>[1]</sup>.

Nukleotydy cykliczne: cykliczny 3'5'-AMP (cAMP) i cykliczny 3'5'-GMP (cGMP) stanowią odrębną grupę związków, dla których prekursorami są odpowiednie trójfosforany: ATP i GTP. Powstają one na drodze reakcji cyklizacji, zachodzącej przy udziale odpowiednio – cyklazy adenylanowej i cyklazy guanylanowej. Polega ona na połączeniu węgli 5' i 3' rybozy wiązaniem fosfodiastrowym poprzez jedną grupę fosforanową<sup>[1]</sup>.

Nukleotydy monofosforanowe mogą powstawać na drodze syntezy *de novo* lub poprzez degradację kwasów nukleinowych i pochodnych nukleotydowych (dwu- i trójfosforanowych).

Degradacja nukleotydów purynowych w organizmie człowieka prowadzi ostatecznie do powstania kwasu moczowego, który wydalany jest z moczem. Nukleotydy pirymidynowe degradowane są do NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CO<sub>2</sub> oraz trzeciego produktu, którym w przypadku rozpadu cytozyny i uracylu jest β-alanina, natomiast w przypadku tyminy – β-aminoizomaślan<sup>[1]</sup>.

### 1.1.1 Rola nukleotydów

Nukleotydy odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmu. Jedną z ich funkcji jest udział w przenoszeniu informacji genetycznej. Elementami składowymi kwasów nukleinowych są nukleotydy zawierające jedną grupę fosforanową. Sekwencja nukleotydów wchodzących w skład kwasów nukleinowych determinuje budowę oraz funkcję białek powstających w procesie translacji<sup>[1]</sup>.

Nukleotydy występują także w formie „wolnej” pełniąc szereg ważnych funkcji w komórce. Są bardzo dobrą formą magazynowania i przenoszenia energii. Szczególnie ważną rolę nośnika energii odgrywa adenozynotrójfosforan (ATP). Magazynuje on energię powstałą w wyniku procesów oddychania komórkowego oraz reakcji katabolicznych. Z drugiej strony stanowi ważne źródło energii dla reakcji syntezy oraz transportu aktywnego przez błony biologiczne. Bierze udział w pracy mięśni, w tym również mięśnia sercowego oraz uczestniczy w utrzymaniu gradientu jonowego po obu stronach błon biologicznych. Obok ATP udział w przemianach energetycznych ma także GTP, UTP i CTP<sup>[1]</sup>.

Nukleotydy uczestniczą w regulacji reakcji enzymatycznych jako efekторы allosteryczne (ATP, AMP) oraz jako elementy kofaktorów enzymów (koenzym A)<sup>[1]</sup>, a GTP także jako ligand białek G<sup>[2]</sup>.

Nukleotydy uczestniczą w syntezie glikogenu i glikoaminoglikanów (UDP-glukoza, UDP-galaktoza). Biorą udział w glikozylacji białek, przemianie galaktozy oraz syntezie fosfolipidów.

Cykliczne nukleotydy uczestniczą w przetwarzaniu i przesyłaniu sygnałów. Pełnią one rolę wtórnego przekaźnika sygnału pochodzącego z receptorów błonowych dla hormonów, przez co warunkują oddziaływanie hormonu na komórkę. Cykliczny 3'5'-AMP (cAMP) aktywuje swoiste kinazy białkowe. Zwiększa przepuszczalność błon komórkowych. Jest wtórnym przekaźnikiem pośredniczącym w działaniu wielu hormonów (np. noradrenaliny i glukagonu) wpływając na regulację szeregu procesów (w tym rozpad i syntezę glikogenu<sup>[3]</sup> oraz przemiany lipidów<sup>[4]</sup>).

Zwiększenie stężenia cyklicznego 3'5'-GMP (cGMP) w komórce powoduje aktywację kinazy białkowej G. cGMP bierze udział w odpowiedzi komórkowej na tlenek azotu przyczyniając się do relaksacji mięśni gładkich (np. rozkurczu naczyń krwionośnych zależnego od funkcji śródbłonna<sup>[5]</sup>). Uczestniczy w agregacji płytek krwi<sup>[6]</sup>, a także w procesie przetwarzania bodźców wzrokowych<sup>[1]</sup>.

Ponadto nukleotydy i nukleozydy zewnątrzkomórkowe poprzez pobudzenie receptorów purynergicznych (nukleotydotowych) regulują szerokie spektrum procesów fizjologicznych. Adenozyna, poprzez pobudzenie receptorów z grupy P1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) wykazuje działanie modulujące pracę układu sercowo – naczyniowego, nerwowego oraz immunologicznego<sup>[7]</sup>. Zwiększone stężenie adenozyny wykazuje działanie przeciwzapalne<sup>[8]</sup>, a nadekspresja receptorów  $A_1$  oraz  $A_3$  u myszy wykazuje efekt kardioprotekcyjny<sup>[7]</sup>. Pobudzenie receptorów P1 działa zwykle antagonistycznie względem pobudzenia receptorów P2 przez ATP i ADP. Oba nukleotydy wykazują działanie na receptory z grup P2Y (receptory metabotropowe - 8 podtypów) oraz P2T. Dodatkowo ATP wykazuje działanie na receptory z grupy P2X (receptory jonotropowe - 7 podtypów). Receptory z grupy P2 mogą być również pobudzone przez nukleotydy pirymidynowe (UTP, UDP) oraz ich związki cukrowe (UDP-glukoza, UDP-galaktoza, UDP-glukuronian)<sup>[7,9]</sup>. Nukleotydy zewnątrzkomórkowe regulują funkcję układu nerwowego, napięcie ścian naczyń krwionośnych oraz stymulują rozwój stanu zapalnego<sup>[7,10]</sup>. Ponadto mogą brać udział w regulacji wzrostu kości oraz wpływać na przyspieszenie wapnienia zastawek w sercu<sup>[10]</sup>. Receptory purynergiczne są szeroko rozpowszechnione u ludzi i zwierząt, jednak fizjologiczny efekt ich pobudzenia często jest różny w różnych tkankach u różnych gatunków<sup>[9]</sup>. Nastręcza to wielu problemów z jednoznacznym określeniem ich funkcji oraz może być jednym z czynników utrudniających praktyczne zastosowania<sup>[11,12]</sup>.

Nukleotydy są ponadto składnikami aktywnych metabolitów, np.: S-adenozylometioniny (donora rodnika metylowego w reakcjach metylacji), PAPS (koenzymu i donora grupy siarczanowej w reakcjach katalizowanych przez sulfotrasferazy), UDP-glukozy czy CDP-choliny.

Analogi nukleotydów są szeroko stosowane w leczeniu niektórych chorób. np. nowotworowych (5-fluorouracyl, 5-fluorouracydyna) i wirusowych (np. azydotymidyna (AZT), dideoksycytydyna, dideoksyinozyna używane w terapii HIV).

### **1.1.2 Nukleotydy nietypowe**

Związki o budowie odmiennej od klasycznej, zachowujące jednak strukturę nukleotydu, określane są one mianem nukleotydów nietypowych.

Najważniejszym przedstawicielem tej grupy jest NMN, czyli mononukleotyd nikotynamidowy. Związek ten w miejscu klasycznej zasady azotowej zawiera, nietypowy dla nukleotydów, nikotynamid. NMN, wraz z ATP, są substratami do syntezy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego ( $\text{NAD}^+$ ) oraz jego ufosforylowanej postaci –  $\text{NADP}^{+}$ <sup>[13,14]</sup>.

Drugim ważnym związkiem z tej grupy jest mononukleotyd flawinowy (FMN) zawierający trójpierścieniową zasadę azotową – dimetyloizoalloksazyne. FMN wchodzi w skład dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), koenzymu biorącego udział w wielu reakcjach metabolicznych<sup>[15]</sup>.

## 1.2 Synteza i metabolizm $\text{NAD}^+$

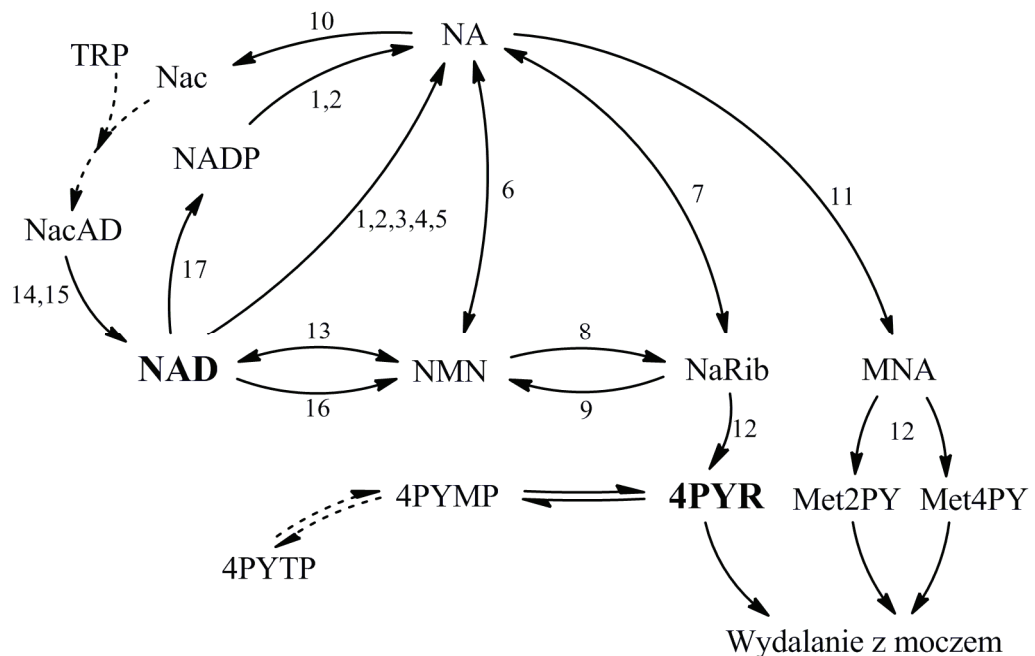
Głównymi prekursorami  $\text{NAD}$  są nikotynamid oraz kwas nikotynowy – związki określane wspólnie jako witamina B<sub>3</sub>. Nikotynamid jest przekształcany do mononukleotydu (NMN), a następnie tworzy dinukleotyd nikotynamidoadeninowy w reakcji katalizowanej przez adenylotransferazę NMN. Z kwasu nikotynowego w pierwszym etapie powstaje dinukleotyd adeninonikotynowy, który ostatecznie przekształcany jest do  $\text{NAD}^+$  w reakcji katalizowanej przez jedną z syntetaz  $\text{NAD}^+$  – hydrolizującą glutaminę lub zależną od amoniaku. Synteza  $\text{NAD}^+$  może odbywać się także *de novo* na drodze przemian tryptofanu<sup>[14,16]</sup>.

Degradacja  $\text{NAD}^+$  przebiega wielokierunkowo. Główną drogą jego rozpadu są reakcje, w których  $\text{NAD}^+$  jest substratem. Można do nich zaliczyć syntezę cyklicznej ADP-rybozy, mono- lub poli-ADP-rybozylację, jak również reakcje deacetylacji katalizowane przez niektóre sirtuiny. Produktem tych przemian jest między innymi nikotynamid<sup>[16,17]</sup>.  $\text{NAD}^+$  może być również przekształcany do  $\text{NADP}^+$  w reakcji katalizowanej przez kinazę  $\text{NAD}^+$  oraz degradowany do NMN przy udziale pirofosfatazy  $\text{NAD}^{+}$ <sup>[16]</sup>. Przemiana NMN do nikotynamidu może przebiegać bezpośrednio przy udziale fosforybozylotransferazy nikotynamidu lub z utworzeniem rybozydu nikotynamidu. Rybozyd nikotynamidu może następnie zostać zdegradowany do nikotynamidu w reakcji katalizowanej przez fosforylazę nukleozydową nikotynamidu lub ponownie przekształcony do NMN przy udziale kinazy rybozylonikotynamidu, enzymu opisanego niedawno przez Bieganowskiego<sup>[18]</sup>. Rybozyd nikotynamidu może również zostać przekształcony do 4PYR w reakcji



katalizowanej przez oksydazę aldehydową. Jest to najbardziej prawdopodobne źródło tego związku w organizmie (dane własne, nieopublikowane). Katabolizm nikotynamidu obejmuje metylację w pozycji 1, w wyniku czego powstaje N-1-metylonikotynamid (MNA)<sup>[19]</sup>, a następnie utlenianie w pozycji 2 lub 4 przy udziale oksydazy aldehydowej, co prowadzi do powstania, odpowiednio: N-1-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu (Met4PY) oraz N-1-metylo-2-pirydono-5-karboksyamidu (Met2PY). Powstałe metabolity wydalone są z moczem<sup>[20,21,22,23]</sup>.

Metabolizm NAD<sup>+</sup> przedstawiono schematycznie na rycinie 1, a dokładny opis zachodzących reakcji zamieszczono w tabeli 1.



**Ryc. 1.** Schemat głównych szlaków powstawania i degradacji NAD<sup>+</sup>.

Objaśnienia: NAD – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy; NA – nikotynamid; Nac – kwas nikotynowy; NacAD – dinukleotyd nikotynoadeninowy; NMN – mononukleotyd nikotynamidu; NaRib – rybozyd nikotynamidu; MNA – N1-metylo nikotynamid; TRP – tryptofan; 4PYR – 4-pirydono-3-karboksyamid; 4PYMP – monofosforan 4-pirydono-3-karboksyamidu; 4PYTP – trójfosforan 4-pirydono-3-karboksyamidu; Met4PY – N-1-metylo-4-pirydono-3-karboksyamid; Met2PY – N-1-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid.

**Tabela 1.** Enzymy oraz katalizowane przez nie reakcje związane z metabolizmem  $\text{NAD}^+$ .

Nr	Nazwa Enzymu	E.C.	Katalizowana reakcja
1	Glikohydrolaza $\text{NAD}^+$ (CD38) <i>NAD<sup>+</sup> glycohydrolase /</i> <i>ADP-ribosyl cyclase *</i>	3.2.2.5	$\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NA} + \text{ADP-ryboza}$
2	Glikohydrolaza $\text{NAD(P)}^+$ (CD38) <i>ADP-ribosyl cyclase /</i> <i>cyclic ADP-ribose hydrolase</i>	3.2.2.6	$\text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NA} + 2'\text{-fosforan}$ ADP-rybozy
3	Polimeraza poli(ADP-rybozy) <i>NAD<sup>+</sup> ADP-ribosyltransferase</i>	2.4.2.30	$\text{NAD}^+ + (\text{ADP-rybozylo})_n\text{-akceptor} \leftrightarrow$ $\text{NA} + (\text{ADP-rybozylo})_{n+1}\text{-akceptor} + \text{H}^+$
4	Mono ADP-rybozylo-transferaza <i>NAD<sup>+</sup>-protein-arginine</i> <i>ADP-ribosyltransferase</i>	2.4.2.31	$\text{NAD}^+ + \text{L-Arg(białko)} \leftrightarrow \text{NA} +$ $\text{N}^{\text{O}}\text{-(ADP-rybozylo)-L-Arg(białko)}$
5	Deacetylaza histonów (sirtuiny) <i>Histone deacetylase</i>	3.5.1.98	Hydroliza N(6)-acetylolizyny histonów z uwolnieniem deacetylowanych histonów
6	Fosforybozylotransferaza nikotynamidu <i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>	2.4.2.12	$\text{NMN} + \text{PPi} \leftrightarrow \text{NA} + \text{PRPP}$
7	Fosforylaza nukleozydu nikotynamidowego <i>Purine-nucleoside phosphorylase</i>	2.4.2.1	$\text{NARib} + \text{Pi} \leftrightarrow \text{NA} + \text{R-1-P} + \text{H}^+$
8	5'-nukleotydaza <i>5'-nucleotidase</i>	3.1.3.5	$\text{NMN} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NARib} + \text{Pi}$
9	Kinaza rybozylnikotynamidu <i>Ribosylnicotinamide kinase</i>	2.7.1.22	$\text{ATP} + \text{NARib} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{NMN}$
10	Deaminaza nikotynamidowa <i>Nicotinamidase</i>	3.5.1.19	$\text{NA} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Nac} + \text{NH}_3$
11	N1-metylotransferaza nikotynamidu <i>Nicotinamide N-methyltransferase</i>	2.1.1.1	$\text{NA} + \text{SAM} \leftrightarrow \text{MNA} + \text{SAH}$
12	Oksydaza aldehydowa <i>Aldehyde oxidase</i>	1.2.3.1	$\text{MNA} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow$ $\text{Met4(2)PY} + \text{H}_2\text{O}_2$
13	Adenylotransferaza NMN <i>Nicotinamide-nucleotide</i> <i>adenyltransferase</i>	2.7.7.1	$\text{NMN} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{PPi}$

Tabela 1 c.d.

Nr	Nazwa Enzymu	E.C.	Katalizowana reakcja
14	Syntetaza NAD <sup>+</sup> zależna od amoniaku <i>NAD<sup>+</sup> synthase</i>	6.3.1.5	NaAD <sup>+</sup> + ATP + NH <sub>3</sub> ↔ NAD <sup>+</sup> + AMP + PPi
15	Syntetaza NAD <sup>+</sup> hydrolizująca glutaminę <i>NAD<sup>+</sup> synthase (glutamine-hydrolysing)</i>	6.3.5.1	NaAD <sup>+</sup> + ATP + L-Gln + H <sub>2</sub> O ↔ NAD <sup>+</sup> + AMP + PPi + L-Glu
16	Pirofosfataza NAD <sup>+</sup> <i>NAD<sup>+</sup> diphosphatase</i>	3.6.1.22	NAD <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O ↔ NMN + AMP
17	Kinaza NAD <sup>+</sup> <i>NAD<sup>+</sup> kinase</i>	2.7.1.23	NAD <sup>+</sup> + ATP ↔ NADP <sup>+</sup> ADP

\* Kursywą zaznaczono nazwy enzymów rekomendowane przez Komitet Nomenklatury Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej dla Nomenklatury i Klasyfikacji Reakcji Katalizowanych Przez Enzymy (*ang. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse*)

### 1.2.1 Rola $NAD^+$

Dinukleotyd nikotynamidoadeninowy ( $NAD^+$ ) oraz jego ufosforylowana pochodna ( $NADP^+$ ) są jednymi z ważniejszych i bardziej rozpowszechnionych cząsteczek w organizmie. Ich główną funkcją jest przenoszenie protonów w wielu procesach oksydoredukcyjnych.  $NAD^+$  jest ważnym elementem przemian nukleotydów (w syntezie GMP) oraz katabolizmu kwasów tłuszczowych. Bierze również udział w metabolizmie aminokwasów w mitochondriach (np. deaminacja oksydacyjna glutaminianu). Jest akceptorem protonów pochodzących z glikolizy oraz cyklu Krebsa stanowiąc jednocześnie źródło energii dla łańcucha oddechowego.  $NADP^+$  jest zaangażowane w cyklu pentozowym oraz syntezie lipidów<sup>[1]</sup>. Wszystkie te reakcje wykorzystują  $NAD^+$  lub  $NADP^+$  nie wpływając jednocześnie na jego pulę komórkową. Co więcej, do niedawna uważano, że funkcja przenośnika protonów jest jedyną funkcją  $NAD^+$  w organizmie. Istnieje jednak grupa reakcji, w których  $NAD^+$  zużywany jest jako substrat, co w konsekwencji prowadzi do jego degradacji.

Jedną z najważniejszych reakcji zużywających  $NAD^+$  jest poli-(ADP-rybozyl)acja. Jest to reakcja katalizowana przez polimerazę poli(ADP-rybozy) (PARP) zachodząca głównie w odpowiedzi na uszkodzenie DNA spowodowane czynnikami zewnętrznymi, takimi jak: promieniowanie jonizujące, wolne rodniki czy związki alkilujące<sup>[24]</sup>. Aktywacja enzymu następuje po połączeniu z uszkodzonym DNA, co powoduje degradację znacznych ilości  $NAD^+$  z wytworzeniem nikotynamidu i ADP-rybozy. Cząsteczki ADP-rybozy (ADPR) wykorzystywane są następnie do utworzenia długich rozgałęzionych polimerów, które po połączeniu z białkiem akceptorowym modyfikują jego strukturę i funkcję<sup>[25]</sup>. W ten sposób modyfikowane są niektóre białka uczestniczące w tworzeniu struktury przestrzennej i metabolizmie DNA (np. histony H1 i H2B<sup>[24]</sup>, polimerazy czy topoizomerazy<sup>[26]</sup>), ale przede wszystkim modyfikowana jest struktura PARP. W efekcie takiej automodyfikacji następuje odłączenie enzymu od DNA i naprawa uszkodzonej struktury<sup>[25,27]</sup>. Jednak rola PARP nie ogranicza się jedynie do udziału w naprawie uszkodzonego DNA. Enzym ten uczestniczy w regulacji długości telomerów<sup>[28]</sup>, zachowaniu integralności struktury DNA, oraz wpływa na takie procesy jak transkrypcja i apoptoza<sup>[25,26,27,29]</sup>.

Poli-ADP-rybozylacja w normalnych warunkach jest procesem naprawczym i regulacyjnym. W niektórych sytuacjach może jednak prowadzić do negatywnych skutków. Utworzenie wielu długich, rozgałęzionych łańcuchów poli(ADP-rybozy) wymaga użycia w krótkim czasie wielu cząsteczek  $\text{NAD}^+$ . W przypadku znacznego uszkodzenia DNA zbyt wysoka aktywność PARP może w przeciągu kilku minut doprowadzić do nadmiernego zużycia  $\text{NAD}^+$ , a nawet do całkowitego wykorzystania komórkowej puli tego związku prowadząc do zaburzenia syntezy ATP<sup>[30]</sup>. Wykazano, że nadmierna aktywacja PARP może również dotyczyć niektórych chorób, w tym: zawału serca, cukrzycy, procesów zapalnych i neurodegeneracyjnych. Inhibitory PARP mogą stać się ważnym elementem terapii tych chorób<sup>[31,32]</sup>.

Kolejną reakcją wykorzystującą ADP-rybozę (ADPR) pochodzącą z  $\text{NAD}^+$  jest mono-ADP-rybozylacja polegająca na modyfikacji białka akceptorowego poprzez enzymatyczne połączenie jednej cząsteczki ADPR z jednym z aminokwasów (u eukariontów głównie z arginina). Reakcje tego typu, katalizowane przez monoADP-rybozylotransferazy z grup ART 1-5, powodują w znacznej większości zahamowanie aktywności białka akceptorowego (np.  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazy, dehydrogenazy aldehydowej)<sup>[26]</sup>.

Odmianą grupą enzymów zużywających  $\text{NAD}^+$  są deacetylasy białkowe z grupy SIRT (sirtuiny - SIRT1 do SIRT7). Mechanizm działania sirtuin polega na przeniesieniu grupy acetylowej (SIRT1, 2, 3, 7), bursztynianowej (SIRT 5) lub lipidowej (SIRT 6) z reszty aminokwasowej acetylolizyny łańcucha peptydowego na ADPR, modyfikując w ten sposób ładunek i funkcję docelowego białka<sup>[33]</sup>. Uważa się, że sirtuiny stanowią ważny element odpowiedzi komórkowej na stres wywołany niedoborem substancji odżywczych lub oddziaływaniem toksycznym<sup>[34,35]</sup>. Poprzez modyfikację czynników transkrypcyjnych (FOXO, p53, NFKappaB) uczestniczą w regulacji procesów zapalnych i apoptozie, zapobiegają nowotworzeniu<sup>[35]</sup>, mają wpływ na adaptację do warunków stresowych i przeżycie komórki<sup>[34]</sup>. Poprzez deacetylację enzymów odpowiadają za regulację utleniania kwasów tłuszczowych, glikolizy, wydzielania insuliny i biosyntezę acetylo-CoA w mitochondriach<sup>[35,36]</sup>. Ochronna rola sirtuin stwarza nadzieje na opracowanie terapii chorób związanych z działaniem toksyn, nowotworów oraz chorób neurodegeneracyjnych w oparciu o ich aktywność<sup>[33,34]</sup>.

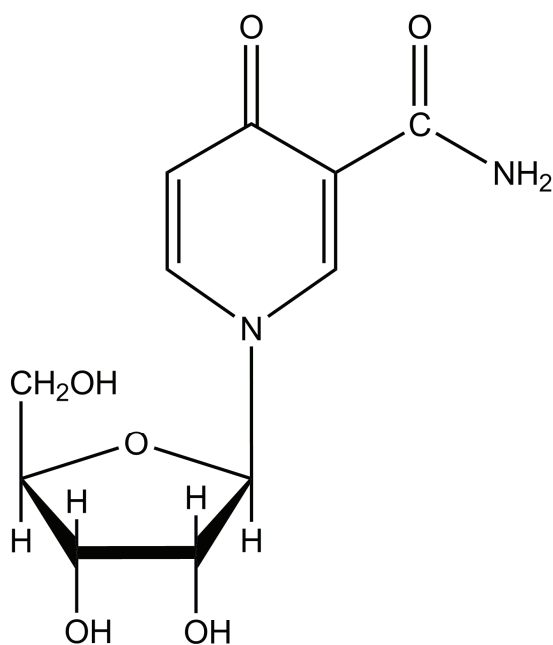
W ostatnich latach znacząco wzrosło znaczenie  $\text{NAD}^+$  jako elementu szlaków sygnałowych związanych z uwalnianiem  $\text{Ca}^{2+}$ . Jednym z mechanizmów szczegółowo

opisanych w literaturze jest rozpad  $\text{NAD}^+$  z wytworzeniem ADPR, która następnie przekształcana jest w cykliczną formę – cykliczną ADP-rybozę (cADPR). Reakcja cyklizacji ADPR katalizowana jest u ludzi przez CD38, białko znane dotychczas jako powierzchniowy antygen limfocytów T. Istnieją jednak przypuszczenia, że zachodzi ona również przy udziale innych, cytozolowych enzymów posiadających aktywność cyklazy ADPR<sup>[26]</sup>. Cykliczna ADP-ryboza, oddziałując na receptory ryanodynowe, powoduje uwolnienie wewnątrzkomórkowej puli  $\text{Ca}^{2+}$ , dzięki czemu odgrywa kluczową rolę w procesie wydzielania insuliny w komórkach  $\beta$  trzustki oraz soku trzustkowego w pęcherzykach wydzielniczych<sup>[26,37]</sup>.

### 1.3 1-β-D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamid (4PYR)

#### 1.3.1 Budowa chemiczna 1-β-D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamidu.

4PYR jest modyfikowanym nukleozydem składającym się z nikotynamidu utlenionego w pozycji czwartej pierścienia pirydynowego oraz rybozy połączonej z azotem pierścienia pirydynowego wiązaniem β-glikozydowym (Ryc. 2)<sup>[38]</sup>. Jego masa cząsteczkowa wynosi 270 g/mol. W warunkach fizjologicznych występuje w formie niezdisocjowanej, natomiast poniżej wartości pH = 2 występuje jako kation<sup>[39]</sup>.



Ryc. 2. Wzór chemiczny 4PYR.

Pierwszej identyfikacji 4PYR dokonał Dutta i wsp. opisując związek wyizolowany z ludzkiego moczu<sup>[38]</sup>. Była to jedna z nielicznych prac prawidłowo określająca jego strukturę chemiczną. 4PYR wielokrotnie opisywany był błędnie jako jego izomer strukturalny – 2PYR – posiadający grupę karbonylową w pozycji 2<sup>[40-43]</sup>. Dopiero w 1989 roku Mills i wsp. dokonał analizy wszystkich izomerów strukturalnych występujących w moczu ludzkim określając ich procentową zawartość. Wynosi ona około 90% dla 4,3-PYR, 9% dla 2,5-PYR i około 0,1% dla 2,3-PYR. Praca ta była swego rodzaju przełomem w badaniach nad 4PYR, ponieważ wykazano, że niemal wszystkie dotychczasowe badania opisujące rybozyd utlenionego nikotynamidu

w rzeczywistości dotyczyły, przeważającej w moczu, izoformy 4,3-PYR<sup>[39]</sup>. 4PYR występuje w organizmie ludzkim głównie jako anomer  $\beta$ <sup>[39]</sup>. W moczu ludzkim występuje również w formie anomeru  $\alpha$ <sup>[44]</sup>. Przepuszczalnie wszystkie izomery strukturalne mogą być związane z rybozą wiązaniem  $\alpha$ -glikozydowym, co daje w sumie aż 6 możliwych form izomerycznych nie różniących się masą. Wszystkie natomiast różnią się od siebie właściwościami fizykochemicznymi, co daje możliwość ich rozdziału i niezależnej analizy za pomocą metod chromatograficznych<sup>[39,45]</sup>.

Problemy z jednoznacznym określeniem struktury chemicznej oznaczanego związku wprowadziły znaczny chaos w nomenklaturze 4PYR. W literaturze stosowano różne skróty zaczynając od najczęściej używanych: 4PYR<sup>[46,47]</sup> i PCNR<sup>[45]</sup>, poprzez te mniej znane: GN<sup>[48]</sup>, 4Py-R<sup>[39]</sup>, czy 4KN-riboside<sup>[49]</sup>. Równocześnie skrótem 4-Pyr określano były inne związki, np. N1-metylo-4-pirydono-3-karboksyamid<sup>[50]</sup>. Obecnie najczęściej używanym skrótem dla dominującej formy tego związku jest 4PYR. Ujednolicenie nazewnictwa wraz z pojawieniem się zaawansowanych metod analitycznych umożliwiło uporządkowanie nomenklatury dotyczącej 4PYR oraz realną ocenę dotychczasowej wiedzy.

### 1.3.2 *Metabolizm 4PYR i jego pochodne*

4PYR jako związek o budowie zbliżonej do nikotynamidu mógłby powstawać zarówno na drodze syntezy *de novo* z tryptofanu jak i na drodze przemian  $\text{NAD}^+$ . Wykazano jednak brak związku pomiędzy ilością przyjmowanego z pokarmem tryptofanu czy nikotynamidu, a ilością 4PYR wydalaną z moczem<sup>[39]</sup>. Sugerowano również, że 4PYR może pochodzić z rozpadu tRNA. Potwierdzeniem tej tezy miało być podwyższone stężenie 4PYR w moczu u pacjentów z chorobą nowotworową, którzy charakteryzują się intensywnym metabolizmem kwasów nukleinowych<sup>[48]</sup>. Obecnie uważa się jednak, że głównym źródłem 4PYR w organizmie człowieka jest szlak przemian  $\text{NAD}^+$ <sup>[39,51]</sup>.

Najbardziej prawdopodobnym prekursorem 4PYR jest rybozyd nikotynamidu. Jest on utleniany przez oksydazę aldehydową, enzym wykorzystujący kofaktor molibdenowy, w procesie przypominającym detoksykację pierwszej fazy. U dzieci z deficytem kofaktora molibdenowego nie stwierdzono we krwi obecności pochodnych



4PYR<sup>[46]</sup>. Ponadto nie udało się wyizolować wolnej utlenionej zasady<sup>[51]</sup>. Występuje ona tylko w połączeniu z rybozą lub grupą metylową, co świadczy o tym, że dopiero podstawienie pozycji pierwszej pierścienia daje możliwość podstawienia grupy karbonylowej w pozycji czwartej lub drugiej.

Zsyntetyzowany w wątrobie 4PYR przedostaje się do osocza, gdzie może występować w formie wolnej bądź związanej z białkami<sup>[51]</sup>. Część związku ulega dystrybucji do erytrocytów, w których następuje jego bardzo szybka fosforylacja do monofosforanowej pochodnej – 4PYMP. Proces jest bardzo intensywny, przez co większość puli 4PYR występuje w formie monofosforanu w erytrocytach. 4PYMP przekształcany jest dalej do dwu- i trójfosforanu, jednak proces ten następuje znacznie wolniej. Najbardziej prawdopodobnym enzymem przekształcającym 4PYR do fosforanowych pochodnych jest kinaza adenozy. W obecności jodotubercydyny (selektywnego inhibitora kinazy adenozy) proces ten zachodzi w stopniu minimalnym. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że kinaza rybozydu nikotynamidu w niewielkim stopniu jest odpowiedzialna za przekształcenie 4PYR do 4PYMP<sup>[52]</sup>.

4PYR wydalany jest w znacznym stopniu przez nerki, a klirens wydalania 4PYR z moczem jest większy niż klirens kreatyniny. Intensywność tego procesu i znaczna różnica stężeń pomiędzy osoczem, a moczem świadczą o jego aktywnym charakterze<sup>[47]</sup>.

### 1.3.3 *Znaczenie 4PYR*

4PYR fizjologicznie występuje w osoczu zdrowych ludzi w stężeniu  $0,013 \pm 0,006 \mu\text{mol/l}$  i wydalany jest z moczem w ilości  $26,7 \pm 18,2 \mu\text{mol}/24\text{h}$ <sup>[47]</sup>. Wartości te mogą się różnić w zależności od wieku. Stężenie 4PYR w osoczu i moczu również może znacząco zmieniać się w przebiegu różnych patologii.

Od wielu lat uważa się, że nukleozydy wydalane z moczem mogą być markerem niektórych chorób, w tym o charakterze nowotworowym. W licznych publikacjach opisywano wyraźną zależność pomiędzy procesem nowotworzenia, a stężeniem nukleozydów wydalanych z moczem<sup>[45,48,53-56]</sup>. Badania dotyczące 4PYR wykazały, że również ten nukleozyd może służyć jako marker rozwoju niektórych chorób nowotworowych. Jego stężenie w moczu istotnie wzrasta u pacjentów w

przypadku zaawansowanych nowotworów złośliwych (różnego typu)<sup>[55]</sup>, u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową<sup>[45,57]</sup> jak również w przebiegu ostrych postaci białaczki szpikowej i limfoblastycznej<sup>[40]</sup>. Oznaczany był w moczu pacjentów ze złośliwym międzybłoniakiem<sup>[58,59]</sup>, rakiem jajnika<sup>[60]</sup> oraz rakiem nosowej części gardła<sup>[61]</sup>. Interesujące wyniki badań z udziałem osób zakażonych HIV przedstawił Interieri et. al.<sup>[62]</sup>. 4PYR (opisany jako PCNR) zaliczony został tu do grupy czynników, których stężenie w osoczu może stanowić podstawę do rokowania względem czasu rozwoju AIDS, a zatem względem długości przeżycia zakażonych wirusem.

Największe zmiany w stężeniu 4PYR w osoczu występują jednak u chorych z przewlekłą chorobą nerek. U tych pacjentów zaobserwowano podwyższone stężenie 4PYR w osoczu, 40-krotnie przekraczające stężenie tego związku u osób zdrowych. Stwierdzono także wzrost stężenia pochodnych 4PYR – 4PYMP oraz 4PYTP w erytrocytach<sup>[47]</sup>. Interesujący wydaje się również proces fosforylacji związku do trójfosforanu, który akumuluje się w erytrocytach znacznie wolniej niż monofosforan. Jego stężenie utrzymuje się na wysokim poziomie nawet do sześciu miesięcy po przeszczepie nerki, podczas gdy stężenie 4PYMP i 4PYR po transplantacji szybko osiąga wartości zbliżone do tych obserwowanych u osób zdrowych<sup>[47]</sup>.

Struktura chemiczna 4PYR może być czynnikiem determinującym jego wpływ na enzymy szlaku przemian  $\text{NAD}^+$ , natomiast nukleotydowe pochodne 4PYR mogą mieć wpływ na funkcjonowanie enzymów zaangażowanych w szlaki przemian niektórych nukleotydów (np. ATP)<sup>[47,52,63]</sup>. Dotychczasowe badania wykazały jednak jedynie niewielką aktywację hydrolazy S-adenozylhomocysteiny (SAHH) pod wpływem inkubacji lizatów erytrocytów ludzkich z 4PYR<sup>[63]</sup>. Wydaje się, że znacznie większy wpływ na procesy metaboliczne ma 4PYMP – bezpośredni metabolit 4PYR. Wykazano, że podczas inkubacji z lizatem erytrocytów hamuje on deaminazę AMP (AMPD)<sup>[63]</sup>, enzym katalizujący przemianę AMP do IMP, co może sugerować działanie kardioprotekcyjne 4PYMP<sup>[64,65]</sup>. Podobny efekt zauważono podczas inkubacji 4PYMP z homogenatem serca oraz w kardiomiocytach szczurzych<sup>[63]</sup>. Jest to zaskakujące biorąc pod uwagę wcześniejsze spekulacje zakładające, że 4PYR może być aktywatorem AMPD w erytrocytach<sup>[52]</sup>. 4PYMP może również w pewnym stopniu hamować aktywność APRT oraz ekto-5' nukleotydazy *in vitro*, jednak konieczność użycia wysokiego stężenia związku, jakie było potrzebne do wywołania znaczących

zmian aktywności enzymatycznej, wyklucza większe znaczenie biologiczne tego procesu<sup>[63]</sup>.

Dotychczasowe badania nad wpływem podwyższonego stężenia 4PYR w erytrocytach *in vitro* wykazały, że może on mieć toksyczny wpływ na metabolizm energetyczny komórki. Szybkie powstawanie nukleotydowych pochodnych 4PYR w erytrocytach inkubowanych w obecności wysokiego stężenia 4PYR wiązało się z obniżeniem stężenia ATP w komórce<sup>[47,52]</sup>. Podobny efekt uzyskano podczas inkubacji komórek śródbłónka z 4PYR<sup>[66]</sup>. Jednak, aby w pełni ocenić toksyczność tego związku względem układu sercowo – naczyniowego konieczne jest przeprowadzenie badań w oparciu o modele eksperymentalne *ex vivo* lub *in vivo* pozwalające na ocenę funkcji serca oraz śródbłónka naczyniowego.

## **1.4 Endogenne czynniki toksyczne w układzie sercowo – naczyniowym**

Układ sercowo – naczyniowy narażony jest na działanie różnorodnych czynników toksycznych, pochodzenia egzogenego oraz endogenego. Czynniki egzogenne są dobrze poznane i stosunkowo łatwe do wyeliminowania lub kontroli. Należą do nich takie grupy substancji jak: leki nasercowe (beta blokery), leki cytostatyczne (antracykliny), substancje zawarte w używkach (nikotyna, kofeina), metale ciężkie (rtęć), monotlenki gazowe (CO) i wiele innych<sup>[67]</sup>. Toksyny endogenne są z kolei grupą słabiej poznaną, a większość z nich zaliczana jest do tzw. toksyn mocznicowych.

### **1.4.1 Toksyny mocznicowe w układzie sercowo – naczyniowym.**

Niewydolność nerek związana jest z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chorób towarzyszących, zwłaszcza obejmujących układ sercowo – naczyniowy. Szacuje się, że częstotliwość wystąpienia miażdżycy naczyń krwionośnych jest 5 do 30 razy wyższa u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek niż u zdrowych osób<sup>[67]</sup>. W grupie tej częściej notuje się przypadki niedokrwienia w obrębie mózgu, kończyn dolnych i serca. Osoby z niewydolnością nerek częściej zapadają na choroby naczyniowe, a przy tym rozwijają się one we wcześniejszym wieku niż u osób zdrowych<sup>[68]</sup>. Zmniejszone wydalanie nerkowe prowadzi do akumulacji we krwi związków aktywnych biologicznie mogących mieć wpływ na funkcję wielu narządów organizmu. Związki te zalicza się do szerokiej grupy toksyn mocznicowych. W 2003 roku do grupy tej zaliczano około 90 związków<sup>[69]</sup> jednak liczba ta stale wzrasta<sup>[70,71]</sup>. Układ sercowo – naczyniowy, jako pierwsza bariera dla toksycznych metabolitów nagromadzonych w osoczu, jest najbardziej narażony na ich działanie, a najczęściej spotykane dysfunkcje związane z niewydolnością nerek to nadciśnienie, stres oksydacyjny, stan zapalny i zwłóknienia<sup>[72]</sup>. Uważa się, że niewydolność nerek i związane z nią znaczne nagromadzenie toksyn mocznicowych jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka rozwoju chorób sercowo – naczyniowych, przewyższając klasyczne czynniki, takie jak nadciśnienie czy otyłość<sup>[68]</sup>. Do najlepiej

poznanych toksyn mocznicowych o udowodnionym wpływie na układ sercowo – naczyniowy należą homocysteina oraz asymetryczna i symetryczna dimetyloarginina.

Jedną z najwcześniej opisanych toksyn mocznicowych jest homocysteina (Hcy)<sup>[73]</sup>. Powstaje ona z metioniny i może być przekształcana ponownie do metioniny oraz do cysteiny przy udziale witamin z grupy B<sup>[74]</sup>. Podwyższone stężenie homocysteiny we krwi, wiąże się ze zwiększoną proliferacją w obrębie mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych<sup>[75]</sup>. Hiperhomocysteinemia prowadzi również do zmian miażdżycowych i podwyższonego ryzyka wystąpienia ostrych epizodów wieńcowych<sup>[74,76,77]</sup>, zakrzepicy żył głębokich<sup>[78]</sup>, choroby niedokrwiennej i zawałów serca<sup>[78,79,80]</sup>. Próby leczenia hiperhomocysteinemii poprzez podanie kwasu foliowego, witaminy B<sub>6</sub> i witaminy B<sub>12</sub> prowadziły do zmniejszenia stężenia homocysteiny w osoczu, jednak zmniejszenie ryzyka wystąpienia chorób sercowo – naczyniowych jest niejednoznaczne<sup>[78,81]</sup>.

Związkiem zaliczanym do grupy toksyn mocznicowych jest także asymetryczna dimetyloarginina (ADMA)<sup>[82]</sup>. ADMA jest analogiem argininy, wykazującym działanie hamujące względem śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS)<sup>[83,84]</sup>. W efekcie dochodzi do zmniejszenia wydzielania tlenku azotu, zmniejszenia jego funkcji rozkurczowej i ochronnej względem naczyń krwionośnych<sup>[85]</sup>. Wykazano, że podwyższone stężenie ADMA w osoczu spowodowane niewydolnością nerek przyczynia się do wzrostu ciśnienia tętniczego<sup>[82,84]</sup>, rozwoju miażdżycy<sup>[86]</sup>, zmian przerostowych i funkcjonalnych mięśnia sercowego<sup>[87]</sup> oraz zgrubienia tętnicy szyjnej<sup>[84]</sup>. Zoccali sklasyfikował asymetryczną dimetyloargininę jako drugi w kolejności (po wieku pacjenta) czynnik ryzyka związany ze śmiertelnością oraz częstością występowania epizodów niedokrwienych u chorych z niewydolnością nerek<sup>[88]</sup>.

Symetryczna dimetyloarginina (SDMA), izomer strukturalny ADMA, jest kolejnym związkiem, którego stężenie wzrasta w przebiegu niewydolności nerek. W przeciwieństwie do AMDA, SMDA nie wykazuje właściwości hamujących na aktywność eNOS, jest jednak inhibitorem kompetycyjnym transportu L-argininy przez błonę komórkową komórek śródbłonka, będącej donorem tlenku azotu w reakcji katalizowanej przez eNOS<sup>[89,90]</sup>. Udział SDMA w rozwoju nadciśnienia zależnego od dysfunkcji śródbłonka nie został w pełni udowodniony<sup>[82]</sup>. Poprzez aktywację NF-kappaB, a w efekcie zwiększoną ekspresję Il-6 i TNF- $\alpha$  SDMA może być

promotorem rozwoju stanu zapalnego związanego z przewlekłą niewydolnością nerek<sup>[91]</sup>.

Nową grupę związków zaliczanych do toksyn mocznicowych stanowią pochodne nikotynamidu. Do dobrze poznanych związków z tej grupy należą utlenione pochodne MNA: Met-2-PY oraz Met-4-PY<sup>[92,93,94,95]</sup> (metabolizm tych związków przedstawiono na rycinie 1), z których pierwszy włączony został do grupy toksyn mocznicowych przez „European Uremic Toxin Group”<sup>[70]</sup>. Wykazano, że oba związki, podobnie jak nikotynamid, hamują aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1)<sup>[96,97]</sup> co w przebiegu niewydolności nerek może mieć kluczowe znaczenie dla zachowania integralności genomu, a w efekcie przyczyniać się do zwiększonej zapadalności na choroby nowotworowe<sup>[98]</sup>. Do grupy tej zaliczono również 4PYR oraz jego pochodną 4PYTP<sup>[93]</sup>. Metabolizm 4PYR oraz jego toksyczne efekty zostały częściowo poznane i przedstawione w oparciu o badania *in vitro* w preparatach erytrocytów oraz w hodowlach komórek śródbłoka (szerzej opisano w punkcie 1.2.3). Brak jest natomiast danych dotyczących dystrybucji oraz metabolizmu 4PYR w pozostałych tkankach oraz wpływu podwyższonego stężenia 4PYR na funkcję układu sercowo - naczyniowego *in vivo*.

## 2. CEL PRACY

Celem pracy była identyfikacja nieznanymi metabolitów 4PYR oraz ocena wpływu 4PYR i jego pochodnych na czynność układu sercowo - naczyniowego.

W szczególności cele pracy obejmowały:

1. Identyfikację nowego metabolitu 4PYR
2. Zbadanie dystrybucji 4PYR i jego pochodnych w tkankach zwierząt
3. Ocenę wpływu 4PYR na funkcję śródbłonna
4. Ocenę wpływu 4PYR na funkcję mechaniczną i krążenie wieńcowe w modelu perfundowanego serca

### **3. MATERIAŁY I METODY**

#### **3.1 Zwierzęta laboratoryjne**

Do eksperymentów wykorzystano szczury rasy Wistar o masie około 300 g oraz myszy C57BL/6 o masie około 30 g pozyskane z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej. Do każdego zabiegu operacyjnego zwierzęta znieczulano mieszaniną ketaminy (K) i ksylazyny (Ks) w iniekcji dootrzewnowej w dawce odpowiednio 80 mg (K)/kg m.c. i 5 mg (Ks)/kg m.c. W przypadku procedur o podwyższonej inwazyjności (stopień 3 i 4 według Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego) dawkę anestetyku zwiększano do 100 mg (K)/kg m.c. i 8 mg (Ks)/kg m.c. Wszystkie procedury chirurgiczne wykonywano w warunkach aseptycznych.

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody 3 Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Gdańsku (uchwała nr 15/2008 z dn. 9.06.2008; uchwała nr 26/2011 z dn. 11.07.2011) oraz po uzyskaniu zezwolenia Dziekana Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach (zezwolenie nr 13/2007). Wszelkie procedury przeprowadzane na zwierzętach wykonywano w oparciu o światowe wytyczne dotyczące traktowania zwierząt laboratoryjnych, technik iniekcji i pobierania materiału biologicznego<sup>[99,100]</sup>.



## 3.2 Metabolizm 4PYR w modelach eksperymentalnych *in vitro*.

### 3.2.1 Inkubacja erytrocytów z 4PYR

Procedurę inkubacji erytrocytów z 4PYR przeprowadzono wykorzystując krew ludzką. Próbkę krwi o objętości około 3 ml pobierano od ochotników różnych płci w wieku 25 – 40 lat wykorzystując probówki próżniowe z heparyną litową. Krew pobierana była przez wykwalifikowany personel medyczny. Pobraną krew przeniesiono do probówek typu Eppendorf i odwirowano przy 3000 obr./min. (wirówka Hettich Universal 320R) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto osocze wraz z warstwą leukocytów. Erytrocyty dwukrotnie płukano buforem składającym się z: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM glukozy, 24 mM HEPES o pH = 7,4. Do eksperymentów erytrocyty rozcieńczono buforem użytym do płukania, doprowadzając do hematokrytu 20%.

Tak przygotowane erytrocyty umieszczono w probówkach typu Eppendorf po 500 µl w każdej. Probówki umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, a następnie dodano do każdej po 20 µl roztworu 4PYR o takim stężeniu, aby ostateczne stężenie w inkubowanej próbce wynosiło 300 µmol/l. Do próbek stanowiących kontrolę dodano po 20 µl 0,9% roztworu NaCl. Do połowy probówek zawierających 4PYR dodano dodatkowo inhibitor kinazy adenozy – 5'-jodotubercydynę (ITU). Odpowiednio po 3, 6 i 12 godzinach przerywano reakcję, dodając do probówek 2,4 M HClO<sub>4</sub>, w stosunku objętościowym 1:1.

Inkubację erytrocytów z różnymi stężeniami 4PYR przeprowadzono według powyższej procedury. Do probówek umieszczonych w łaźni wodnej dodano 20 µl roztworu 4PYR o takich stężeniach, aby ostateczne stężenia w mieszaninach reakcyjnych wynosiły odpowiednio 0,1, 0,3 oraz 1 mmol/l. Do połowy probówek dodano dodatkowo ITU. Czas trwania reakcji wynosił 3 godziny, po upływie których przerywano reakcję dodając 2,4 M HClO<sub>4</sub>.

Degradację metabolitów 4PYR (4PYMP oraz 4PYRAD) przeprowadzono przy użyciu erytrocytów preinkubowanych przez 3 godziny z 300 µM 4PYR według powyższej procedury. Mieszaniny reakcyjne nie zawierały ITU. Po upływie 3 godzin erytrocyty odwirowano przy 3000 obr./min. przez 5 minut w temperaturze pokojowej w

celu usunięcia buforu zawierającego 4PYR, po czym rozcieńczono je buforem reakcyjnym uzyskując hematokryt 20%. Następnie do próbek dodano ITU lub 0,9% NaCl, a następnie poddano inkubacji w 37°C przez 0,5, 1, 2, 3 i 6 godzin. Po upływie tego czasu inkubację przerywano dodając 2,4 M HClO<sub>4</sub>. Po zatrzymaniu reakcji erytrocyty poddano ekstrakcji opisaną w punkcie 3.4.3, a uzyskane ekstrakty poddano analizie z wykorzystaniem HPLC.

### **3.2.2 *Metabolizm 4PYR w tkankach zwierząt***

Szczury uśpiono mieszaniną ketaminy i ksylazyny, po czym pobrano od nich serce, wątrobę i nerki. Pobrane narządy zważono i przeniesiono do oddzielnych probówek i umieszczono w lodzie. Następnie tkanki homogenizowano z buforem o temperaturze 4°C w stosunku wagowo – objętościowym wynoszącym 1:9 (150 mM KCl, 20 mM TRIS, 1 mM dithiothreitol, 1mM EDTA, pH 7,0). Homogenaty odwirowano przy 14000 obr./min. w temperaturze 4°C przez 30 minut (Universal 320R, Hettich), a otrzymany supernatant rozcieńczono 20-krotnie buforem inkubacyjnym (7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM EDTA, 3,3 mM cytrynian sodu, pH 7,5). Do rozcieńczonego homogenatu dodano roztwór reakcyjny (0,6 mM roztwór 4PYR z dodatkiem 4 mM ATP, 8 mM fosfokreatyny, 5 μM EHNA, 0,2 mg/ml fosfokinazy kreatynowej i 0,03 mg/ml miokinazy) w stosunku objętościowym 1:1. Do połowy próbek dodano ITU w stężeniu 5 μM. Próbkę kontrolną nie zawierały 4PYR w roztworze reakcyjnym. Inkubację prowadzono w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 3h. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie 1,3 M HClO<sub>4</sub>. Następnie próbki odwirowano (14000 obr./min., 4°C, 15 min.), a zebrane supernatanty doprowadzono do pH 6-6,5 poprzez dodanie 3M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Po 15 minutowej inkubacji w lodzie próbki ponownie odwirowano (14000 obr./min., 4°C, 5 min.), a supernatanty poddano analizie z użyciem HPLC.

### **3.3 Metabolizm 4PYR oraz jego wpływ na układ sercowo – naczyniowy w eksperymentalnych modelach zwierzęcych.**

#### **3.3.1 Farmakokinetyka 4PYR u myszy.**

Krzywą eliminacji 4PYR oraz powstających z niego metabolitów – 4PYMP i 4PYRAD – wykonano po podskórnym wstrzyknięciu w okolicę pachową 100  $\mu$ l 50 mM roztworu 4PYR rozpuszczonego w 0,9% NaCl. Pełną krew, w której oznaczano stężenia związków (około 30  $\mu$ l) pobrano z żyły odpiszczelowej (*v. saphena*) bezpośrednio przed wykonaniem iniekcji, co stanowiło czas zerowy, oraz dokładnie w 5, 30, 90 oraz 180 minucie od podania 4PYR. Pobrane próbki krwi poddano ekstrakcji opisaney w punkcie 3.4.3, a stężenia związków oznaczono w ekstraktach przy użyciu HPLC.

#### **3.3.2 Zwierzęce modele długotrwałe podwyższonego stężenia 4PYR we krwi.**

##### **3.3.2.1 Infuzja dootrzewnowa 4PYR u szczura**

Infuzję dootrzewnową 4PYR wykonano przy użyciu osmotycznych pomp infuzyjnych firmy ALZET (model 2ML1) zapewniających stałą, siedmiodniową infuzję z szybkością 10  $\mu$ l/h. W jednej grupie pompy wypełniono 70 mM roztworem 4PYR rozpuszczonym w 0,9% roztworze NaCl, a w drugiej, stanowiącej kontrolę, pompy wypełniono 0,9% roztworem NaCl. Procedurę wypełniania pomp przeprowadzono w warunkach aseptycznych, a roztwór 4PYR bezpośrednio przed umieszczeniem w pompie przefiltrowano przez jałowy filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22  $\mu$ m.

Do procedury implantacji pomp osmotycznych szczury znieczulono mieszaniną ketaminy i ksylazyny, ogolono po stronie brzusznej w 2/3 długości ciała licząc od głowy i zdezynfekowano skórę. Następnie wykonano około 1cm nacięcie skóry i znajdującej się pod nią warstwy mięśni, przez które wsunięto pompę osmotyczną do jamy otrzewnej. Nacięcie zamknięto poprzez założenie szwów chirurgicznych (Prolene 0-3 firmy Ethicon). Bezpośrednio po implantacji pompy osmotycznej pobrano około 100  $\mu$ l krwi poprzez punkcję żyły odpiszczelowej (*v. saphena*). W ten sam sposób pobierano krew od szczurów z wszczepioną pompą osmotyczną w 1, 3 i 7 dniu infuzji.

Pobrana krew została odwirowana przy 3000 obr./min. w temperaturze 20°C i rozdzielona na osocze i erytrocyty, które następnie poddano kwaśnej ekstrakcji i analizie z użyciem HPLC. Po zabiegu wszczepienia pomp infuzyjnych szczury umieszczono w klatkach umożliwiającym kontrolę ilości oddawanego moczu. Mocz zbierano co 24 godziny, odciedzano resztki pokarmu, sierści i innych większych nieczystości na gęstej gazie bawełnianej i przechowywano w -80°C do czasu dalszej obróbki i analizy z wykorzystaniem HPLC.

Po 7 dniach od wszczepienia pomp infuzyjnych szczury poddano głębokiej anestezji, a następnie pobrano serce, a w dalszej kolejności wątrobę, płuca, nerki i mięśnie. Pobrany materiał natychmiast zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

### 3.3.2.2 *Iniekcje podskórne 4PYR u myszy*

4PYR podawano myszom podskórnie. Iniekcje wykonywano co 12 godzin przez 7 dni roztworem o objętości około 100 µl i stężeniu 50 mM. Objętość podawanego roztworu ustalano indywidualnie dla każdej myszy w taki sposób, aby uzyskana dawka związku wynosiła 100 mg/kg/24h. Związek rozpuszczony był w 0,9% roztworze NaCl. Roztwór podawano bez uprzedniego znieczulenia w okolicę pachową. Grupę kontrolną stanowiły myszy otrzymujące iniekcje 0,9% roztworu NaCl.

Po 7 dniach podawania 4PYR myszy znieczulono, a następnie pobrano serce, a w dalszej kolejności wątrobę, płuca, nerki i mięśnie. Pobrany materiał natychmiast zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

### 3.3.3 *Wpływ 4PYR na funkcję śródbłonna naczyniowego myszy.*

#### 3.3.3.1 *Ocena funkcji śródbłonna naczyniowego w tętnicy udowej myszy in vivo*

Funkcję śródbłonna naczyniowego myszy oceniono w oparciu o zmodyfikowaną metodę pomiaru funkcji śródbłonna tętnicy udowej myszy opisaną przez Tamurę i wsp.<sup>[101]</sup>. Po 7 dniowym podawaniu 4PYR w podskórnych iniekcjach zwierzęta znieczulono mieszaniną ketaminy i ksylazyny, a następnie umieszczono w inkubatorze. Podczas całej procedury utrzymywano stałą temperaturę ciała zwierzęcia

na poziomie 37°C za pomocą podgrzewanego podłoża z możliwością regulacji intensywności grzania. Temperaturę ciała monitorowano przy pomocy sondy doodbytniczej połączonej z termometrem elektronicznym. Temperatura zewnętrzna w bezpośrednim otoczeniu utrzymywana była na poziomie 30°C. W pierwszym etapie chirurgicznie uwidoczniono i delikatnie wypreparowano tętnicę udową (*a. femoralis*) i pozostawiono na 10 minut w celu wyeliminowania efektów związanych z procedurą chirurgiczną. Następnie zamknięto przepływ krwi w tętnicy na 3 minuty zakładając przeznaczony dla myszy mikrozacisk naczyniowy. Po upływie 3 minut zacisk zdjęto przywracając normalny przepływ krwi. W efekcie działania siły ścinającej wywieranej przez krew na ścianę tętnicy (*Wall Shear Stress*) dochodzi do rozkurczu naczynia zależnego od czynności śródbłonna. Po kolejnych 3 minutach równoważenia na wyeksponowaną tętnicę zaaplikowano 100 µl 0,2% roztworu nitrogliceryny (Nitracor, Teva), wywołując rozkurcz niezależny od funkcji śródbłonna.

Opisana powyżej procedura rejestrowana była za pomocą mikroskopu-kamery połączonej z komputerem. Obraz zapisywany był w wysokiej rozdzielczości z szybkością 1 klatki na sekundę. Zarejestrowany materiał posłużył do wykonania precyzyjnych pomiarów mikrometrycznych średnicy tętnicy udowej w odległości około 2 mm dystalnie od zacisku. Pomiary wykonano bezpośrednio przed założeniem zacisku, podczas hemostazy, 30 sekund po przywróceniu przepływu oraz 30 sekund po podaniu nitrogliceryny, co stanowiło odpowiednio: wartość podstawową średnicy naczynia, test skuteczności zacisku, wartość średnicy dla rozkurczu zależnego od funkcji śródbłonna oraz wartość średnicy naczynia podczas rozkurczu niezależnego od funkcji śródbłonna.

Wyniki przedstawiono jako procentową zmianę średnicy tętnicy udowej myszy po rozkurczu w stosunku do wartości podstawowej wyrażonej jako 100%.

### 3.3.3.2 Ocena funkcji śródbłonna naczyniowego aorty zstępującej myszy *ex vivo*

Ocenę funkcji śródbłonna naczyniowego u myszy wykonano po 7 – dniowym podawaniu 4PYR (punkt 3.3.2.2). Zwierzęta znieczulono, a następnie wykonano torakotomię i pobrano część piersiową aorty zstępującej, umieszczając ją natychmiast w buforze Krebsa – Henseleita (118,0 mM NaCl, 2,52 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,64 mM MgSO<sub>4</sub>, 24,88 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,18 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,7 mM KCl, 10,0 mM glukoza) o temperaturze pokojowej.

Wypreparowane aorty oczyszczono z przylegających tkanek i pocięto na 2 mm krążki. Każdy z tak przygotowanych krążków zamontowano pomiędzy dwoma pinami miografu (620M, Danish Myo Technology), zanurzonymi w buforze Krebsa – Henseleita. Jeden z pinów stanowił przekaźnik siły napięcia krążka aortalnego umożliwiając jej pomiar i rejestrację w programie komputerowym (LabChart, ADInstruments, Australia). Drugi natomiast był zamontowany na stałe i stanowił opór podczas procedury zwiększania napięcia krążka. W czasie 30 minut po zamontowaniu krążki aortalne równoważono w buforze Krebsa – Henseleita o temperaturze 37°C i pH = 7,4. Bufor nieprzerwanie gazowano karbogenem (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Początkowo napięcie spoczynkowe krążków podniesiono do wartości 10 mN i równoważono w identycznych warunkach przez kolejne 30 min. Po zrównoważeniu krążki poddano ocenie kurczliwości w odpowiedzi na 30 i 60 mM KCl, a następnie, po przepłukaniu buforem Krebsa, wywołano skurcz krążków używając rosnących stężeń fenylefryny (0,01 – 1 μM) tak, aby osiągnęły 60-90% skurczu wywołanego przez 60 mM KCl. Tak obkurczone krążki poddano działaniu wzrastających stężeń acetylocholino (0,01 – 10 μM) uzyskując rozkurcz. Pozwoliło to na ocenę funkcji śródbłonna wyrażoną jako procent skurczu uzyskanego za pomocą fenylefryny. Następnie krążki przepłukano i po krótkim równoważeniu ponownie obkurczono fenylefryną, po czym poddano je działaniu rosnących stężeń nitroprusydku sodu (0,001 – 1 μM) oceniając zdolność krążków aortalnych do rozkurczu niezależnego od śródbłonna.

### **3.3.4 *Efekt krótkotrwałej infuzji 4PYR na funkcję układu sercowo – naczyniowego w modelu perfundowanego serca szczura.***

#### *3.3.4.1 Perfuzja serc szczura w układzie Langendorffa*

Serca pobrano od znieczulonych szczurów i natychmiast umieszczono je w buforze Krebsa – Henseleita (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,4 mM CaCl<sub>2</sub>, i 11 mM glukoza, pH 7,4) o temperaturze 4°C. Następnie wypreparowano aortę, do której wprowadzono kaniulę aparatu do perfuzji. Połączenie aorty z kaniulą zabezpieczono pętlą w taki sposób aby zaciśnięta była część wstępująca aorty pomiędzy ujściem tętnic wieńcowych, a ujściem pnia ramiennie – głowowego. Układ do perfuzji składał się z termostatowanej kolumny

o wysokości 1 metra wypełnionej buforem Krebsa – Henseleita o temperaturze 37°C oraz pompy perystaltycznej połączonej z kolumną dwoma drenami, z których jeden zapewniał dopływ 2mM 4PYR rozpuszczonego w buforze Krebsa - Henseleita, drugi natomiast doprowadzał czysty bufor stanowiący kontrolę. Perfuzja buforem z 4PYR następowała poprzez natychmiastowe przełączenie drenów. Przepływ z pompy perystaltycznej stanowił 5% całkowitego przepływu wieńcowego mierzonego na kolumnie z buforem za pomocą przepływomierza elektromagnetycznego. W efekcie, po włączeniu przepływu 2 mM 4PYR, jego stężenie w buforze przepływającym przez serce wynosiło 100 µM. Bufor perfundujący serce uprzednio przefiltrowano przez filtr o wielkości porów 0,45 µm i stale gazowano karbogenem (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>)<sup>[102]</sup>.

W pierwszym etapie po podłączeniu do systemu następował 15 minutowy okres pracy serca bez obciążenia lewej komory, mający na celu jego zrównoważenie. Następnie wykonano dwukrotny pomiar funkcji serca opisany szczegółowo w punkcie 3.3.4.2. Po krótkotrwałym równoważeniu, wprowadzony wcześniej do lewej komory balon wypełniono wodą do momentu osiągnięcia 5 mmHg ciśnienia końcoworozkurczowego. W takich warunkach perfundowano serce wstępnie przez 5 minut podając z pompy perystaltycznej bufor Krebsa – Henseleita, a następnie przez kolejne 5 minut perfundowano serce buforem z dodatkiem 4PYR. Po upływie tego czasu przywrócono 100% przepływ buforu perfundującego i wykonano podwójny pomiar funkcji mechanicznej serca. Następnie, po krótkotrwałym zrównoważeniu, serca zamrażano poprzez zaciśnięcie w aluminiowych blokach o temperaturze ciekłego azotu. Pobrany materiał poddano liofilizacji, a następnie umieszczono w -80°C. W takich warunkach materiał przechowywano do dalszych analiz.

#### 3.3.4.2 *Ocena funkcji mechanicznej oraz przepływu wieńcowego w modelu perfundowanego serca szczura*

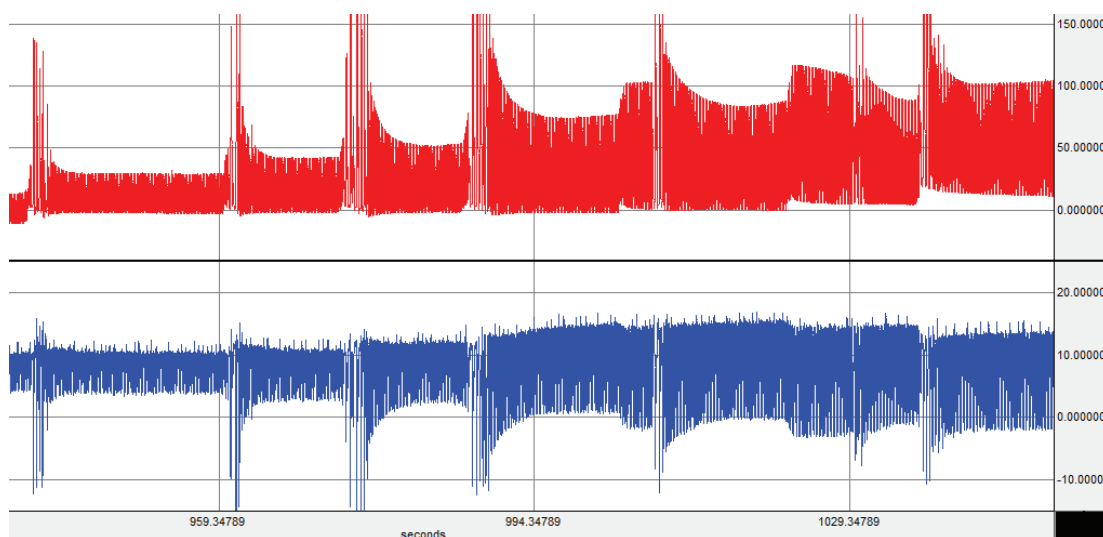
W ciągu pierwszych 15 minut perfuzji w lewej komorze serca, poprzez nacięcie uszka lewego przedsionka i zastawkę mitralną, umieszczono balon z folii PCV połączony z elastycznym drenem, którego koniec podłączono do przetwornika ciśnienia krwi (TSD 104A). Układ zakończono zaworem trójdrożnym umożliwiającym napełnienie balonu odgazowaną wodą. Otwarcie zaworu umożliwiało swobodny odpływ wody, podczas gdy jego zamknięcie skutkowało utrzymaniem w układzie ustalonego ciśnienia wody.



Pomiar funkcji mechanicznej lewej komory serca rozpoczynał się od wypełnienia balonu wodą tak, aby ciśnienie końcoworozkurczowe nie przekroczyło wartości 40 mmHg. Istotnym elementem była wielkość balonu, na tyle duża, aby po wprowadzeniu maksymalnej objętości wody ciśnienie końcoworozkurczowe było wynikiem napięcia ścian serca, a nie sztywności balonu. Tak przygotowany układ opróżniano poprzez otwarcie zaworu i umożliwienie swobodnego odpływu wody, doprowadzając ciśnienie w komorze serca do zera. Następnie zawór zamykano i wprowadzano co 15 sekund 50 mikrolitrowe objętości wody wypełniając balon aż do uzyskania ciśnienia końcoworozkurczowego 40 mmHg, po czym otwierano zawór pozwalając na wypłynięcie nadmiaru wody z układu. Czynność tą powtarzano dwukrotnie, co stanowiło jeden pomiar funkcji serca. Odpływ wody po pomiarze odbarczał lewą komorę serca. W efekcie następowało nagłe zwiększenie przepływu wieńcowego, a zarazem siły ścinającej wywieranej na ściany naczynia (*Shear Stress*), czynnika stymulującego śródbłonek naczyniowy do wydzielania tlenu azotu. Maksymalny przepływ wieńcowy uzyskany po odbarczeniu lewej komory był zatem podstawą oceny funkcji śródbłonek naczyń wieńcowych.

Przepływ wieńcowy monitorowano za pomocą przepływomierza (MDL 1401) z czujnikiem elektromagnetycznym Skalar (AGM Medical Systems). Zarówno czujnik ciśnienia jak i przepływomierz podłączono do przetwornika danych systemu rejestrującego Biopac Systems MP100 zintegrowanego z programem komputerowym do rejestracji danych Biopac Acq 3.9.1.6. Umożliwiało to jednocześnie monitorowanie w czasie rzeczywistym oraz rejestrację i późniejszą obróbkę danych. Przykładowy wykres tworzony przez program komputerowy przedstawiający zmiany ciśnienia w lewej komorze serca oraz zmiany przepływu wieńcowego w czasie przedstawiono na rycinie 3.





**Ryc. 3** Wykres przedstawiający zmiany ciśnienia wywieranego przez ściany komory serca na balonik z wodą podczas procedury napełniania (mmHg) (górny panel) oraz obrazujący aktualny przepływ wieńcowy (ml/min.) (dolny panel) rejestrowany w czasie rzeczywistym w programie Acq Knowledge.

### 3.4 Przygotowanie materiału biologicznego do analizy z wykorzystaniem HPLC

#### 3.4.1 *Ekstrakcja tkanek zwierzęcych*

Wszystkie pobrane od zwierząt tkanki przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , a przed ekstrakcją liofilizowano. Liofilizaty, po zważeniu, umieszczano w homogenizatorze, a następnie dodawano  $0,4\text{ M HClO}_4$  o temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  w stosunku wagowo – objętościowym 1:25. Do homogenizacji użyto homogenizatora szklanego. Podczas homogenizacji dolną część homogenizatora umieszczano w lodzie zapewniając ciągle chłodzenie preparatu. Następnie homogenaty przenoszono do próbek typu Eppendorf i odwirowywano (10 min.,  $4^{\circ}\text{C}$  przy 14000 obr./min., Universal 320R, Hettich). Uzyskane supernatanty zbierano, po czym doprowadzono do  $\text{pH} = 6,5$  za pomocą  $2\text{ M KOH}$  i umieszczano w lodzie na 15 minut. Po upływie tego czasu ekstrakty ponownie odwirowywano (5 min.  $4^{\circ}\text{C}$ , 14000 obr./min.) w celu oddzielenia nierozpuszczalnego osadu  $\text{KClO}_4$ . Zebrane supernatanty poddano analizie przy użyciu HPLC.

### 3.4.2 *Ekstrakcja pełnej krwi i osocza*

Krew pobraną od zwierząt oraz osocze poddawano kwaśnej ekstrakcji dodając w stosunku objętościowym 1:1 1,3 M HClO<sub>4</sub>. Po 15 – minutowej inkubacji w lodzie ekstrakt odwirowano w 4°C przy 14000 obr./min. przez 15 min. Następnie do supernatantu dodawano 3 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> doprowadzając do pH = 6,5. Próbki ponownie umieszczono w lodzie na 15 min. Tak przygotowane ekstrakty odwirowano przy 14000 obr./min. przez 5 min. w temperaturze 4°C, aby oddzielić wytrącony KClO<sub>4</sub>. Supernatanty poddano analizie przy użyciu HPLC.

### 3.4.3 *Ekstrakcja płukanych erytrocytów*

Krew pobierano z żyły biodrowej wspólnej (*v. iliaca communis*), lub w przypadku pobrań przeżyciowych, z żyły odpiszczelowej (*v. saphena*). Jedną porcję krwi poddawano ekstrakcji opisanej powyżej, pozostałą część natomiast przenoszono do probówek typu Eppendorff i odwirowywano przez 5min. przy 3000 obr/min. (wirówka Hettich Universal 320R). Oddzielone osocze zbierano do oddzielnych probówek do dalszej ekstrakcji. Pozostałe erytrocyty, po usunięciu powierzchniowej warstwy białokrwinkowej, płukano buforem zawierającym 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM glukozy, 24 mM HEPES o pH 7,4. Powstałą mieszaninę wirowano przez 5 min. przy 3000 obr/min. Płukanie przeprowadzono dwukrotnie w celu usunięcia pozostałości osocza. W otrzymanej zawieszynie erytrocytów oznaczono hematokryt (kapilary hematokrytowe Medlab, wirówka hematokrytowa MPW-215), w celu ustalenia ilości erytrocytów w badanej próbce. Następnie erytrocyty poddawano kwaśnej ekstrakcji dodając w stosunku objętościowym 1:1 2,4 M HClO<sub>4</sub> i energicznie wstrząsając. Próbki umieszczono w lodzie i po 15 minutach odwirowano w 4°C przy 14000 obr./min. przez 15 min. (Universal 320R, Hettich). Po odwirowaniu zbierano supernatant doprowadzając go do pH = 6,5 za pomocą 3 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Próbki ponownie umieszczano w lodzie na 15 min. Po upływie tego czasu ekstrakty odwirowywano w 4°C przy 14000 obr./min. w czasie 5 min. Uzyskany supernatant analizowano z użyciem HPLC.

#### **3.4.4 *Ultrafiltracja moczu***

Rozcieńczony pięciokrotnie wodą mocz poddawano ultrafiltracji z użyciem filtrów wirówkowych Sartorius Vivaspin 500 o zdolności filtracji do 10 kD. Próbki odwirowywano przy 14000 obr./min. przez 30 minut w temperaturze 4°C. Filtraty zebrano i poddano analizie z użyciem HPLC.

## 3.5 Metody analityczne

### 3.5.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV

#### 3.5.1.1 Analiza próbek materiału biologicznego

Oznaczenie stężeń 4PYR, 4PYMP, 4PYTP oraz 4PYRAD, jak również stężenia nukleotydów purynowych (ATP, GTP),  $\text{NAD}^+$  oraz ich metabolitów wykonano w oparciu o technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV.

System chromatograficzny (HP-Agilent 1100) składał się z kolejno połączonych elementów: degazera, pompy wysokociśnieniowej, autosamplera z chłodzeniem ( $4^{\circ}\text{C}$ ), kolumny analitycznej o wymiarach 150mm/4,9mm z wypełnieniem typu odwróconej fazy (Hypersil C18-BDS) firmy Phenomenex o wielkości ziarna  $3\ \mu\text{m}$  umieszczonej w termostacie ( $23^{\circ}\text{C}$ ), detektora DAD, komputera PC z oprogramowaniem analitycznym HP ChemStation umożliwiającym rejestrację oraz jakościową i ilościową analizę danych.

Rozdział próbki zachodził przy zmieniającym się składzie eluentu. Bufor A składał się z 122 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM KCl, 28 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Bufor B wykonano poprzez dodanie 15% acetonitrylu do buforu A. Przebieg gradientu był następujący: 0,0 min. – 0% B; 0,1 min. – 0,1% B; 3,3 min. – 3,0% B; 7,3 min. – 35,0% B; 8,3 min. – 100,0% B; 10,5 min. – 100,0% B; 10,6 min. – 0,0% B. Czas rozdziału wynosił 13,5 min. przy szybkości przepływu eluentu wynoszącej 0,9 ml/min. i ciśnieniu  $180\div 200$  bar. Objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła, zależnie od analizowanego materiału,  $5\div 10\ \mu\text{l}$ . Każdą analizę (serię próbek) poprzedzał i kończył nastrzyk mieszaniny wzorcowej zawierającej 19 znanych związków w określonych stężeniach, które wyflukiwane były z kolumny analitycznej w kolejności: fosfokreatyna, kreatyna, GTP, GDP, kwas moczowy, GMP, IMP, ATP, ADP, hipoksantyna, ADPR, ksantyna, AMP,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NAD}^+$ , adenina, inozyna, guanozyna i adenozyne. Oprócz standardowego roztworu wzorcowego nastrzykiwano również wzorzec 4PYR, 4PYMP, 4PYTP oraz wzorzec 4PYRAD wyizolowany z krwi szczurzej inkubowanej z 4PYR. Analiza jakościowa przeprowadzona była w oparciu o czas retencji oraz spektrum absorbancji badanego związku w porównaniu z wzorcem. Analiza ilościowa przeprowadzona została w oparciu o proporcjonalne przeliczenie

pola powierzchni pod krzywą szczytu chromatograficznego (*chromatographic peak*) w porównaniu do pola powierzchni pod krzywą szczytu standardu<sup>[103]</sup>.

### **3.5.2 Izolacja i identyfikacja 4PYRAD**

#### **3.5.2.1 Izolacja 4PYRAD**

Izolacja 4PYRAD, zsyntetyzowanego po inkubacji erytrocytów z 4PYR, wymagała, w pierwszej kolejności, chromatograficznego oddzielenia tego związku od innych substancji zawartych w ekstrakcie erytrocytów (Ryc. 4). Wstępnego oczyszczenia i zebrania frakcji dokonano przy użyciu metody analitycznej opisanej w punkcie 3.5.1. Frakcję zawierającą 4PYRAD zbierano w oparciu o czas retencji przy użyciu połączonego z systemem chromatograficznym kolektora frakcji (Jaytee 5512, Jaytee Biosciences). Zebrane frakcje połączone i zagęszczono poprzez 24 godziną liofilizację.

W drugim etapie zagęszczone frakcje poddane zostały oczyszczaniu w innym układzie chromatograficznym. Celem tego etapu było pozbycie się soli fosforanowych i potasowych oraz dokładna izolacja 4PYRAD. Zastosowano układ dwóch buforów. Bufor A stanowił 8mM octan amonu, natomiast bufor B składał się z 15% acetonitrylu rozpuszczonego w buforze A. Rozdział polegał na zmieniającym się gradientowo składzie buforów i trwał 10 minut przy przepływie 0,9 ml/min. i ciśnieniu 100÷120 bar. Gradient buforów rozpoczynał się od 100% buforu A, po czym udział procentowy buforu B w eluencie wzrastał liniowo, osiągając 100% w 6 minucie. Do rozdziału zastosowano kolumnę analityczną o wymiarach 150mm/4,9mm z wypełnieniem typu odwróconej fazy (Hypersil C18-BDS) firmy Phenomenex o wielkości ziarna 3 µm umieszczoną w termostacie (18°C). Frakcję zawierającą 4PYRAD zbierano przy użyciu kolektora frakcji, po czym odparowano rozpuszczalniki organiczne poprzez 24 godziną liofilizację. Czystość i zgodność związku poddanego oczyszczaniu porównano z tym pochodzącym z ekstraktów erytrocytów za pomocą metody analitycznej HPLC (Ryc. 5). Oczyszczony związek poddano również analizie masowej LC/MS (TOF) i <sup>1</sup>H NMR.

### 3.5.2.2 *Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją masową.*

Analizę dokładnej masy wyizolowanej substancji przeprowadzono z zastosowaniem systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detektorem masowym typu czasu przelotu. System chromatograficzny stanowił chromatograf Dionex Ultimate 3000. Detektor masowy to MicroTOF QII firmy Bruker wyposażony w źródło jonów Apollo typu ESI. Analizę prowadzono z zastosowaniem kolumny analitycznej 150mm/4,9mm z wypełnieniem typu odwróconej fazy (Hypersil C18 – BDS) firmy Phenomenex o wielkości ziarna 3  $\mu\text{m}$  umieszczonej w termostacie (18°C). Fazę ruchomą stanowił 10 mM octan amonu jako faza A oraz acetonitryl jako faza B. Gradient przebiegał liniowo od 0% do 100% fazy B w czasie 10 min.

### 3.5.2.3 *Analiza $^1\text{H NMR}$*

Potwierdzenie struktury chemicznej nowo odkrytego związku wykonano w pracowni jądrowego rezonansu magnetycznego Międzywydziałowego Laboratorium NMR Politechniki Gdańskiej. Badania obejmowały analizę spektrometryczną 1D i 2D ( $^1\text{H}$  i gCOSY). Widma wykonano przy użyciu spektrometru Varian Unity 500 plus w temperaturze pokojowej w roztworze  $\text{D}_2\text{O}$ . Do zakwaszenia roztworów użyto kwasu trifluorooctowego (TFA).

### 3.6 Materiały i odczynniki

4PYR wykorzystany we wszystkich eksperymentach otrzymano na drodze syntezy chemicznej wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przed dr Czesławę Orlewską. Struktura i czystość związku potwierdzono metodami HPLC i NMR <sup>[47]</sup>.

KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, octan amonu i acetonitryl niezbędne do przygotowania buforów do wysokosprawnej chromatografii cieczowej pochodziły z firmy Merck.

HClO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KOH, KCl, MgSO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, NaCl i cytrynian sodu służące do inkubacji, ekstrakcji i homogenizacji tkanek oraz do przygotowania buforu do perfuzji serc pochodziły z firmy AnaLaR.

Glukoza oraz NaHCO<sub>3</sub> służące do przygotowania buforu do perfuzji serc w systemie Langendorfa pochodziły z firmy POCH S.A.

Fizjologiczny 0,9% roztwór NaCl (nazwa handlowa: Injectio Natrii Chlorati Isotonica) wykorzystywany jako rozpuszczalnik oraz roztwór kontrolny do wstrzyknięć i infuzji pochodził z firmy Polpharma.

Jako antykoagulantu używano komercyjnego roztworu heparyny sodowej o aktywności 5000 j.m./ml (Heparinum WZF).

Pozostałe odczynniki używane w trakcie badań naukowych pochodziły z firmy Sigma – Aldrich.

Woda wykorzystywana we wszystkich eksperymentach i analizach oczyszczana była w czteroetapowym procesie. Kolejne etapy stanowiły: filtracja mechaniczna, demineralizacja (żywica jonowymienna i odwrócona osmoza) oraz końcowe oczyszczenie za pomocą kompleksowego systemu do produkcji wody o wysokiej czystości firmy Barnstead.

### 3.7 Metody statystyczne

Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD), lub średnie  $\pm$  błąd standardowy (SEM).

W celu ustalenia istotności statystycznej obserwowanych różnic pomiędzy dwiema grupami użyto niesparowanego testu t-Studenta. Analiza różnic poprzedzona była testem rozkładu Shapiro – Wilka. Jedynie w eksperymencie badającym napięcie krążków aortalnych rozkład normalny sprawdzony został testem D'Agostino & Pearson. W przypadku porównywania więcej niż 2 grup przeprowadzono analizę wariancji (one-way ANOVA) oraz analizę testem „post-hoc” Student-Newmann-Keuls w celu identyfikacji indywidualnych różnic.

Analizy statystyczne wykonano przy użyciu programu SigmaStat.



## 4. WYNIKI

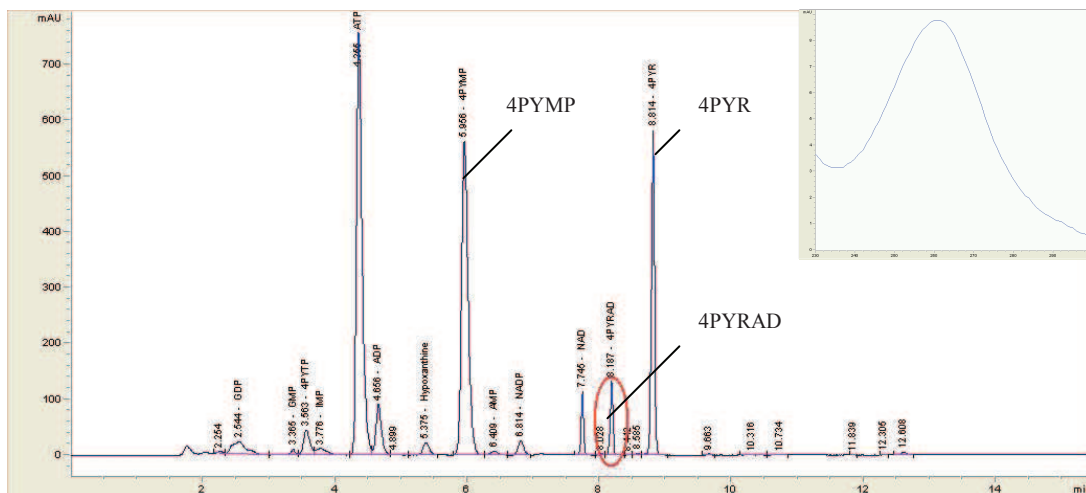
### 4.1 Identyfikacja i powstawanie 4PYRAD

#### 4.1.1 Identyfikacja 4PYRAD

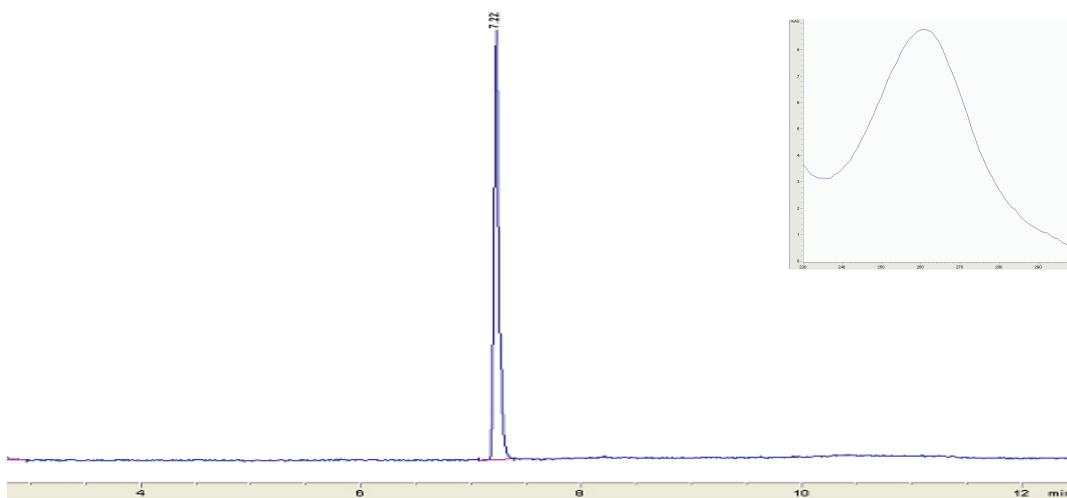
W ekstraktach erytrocytów inkubowanych z 4PYR oprócz znanych nukleotydowych pochodnych 4PYR – 4PYMP i 4PYTP – zaobserwowano obecność niezidentyfikowanego piku, który w zastosowanym układzie chromatograficznym wypłukiwany był z kolumny w czasie zbliżonym do  $\text{NAD}^+$ . Jednocześnie jego spektrum absorpcji w UV nie pokrywało się z żadnym z grupy związków stanowiących wzorce (Ryc. 4).

W celu jego identyfikacji zastosowano dwuetapowy układ chromatograficzny, który umożliwił otrzymanie związku o czystości 99,9% (Ryc. 5). Analiza oczyszczonego związku z wykorzystaniem systemu LC/MS pozwoliła na określenie stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ), który w pozytywnej jonizacji wynosił 680,111 (Ryc. 6). Odpowiada to rzeczywistej masie molowej równej 679,111 g/mol i związkowi o sumarycznym wzorze  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{15}\text{P}_2$ .

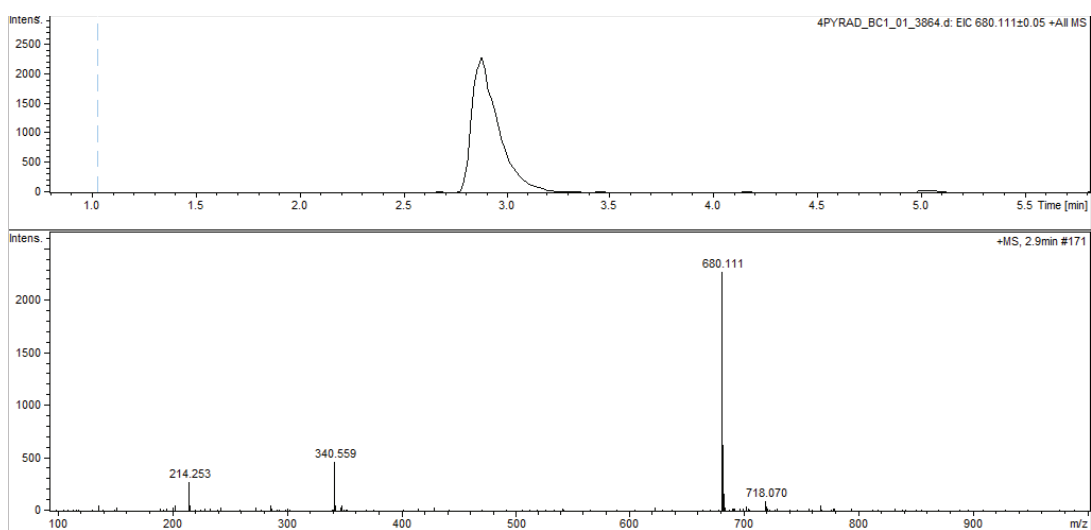
Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H NMR}$ ) pozwoliły na identyfikację podstawowych struktur wzoru sumarycznego, do których należą fragmenty pirydoniowy i purynowy oraz struktura cukrowa. (Ryc. 7) Wykazano również znaczne podobieństwo do związków wzorcowych: 4PYR i  $\text{NAD}^+$  (Ryc. 8). Analizy wykazały, że badany związek jest analogiem  $\text{NAD}^+$  (Ryc. 9 A), w którym NMN zastąpiony został przez 4PYMP (Ryc. 9 B i 9 C). Nazwa nowo zidentyfikowanego związku według Międzynarodowego Związku Chemii Czystej i Stosowanej (*International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*) to: {[ (2R, 3S, 4R, 5R) – 5 – (6 – aminopurin – 9 – yl) – 3, 4 – dihydroxyoxolan – 2 – yl] methoxy – hydroxy – phosphoryl} [(2R, 3S, 4R, 5R) – 5 – (3 – carbamoyl – 4 – oxopyridin – 1(4H) – yl) – 3, 4 – dihydroxyoxolan – 2 – yl] methyl hydrogen phosphate; skrócona: 4-oxo-1,4-dihdropyridine-3-carbo xamide adenine dinucleotide. Proponowana przez nas nazwa skrócona: dinukleotyd 1- $\beta$ -D-rybofuranozyl-4-pirydono-3-karboksyamidoadeninowy, a proponowany skrót: 4PYRAD. Wzór strukturalny przedstawiono na ryc. 9.



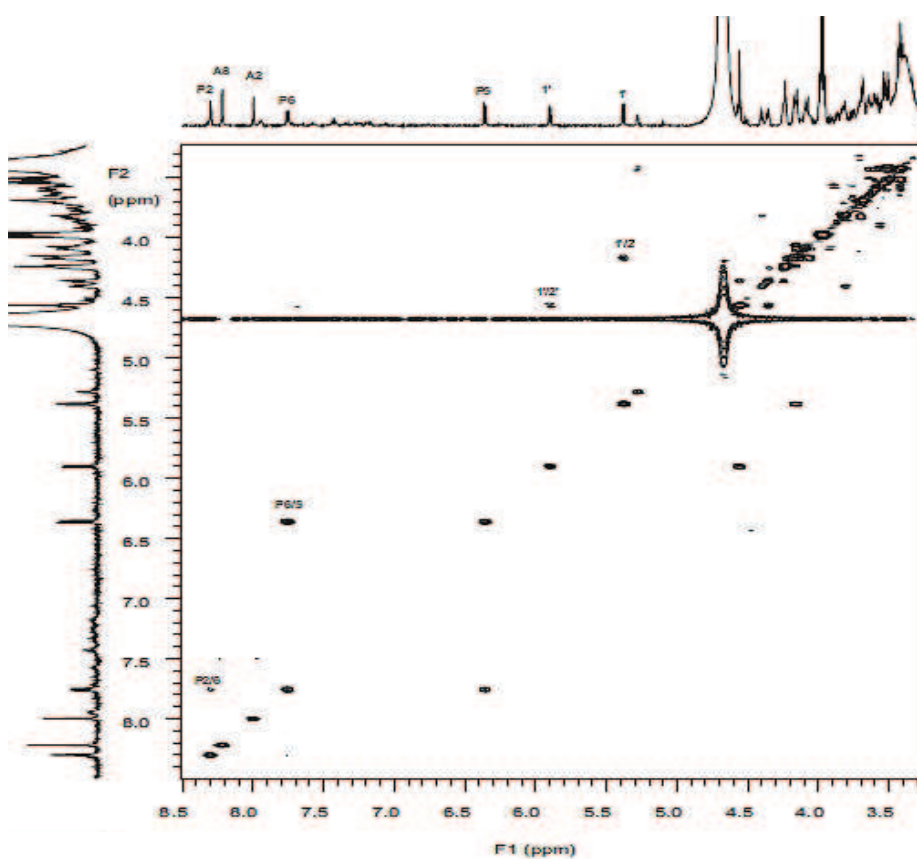
**Ryc. 4.** Chromatogram z analizy ekstraktu erytrocytów inkubowanych z 4PYR wykonywanej przy użyciu HPLC. Pętlą oznaczono pik odpowiadający nowemu metabolitowi powstającemu w czasie inkubacji.



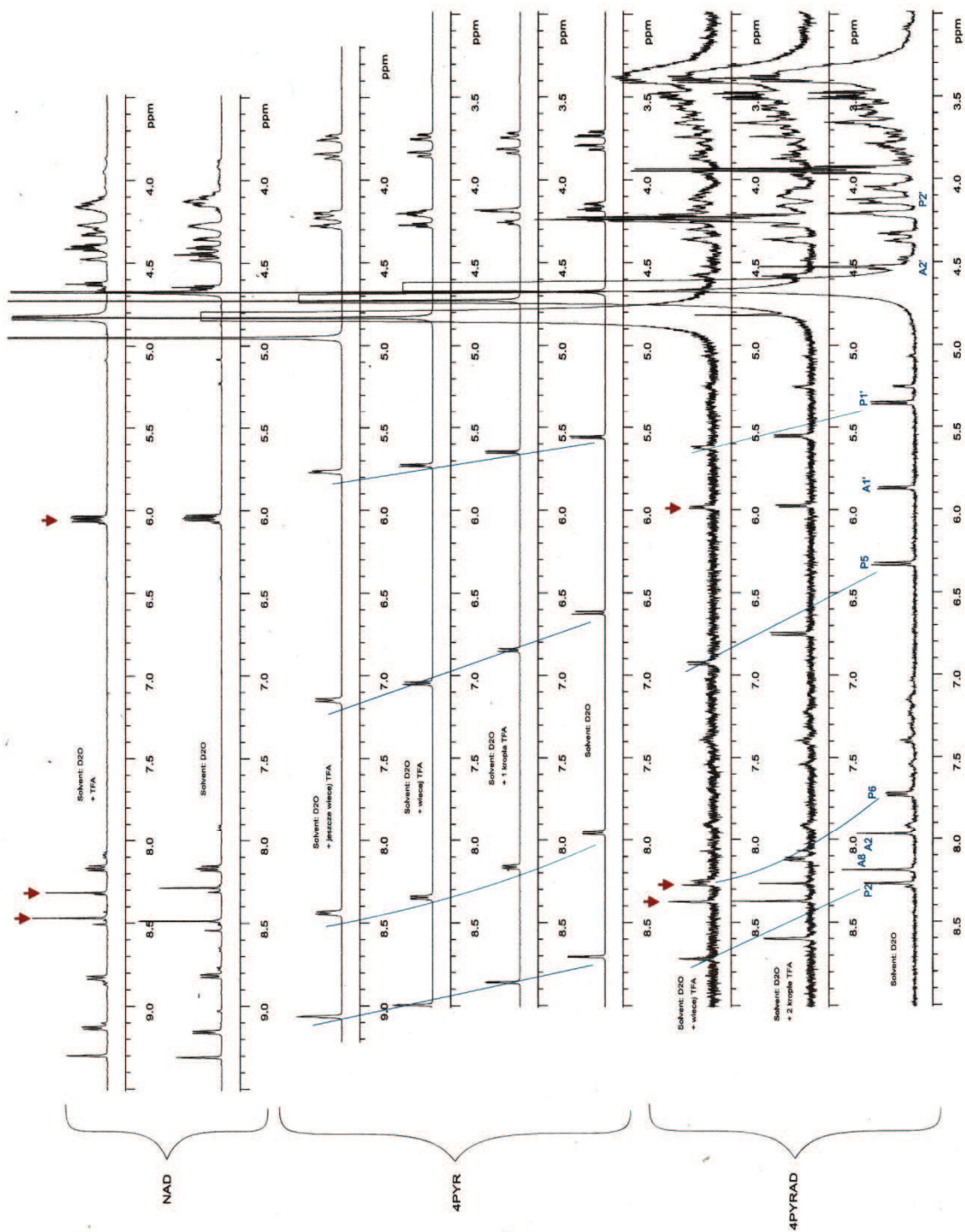
**Ryc. 5.** Chromatogram HPLC i spektrum UV nowego związku otrzymanego po procedurze oczyszczenia. Czystość wyizolowanego związku wynosiła 99,9%.



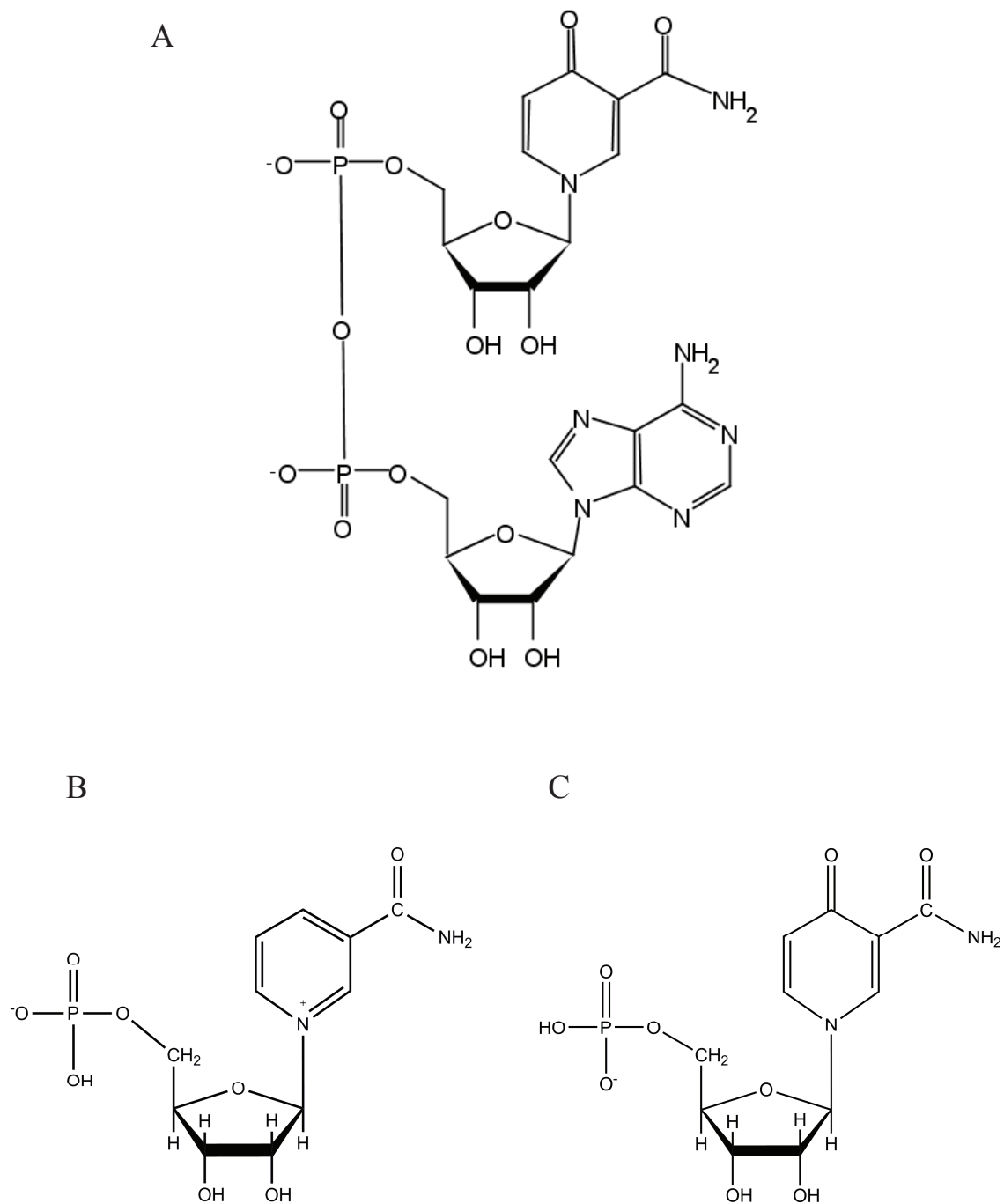
Ryc. 6. Chromatogram z analizy LC/MS dla oczyszczonego związku przy zastosowaniu jonizacji pozytywnej.



Ryc. 7. Widmo gCOSY uzyskane dla 4PYRAD metodą NMR.



Ryc. 8. Wpływ zakwaszania roztworu na obraz widm  $^1\text{H}$  NMR w  $\text{D}_2\text{O}$ :  $\text{NAD}^+$ , 4PYR oraz próbki zawierającej oczyszczony związek.



**Ryc. 9.** Wzór strukturalny 4PYRAD (A), NMN (B) oraz 4PYMP (C).

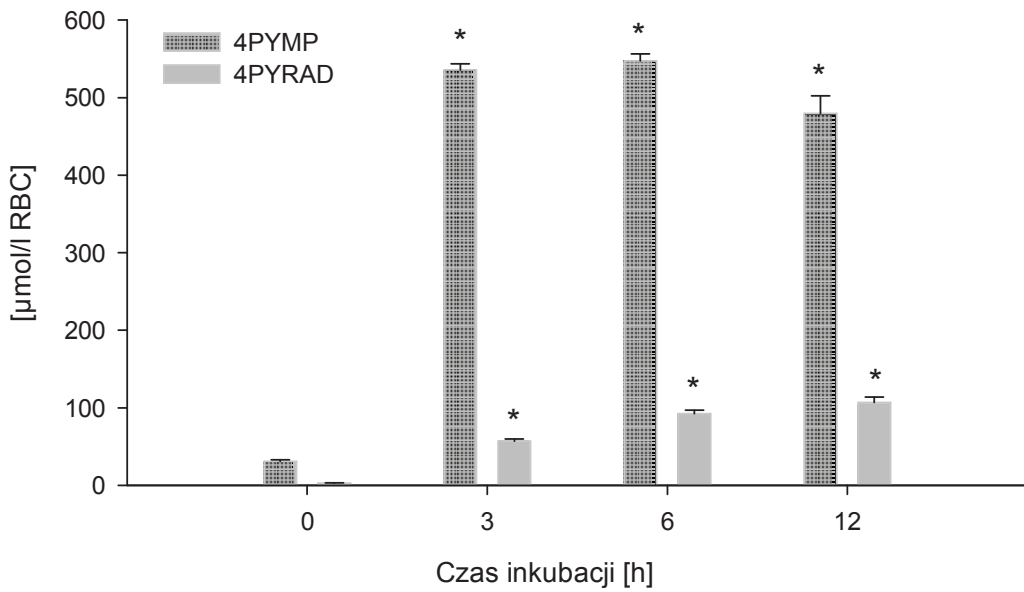
#### 4.1.2 *Metabolizm 4PYRAD w ludzkich erytrocytach*

W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę stężenia powstającego 4PYRAD w erytrocytach w zależności od czasu inkubacji i zastosowanego stężenia 4PYR. Analiza ekstraktów ludzkich erytrocytów inkubowanych przez 12 godzin z 300  $\mu\text{M}$  4PYR wykazała wzrost stężenia 4PYRAD, które osiągnęło najwyższą wartość w 6 i 12 godzinie inkubacji (odpowiednio:  $92,3 \pm 0,6 \mu\text{mol/l RBC}$  oraz  $106 \pm 7,1 \mu\text{mol/l RBC}$ ). Zaobserwowano również wzrost stężenia 4PYMP, które w 6 godzinie inkubacji osiągnęło  $547 \pm 8,7 \mu\text{mol/l RBC}$ , po czym w 12 godzinie inkubacji nastąpił jego spadek do wartości  $480 \pm 22,3 \mu\text{mol/l RBC}$ . Przebieg zmian stężenia obu związków podczas inkubacji erytrocytów z 4PYR przedstawiono na rycinie 10.

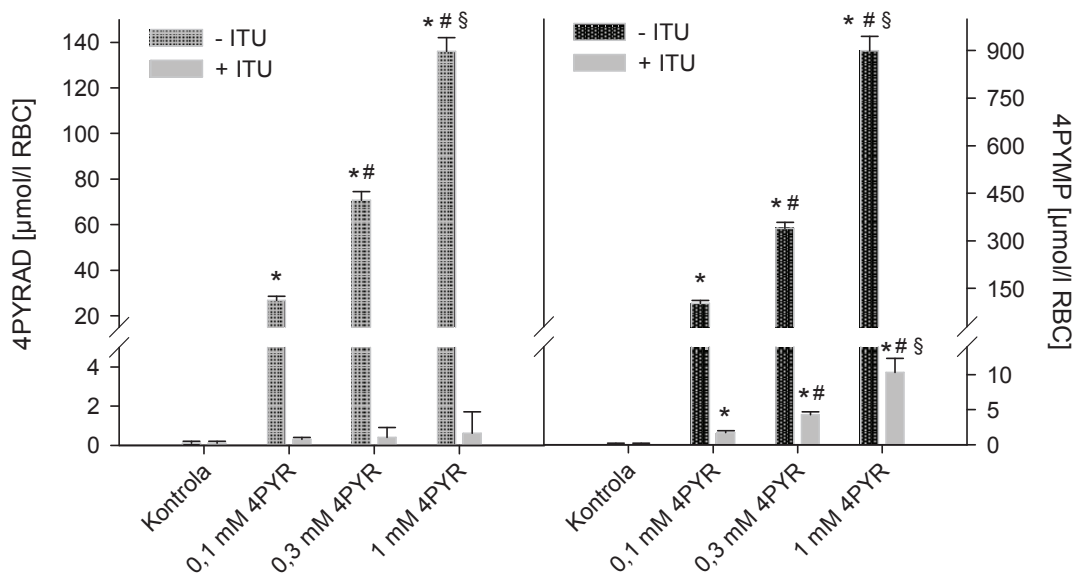
Trzygodzinna inkubacja ludzkich erytrocytów w obecności 4PYR w stężeniu 0,1 mM, 0,3 mM i 1 mM wykazała zależność pomiędzy szybkością reakcji powstawania 4PYRAD, a stężeniem 4PYR. Stężenia 4PYRAD wynosiły odpowiednio:  $26,8 \pm 1,7 \mu\text{mol/l RBC}$ ,  $70,6 \pm 3,9 \mu\text{mol/l RBC}$  oraz  $136,0 \pm 6,1 \mu\text{mol/l RBC}$ . W czasie reakcji powstał również 4PYMP w stężeniu, odpowiednio:  $102,6 \pm 9,4 \mu\text{mol/l RBC}$ ,  $339,6 \pm 18,5 \mu\text{mol/l RBC}$  oraz  $899 \pm 45,7 \mu\text{mol/l RBC}$ .

Wcześniejsze badania wykazały, że inkubacja erytrocytów w obecności 4PYR i ITU (inhibitora kinazy adenozyliny) powodowała niemal całkowite zahamowanie powstawania 4PYMP. Sprawdzone zatem, czy zastosowanie ITU zablokuje także powstawanie 4PYRAD. Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek inhibitora (ITU) spowodował brak istotnego wzrostu stężenia 4PYRAD oraz niemal 100 krotnie niższy wzrost stężenia 4PYMP (Ryc. 11).

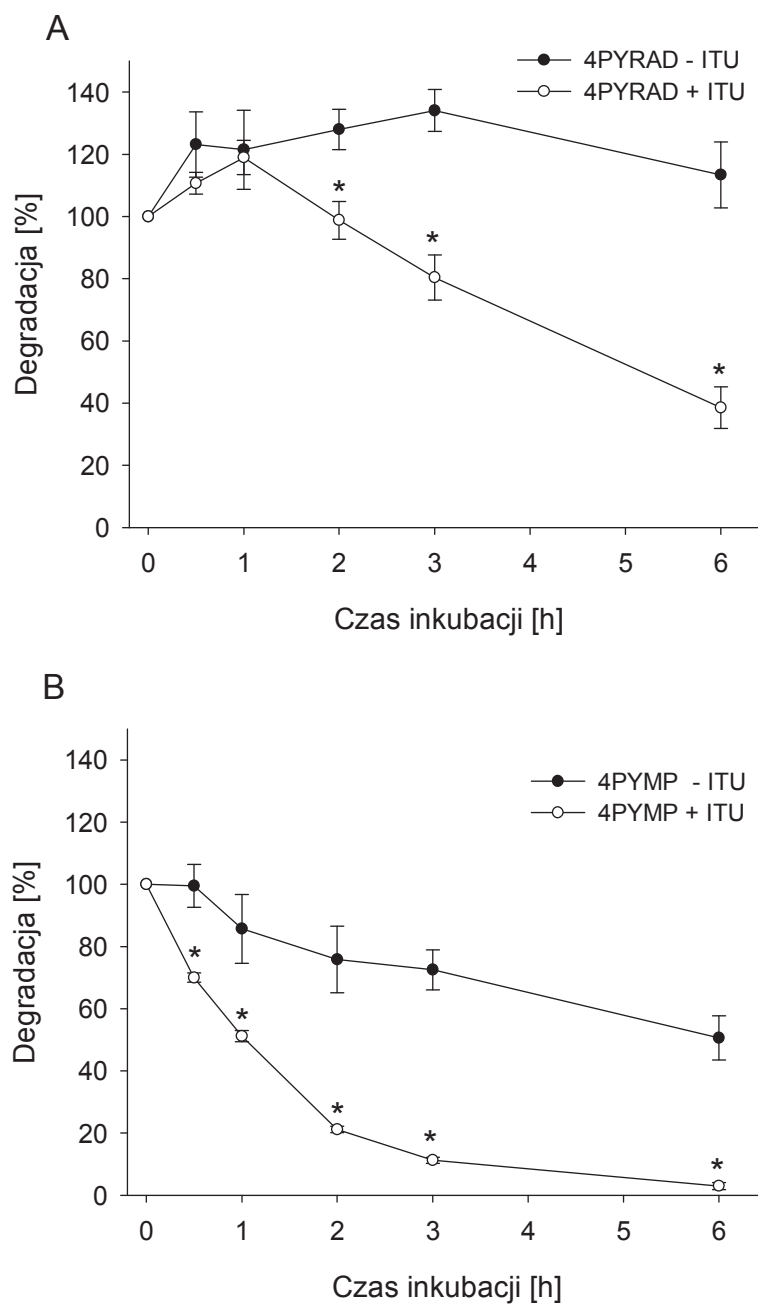
Degradację 4PYRAD i 4PYMP przeprowadzono po wcześniejszej inkubacji ludzkich erytrocytów z 300  $\mu\text{M}$  4PYR. W tym celu usunięto substrat z mieszaniny reakcyjnej. W grupie zawierającej ITU po 6 godzinnej inkubacji stężenie 4PYRAD i 4PYMP wynosiło  $38,5 \pm 6,7 \%$  oraz  $3,0 \pm 1,1 \%$  wartości stężenia początkowego. Tymczasem w grupie nie zawierającej ITU stężenie 4PYRAD wzrosło do  $113,4 \pm 10,6 \%$  natomiast stężenie 4PYMP osiągnęło  $50,6 \pm 7,1 \%$  wartości stężenia początkowego. Przebieg procesu degradacji obu związków przedstawiono na rycinie 12.



**Ryc. 10.** Stężenie 4PYRAD oraz 4PYMP w ludzkich erytrocytach w zależności od czasu inkubacji w obecności 300  $\mu\text{M}$  4PYR. Wyniki stanowią średnią ( $n = 3$ )  $\pm$  SD, (\*)  $p < 0,05$  vs. czas 0.



**Ryc. 11.** Stężenie 4PYRAD i 4PYMP w ludzkich erytrocytach podczas 3 godzinnej inkubacji w zależności od stężenia 4PYR w obecności i nieobecności 5'jodotubercydyny. Wyniki stanowią średnią ( $n = 3$ )  $\pm$  SD, (\*)  $p < 0,05$  vs. kontrola; (#)  $p < 0,05$  vs. 0,1 mM 4PYR; (§)  $p < 0,05$  vs. 0,3 mM 4PYR.



**Ryc. 12.** Degradacja metabolitów 4PYR: 4PYRAD (A) oraz 4PYMP (B) w erytrocytach ludzkich w zależności od czasu inkubacji w obecności i nieobecności 5'jodotubercydyny. Wyniki stanowią średnią ( $n = 3$ )  $\pm$  SD. (\*)  $p < 0,05$  vs. - ITU



## 4.2 Metabolizm 4PYR

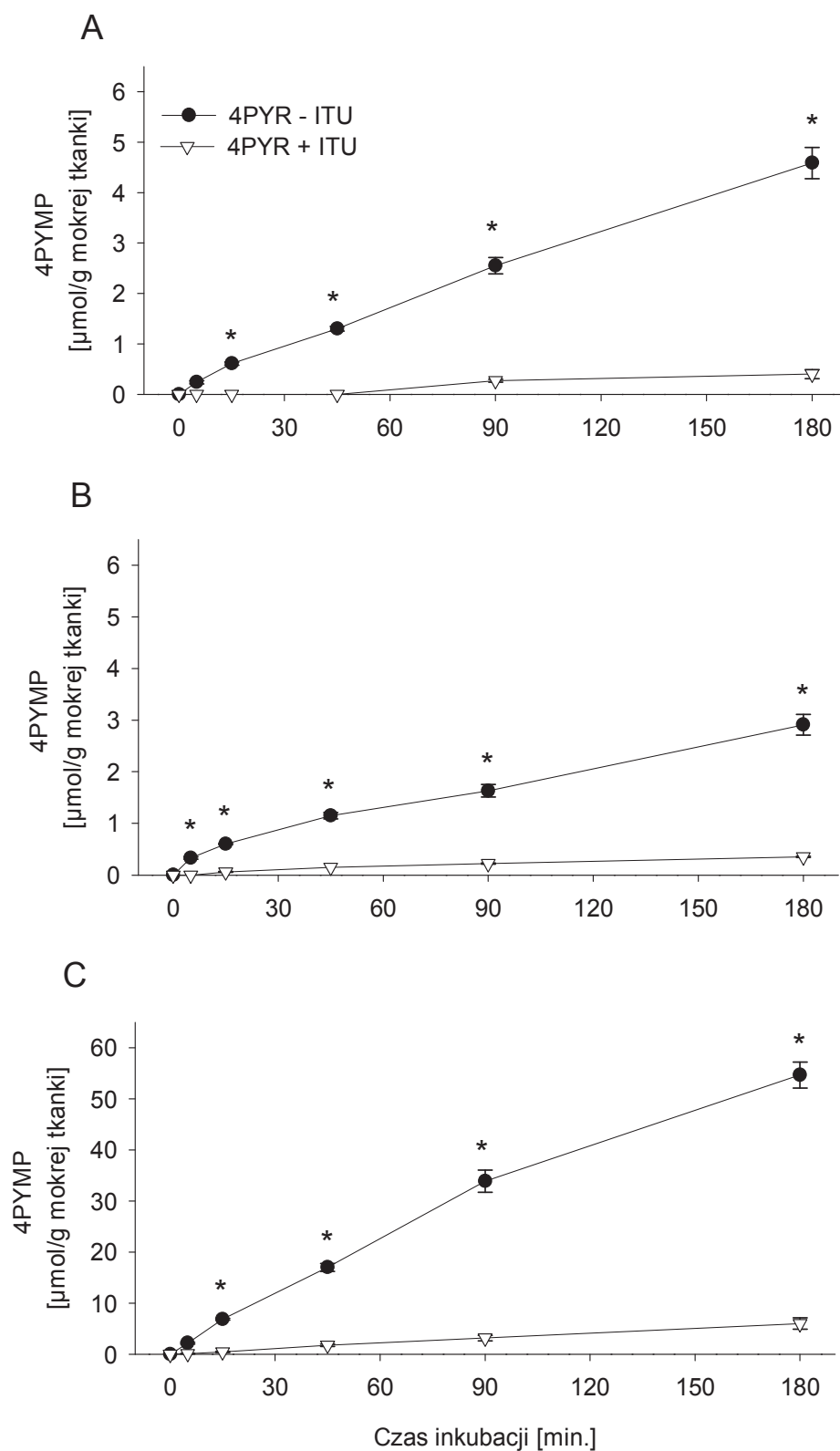
### 4.2.1 *Metabolizm 4PYR w homogenatach tkankowych szczura*

Podczas 3-godzinnej inkubacji homogenatów serca, nerki i wątroby z 300  $\mu\text{M}$  4PYR stężenie 4PYMP w mieszaninach inkubacyjnych wzrastało liniowo osiągając po 180 minutach w wyżej wymienionych tkankach odpowiednio stężenie  $4,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/g}$ ,  $2,9 \pm 0,2 \mu\text{mol/g}$  i  $54,6 \pm 2,5 \mu\text{mol/g}$  (Ryc. 13). Największą szybkość powstawania nukleotydu, wyrażoną w odniesieniu do 1 grama mokrej tkanki użytej do przygotowania homogenatów, zaobserwowano w homogenacie wątroby ( $390 \pm 27 \text{ nmol/g/min}$ ), natomiast w homogenatach serca i nerki szybkości reakcji były zbliżone i wyniosły, odpowiednio:  $34,3 \pm 4,3 \text{ nmol/g/min}$  i  $33,2 \pm 9,2 \text{ nmol/g/min}$ .

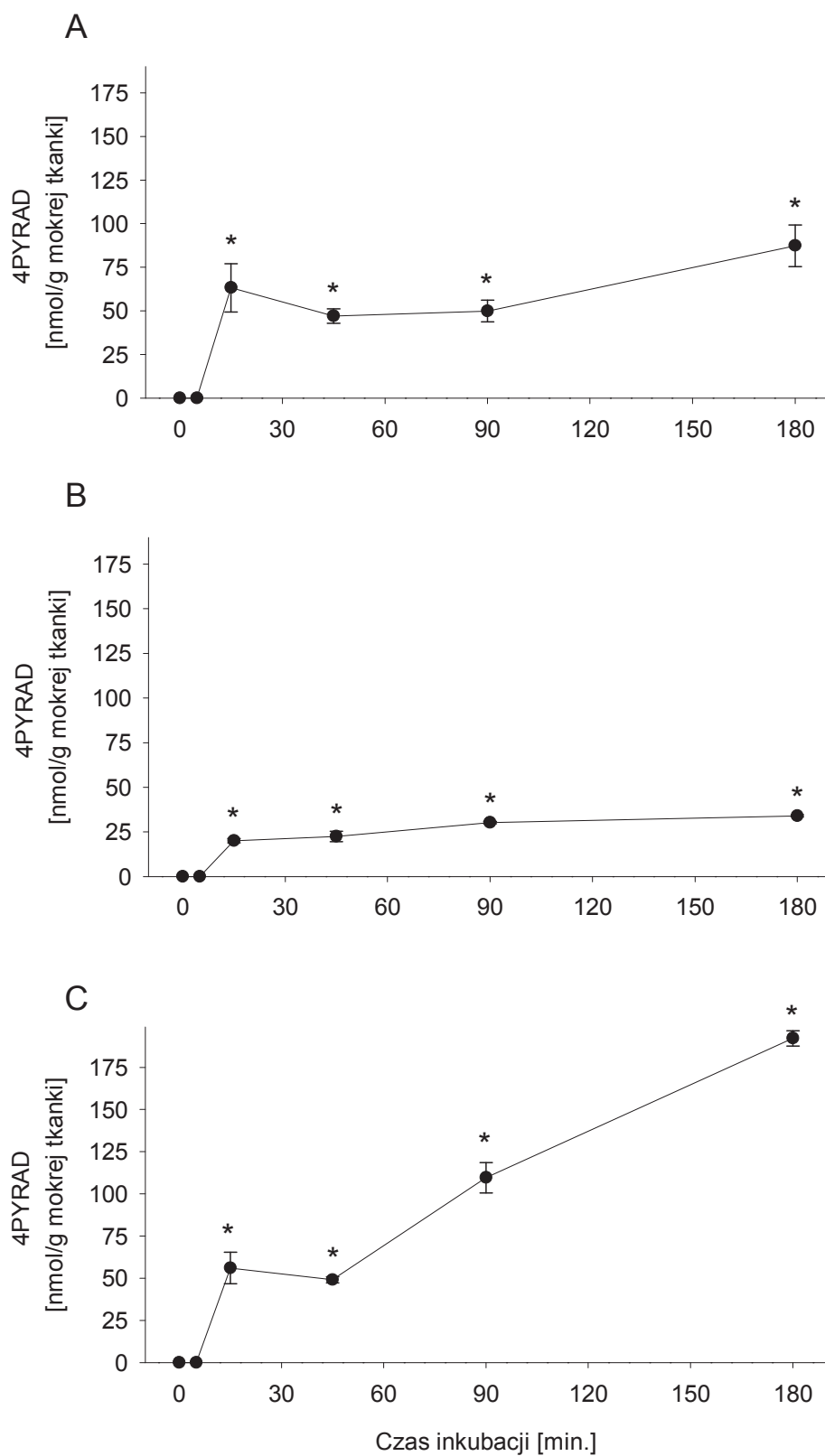
Dodanie inhibitora kinazy adenozyliny (ITU) do mieszanin inkubacyjnych spowodowało około dziesięciokrotny spadek szybkości reakcji fosforylacji 4PYR ( $2,7 \pm 0,6 \text{ nmol/g/min}$ ,  $2,4 \pm 0,1 \text{ nmol/g/min}$  oraz  $40,0 \pm 7,5 \text{ nmol/g/min}$  odpowiednio dla homogenatu serca, nerki i wątroby) (Ryc. 13).

W wyniku inkubacji z 4PYR w mieszaninach reakcyjnych powstawał również 4PYRAD, którego najwyższe stężenie,  $192,1 \pm 4,5 \text{ nmol/g}$ , zaobserwowano w homogenacie wątroby. Stężenie tego związku w homogenacie serca i nerki wyniosło odpowiednio:  $87,3 \pm 11,9 \text{ nmol/g}$  i  $33,9 \pm 0,5 \text{ nmol/g}$ . (Ryc. 14)

Nie zaobserwowano powstawania 4PYRAD w obecności 5'jodotubercydyny w żadnej z badanych tkanek.



**Ryc. 13.** Stężenie 4PYMP w homogenatach tkankowych szczura (A – serce, B – nerki, C – wątroba) inkubowanych z 300  $\mu\text{M}$  4PYR w 0, 5, 15, 45, 90 i 180 minucie inkubacji. Wyniki stanowią średnią ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  vs. + ITU.



**Ryc. 14.** Stężenie 4PYRAD w homogenatach tkankowych szczura (A – serce, B – nerki, C – wątroba) inkubowanych z 300  $\mu$ M 4PYR w 0, 5, 15, 45, 90 i 180 minucie inkubacji. Wyniki stanowią średnią ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  vs. czas 0.

## 4.2.2 *Metabolizm 4PYR u gryzoni in vivo*

### 4.2.2.1 *Metabolizm 4PYR w tkankach szczura*

Siedmiodniowa infuzja dootrzewnowa 4PYR u szczurów spowodowała stopniową akumulację 4PYR we krwi zwierząt. Maksymalne stężenie związku uzyskano w 7 dniu infuzji i wyniosło  $11,1 \pm 0,9$   $\mu\text{mol/l}$  w osoczu (Ryc. 15) i  $5,0 \pm 0,8$   $\mu\text{mol/l}$  RBC w erytrocytach (Ryc. 17 A). Bardzo niskie stężenie 4PYR uzyskane we krwi związane było z niezwykle dużym wydalaniem tego związku z moczem, w którym stężenie 4PYR osiągało wartości do 5 mmol/l. W związku z różnym stopniem zagęszczenia wydalanego moczu stężenia 4PYR zostały przeliczone na milimol kreatyniny. W szczycie wydalania, tj. w 3 dniu infuzji, stężenie 4PYR w moczu wzrosło ponad 400  $\mu\text{mol/mmol}$  kreatyniny, po czym w kolejnych dniach nieznacznie się obniżyło (Ryc. 16).

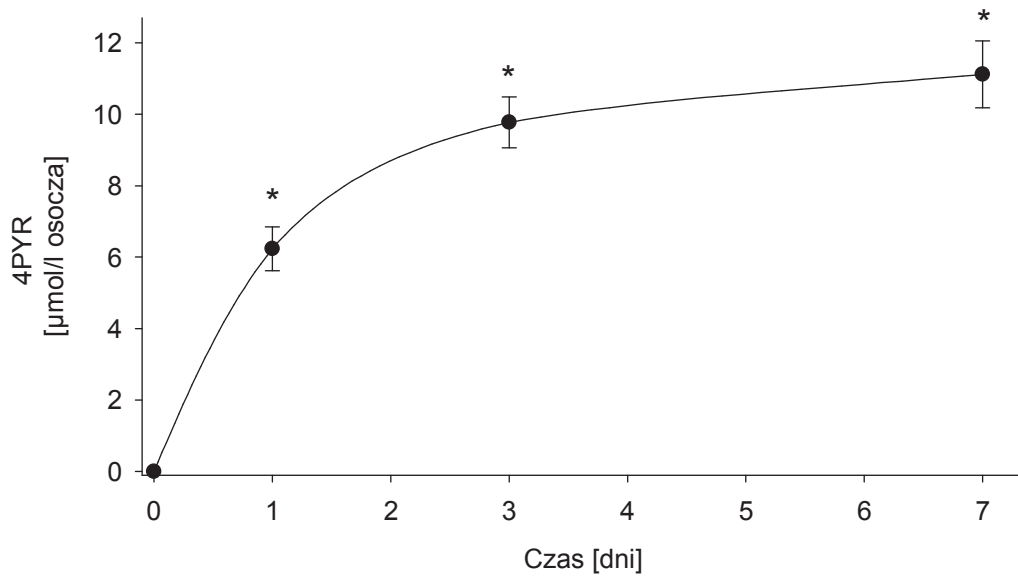
Najwyższe zanotowane stężenie 4PYMP w erytrocytach szczurów ( $61,3 \pm 6,2$   $\mu\text{mol/l}$  RBC) odnotowano w 3 dniu infuzji. Pod koniec procedury stężenie monofosforanu obniżyło się, podobnie jak ilość wydalanego 4PYR, o około 15% (Ryc. 17 A).

Dootrzewnowe podanie 4PYR spowodowało początkowo szybką akumulację 4PYRAD w erytrocytach, jednak w 3 dniu infuzji stężenie związku ustabilizowało się na poziomie około 11  $\mu\text{mol/l}$  erytrocytów i do końca procedury tylko nieznacznie wzrosło (Ryc. 17 B).

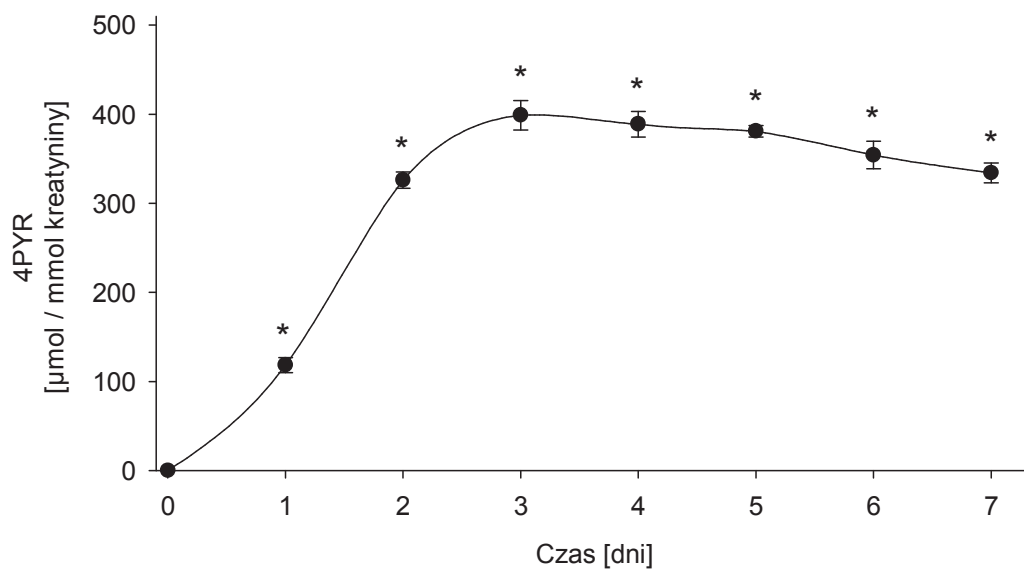
4PYR uległ fosforylacji w niemal wszystkich tkankach szczura. Wysokie stężenie monofosforanu, wynoszące powyżej 200 nmol/g suchej tkanki, zanotowano w mięśniach i płucach, a nieco niższe w sercu i wątrobie (odpowiednio  $146 \pm 21$  nmol/g i  $110 \pm 16$  nmol/g suchej tkanki) (Ryc. 18 A).

W tkankach po siedmiodniowej dootrzewnowej infuzji 4PYR zanotowano wysokie stężenie 4PYRAD osiągające w wątrobie 95 nmol/g suchej tkanki. W sercu, płucach i mięśniach stężenie 4PYRAD mieściło się w granicach 30 – 60 nmol/g suchej tkanki (Ryc. 18 B).

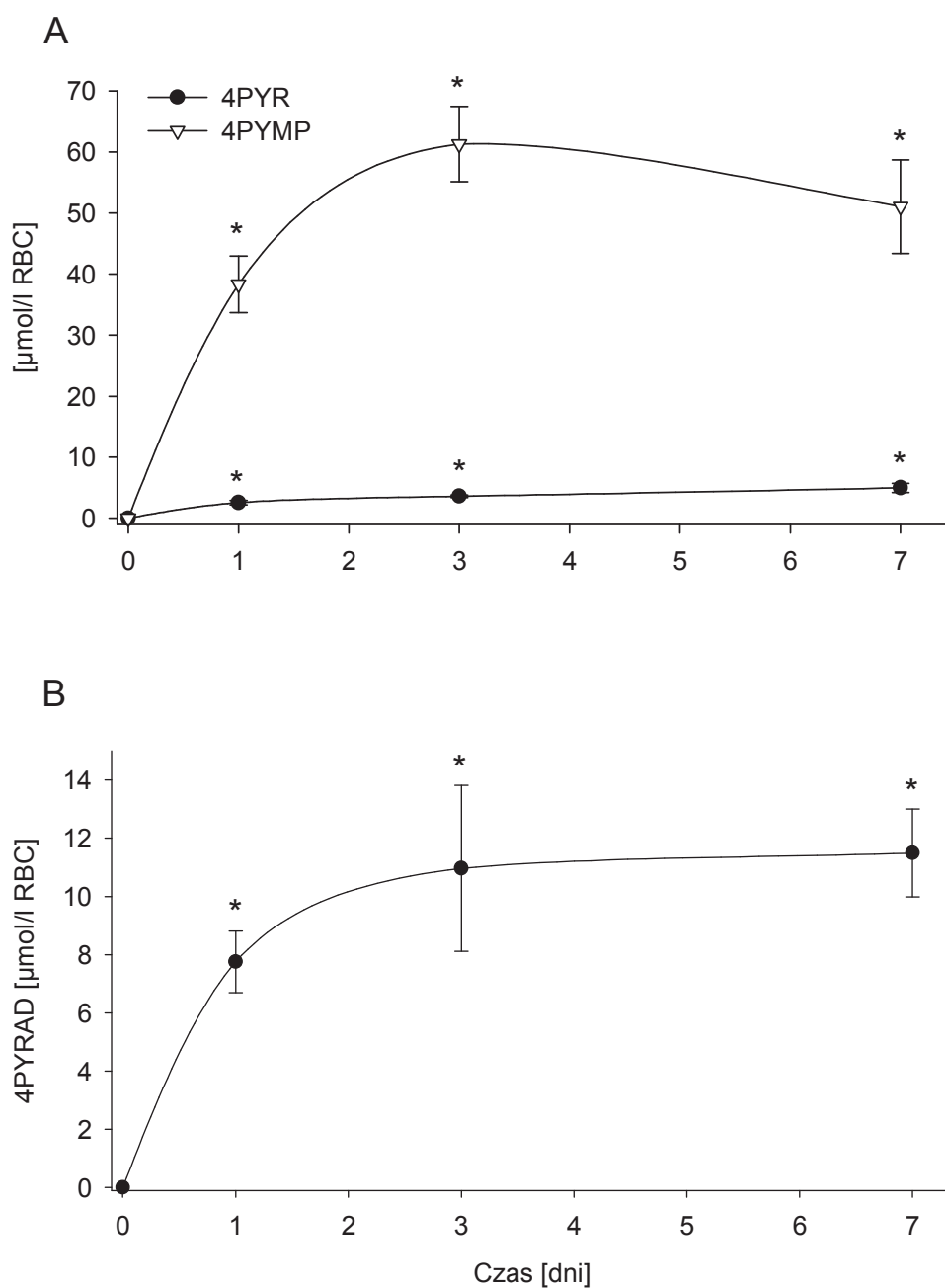
Jedynym narządem, w którym nie zaobserwowano syntezy pochodnych 4PYR (4PYMP, 4PYRAD) była nerka (Ryc. 18 A i B).



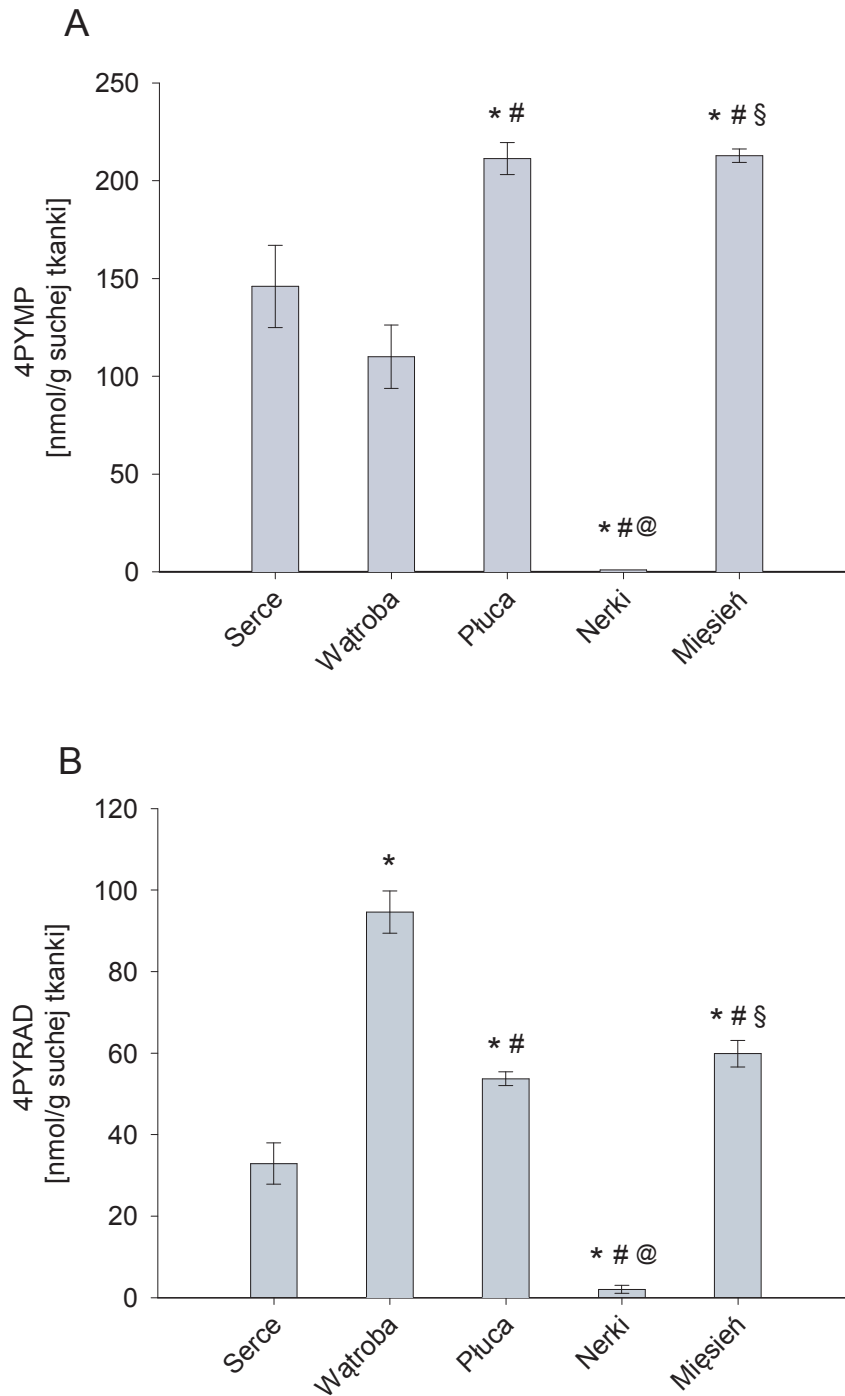
**Ryc. 15.** Stężenie 4PYR w osoczu szczura w 0, 1, 3 i 7 dniu infuzji dootrzewnowej 4PYR. Wyniki stanowią średnią ( $n = 4$ )  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. czas 0.



**Ryc. 16.** Stężenie 4PYR w moczu szczura w kolejnych dniach infuzji dootrzewnowej wyrażone jako stosunek stężeń 4PYR do kreatyniny. Wyniki stanowią średnią ( $n=4$ )  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  vs. czas 0.



**Ryc. 17.** Stężenie 4PYR i 4PYMP (A) oraz 4PYRAD (B) w erytrocytach szczura w 0, 1, 3 i 7 dniu infuzji dootrzewnowej 4PYR. Wyniki stanowią średnią ( $n = 4$ )  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  vs. czas 0.



**Ryc. 18.** Stężenie 4PYMP (A) oraz 4PYRAD (B) w tkankach szczura po siedmiodniowej dootrzewnowej infuzji roztworu 4PYR. Wyniki stanowią średnią ( $n = 4$ )  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  vs. serce; (#)  $p < 0,05$  vs. wątroba; (@)  $p < 0,05$  vs. płuca; (§)  $p < 0,05$  vs. nerki.

#### 4.2.2.2 *Metabolizm 4PYR w tkankach myszy*

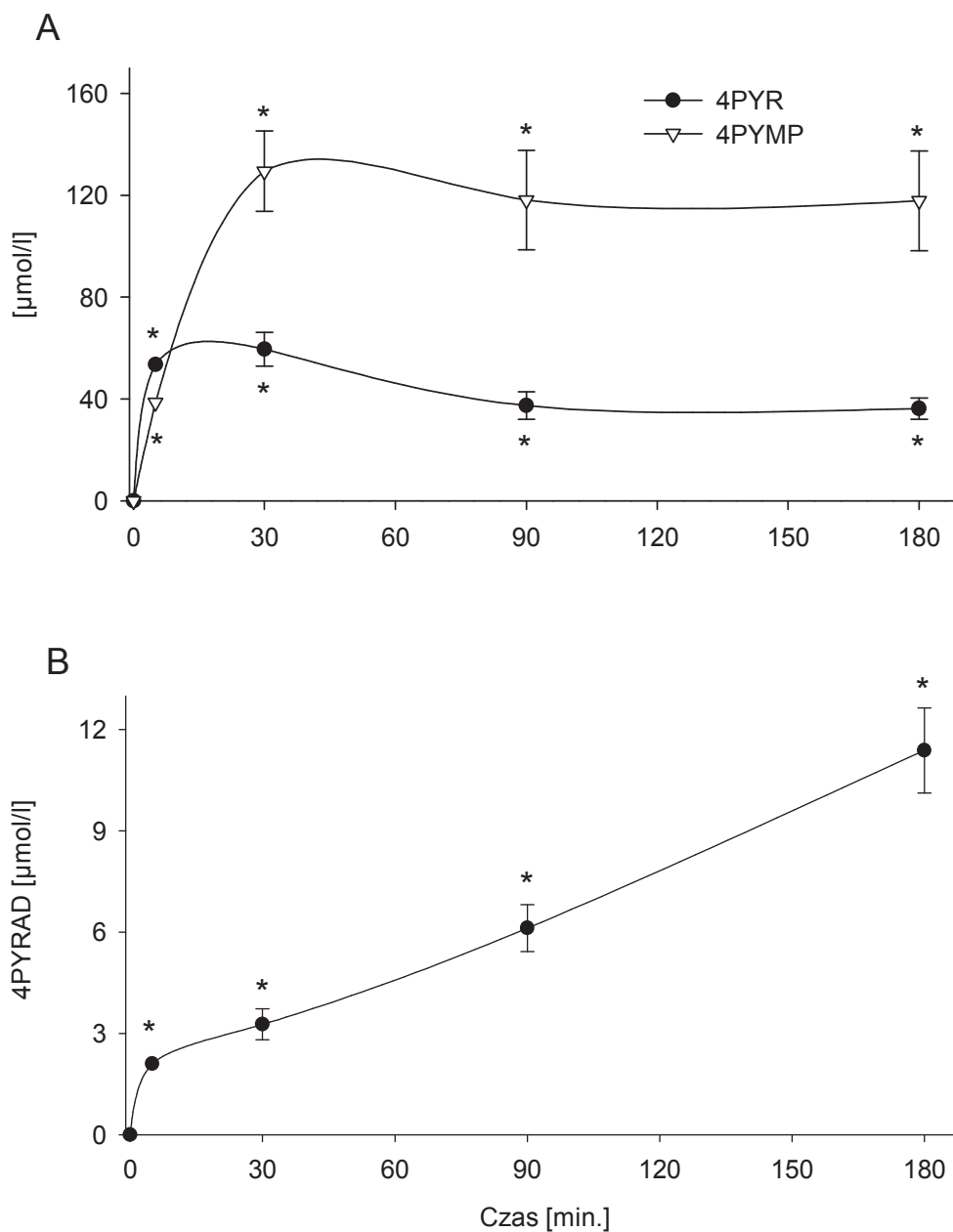
Pojedyncze podskórne wstrzyknięcie myszy 100  $\mu$ l 50 mM 4PYR spowodowało niemal natychmiastowe pojawienie się tego związku we krwi w stężeniu około 60  $\mu$ mol/l. Już w 30 minucie od iniekcji stężenie 4PYMP ponad dwukrotnie przekroczyło stężenie prekursora osiągając 130  $\mu$ mol/l. Wynikiem szybkiego metabolizmu i dystrybucji 4PYR do tkanek był spadek jego stężenia we krwi, które w 90 minucie wyniosło 36  $\mu$ mol/l i nie zmieniło się do 180 minuty. Podobny przebieg krzywej stężenia można zaobserwować dla 4PYMP, który pozostawał w równowadze z 4PYR zachowując stosunek stężeń około 3:1 (Ryc. 19 A). Po 12 godzinach od wstrzyknięcia stężenia obu związków (4PYR, 4PYMP) obniżyły się do poziomu poniżej 10  $\mu$ mol/l pełnej krwi jednak wciąż były obecne w organizmie zwierząt.

Iniekcja podskórna 4PYR u myszy spowodowała powolny niemal liniowy wzrost stężenia 4PYRAD (Ryc. 19 B). Zauważalny poziom związku pojawił się we krwi myszy już w 5 minucie po iniekcji (około 2  $\mu$ mol/l). Po 3 godzinach stężenie 4PYRAD wynosiło już  $11,4 \pm 1,3$   $\mu$ mol/l pełnej krwi. W przeciwieństwie do 4PYR i 4PYMP stężenie 4PYRAD po 12 godzinach tylko nieznacznie spadło do poziomu około 8  $\mu$ mol/l.

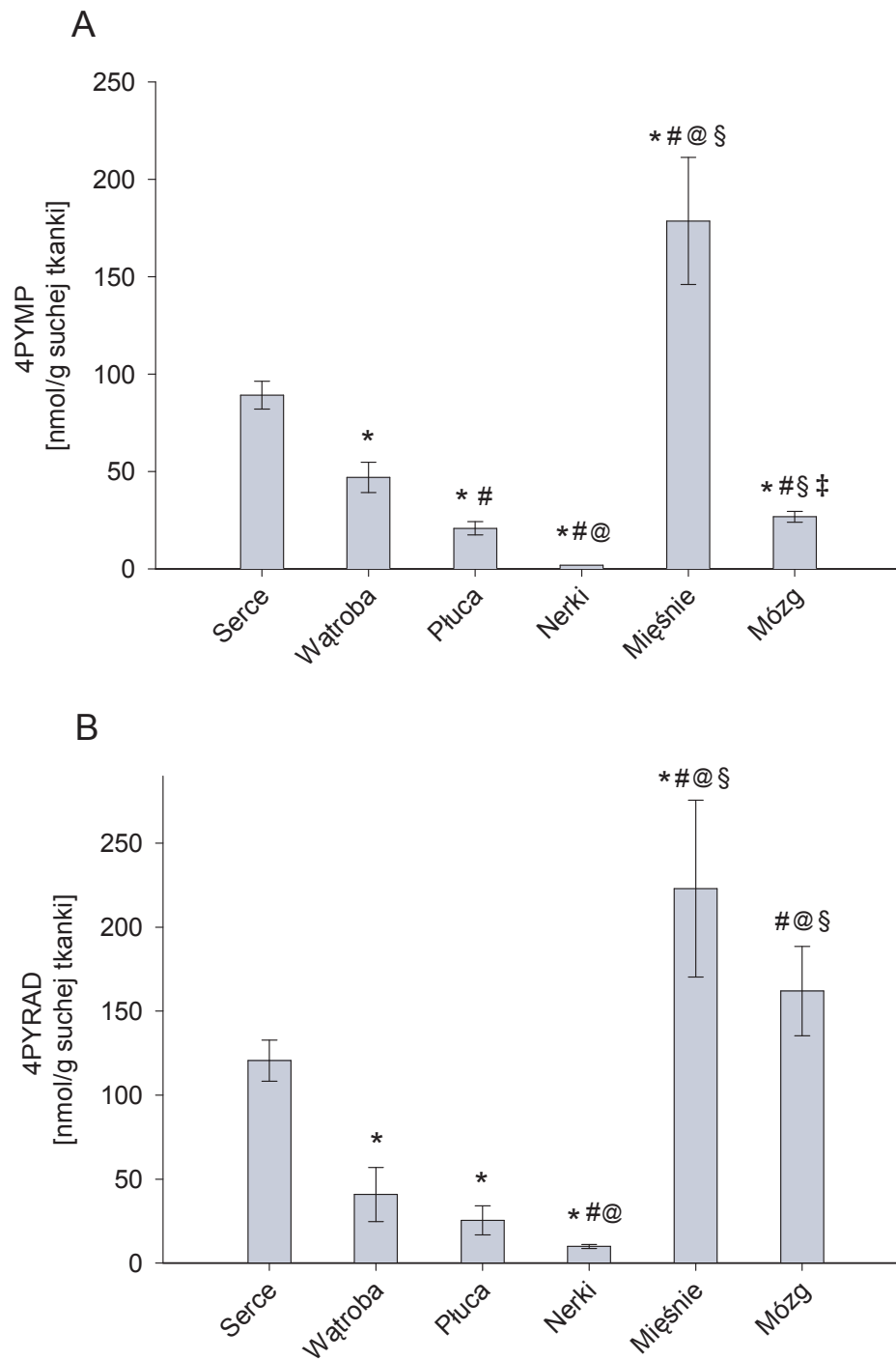
W grupie myszy otrzymujących podskórne iniekcje 4PYR co 12 godzin przez 7 dni zaobserwowano akumulację monofosforanu 4PYR niemal we wszystkich tkankach (Ryc. 20 A). Najwyższe stężenie 4PYMP, podobnie jak w przypadku szczurów, zaobserwowano w mięśniach ( $178,6 \pm 32,6$  nmol/g suchej tkanki). Serce, wątroba oraz mózg wykazały niższą zdolność akumulacji nukleotydu (odpowiednio:  $89,2 \pm 7,1$ ,  $47,0 \pm 7,8$  i  $26,7 \pm 2,8$  nmol/g suchej tkanki), natomiast płuca, odmiennie niż u szczurów, były tkanką o najmniejszej zdolności fosforylacji 4PYR. Jedynie w nerkach nie stwierdzono akumulacji 4PYMP (poniżej 1 nmol/g suchej tkanki).

Najwyższe stężenie 4PYRAD u myszy zaobserwowano w mięśniach (223 nmol/g suchej tkanki). Niemal równie wysoką zdolność akumulacji 4PYRAD wykazano w tkance mózgowej, natomiast w pozostałych tkankach stężenie związku mieściło się w granicach  $25 \div 95$  nmol/g. W nerkach nie zaobserwowano akumulacji 4PYRAD ( $< 9$  nmol/g, co w tym przypadku stanowiło granicę detekcji) (Ryc. 20 B).





**Ryc. 19.** Stężenie 4PYR i 4PYMP (A) oraz 4PYRAD (B) we krwi myszy po podskórnym podaniu 100  $\mu\text{l}$  50 mM 4PYR. Wyniki stanowią średnią ( $n = 6$ )  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  vs. czas 0.



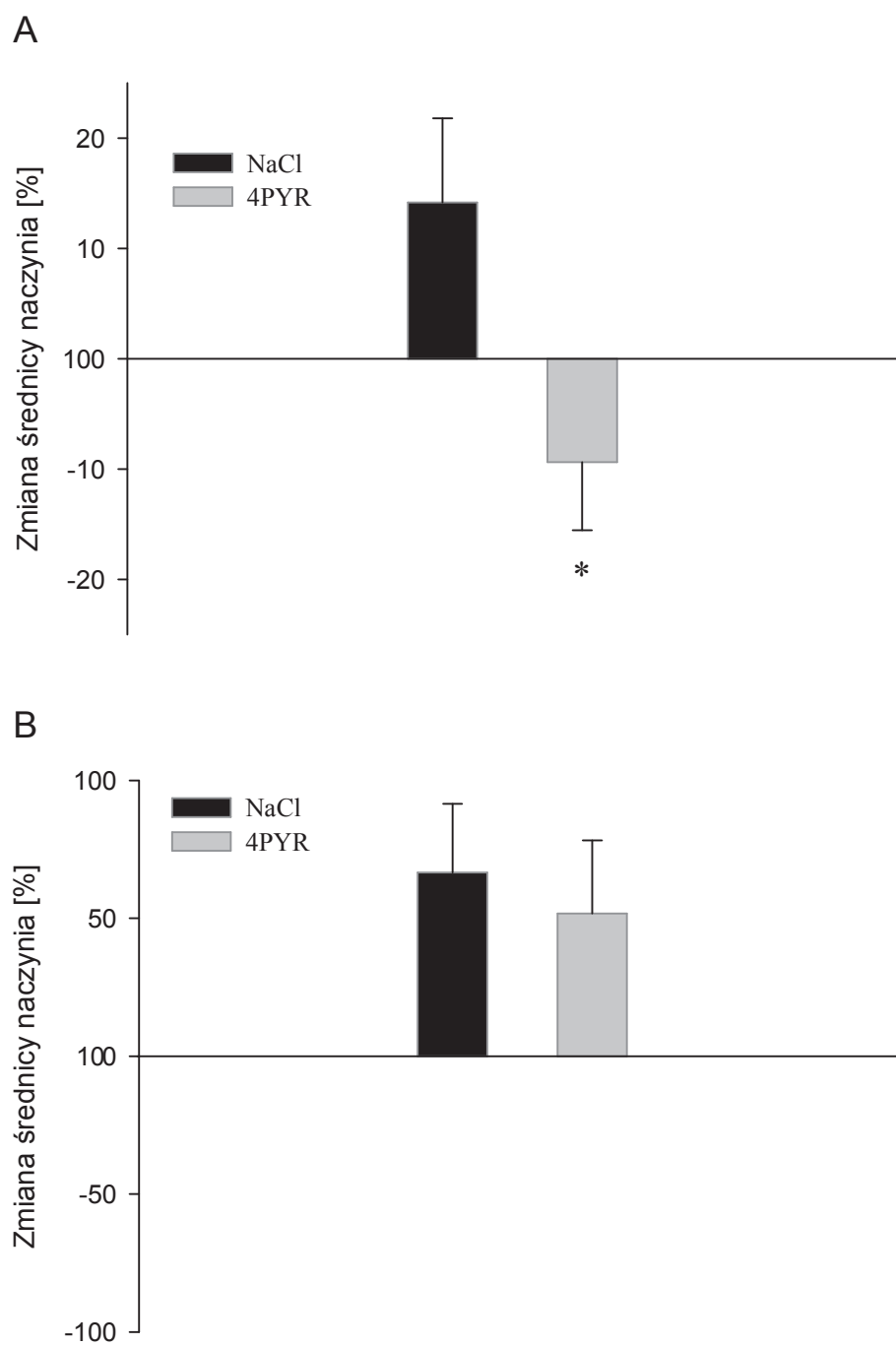
**Ryc. 20.** Stężenie 4PYMP (A) oraz 4PYRAD (B) w tkankach myszy po 7-dniowym podskórnym podawaniu 4PYR. Wyniki stanowią średnią ( $n = 6$ )  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  vs. serce; (#)  $p < 0,05$  vs. wątroba; (@)  $p < 0,05$  vs. płuca; (§)  $p < 0,05$  vs. nerki; (‡)  $p < 0,05$  vs. mózg.

### 4.3 Ocena wpływu 4PYR na układ sercowo naczyniowy

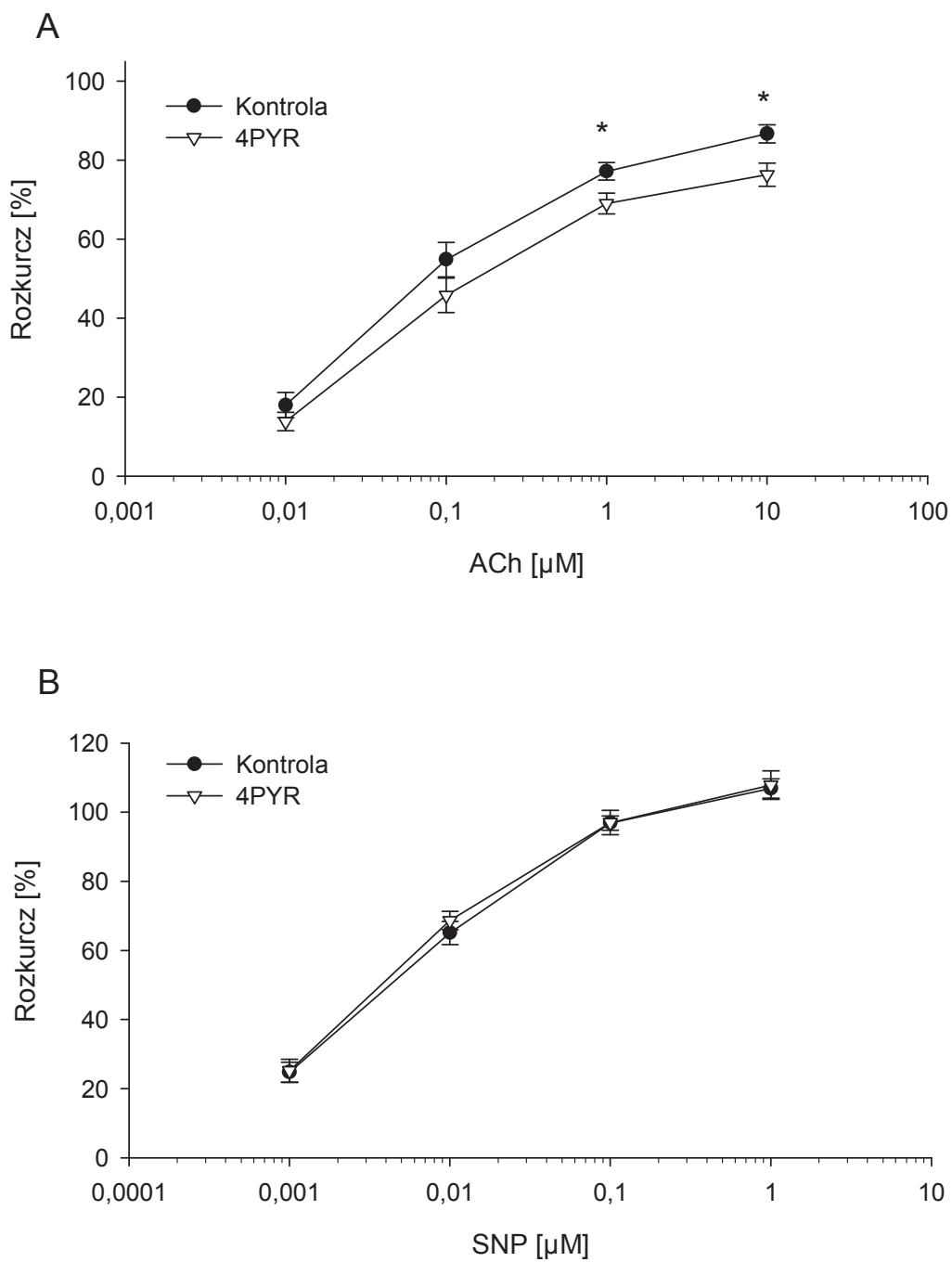
#### 4.3.1 Wpływ długotrwałe podwyższonego stężenia 4PYR na funkcję śródbłonna naczyniowego myszy.

Pomiar funkcji śródbłonna w modelu mysim *in vivo*, oparty na oznaczeniu średnicy tętnicy udowej, wykazał istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą myszy otrzymującą przez 7 dni 4PYR podskórną, a grupą kontrolną otrzymującą 0,9% NaCl. Rozkurcz naczyń wywołany zależną od przepływu aktywacją śródbłonna u myszy otrzymujących 4PYR zmierzony 30 sekund po wznowieniu przepływu krwi wynosił zaledwie  $90,6 \pm 6,2\%$  względem stanu sprzed założenia zacisku (100%), podczas gdy w grupie kontrolnej wartość ta wynosiła  $114,2 \pm 7,6\%$  (Ryc. 21 A). Podanie do tętnicy udowej 0,2% roztworu nitrogliceryny wywołało niezależny od śródbłonna rozkurcz naczyń. W obu badanych grupach średnica tętnicy udowej po rozkurczu była porównywalna (odpowiednio 152 i 166%) (Ryc. 21 B).

Pomiar funkcji śródbłonna w modelu mysim *ex vivo* oparty był na pomiarze napięcia ściany krążków aortalnych pobranych od myszy po 7-dniowym okresie podawania 4PYR. W grupie zwierząt traktowanych 4PYR istotnemu zaburzeniu uległa funkcja śródbłonna polegająca na rozkurczu naczyń w odpowiedzi na rosnące stężenie acetylocholin (Ryc. 22 A). Rozkurcz krążków aortalnych przy najwyższym stężeniu acetylocholin, przedstawiony jako procent skurczu wywołanego uprzednio przez fenylefrynę, był istotnie mniejszy w grupie zwierząt otrzymujących 4PYR ( $76,3 \pm 2,9\%$ ) w porównaniu z grupą kontrolną ( $86,7 \pm 2,3\%$ ). Jednocześnie nie wykazano istotnych różnic w odpowiedzi krążków aortalnych na nitroprusydek sodu (Ryc. 22 B).



**Ryc. 21.** Procentowa zmiana średnicy tętnicy udowej myszy w stosunku do stanu podstawowego zmierzona 30 sekund po przywróceniu przepływu (A) oraz po podaniu 0,2% roztworu nitrogliceryny (B). Wyniki stanowią średnią ( $n = 3$ )  $\pm$  S.D.; (\*)  $p < 0,05$  vs. kontrola.



**Ryc. 22.** Rozkurcz krążków aortalnych w odpowiedzi na różne stężenia acetylocholiny (A) oraz nitroprusydku sodu (B) wyrażony jako procent skurczu uprzednio wywołanego fenylefryną. Wyniki stanowią średnią ( $n = 22$ )  $\pm$  SEM.; (\*)  $p < 0,05$  vs. kontrola.

#### **4.3.2 Wpływ krótkotrwałej perfuzji serc szczura roztworem 4PYR na funkcję śródbłonna naczyń wieńcowych oraz funkcję mechaniczną serca**

##### *4.3.2.1 Funkcja mechaniczna mięśnia sercowego i przepływ wieńcowy*

Wpływ krótkotrwałe podwyższonego stężenia 4PYR na układ sercowo – naczyniowy i funkcję mechaniczną serca zbadano wykorzystując model 5 – minutowej infuzji wieńcowej 100  $\mu$ M 4PYR w perfundowanym sercu szczura.

Oddziaływanie związku na śródbłonek naczyniowy zbadano wykorzystując pomiar wielkości przepływu wieńcowego w trakcie infuzji 4PYR, który nie zmienił się istotnie podczas infuzji. Nie zaobserwowano również istotnych różnic w wielkości przepływu wieńcowego względem grupy kontrolnej w przebiegu procedury pomiaru funkcji śródbłonna oraz podczas infuzji 4PYR (Ryc. 23). Nie wykazano również wpływu 4PYR na częstotliwość skurczów serca oraz funkcję skurczową i rozkurczową lewej komory serca (Ryc. 24 A i B).

Analiza stężeń nukleotydów purynowych a także fosfokreatyny w tkance mięśnia sercowego nie wykazała różnic w stosunku do grupy kontrolnej. Zaobserwowano natomiast wysokie stężenie 4PYMP i 4PYRAD w grupie otrzymującej 4PYR. Szczegółowe dane dotyczące stężeń wybranych związków przedstawiono w tabelach 2 i 3.

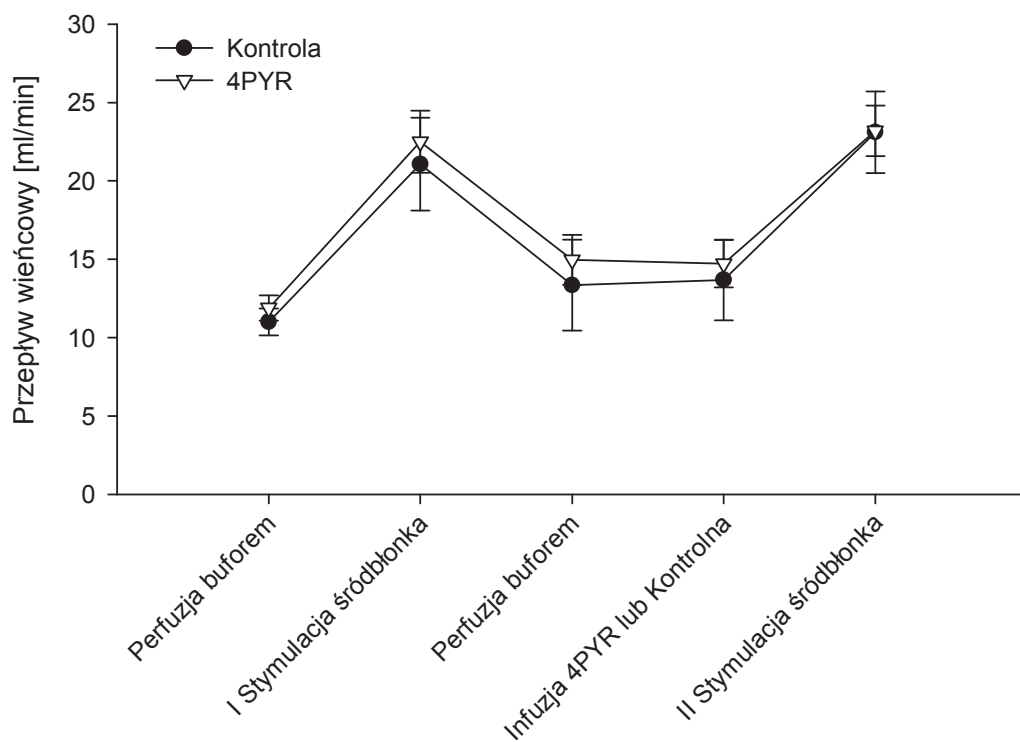
Potencjał oksydoredukcyjny komórki określony jako stosunek zredukowanej formy NAD (NADH) do formy utlenionej (NAD<sup>+</sup>) wyniósł 0,028 w grupie kontrolnej, oraz 0,032 w grupie traktowanej 4PYR. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupami.

		<b>4PYR</b>	<b>4PYMP</b>	<b>4PYRAD</b>
		$\mu\text{mol/g}$	$\text{nmol/g}$	$\text{nmol/g}$
<b>Kontrola</b>	średnia	<b>&lt; 0,02</b>	<b>&lt; 20,00</b>	<b>&lt; 20,00</b>
	SD	0,00	0,00	0,00
<b>Perfuzja 4PYR</b>	średnia	<b>1,95 *</b>	<b>85,60 *</b>	<b>43,91 *</b>
	SD	0,85	46,91	6,47

**Tabela 2.** Stężenia 4PYR i jego metabolitów w mięśniu sercowym po 5 minutowej perfuzji serca 100  $\mu\text{M}$  roztworem 4PYR. Wyniki stanowią ( $n = 8$ )  $\pm$  SD, (\*)  $p < 0,05$  vs. kontrola.

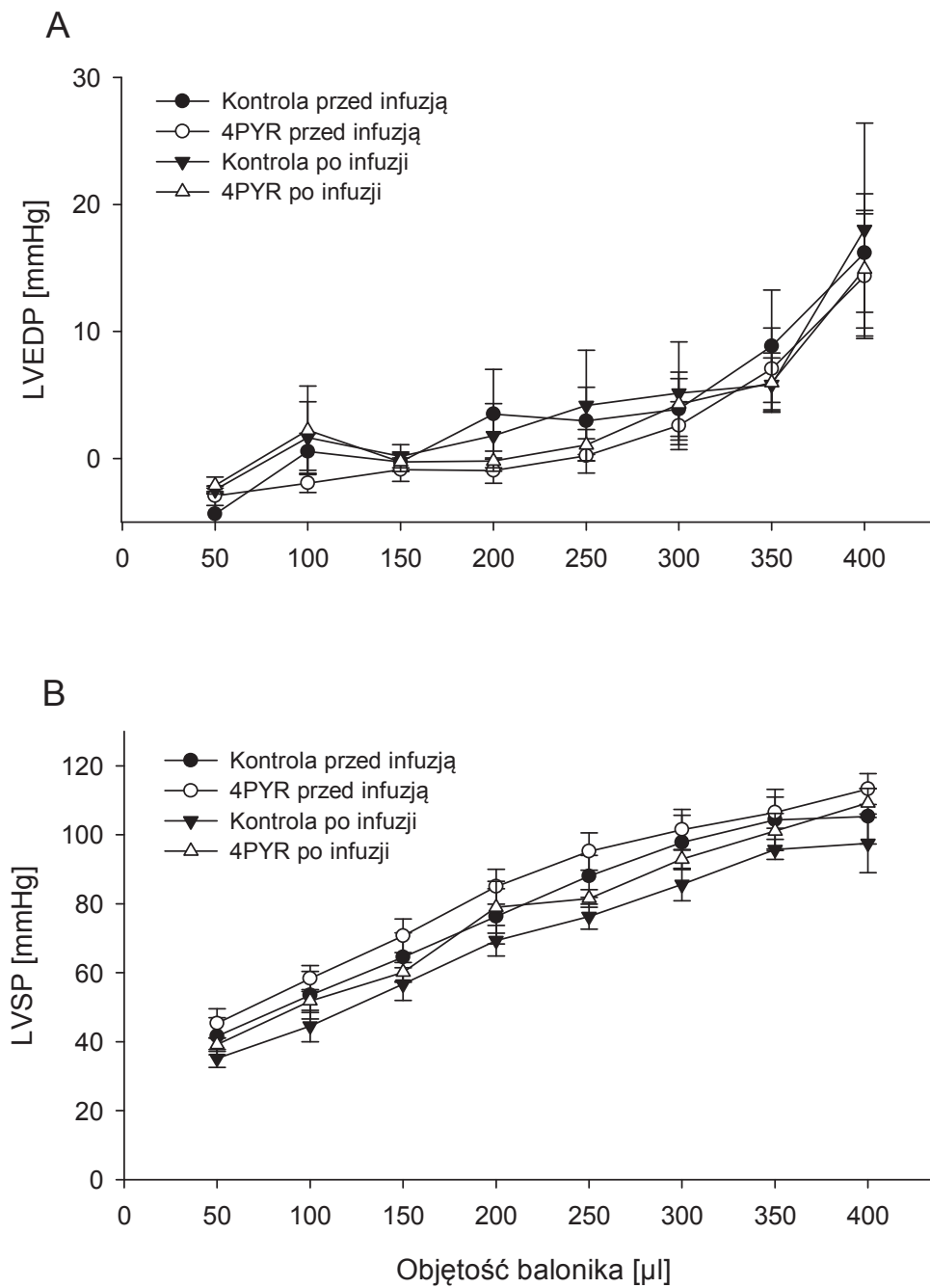
		<b>ATP</b>	<b>ADP</b>	<b>AMP</b>	<b>NAD<sup>+</sup></b>	<b>ADPR</b>	<b>NADP<sup>+</sup></b>	<b>GTP</b>	<b>Hipoksantyna</b>
		$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\text{nmol/g}$	$\text{nmol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\text{nmol/g}$
<b>Kontrola</b>	średnia	<b>20,53</b>	<b>4,07</b>	<b>0,59</b>	<b>4,73</b>	<b>131,28</b>	<b>359,14</b>	<b>1,24</b>	<b>23,83</b>
	SD	1,86	0,19	0,41	0,26	26,64	37,87	0,11	11,66
<b>Perfuzja 4PYR</b>	średnia	<b>19,36</b>	<b>4,27</b>	<b>0,80</b>	<b>4,41</b>	<b>142,59</b>	<b>337,50</b>	<b>1,28</b>	<b>27,45</b>
	SD	1,18	0,50	0,31	0,65	58,94	30,84	0,09	20,29

**Tabela 3.** Stężenia metabolitów nukleotydów w mięśniu sercowym po 5 minutowej perfuzji serca 100  $\mu\text{M}$  roztworem 4PYR. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD ( $n = 8$ ). Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic.



**Ryc. 23.** Przeptyw wieńcowy w perfundowanym sercu szczura w warunkach podstawowych i po stymulacji śródbłonka przed i po infuzji 4PYR lub buforu kontrolnego. Wyniki stanowią średnią ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic.





**Ryc. 24.** Zmiany ciśnienia końcoworozkurczowego (LVEDP) (A) oraz skurczowego (LVSP) (B) w sercach perfundowanych 4PYR w porównaniu z kontrolą. Wyniki stanowią średnią ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy.

## 5. DYSKUSJA

### 5.1 4PYRAD – nowy metabolit 4PYR

#### 5.1.1 *Oczyszczanie i identyfikacja 4PYRAD*

Odkrycia nowych metabolitów są niezwykle rzadkie, szczególnie gdy dotyczą istotnych i wielostronnie badanych związków, takich jak  $\text{NAD}^+$ . Tym bardziej intrygujący jest fakt odkrycia w ostatnich latach grupy związków o budowie analogicznej do rybozydu i nukleotydów nikotynamidu (4PYR, 4PYMP, 4PYTP)<sup>[47]</sup>. Jednym z ważniejszych osiągnięć niniejszej pracy jest identyfikacja kolejnego związku należącego do tej grupy – 4PYRAD.

Pierwszych obserwacji dotyczących tego nowego metabolitu dokonano w erytrocytach inkubowanych z 4PYR, w których w czasie analizy HPLC zauważono wyraźny przyrost pola powierzchni nieznanego szczytu chromatograficznego o czasie retencji zbliżonym do  $\text{NAD}^+$ , adeniny i 4PYR. Widmo absorpcji UV tego szczytu chromatograficznego zbliżone było do 4PYR i adenozyiny, lecz nie pokrywające się z żadnym dotychczas oznaczanym związkiem. Pozwalało to przypuszczać, że jest to nowy związek uczestniczący w przemianach 4PYR. Warto również zaznaczyć, że podczas inkubacji erytrocytów stężenie 4PYR ulegało zmniejszeniu, a przyrost stężenia powstającego monofosforanu i trójfosforanu nie był równoważny ubytkowi substratu. Przyrost stężenia 4PYRAD wyjaśnił tę rozbieżność.

Analizę związku poprzedzono syntezą opartą o reakcję zachodzącą w erytrocytach przy udziale 4PYR jako substratu. Początkowe ilości otrzymywane w wyniku reakcji zachodzącej w erytrocytach były zadowalające, jednak w przebiegu dwuetapowego oczyszczania chromatograficznego zanotowano bardzo duże straty badanego związku, których nie udało się wyeliminować. Niska wydajność procesu nastroczała wielu praktycznych trudności jak choćby bardzo duże zużycie odczynników oraz długi czas trwania rozdzielów chromatograficznych, przez co niemożliwe było uzyskanie ilości niezbędnej do przeprowadzenia wszystkich planowanych badań. Uzyskana ilość pozwoliła jednak na wykonanie analizy masowej oraz analizy z zastosowaniem magnetycznego rezonansu jądrowego. Metody te zostały dobrane w

taki sposób, aby z jak największą precyzją określić strukturę badanego związku zużywając przy tym jak najmniejszą ilość substancji. Analiza z wykorzystaniem spektrometrii masowej typu czasu przelotu pozwoliła z dużą dokładnością określić masę związku, dzięki której możliwe było ustalenie wzoru sumarycznego. Analizę NMR wykorzystano natomiast w celu potwierdzenia struktury chemicznej badanej substancji.

W dalszym etapie podjęto próby syntezy 4PYRAD z wykorzystaniem metody chemiczno – enzymatycznej, z udziałem białka CD38. Procedurę oparto o dostępne w piśmiennictwie zmodyfikowane metody otrzymywania analogów NAD<sup>+</sup> [104,105,106] wykorzystując komercyjnie dostępną NADazę (Sigma) i reakcję wymiany. Jako substrat wykorzystano między innymi 4PYR, ale także nikotynamid. Niewielka ilość powstającego 4PYRAD oraz znaczne zanieczyszczenie nie pozwoliły na uzyskanie dużych ilości tego związku. Wydaje się jednak, że po dopracowaniu metoda łączona może okazać się dobrym źródłem otrzymywania tego związku. Tak otrzymany 4PYRAD mógłby posłużyć do przeprowadzenia dalszych badań nad jego właściwościami biochemicznymi, włącznie z wpływem na enzymy NAD–zależne oraz procesy oksydoredukcyjne zachodzące z udziałem NAD.

### **5.1.2 *Metabolizm 4PYRAD w erytrocytach ludzkich***

Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie 4PYRAD w erytrocytach inkubowanych z 4PYR jest zależne zarówno od czasu inkubacji jak i od stężenia użytego substratu. Mało prawdopodobne jest jednak, że reakcja ta zachodzi bez etapów pośrednich. Bezpośrednim metabolitem 4PYR w erytrocytach jest 4PYMP, którego stężenie szybko wzrastało w przebiegu inkubacji. Wzrost ten również uzależniony był od czasu i stężenia 4PYR, a równowaga pomiędzy reakcją tworzenia 4PYMP i jego degradacją ustalała się już po 3 godzinach trwania inkubacji. Tak wysokie i stabilne stężenie monofosforanu tłumaczy niemal liniowy przyrost stężenia 4PYRAD w czasie (Ryc. 11). Potwierdzeniem tej tezy są eksperymenty z wykorzystaniem ITU – inhibitora kinazy adenosyny, którego obecność spowodowała zahamowanie tworzenia 4PYMP, a w konsekwencji brak istotnego przyrostu 4PYRAD (Ryc. 12). Podobny efekt zachodził podczas degradacji 4PYRAD oraz 4PYMP w erytrocytach (Ryc. 13). Obecność ITU spowodowała natychmiastowe obniżenie stężenia 4PYMP z powodu braku możliwości

jego resyntezy z powstającego 4PYR, natomiast stężenie 4PYRAD istotnie obniżyło się dopiero po 2 godzinach inkubacji w odpowiedzi na około 60% obniżenie stężenia 4PYMP. Wykluczyć można bezpośredni udział 4PYR w tworzeniu 4PYRAD gdyż w obecności 4PYR i ITU pochodna NAD nie powstawała.

Podwyższone stężenie 4PYR wraz z jego metabolitami (4PYMP i 4PYTP) zostało stwierdzone w erytrocytach pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek<sup>[47]</sup>. Wstępne dane potwierdzają również obecność 4PYRAD w erytrocytach u tych chorych. Badania przedstawione w niniejszej pracy przedstawiają akumulację 4PYRAD w erytrocytach osób zdrowych inkubowanych z 4PYR, jednak stężenie tego związku otrzymane w trakcie inkubacji erytrocytów jest znacznie mniejsze niż stężenie 4PYMP. Dalsze badania w kierunku obecności tych metabolitów u ludzi powinny się skoncentrować na stanach patologicznych, w których może wystąpić akumulacja 4PYR i jego pochodnych we krwi.

## 5.2 Metabolizm 4PYR u gryzoni

Dotychczasowy stan wiedzy dotyczący metabolizmu 4PYR obejmował jedynie przemiany zachodzące w erytrocytach i komórkach śródbłonna<sup>[66,47,52]</sup>. Niniejsza praca uzupełniła te dane dostarczając informacji na temat metabolizmu 4PYR w innych tkankach. W badaniach wykorzystano szczury i myszy, którym podawano 4PYR w dootrzewnowej infuzji oraz poprzez serię podskórnych wstrzyknięć. Zbadano również metabolizm 4PYR w homogenatach tkankowych serca wątroby i nerki szczura. Taki dobór metodyczny pozwolił w pewnym stopniu porównać zarówno różne drogi podania związku jak i jego metabolizm u dwóch gatunków minimalizując jednocześnie zużycie zwierząt laboratoryjnych.

4PYR inkubowany z homogenatami tkankowymi serca, wątroby i nerki przekształcany był do 4PYMP, a następnie do 4PYRAD we wszystkich badanych tkankach (Ryc. 14 i 15). Szybkość reakcji była porównywalna w homogenacie serca i nerki, natomiast w homogenacie wątroby metabolity 4PYR powstawały dziesięciokrotnie szybciej. Pozostaje to w zgodzie z danymi z piśmiennictwa dotyczącymi izolowanej aktywności kinazy adenozyliny w tkankach szczura<sup>[107]</sup>. Obecność ITU w nadmiarze, podobnie jak w przypadku erytrocytów, spowodowała

zmniejszenie szybkości reakcji fosforylacji 4PYR do około 10% szybkości reakcji w próbkach kontrolnych. Można zatem przypuszczać, że reakcja fosforylacji nie przebiega jedynie przy udziale kinazy adenozy, ale również z udziałem innej, podobnej, aktywności enzymatycznej. Najbardziej prawdopodobną drogą alternatywną dla fosforylacji 4PYR wydaje się być reakcja katalizowana przez kinazę rybozydu nikotynamidu, zaangażowaną w przekształcanie rybozydu nikotynamidu do mononukleotydu nikotynamidu. Weryfikacja tej tezy wymaga jednak dalszych badań.

4PYR w badaniach *in vivo* ulegał szybkiej dystrybucji zarówno po podaniu podskórnym jak i w trakcie infuzji dootrzewnowej, a w tkankach ulegał przekształceniu do metabolitów: 4PYMP i 4PYRAD. Zaskakujące wydaje się wysokie stężenie 4PYRAD w tkankach, które w 7 dniu eksperymentu dorównało, a w niektórych przypadkach przewyższyło stężenie 4PYMP (Ryc.19 i 21). Pozostaje to w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w erytrocytach ludzkich i homogenatach tkankowych. Wydaje się, że przyczyną tego była kompartmentacja wewnątrzkomórkowa aktywności enzymatycznych degradujących 4PYRAD. Bardziej prawdopodobną przyczyną jednak była niewielka szybkość reakcji tworzenia 4PYRAD, powodująca, że czas inkubacji erytrocytów i homogenatów tkankowych był zbyt krótki, aby zaobserwować wyższe stężenia 4PYRAD.

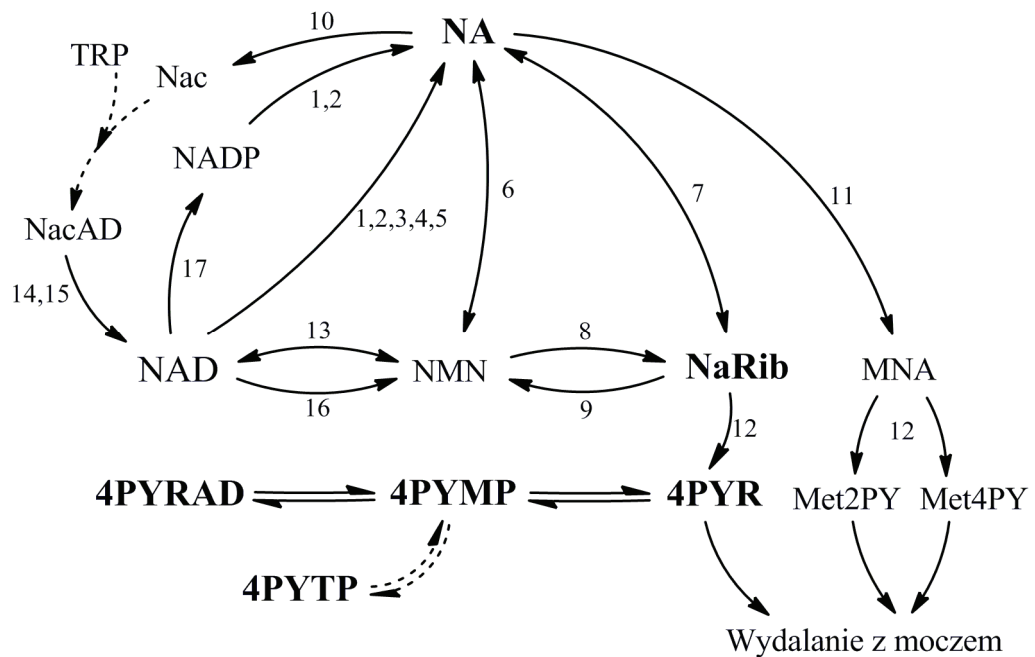
Jedyną tkanką, zarówno u szczurów jak i u myszy, w której nie zaobserwowano metabolitów 4PYR były nerki. Jest to tym bardziej niezwykle, że podczas inkubacji 4PYR z homogenatem nerki szczura, stężenie 4PYMP i 4PYRAD wzrastało z szybkością porównywalną do obserwowanej w homogenacie serca (punkt 4.2.1). 4PYR, jako związek drobnocząsteczkowy, ulega filtracji kłębuszkowej. Mało prawdopodobne wydaje się jednak, aby na tym etapie usunięte zostało z osocza więcej niż 20% związku. Jest to zbyt mało, by niemal wyeliminować metabolizm tego nukleozydu w nerce. Co więcej, degradacja 4PYMP znajdującego się w erytrocytach natychmiast uzupełniłaby tę lukę. 4PYR może być zatem aktywnie wydzielany w cewkach nerkowych. Potwierdzeniem tej tezy jest niezwykle wysoki wzrost stężenia 4PYR w osoczu chorych z przewlekłą niewydolnością nerek oraz znaczna ilość tego związku wydalana z moczem zwierząt (Ryc. 17). Nie tłumaczy to jednak całkowitego braku 4PYR i jego metabolitów w komórkach nerkowych. Niewątpliwie nerka posiada mechanizm aktywnego wydzielania 4PYR, jednak zjawisko to wymaga dalszych badań.

Wykorzystane w badaniach *in vivo* drogi podania różnią się uzyskiwanym stężeniem 4PYR w osoczu. Jednak w obu grupach ostateczne stężenie metabolitów w mięśniach było na podobnym poziomie. Przewaga infuzji nad podaniem w jednej dawce jest niezaprzeczalna, ale pompy infuzyjne przeznaczone dla myszy charakteryzują się nieoptymalną szybkością infuzji. Uzasadnione wydaje się zatem wykorzystanie podskórnej drogi podania w eksperymentach wymagających użycia dużej ilości roztworu.

### 5.2.1 Szlak metaboliczny 4PYR

Dotychczasowe doniesienia dotyczące metabolizmu 4PYR w erytrocytach obejmowały jego fosforylację do mono- i trójfosforanowych pochodnych. Poprzez identyfikację 4PYRAD rozszerzono szlak metaboliczny 4PYR o kolejny element, którego rola, ze względu na podobieństwo strukturalne do NAD, może okazać się kluczowa w badaniach patogenezy schorzeń związanych z podwyższonym stężeniem 4PYR w organizmie. Dokładny przebieg zachodzących reakcji oraz uczestniczące w nich enzymy wciąż wymagają dalszych badań, jednak wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy wskazują na duże podobieństwo metabolizmu 4PYR do metabolizmu rybozydu nikotynamidu. Oba związki w podobny sposób przekształcane są do mononukleotydowych pochodnych: 4PYMP i NMN, stanowiących substrat w reakcji katalizowanej przez adenylotransferazę NMN, w której ostatecznie powstają dinukleotydy, odpowiednio: 4PYRAD i NAD. Pomimo wielu podobieństw, metabolizm 4PYR różni się jednak od metabolizmu NaRib. W eksperymentach przedstawionych w niniejszej rozprawie, jak również w wynikach prezentowanych w piśmiennictwie nie wykazano przyrostu stężenia wolnej zasady (4PY) w trakcie inkubacji komórek z 4PYR. Nie stwierdzono również przyrostu stężenia nikotynamidu w trakcie inkubacji komórek z 4PY (dane własne, niepublikowane). Można zatem założyć, że 4PYR, w odróżnieniu od rybozydu nikotynamidu, nie podlega reakcji katalizowanej przez fosforylazę rybozydu nikotynamidowego, a stanowi produkt nieodwracalnej reakcji utlenienia rybozydu nikotynamidu przez oksydazę aldehydową<sup>[46]</sup>. Elementem charakterystycznym dla metabolizmu 4PYR jest 4PYTP, związek, który został stwierdzony w erytrocytach pacjentów z niewydolnością nerek<sup>[47,51,52]</sup>. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania z zastosowaniem

homogenatów tkanek zwierzęcych, jak również eksperymenty *in vivo* nie wykazały przyrostu stężenia 4PYTP w żadnej z badanych tkanek. Jednym z powodów mogła być charakterystyczna dla 4PYTP powolna akumulacja i niezwykle wolna degradacja<sup>[47]</sup>. Wydaje się jednak, że podczas tygodniowego okresu podawania wysokiego stężenia 4PYR, wzrastające stężenie 4PYTP powinno być zauważalne. Drugim z powodów może być brak aktywności enzymatycznej umożliwiającej powstawanie 4PYTP u gryzoni. Szlak przemian NAD, uzupełniony o nowe dane przedstawiono na rycinie 25. Opisy poszczególnych reakcji przedstawiono w punkcie 1.2 w tabeli 1.



**Ryc. 25.** Schemat głównych szlaków powstawania i degradacji NAD<sup>+</sup> uzupełniony o 4PYRAD powstający na drodze metabolizmu wewnątrzkomórkowego 4PYR.

### 5.3 Wpływ 4PYR na układ sercowo – naczyniowy.

#### 5.3.1 Toksyczność śródbłonkowa 4PYR

Wpływ długotrwałego wzrostu stężenia 4PYR w osoczu na układ sercowo – naczyniowy zbadano wykorzystując dwa modele eksperymentalne: model oparty na pomiarze zmiany napięcia ściany krążków aortalnych w odpowiedzi na indukcję acetylocholiną oraz model wykorzystujący zależny od śródbłonka rozkurcz tętnicy udowej myszy indukowany siłą ścinającą wywieraną przez krew na ściany naczynia (*Shear Stress*) *in vivo*.

Metoda pomiaru funkcji śródbłonka w oparciu o rozkurcz izolowanych krążków aortalnych pochodzących od myszy wykorzystywana jest rutynowo<sup>[108,109,110,111]</sup> i stanowi podstawę oceny zdolności śródbłonka do produkcji tlenu azotu w odpowiedzi na czynniki stymulujące jego wydzielanie<sup>[112]</sup>. Jest zatem podstawową metodą pozwalającą na określenie stopnia uszkodzenia śródbłonka naczyniowego w efekcie działania czynników toksycznych bądź jako następstwo chorób układu sercowo – naczyniowego na czele z miażdżycą, nadciśnieniem i hipercholesterolemią. Badania przedstawione w niniejszej pracy (Ryc. 23) wykazały istotnie zaburzoną funkcję śródbłonka naczyniowego u myszy otrzymujących przez 7 dni iniekcje z roztworem 4PYR przy zachowanej zdolności do rozkurczu (w odpowiedzi na nitroprusydek sodu). Taki efekt może być spowodowany obecnością metabolitów 4PYR w komórkach śródbłonka lub ich uszkodzeniem spowodowanym długotrwałym toksycznym wpływem 4PYR na metabolizm komórek śródbłonka. Zastosowany model eksperymentalny nie daje jednak możliwości oceny mechanizmu powstawania obserwowanej dysfunkcji śródbłonka.

Funkcja śródbłonka naczyniowego w warunkach *in vivo* podlega wieloczynnikowej regulacji włączając szybkość przepływu krwi, oddziaływanie układu nerwowego oraz funkcję regulacyjną morfotycznych składników krwi (głównie trombocytów). Zasadne było zatem potwierdzenie toksyczności 4PYR w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Jedną z metod pomiaru funkcji śródbłonka naczyniowego *in vivo* jest metoda oparta na zależnym od śródbłonka rozkurczu naczyń krwionośnych w odpowiedzi na zwiększony przepływ krwi (FMV: *flow – mediated*



*vasodilation*)<sup>[113]</sup>. Badania oparte na tej metodzie stosowane są w celu oznaczenia funkcji śródbłonna tętnicy ramiennej u ludzi *in vivo*<sup>[114,115]</sup>, a także w oznaczeniach funkcji śródbłonna w ludzkich naczyniach wieńcowych i obwodowych<sup>[116]</sup>. W niniejszej pracy wykorzystano metodę pomiaru funkcji śródbłonna tętnicy udowej myszy opracowaną i zoptymalizowaną przez Tamurę<sup>[101]</sup>. Dokonane modyfikacje metody (użycie inkubatora czy użycie tętniczego zacisku mechanicznego przeznaczonego dla myszy) były wynikiem wstępnych eksperymentów i wpłynęły na stabilność i powtarzalność otrzymanych wyników. Uzyskana odpowiedź naczyniowa była porównywalna z opisaną przez Tamurę przy zastosowaniu optymalnych warunków (siły zacisku, czasu utrzymywania zacisku oraz czasu, po którym następował maksymalny rozkurcz). Maksymalny rozkurcz zależny od śródbłonna uzyskany przez Tamurę w grupie kontrolnej w optymalnych warunkach stanowił około 130% wartości podstawowej, natomiast rozkurcz niezależny od śródbłonna stanowił około 140% wartości podstawowej. Wartości uzyskane w niniejszej pracy stanowiły odpowiednio około 114% i 160% co, przy zachowaniu optymalnych czasów, wskazuje na zbyt małą, lub zbyt dużą siłę zastosowanego zacisku naczyniowego. Jednak mniejsza inwazyjność takiego rozwiązania oraz jednoczesne uproszczenie procedury w efekcie zwiększyło powtarzalność wyników.

Otrzymane wyniki potwierdziły śródbłonkową toksyczność 4PYR wykazaną z zastosowaniem krążków aortalnych. Podobnie jednak jak w przypadku eksperymentów *ex vivo*, zastosowana metodologia nie daje możliwości odpowiedzi na pytanie dotyczące odwracalności tego efektu.

4PYR obecny w komórkach śródbłonna jest metabolizowany do 4PYMP i 4PYRAD<sup>[66]</sup>. Oba związki potencjalnie mogą zaburzać metabolizm komórkowy wpływając na przemiany i stężenie ATP oraz NAD. 4PYRAD może akumulować się w mitochondriach wpływając na NAD-zależne enzymy łańcucha oddechowego, czego efektem może być zaburzenie potencjału błonowego mitochondrium oraz, obserwowane przez innych autorów, obniżenie stężenia ATP w komórce<sup>[47,66]</sup>. W piśmiennictwie wciąż brak jest jednak danych, które mogłyby stanowić jednoznaczne wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania 4PYR na komórki śródbłonna.

### **5.3.2 Wpływ 4PYR na serce w krótkiej perfuzji**

Związki o budowie nukleozydowej bądź nukleotydowej, poprzez wpływ na receptory purynergiczne, a w szczególności adenozynowe, mogą zmieniać funkcję śródbłonna naczyń wieńcowych, jak również funkcję mechaniczną mięśnia sercowego. W niniejszej pracy wykazano brak wpływu 4PYR podanego w infuzji wieńcowej na perfundowane serce szczura. W przedstawionych eksperymentach nie zaobserwowano wpływu 4PYR na przepływ wieńcowy, kurczliwość mięśnia sercowego, czy częstość skurczów. Nie zaobserwowano również wpływu na metabolizm energetyczny mięśnia sercowego, pomimo znacznej akumulacji metabolitów 4PYR.

Borkowski w rozprawie doktorskiej wykazał, że 4PYR jest słabym inhibitorem deaminazy AMP (AMPD) w izolowanych kardiomiocytach szczurzych<sup>[117]</sup>. Podobny efekt zaobserwowano w lizatach erytrocytów oraz homogenacie serca szczura<sup>[63]</sup>. Uzyskanie znaczącego efektu zahamowania AMPD przedstawionego w powyższych badaniach wymagało jednak zastosowania długiego czasu inkubacji. Zastosowany w niniejszej pracy model eksperymentalny miał na celu identyfikację efektów natychmiastowych w obrębie serca, związanych z oddziaływaniem receptorowym 4PYR, lub z nagłą zmianą energetyczną spowodowaną akumulacją 4PYMP. Brak efektów metabolicznych związanych z potencjalnym hamowaniem AMPD przez 4PYR w zastosowanym modelu nie wyklucza występowania takiego działania.

## 6. WNIOSKI

1. Nieznanym metabolitem powstającym w erytrocytach ludzkich podczas inkubacji z 4PYR jest dinukleotyd 1- $\beta$ -D-rybofuranozyl-4-pirydono-3-karboksyamidoadeninowy (4PYRAD),
2. 4PYRAD powstaje z udziałem 4PYMP, a jego struktura chemiczna jest podobna do NAD<sup>+</sup>,
3. 4PYR jest metabolizowany do pochodnych – 4PYMP i 4PYRAD nie tylko w erytrocytach ale również w innych komórkach i tkankach,
4. W nerce, pomimo zdolności do metabolizowania 4PYR *in vitro*, nie zaobserwowano akumulacji 4PYR ani jego metabolitów w warunkach *in vivo*,
5. 4PYR *in vivo* nie wpływa znacząco na metabolizm energetyczny komórek, a w szczególności poziom komórkowego ATP,
6. Długotrwała obecność 4PYR w środowisku upośledza funkcję śródbłonna naczyniowego zmniejszając zdolność naczyń krwionośnych do rozkurczu,
7. Krótkotrwałe efekty 4PYR obecnego w krążeniu wieńcowym nie są znaczące; brak jest wpływu na funkcję śródbłonna naczyń, funkcję mechaniczną czy metabolizm energetyczny serca.

## 7. STRESZCZENIE

Ostatnie lata przyniosły dynamiczny rozwój wiedzy dotyczącej przemian pochodnych nikotynamidu, w tym substancji zawierających w swojej strukturze utleniony pierścień nikotynamidowy. Niniejsza rozprawa poddała analizie przemiany i efekty jednej z takich pochodnych: 1- $\beta$ -D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR).

Celem pracy była identyfikacja nowych metabolitów 4PYR, jak również ocena metabolizmu tego związku w wybranych tkankach zwierzęcych oraz jego dystrybucji u zwierząt w modelach symulujących podwyższone stężenie 4PYR we krwi. Podjęto również próbę oceny wpływu tego związku na funkcję śródbłonka naczyniowego u myszy *in vivo* oraz na funkcję śródbłonka naczyń wieńcowych i funkcję mechaniczną serca w modelu perfundowanego serca szczura.

Szczególnym osiągnięciem przedstawionym w niniejszej rozprawie była identyfikacja nowego metabolitu 4PYR, powstającego w erytrocytach ludzkich oraz tkankach zwierzęcych. Określono strukturę chemiczną tego związku oraz ustalono, że jego prekursorem jest monofosforanowa pochodna 4PYR (4PYMP). Zaproponowana nazwa nowego metabolitu to: dinukleotyd 1- $\beta$ -D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamidoadeninowy (4PYRAD).

W kolejnym etapie zbadano metabolizm 4PYR w homogenatach wybranych tkanek zwierzęcych, gdzie związek ten przekształcany jest do 4PYMP i 4PYRAD. Przeanalizowano również dystrybucję i metabolizm 4PYR w tkankach zwierzęcych *in vivo*. Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność wszystkich tkanek do przekształcania 4PYR do 4PYMP i 4PYRAD. Jedynie w nerkach w badaniach *in vivo* nie zaobserwowano 4PYR ani jego pochodnych.

Wpływ 4PYR na układ sercowo naczyniowy zbadano wykorzystując modele mysie *in vivo* (model oparty na rozkurczu zależnym od śródbłonka - FMV), oraz *ex vivo* (pomiar funkcji śródbłonka izolowanych krążków aortalnych). Uzyskane wyniki wykazały istotnie upośledzoną funkcję śródbłonka naczyniowego u myszy, które przez 7 dni otrzymywały 4PYR w iniekcjach podskórnych. Z kolei nie zaobserwowano wpływu 4PYR na funkcję śródbłonka naczyń wieńcowych oraz na funkcję mechaniczną serca szczura po krótkiej, 5-minutowej infuzji tego związku w modelu perfundowanego serca szczura.

Badania przedstawione w niniejszym opracowaniu przyczyniły się do identyfikacji nowych metabolitów związanych z przemianami nikotynamidu oraz do określenia potencjalnych kierunków ich toksycznego działania. Może to pomóc w zrozumieniu patologii takich jak przewlekła choroba nerek oraz przyczynić się do rozwoju terapii.

## 8. ABSTRACT

Nicotinamide and its derivatives containing an oxidized nicotinamide ring in its structure attracted substantial scientific interest in the recent years. This dissertation is focused on the metabolism and the effects of one of such derivatives: 4-pirydone-3-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl (4PYR).

The aim of the studies that constitute basis for this thesis was the identification of new metabolites of 4PYR as well as evaluation of the metabolism and distribution of 4PYR and its metabolites in blood and animal tissues. Further aim was evaluation of the impact of this compound on vascular endothelial function in mice *in vivo* and on coronary endothelial and mechanical function of the heart in perfused rat heart model.

An important discovery presented in this thesis was the identification of a new metabolite of the 4PYR that is present in human erythrocytes and in animal tissues. The chemical structure of this compound as well as its precursor which was a monophosphate derivative of the 4PYR (4PYMP) were identified. The proposed name of the new metabolite was: 4-pirydone-3-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside adenine dinucleotide (4PYRAD).

In a next step 4PYR metabolism was examined in homogenates of animals tissues where this compound was converted to 4PYMP and 4PYRAD. The distribution and the metabolism of 4PYR in animal tissues *in vivo* were also analyzed. The results confirmed the ability of all tissues to transform 4PYR to 4PYMP and 4PYRAD. However the kidneys was the only tissue where neither accumulation of 4PYR nor formation of its derivatives in *in vivo* models were observed.

An impact of the 4PYR on the cardiovascular system was assessed using mouse models *in vivo* (flow-mediated vasodilation - FMV), and *ex vivo* (endothelial function in isolated aortic rings). The vascular endothelial function in mouse was impaired after 7 days of 4PYR treatment. On the other hand, no effect on a coronary endothelial or mechanical function in rat heart was observed after a short 5-minute infusion of 4PYR in the perfused rat heart model.

The research presented in this thesis contributed to the identification of new metabolites associated with nicotinamide metabolism and highlighted potential directions for their toxicity. This may help in understanding the pathologies such as chronic kidney disease and contribute to the development of therapies.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Bankowski E.; *Biochemia*; 2009; wyd. 2; Elsevier Urban&Partner Wrocław
2. Birnbaumer L.; From GTP and G proteins to TRPC channels: a personal account; *J. Mol. Med. (Berl)*; 2015; 93; 941-953
3. Cohen P., Hardie D. G.; The actions of cyclic AMP on biosynthetic processes are mediated indirectly by cyclic AMP-dependent protein kinase; *Biochim. Biophys. Acta*; 1991; 1094; 292-299
4. Rogne M., Tasken K.; Compartmentalization of cAMP signaling in adipogenesis, lipogenesis, and lipolysis; *Horm. Metab. Res.*; 2014; 46; 833-840
5. Borysova L., Burduga T.; Evidence that NO/cGMP/PKG signalling cascade mediates endothelium dependent inhibition of IP3R mediated Ca(2+) oscillations in myocytes and pericytes of ureteric microvascular network in situ; *Cell Calcium*; 2015; 58; 535-540
6. Nygaard G., Herfindal L., Kopperud R., Aragay A. M., Holmsen H., Doskeland S. O., Kleppe R., Selheim F.; Time-dependent inhibitory effects of cGMP-analogues on thrombin-induced platelet-derived microparticles formation, platelet aggregation, and P-selectin expression; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2014; 449; 357-363
7. Burnstock G.; Purine and pyrimidine receptors; *Cell Mol. Life Sci.*; 2007; 64; 1471-1483
8. Boyle D. L., Kowaluk E. A., Jarvis M. F., Lee C. H., Bhagwat S. S., Williams M., Firestein G. S.; Anti-inflammatory effects of ABT-702, a novel non-nucleoside adenosine kinase inhibitor, in rat adjuvant arthritis; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 2001; 296; 495-500
9. King B. F., Townsend-Nicholson A., Burnstock G.; Metabotropic receptors for ATP and UTP: exploring the correspondence between native and recombinant nucleotide receptors; *Trends Pharmacol. Sci.*; 1998; 19; 506-514
10. Osman L., Chester A. H., Amrani M., Yacoub M. H., Smolenski R. T.; A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification: a potential target for atorvastatin; *Circulation*; 2006; 114; I566-I572
11. De Giorgi M., Cinti A., Pelikant-Malecka I., Chisci E., Lavitrano M., Giovannoni R., Smolenski R. T.; Co-expression of functional human Heme Oxygenase 1, Ecto-5'-Nucleotidase and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 by "self-cleaving" 2A peptide system; *Plasmid*; 2015; 79; 22-29
12. De Giorgi M., Pelikant-Malecka I., Sielicka A., Slominska E. M., Giovannoni R., Cinti A., Cerrito M. G., Lavitrano M., Smolenski R. T.; Functional analysis of expression of human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 and/or ecto-5'-nucleotidase in pig endothelial cells; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2014; 33; 313-318
13. Dolle C., Rack J. G., Ziegler M.; NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria; *FEBS J.*; 2013; 280; 3530-3541
14. Nikiforov A., Kulikova V., Ziegler M.; The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization; *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.*; 2015; 50; 284-297
15. Giancaspero T. A., Galluccio M., Miccolis A., Leone P., Eberini I., Iametti S., Indiveri C., Barile M.; Human FAD synthase is a bi-functional enzyme with a FAD hydrolase activity in the molybdopterin binding domain; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2015; 465; 443-449
16. Magni G., Amici A., Emanuelli M., Orsomando G., Raffaelli N., Ruggieri S.; Enzymology of NAD+ homeostasis in man; *Cell Mol. Life Sci.*; 2004; 61; 19-34
17. Verdin E.; NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration; *Science*; 2015; 350; 1208-1213
18. Bieganowski P., Brenner C.; Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD+ in fungi and humans; *Cell*; 2004; 117; 495-502
19. Hoshino J., Schluter U., Kroger H.; Nicotinamide methylation and its relation to NAD synthesis in rat liver tissue culture. Biochemical basis for the physiological activities of 1-methylnicotinamide; *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 801; 250-258
20. Felsted R. L., Chaykin S.; N1-methylnicotinamide oxidation in a number of mammals; *J. Biol. Chem.*; 1967; 242; 1274-1279
21. Quinn G. P., Greengard P.; The pathway for the biosynthesis of N 1-methyl-4-pyridone-3-carboxamide; *Arch. Biochem. Biophys.*; 1966; 115; 146-152
22. Stanulovic M., Chaykin S.; Metabolic origins of the pyridones of N 1 -methylnicotinamide in man and rat; *Arch. Biochem. Biophys.*; 1971; 145; 35-42



23. Stanulovic M., Chaykin S.; Aldehyde oxidase: catalysis of the oxidation of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide and pyridoxal; *Arch. Biochem. Biophys.*; 1971; 145; 27-34
24. Oliver F. J., Menissier-de M. J., de M. G.; Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease; *Am. J. Hum. Genet.*; 1999; 64; 1282-1288
25. Lindahl T., Satoh M. S., Poirier G. G., Klungland A.; Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks; *Trends Biochem. Sci.*; 1995; 20; 405-411
26. Ziegler M.; New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling; *Eur. J. Biochem.*; 2000; 267; 1550-1564
27. Herceg Z., Wang Z. Q.; Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death; *Mutat. Res.*; 2001; 477; 97-110
28. Smith S., de L. T.; Tankyrase promotes telomere elongation in human cells; *Curr. Biol.*; 2000; 10; 1299-1302
29. Verdone L., La F. M., Ciccarone F., Caiafa P., Zampieri M., Caserta M.; Poly(ADP-Ribosyl)ation Affects Histone Acetylation and Transcription; *PLoS. One.*; 2015; 10; e0144287-
30. Chiarugi A.; Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited; *Trends Pharmacol. Sci.*; 2002; 23; 122-129
31. Beneke S.; Poly(ADP-ribose) polymerase activity in different pathologies--the link to inflammation and infarction; *Exp. Gerontol.*; 2008; 43; 605-614
32. Nguewa P. A., Fuertes M. A., Valladares B., Alonso C., Perez J. M.; Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications; *Prog. Biophys. Mol. Biol.*; 2005; 88; 143-172
33. Mericskay M.; Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential; *Arch. Cardiovasc. Dis.*; 2015;
34. Yang T., Sauve A. A.; NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity; *AAPS. J.*; 2006; 8; E632-E643
35. Sauve A. A., Youn D. Y.; Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation; *Curr. Opin. Chem. Biol.*; 2012; 16; 535-543
36. Saunders L. R., Verdin E.; Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging; *Oncogene*; 2007; 26; 5489-5504
37. Wang S., Zhu W., Wang X., Li J., Zhang K., Zhang L., Zhao Y. J., Lee H. C., Zhang L.; Design, synthesis and SAR studies of NAD analogues as potent inhibitors towards CD38 NADase; *Molecules.*; 2014; 19; 15754-15767
38. Dutta S. P., Crain P. F., McCloskey J. A., Chheda G. B.; Isolation and characterization of 1-beta-D-ribofuranosylpyridin-4-one-3-carboxamide from human urine; *Life Sci.*; 1979; 24; 1381-1388
39. Mills G. C., Davis N. J., Lertratanakoon K.; Isolation and identification of 1-ribosyl pyridone nucleosides from human urine; *Nucleos. Nucleot.*; 1989; 8; 415-430
40. Heldman D. A., Grever M. R., Trewyn R. W.; Differential excretion of modified nucleosides in adult acute leukemia; *Blood*; 1983; 61; 291-296
41. Mrochek J. E., Dinsmore S. R., Waalkes T. P.; Analytic techniques in the separation and identification of specific purine and pyrimidine degradation products of tRNA: application to urine samples from cancer patients; *J. Natl. Cancer Inst.*; 1974; 53; 1553-1563
42. Gehrke C. W., Zumwalt R. W., McCune R. A., Kuo K. C.; Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of modified nucleosides in physiological fluids, tRNA, and DNA; *Recent Results Cancer Res.*; 1983; 84; 344-359
43. Schlimme E., Boos K.-S., Frister H., Raezke K.-P., Wilmers B.; Ribonucleosides: marker molecules in body fluids; *Fresenius Z. Anal. Chem.*; 1987; 327; 77-78
44. Chheda G. B., Patrzyc H. B., Tworek H. A., Dutta S. P.; Isolation and Characterisation of an Unusual Nucleoside, 1-alpha-D-Ribofuranosyl-4-pyridone-3-carboxamide, from the Urines of Normal Human Individuals and Leukemic Patients; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 1995; 14; 1519-1537
45. Schram K. H.; Urinary nucleosides; *Mass Spectrom. Rev.*; 1998; 17; 131-251
46. Laurence A., Edbury S. M., Marinaki A. M., Smolenski R. T., Goldsmith D. J., Simmonds H. A., Carrey E. A.; 4-pyridone-3-carboxamide ribonucleoside triphosphate accumulating in erythrocytes in end stage renal failure originates from tryptophan metabolism; *Clin. Exp. Med.*; 2007; 7; 135-141
47. Slominska E. M., Carrey E. A., Foks H., Orlewska C., Wiczerzak E., Sowinski P., Yacoub M. H., Marinaki A. M., Simmonds H. A., Smolenski R. T.; A novel nucleotide found in human erythrocytes, 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate; *J. Biol. Chem.*; 2006; 281; 32057-32064

48. Speer J., Gehrke C. W., Kuo K. C., Waalkes T. P., Borek E.; tRNA breakdown products as markers for cancer; *Cancer*; 1979; 44; 2120-2123
49. Carrey E. A., Synesiou E., Simmonds H. A., Fairbanks L. D.; The novel nucleotide 4KNTP, in high concentrations in erythrocytes of renal failure children: a comparison with accumulation of other putative precursors in the plasma; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2006; 25; 1051-1054
50. Shibata K., Kakehi H., Matsuo H.; Niacin catabolism in rodents; *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*; 1990; 36; 87-98
51. Synesiou E., Fairbanks L. D., Simmonds H. A., Slominska E. M., Smolenski R. T., Carrey E. A.; 4-Pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside triphosphate (4PyTP), a novel NAD metabolite accumulating in erythrocytes of uremic children: a biomarker for a toxic NAD analogue in other tissues?; *Toxins. (Basel)*; 2011; 3; 520-537
52. Slominska E. M., Orlewska C., Yuen A., Osman L., Romaszko P., Sokolowska E., Foks H., Simmonds H. A., Yacoub M. H., Smolenski R. T.; Metabolism of 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside triphosphate and its nucleoside precursor in the erythrocytes; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2008; 27; 830-834
53. Dudley E., Lemiere F., Van D. W., Esmans E., El-Sharkawi A. M., Games D. E., Brenton A. G., Newton R. P.; Urinary modified nucleosides as tumor markers; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2003; 22; 987-989
54. Hsu W. Y., Chen C. J., Huang Y. C., Tsai F. J., Jeng L. B., Lai C. C.; Urinary nucleosides as biomarkers of breast, colon, lung, and gastric cancer in Taiwanese; *PLoS. One.*; 2013; 8; e81701-
55. Seidel A., Brunner S., Seidel P., Fritz G. I., Herbarth O.; Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control; *Br. J. Cancer*; 2006; 94; 1726-1733
56. Struck W., Siluk D., Yumba-Mpanga A., Markuszewski M., Kaliszczan R., Markuszewski M. J.; Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers; *J. Chromatogr. A*; 2013; 1283; 122-131
57. Trewyn R. W., Heldman D. A., rever M. R.; Clinical application of urinary nucleosides in cancer; *Cancer Bull*; 1985; 37; 82-82
58. Borek E., Sharma O. K., Waalkes T. P.; New applications of urinary nucleoside markers; *Recent Results Cancer Res.*; 1983; 84; 301-316
59. Fischbein A., Sharma O. K., Selikoff I. J., Borek E.; Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma; *Cancer Res.*; 1983; 43; 2971-2974
60. Oerlemans F., Lange F.; Major and modified nucleosides as markers in ovarian cancer: a pilot study; *Gynecol. Obstet. Invest*; 1986; 22; 212-217
61. Trewyn R. W., Glaser R., Kelly D. R., Jackson D. G., Graham W. P., III, Speicher C. E.; Elevated nucleoside excretion by patients with nasopharyngeal carcinoma. Preliminary diagnostic/prognostic evaluations; *Cancer*; 1982; 49; 2513-2517
62. Intrieri M., Calcagno G., Oriani G., Pane F., Zarrilli F., Cataldo P. T., Foggia M., Piazza M., Salvatore F., Sacchetti L.; Pseudouridine and 1-ribosylpyridin-4-one-3-carboxamide (PCNR) serum concentrations in human immunodeficiency virus type 1-infected patients are independent predictors for AIDS progression; *J. Infect. Dis.*; 1996; 174; 199-203
63. Slominska E. M., Borkowski T., Rybakowska I., Abramowicz-Glinka M., Orlewska C., Smolenski R. T.; In vitro and cellular effects of 4-pyridone-3-carboxamide riboside on enzymes of nucleotide metabolism; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2014; 33; 353-357
64. Smolenski R. T., Rybakowska I., Turyn J., Romaszko P., Zabielska M., Taegtmeier A., Slominska E. M., Kaletha K. K., Barton P. J.; AMP deaminase 1 gene polymorphism and heart disease-a genetic association that highlights new treatment; *Cardiovasc. Drugs Ther.*; 2014; 28; 183-189
65. Kolek M. J., Carlquist J. F., Thaneemit-Chen S., Lazzeroni L. C., Whiting B. M., Horne B. D., Muhlestein J. B., Lavori P., Anderson J. L.; The role of a common adenosine monophosphate deaminase (AMPD)-1 polymorphism in outcomes of ischemic and nonischemic heart failure; *J. Card Fail.*; 2005; 11; 677-683
66. Pelikant-Malecka I., Sielicka A., Kaniewska E., Smolenski R. T., Slominska E. M.; 4-Pyridone-3-carboxamide-1beta-D-ribose nucleoside metabolism in endothelial cells and its impact on cellular energetic balance; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2014; 33; 338-341
67. Onen C. L.; Epidemiology of Cardiovascular Toxins; *The Heart and Toxins*; 2015; 1-35
68. Vanholder R., Glorieux G., Lameire N.; Uraemic toxins and cardiovascular disease; *Nephrol. Dial. Transplant.*; 2003; 18; 463-466



69. Vanholder R., De S. R., Glorieux G., Argiles A., Baurmeister U., Brunet P., Clark W., Cohen G., De Deyn P. P., Deppisch R., Descamps-Latscha B., Henle T., Jorres A., Lemke H. D., Massy Z. A., Passlick-Deetjen J., Rodriguez M., Stegmayr B., Stenvinkel P., Tetta C., Wanner C., Zidek W.; Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability; *Kidney Int.*; 2003; 63; 1934-1943
70. Vanholder R., Meert N., Schepers E., Glorieux G.; Uremic toxins: do we know enough to explain uremia?; *Blood Purif.*; 2008; 26; 77-81
71. Vanholder R., Van L. S., Glorieux G.; What is new in uremic toxicity?; *Pediatr. Nephrol.*; 2008; 23; 1211-1221
72. Lekawanvijit S., Kompa A. R., Wang B. H., Kelly D. J., Krum H.; Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins; *Circ. Res.*; 2012; 111; 1470-1483
73. McCully K. S.; Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis; *Am. J. Pathol.*; 1969; 56; 111-128
74. Welch G. N., Loscalzo J.; Homocysteine and atherothrombosis; *N. Engl. J. Med.*; 1998; 338; 1042-1050
75. Tsai J. C., Perrella M. A., Yoshizumi M., Hsieh C. M., Haber E., Schlegel R., Lee M. E.; Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 1994; 91; 6369-6373
76. Graham I. M., et.al.; Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease; *JAMA*; 1997; 277; 1775-1781
77. Hankey G. J., Eikelboom J. W.; Homocysteine and vascular disease; *Indian Heart J.*; 2000; 52; S18-S26
78. Wald D. S., Law M., Morris J. K.; Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis; *BMJ*; 2002; 325; 1202-
79. Perry I. J., Refsum H., Morris R. W., Ebrahim S. B., Ueland P. M., Shaper A. G.; Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men; *Lancet*; 1995; 346; 1395-1398
80. Deloughery T. G.; Hyperhomocysteinemia in Ischemic Stroke; *Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke*; 2002; 2; 111-119
81. Sydow K., Schwedhelm E., Arakawa N., Bode-Boger S. M., Tsikas D., Hornig B., Frolich J. C., Boger R. H.; ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins; *Cardiovasc. Res.*; 2003; 57; 244-252
82. Fleck C., Janz A., Schweitzer F., Karge E., Schwertfeger M., Stein G.; Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients; *Kidney Int. Suppl.*; 2001; 78; S14-S18
83. Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., Moncada S.; Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis; *J. Cardiovasc. Pharmacol.*; 1992; 20 Suppl 12; S60-S62
84. Tran C. T., Leiper J. M., Vallance P.; The DDAH/ADMA/NOS pathway; *Atheroscler. Suppl.*; 2003; 4; 33-40
85. Boger R. H., Bode-Boger S. M., Szuba A., Tsao P. S., Chan J. R., Tangphao O., Blaschke T. F., Cooke J. P.; Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia; *Circulation*; 1998; 98; 1842-1847
86. Miyazaki H., Matsuoka H., Cooke J. P., Usui M., Ueda S., Okuda S., Imaizumi T.; Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis; *Circulation*; 1999; 99; 1141-1146
87. Nopora M., Graczykowska A., Prochniewska K., Zdrojewski Z., Calka A., Gorny J., Stompor T.; Relationship between serum asymmetric dimethylarginine and left ventricular structure and function in patients with endstage renal disease treated with hemodialysis; *Pol. Arch. Med. Wewn.*; 2012; 122; 226-234
88. Zoccali C., Bode-Boger S., Mallamaci F., Benedetto F., Tripepi G., Malatino L., Cataliotti A., Bellanuova I., Fermo I., Frolich J., Boger R.; Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study; *Lancet*; 2001; 358; 2113-2117
89. Bode-Boger S. M., Scalera F., Kielstein J. T., Martens-Lobenhoffer J., Breithardt G., Fobker M., Reinecke H.; Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease; *J. Am. Soc. Nephrol.*; 2006; 17; 1128-1134
90. Mann G. E., Yudilevich D. L., Sobrevia L.; Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells; *Physiol Rev.*; 2003; 83; 183-252

91. Schepers E., Barreto D. V., Liabeuf S., Glorieux G., Eloit S., Barreto F. C., Massy Z., Vanholder R.; Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease; *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*; 2011; 6; 2374-2383
92. Rutkowski P., Slominska E. M., Wolyniec W., Smolenski R. T., Szolkiewicz M., Swierczynski J., Rutkowski B.; Nicotinamide metabolites accumulate in the tissues of uremic rats; *J. Ren Nutr.*; 2008; 18; 56-59
93. Rutkowski B., Rutkowski P., Slominska E., Smolenski R. T., Swierczynski J.; Cellular toxicity of nicotinamide metabolites; *J. Ren Nutr.*; 2012; 22; 95-97
94. Rutkowski B., Rutkowski P., Slominska E., Swierczynski J.; Distribution of purine nucleotides in uremic fluids and tissues; *J. Ren Nutr.*; 2010; 20; S7-10
95. Slominska E. M., Smolenski R. T., Szolkiewicz M., Leaver N., Rutkowski B., Simmonds H. A., Swierczynski J.; Accumulation of plasma N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in patients with chronic renal failure; *Mol. Cell Biochem.*; 2002; 231; 83-88
96. Slominska E. M., Smolenski R. T., Osborne F., Swierczynski J., Yacoub M. H.; The effect of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide--A nicotinamide catabolite on poly ADP-ribosylation and oxidative stress injury in endothelial cells; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2005; 24; 259-262
97. Slominska E. M., Kowalik K., Smolenski R. T., Szolkiewicz M., Rutkowski P., Rutkowski B., Swierczynski J.; Accumulation of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in children with chronic renal failure; *Pediatr. Nephrol.*; 2006; 21; 800-806
98. Maisonneuve P., Agodoa L., Gellert R., Stewart J. H., Bucciante G., Lowenfels A. B., Wolfe R. A., Jones E., Disney A. P., Briggs D., McCredie M., Boyle P.; Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study; *Lancet*; 1999; 354; 93-99
99. Diehl K. H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J. M., van d., V; A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes; *J. Appl. Toxicol.*; 2001; 21; 15-23
100. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition; *National Academy of Sciences*; 2011;
101. Tamura Y., Naemura A., Inoue A., Ijiri Y., Seki J., Yada T., Goto M., Shinohara M., Kawashima S., Giddings J.C., Yamamoto J.; Impaired endothelial function may be due to decreased aortic tetrahydrobiopterin, assessed by a new flow-mediated vasodilation in vivo in hypercholesterolemic/atherogenic mice.; *Blood Coagulation and Fibrinolysis*; 2009; 20; 699-705
102. Langendorff H.; Untersuchungen am uberlebenden Säugethierherzen; *Pflugers Arch. Gesamte Physiol Menschen. Tiere.*; 1895; 61; 291-332
103. Smolenski R. T., Lachno D. R., Ledingham S. J., Yacoub M. H.; Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation; *J. Chromatogr.*; 1990; 527; 414-420
104. Pacaud K., Tritsch D., Burger A., Biellmann J. F.; Determination of the transglycosidation activity of NAD<sup>+</sup> glycohydrolases with 4-(2'-alkyl-sulfanyl-vinyl)-pyridine derivatives generating chromophoric NAD<sup>+</sup> analogs; *Bioorg. Chem.*; 2003; 31; 288-305
105. Tono-oka S.; Enzymatic Synthesis of Pyridine Nucleotides. Structural Property of Some New NAD-analogs, and Base Conditions Available for the Analog Formation; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*; 1982; 55; 1531-1537
106. Polzonetti V., Pucciarelli S., Vita A., Vincenzetti S., Natalini P.; CD38 in bovine lung: A multicatalytic NADase; *J. Membr. Biol.*; 2009; 227; 105-110
107. Arch J. R., Newsholme E. A.; Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine; *Biochem. J.*; 1978; 174; 965-977
108. Bauer V., Sotnikova R., Drabikova K.; Effects of reactive oxygen species and neutrophils on endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta; *Interdiscip. Toxicol.*; 2011; 4; 191-197
109. Bartus M., Lomnicka M., Lorkowska B., Franczyk M., Kostogrys R. B., Pisulewski P. M., Chlopicki S.; Hypertriglyceridemia but not hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction in the rat; *Pharmacol. Rep.*; 2005; 57 Suppl; 127-137
110. Bartus M., Lomnicka M., Kostogrys R. B., Kazmierczak P., Watala C., Slominska E. M., Smolenski R. T., Pisulewski P. M., Adamus J., Gebicki J., Chlopicki S.; 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats; *Pharmacol. Rep.*; 2008; 60; 127-138
111. Bauer V., Sotnikova R., Drabikova K.; Effects of activated neutrophils on isolated rings of rat thoracic aorta; *J. Physiol Pharmacol.*; 2011; 62; 513-520

112. Tugrul I., Dost T., Demir O., Gokalp F., Oz O., Girit N., Birincioglu M.; Effects of a PPAR-gamma receptor agonist and an angiotensin receptor antagonist on aortic contractile responses to alpha receptor agonists in diabetic and/or hypertensive rats; *Cardiovasc. J. Afr.*; 2016; 27; 1-6
113. Moens A. L., Goovaerts I., Claeys M. J., Vrints C. J.; Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool?; *Chest*; 2005; 127; 2254-2263
114. Soga J., Nishioka K., Nakamura S., Umemura T., Jitsuiki D., Hidaka T., Teragawa H., Takemoto H., Goto C., Yoshizumi M., Chayama K., Higashi Y.; Measurement of flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a comparison of measurements in the seated and supine positions; *Circ. J.*; 2007; 71; 736-740
115. Uehata A., Lieberman E. H., Gerhard M. D., Anderson T. J., Ganz P., Polak J. F., Creager M. A., Yeung A. C.; Noninvasive assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery; *Vasc. Med.*; 1997; 2; 87-92
116. Anderson T. J., Uehata A., Gerhard M. D., Meredith I. T., Knab S., Delagrangue D., Lieberman E. H., Ganz P., Creager M. A., Yeung A. C., .; Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations; *J. Am. Coll. Cardiol.*; 1995; 26; 1235-1241
117. Borkowski T.; Wpływ inhibitorów deaminazy AMP na metabolizm i czynność serca w eksperymentalnych modelach niewydolności i niedokrwienia.; *Rozprawa doktorska*; 2009;Gdański Uniwersytet Medyczny