

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

*Barbara Kutryb-Zajac*

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów  
w stenozie aortalnej i miażdżycy naczyń**

PhD THESIS

**Extracellular nucleotide metabolism  
in aortic stenosis and atherosclerosis**

GDAŃSK 2017

Wydano za zgodą  
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Issued with the consent of  
Dean of the Medical Faculty

Katedra i Zakład Biochemii  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Department of Biochemistry  
Medical University of Gdansk

Promotor/Supervisor  
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński

*Pragnę podziękować wszystkim, bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.*

*Przede wszystkim mojemu Promotorowi,  
Profesorowi Ryszardowi Tomaszowi Smoleńskiemu  
za opiekę merytoryczną, okazane wsparcie i rozbudzenie pasji do nauki.*

*Składam również serdeczne podziękowania Profesorowi Stefanowi Chłopickiemu  
za możliwość realizacji badań, okazaną pomoc i życzliwość.*

*Dziękuję współautorom oraz wszystkim osobom zaangażowanym w uzyskanie materiału do  
badań oraz pomoc w badaniach będących podstawą publikacji składających się na niniejszą  
rozprawę doktorską.*

*Serdecznie dziękuję Rodzicom za wsparcie i troskę.*

*Dziękuję Mężowi za pomoc, zrozumienie i bezustanną motywację w dążeniu do celu.*

Badania wykonano w ramach realizacji projektów Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (TEAM/2011-8/7) oraz Narodowego Centrum Nauki (PRELUDIUM 2014/13/N/NZ4/04471) w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanej przez prof. dr hab. Juliana Świerczyńskiego (do 09/2016) oraz prof. dr hab. Ryszarda T. Smoleńskiego (od 10/2016), we współpracy z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) w Krakowie, kierowanym przez prof. dr hab. Stefana Chłopickiego.

This research has been performed within the projects supported by the Foundation for Polish Science (TEAM/2011-8/7) and National Science Centre in Poland (PRELUDIUM 2014/13/N/NZ4/04471) at the Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, headed by prof. dr hab. Julian Swierczynski (untill 09/2016) and prof. dr hab. Ryszard T. Smolenski (from 10/2016), in collaboration with the Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET) in Krakow, headed by prof. dr hab. Stefan Chlopicki.



1. WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS.....	7
2. WSTĘP .....	10
2.1 Znaczenie nukleotydów i adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej .....	10
2.1.1 Mechanizmy uwalniania nukleotydów z komórek do przestrzeni pozakomórkowej .....	10
2.1.2 Receptory nukleotydowe.....	11
2.1.3 Przemiany nukleotydów w przestrzeni pozakomórkowej .....	11
2.1.4 Receptorowe mechanizmy fizjologicznego działania adenozyiny .....	12
2.1.5 Rodzaje transportu nukleotydów .....	14
2.1.6 Katabolizm adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej .....	14
2.2 Patogeneza stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic .....	16
2.3 Znaczenie sygnalizacji purynergiczej w patologii stenozy aortalnej i miażdżycy .....	17
2.4 Przemiany nukleotydów i adenozyiny na powierzchni komórki jako cel terapeutyczny w chorobach sercowo-naczyniowych .....	20
3. CEL PRACY.....	22
4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ .....	23
4.1 Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów i adenozyiny na powierzchni naczyń objętych procesem miażdżycowym .....	23
4.2 Identyfikacja komórek będących źródłem zwiększonej aktywności ekto-deaminazy adenozyiny w miażdżycy .....	26
4.3 Ocena wpływu czynników pro- i przeciwmiażdżycowych na aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów na powierzchni komórek śródbłonna i makrofagów .....	28
4.4 Porównanie aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyiny na powierzchni naczyń i zastawek serca .....	30
4.5 Wpływ procedury przygotowania biologicznej protezy zastawkowej na aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów adeninowych i adenozyiny .....	31
4.6 Wpływ hamowania ekto-deaminazy adenozyiny na rozwój miażdżycy i ocena jego potencjału terapeutycznego.....	33
5. WNIOSKI .....	35
6. INTRODUCTION .....	36
6.1 The role of nucleotides and adenosine in the extracellular space.....	36
6.1.1 Mechanisms of nucleotide release from cells into the extracellular space .....	36
6.1.2 Nucleotide receptors .....	37
6.1.3 Extracellular nucleotide metabolism.....	37
6.1.4 Receptor mechanisms of physiological effects of adenosine.....	38
6.1.5 The types of nucleoside transport .....	40
6.1.6 Extracellular adenosine catabolism.....	40
6.2 Pathogenesis of aortic stenosis and atherosclerosis.....	41
6.3 Purinergic signaling in the pathophysiology of aortic stenosis and atherosclerosis.....	42
6.4 Enzymes of extracellular nucleotide and adenosine metabolism as therapeutic targets in cardiovascular diseases .....	45
7. AIMS .....	46
8. THE MOST IMPORTANT RESULTS .....	47
8.1 Extracellular nucleotide and adenosine metabolism on the surface of atherosclerotic vessels .....	47
8.2 Cellular sources of increased activity of ecto-adenosine deaminase in atherosclerosis....	50
8.3 The effects of pro- and anti-atherosclerotic factors on the activities of ecto-enzymes engaged in the nucleotide metabolism on the surface of endothelial cells and macrophages.....	51

8.4	The comparison of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzyme activities on the surface of vessels and heart valves .....	53
8.5	The impact of the procedures for the preparation of biological heart valve prostheses on the activity of extracellular adenine nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzymes.....	54
8.6	The impact of ecto-adenosine deaminase inhibition on atherosclerosis development and its therapeutic potential .....	56
9.	CONCLUSIONS .....	58
10.	PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES .....	59
11.	STRESZCZENIE.....	65
12.	ABSTRACT .....	66
13.	WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ LIST OF PAPERS .....	67
	ZAŁĄCZNIKI/ APPENDIX:	
	- PRACA A/ PAPER A	
	- SUPLEMENT PRACY A/ SUPPLEMENT FOR PAPER A	
	- PRACA B/ PAPER B	
	- PRACA C/ PAPER C	
	- PRACA D/ PAPER D	

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS

ABA	– aorta zstępująca brzuszna/ descending abdominal aorta
ADP	– adozynodwufosforan/ adenosine diphosphate
ALP	– fosfataza alkaliczna/ alkaline phosphatase
AMP	– adozynomonofosforan/ adenosine monophosphate
AOPCP	– $\alpha$ , $\beta$ -metyleno-ADP/ $\alpha$ , $\beta$ -methylene-ADP
ApoE	– apolipoproteina E/ apolipoprotein E
AR	– korzeń aorty/ aortic root
ARL 67156	– 6-N,N-dietylo-D- $\beta$ - $\gamma$ -dibromometyleno-ATP/ 6-N,N-dietylo-D- $\beta$ - $\gamma$ -dibromometyleno-ATP
ARs	– receptory adozynowe/ adenosine receptors
ATP	– adozynotrójfosforan/ adenosine triphosphate
BCA	– pień ramiennie-głowy/ brachiocephalic artery
cAMP	– cykliczny adozynomonofosforan/ cyclic adenosine monophosphate
C/EBP	– białka wiążące się z sekwencją regulatorową CCAAT/ CCAAT-enhancer-binding proteins
CHOP	– białko homologiczne C/EBP/ C/EBP-homologous protein
CNT	– transporter nukleozydowy Na <sup>+</sup> -zależny/ sodium dependent concentrative nucleoside transporter
CTP	– cytydynotrójfosforan/ cytidine triphosphate
dCF	– 2'-deoksykoformycyna/ 2'-deoxycoformycin
DHA	– kwas dokozaheksaenowy/ docosahexaenoic acid
e5'NT, CD73	– ekto-5' nukleotydaza/ ecto-5' nucleotidase
EC	– komórki śródbłónka/ endothelial cells
EHNA	– erythro-9-(2-hydroksy-3-nonylo)adenina/ erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine
eNPP	– ekto-pyrofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydydowe / ecto-nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases
eNPP1	– ekto-pyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydydowa 1/ ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
eNPP1 Tg	– transgeniczne myszy z nadekspresją eNPP1/ transgenic mice with overexpression of eNPP1

ENT	– równowagowe transportery nukleozydów/ equilibrative nucleoside transporters
eNTPD1, CD39	– ekto-dwufosfohydrolaza trójfosfonukleozydowa 1/ ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
FAD	– dinukleotyd flawinoadeninowy/ flavin adenine dinucleotide
FMN	– mononukleotyd flawinowy/ flavin mononucleotide
Glc	– glukoza/ glucose
GTP	– guanozynotrójfosforan/ guanosine triphosphate
<i>h</i> CD39 Tg	– transgeniczne myszy z nadekspresją ludzkiej CD39/ transgenic mice with overexpression of human CD39
<i>h</i> CD73 Tg	– transgeniczne myszy z obniżoną odpornością po przeszczepie komórek macierzystych pochodzących od pacjentów z mutacją w genie kodującym e5'NT/ immunocompromised transgenic mice after transplantation of stem cells from patients with arterial calcific disease due to deficiency of e5'NT
HPLC-RP	– wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych/ reverse phase high performance liquid chromatography
IFN $\gamma$	– interferon gamma/ interferon gamma
ICAM-1	– cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1/ intracellular adhesion molecule 1
iNOS	– indukowalna syntaza tlenku azotu/ inducible nitric oxide synthase
LDL	– lipoproteiny o niskiej gęstości/ low density lipoproteins
LDLR	– receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości/ low density lipoprotein receptor
LPS	– lipopolisacharyd/ lipopolysaccharide
Mac-1	– integryna $\alpha$ M $\beta$ 2, ligand dla ICAM-1/ $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin, ligand for ICAM-1
Man	– mannitol/ mannitol
M-CSF	– czynnik stymulujący powstawanie kolonii makrofagów/ macrophage colony-stimulating factor
MIP-1 $\alpha$	– białko zapalne makrofagów-1 alfa/ macrophage inflammatory protein-1 alpha
NAD	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy/ nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	– fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego/ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NBTI	– nitrobenzyltioinozyna/ nitrobenzylthioinosine
NF $\kappa$ B	– czynnik jądrowy $\kappa$ B/ $\kappa$ B nuclear factor
NO	– tlenek azotu/ nitric oxide
OMSB	– barwienie <i>Orsein, Martius, Scarlet, Blue</i> / Orsein, Martius, Scarlet and Blue staining
ORO	– barwienie czerwienią oleistą/ Oil red O staining
Pi	– fosforan nieorganiczny/ inorganic phosphate
PTH	– parathormon/ parathyroid hormone
RANKL	– ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika $\kappa$ B/ receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand
ROS	– reaktywne formy tlenu/ reactive oxygen species
SAA	– surowiczy alfa amyloid/ serum alpha amyloid
SCID	– ciężki złożony niedobór odporności immunologicznej/ severe combined immunodeficiency syndrome
scid/scid	– myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności immunologicznej/ mice with severe combine immunodeficiency syndrome
TA	– aorta zstępująca piersiowa/ descending thoracic aorta
TAOS	– całkowity status antyoksydacyjny osocza/ plasma total antioxidant status
TNAP	– tkankowo niespecyficzna fosfataza alkaliczna/ tissue nonspecific alkaline phosphatase
TNAP-OE	– myszy z nadekspresją TNAP/ mice with overexpression of TNAP
TNF	– czynnik martwicy nowotworu/ tumor necrosis factor
UDP	– urydynodwufosforan/ uridine diphosphate
UMP	– urydynomonofosforan/ uridine monophosphate
UTP	– urydynotrójfosforan/ uridine triphosphate
VCAM-1	– cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1/ vascular cell adhesion molecule 1
VEC	– komórki śródbłonna zastawki/ valvular endothelial cells
VIC	– komórki śródmiąższowe zastawki/ valvular interstitial cells
VSMC	– komórki mięśniówki gładkiej naczyń/ vascular smooth muscle cells
vWF	– czynnik von Willebranda/ von Willebrand factor
WT	– myszy szczepu dzikiego/ wild type mice

## 2. WSTĘP

Nukleotydy pełnią kluczową rolę w komórce, zapewniając właściwe funkcjonowanie wielu procesów biologicznych. Stanowią podstawowy składnik strukturalny kwasów nukleinowych, uczestnicząc w przechowywaniu i ekspresji informacji genetycznej.<sup>1</sup> Dzięki obecności wysokoenergetycznych wiązań, nukleotydy takie jak ATP i GTP, pełnią funkcje przenośników energii, gromadzonej w wyniku procesów oddychania komórkowego i szlaków katabolicznych.<sup>1</sup> Ponadto, odpowiadają za przekazywanie sygnałów w komórce (cykliczne nukleotydy)<sup>2</sup>, działają jako efektory allosteryczne (ATP, AMP)<sup>1</sup>, wchodzą w skład kofaktorów enzymów (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FMN, FAD)<sup>3,4</sup> oraz uczestniczą w procesach biosyntezy, m.in. w syntezie glikogenu, glikozaminoglikanów (UTP) i fosfolipidów (CTP).<sup>5</sup> Poza wielokierunkowym działaniem nukleotydów w środowisku wewnątrzkomórkowym, ich obecności w przestrzeni pozakomórkowej nie przypisywano znaczącej funkcji. W latach 70-tych ubiegłego wieku, badania podjęte przez brytyjskiego badacza Geoffrey'a Burnstock'a wykazały istnienie błonowych receptorów stymulowanych przez nukleotydy i będącą produktem katabolizmu nukleotydów adeninowych adenozyne.<sup>6,7</sup> Odkrycie to zapoczątkowało intensywny rozwój badań dotyczących roli nukleotydów i adenozyliny jako cząstek sygnałowych, umożliwiających komunikację międzykomórkową.

### 2.1 Znaczenie nukleotydów i adenozyliny w przestrzeni pozakomórkowej

#### 2.1.1 Mechanizmy uwalniania nukleotydów z komórek do przestrzeni pozakomórkowej

Nukleotydy w przestrzeni pozakomórkowej mogą pochodzić z uszkodzonych komórek, lecz ciekawsze i ważniejsze fizjologicznie są mechanizmy uwalniania nukleotydów drogą egzocytozy, transportu przez błonę komórkową (np. poprzez transportery kasetowe wiążące ATP), kanałami jonowymi zależnymi od potencjału błonowego, bądź semikanałami paneksynowymi i koneksynowymi.<sup>8</sup> W przestrzeni zewnątrzkomórkowej, nukleotydy znajdują się w stężeniach znacznie niższych niż w komórkach. Stężenie zewnątrzkomórkowego ATP oscyluje na poziomie nanomolowym, podczas gdy w komórce osiąga stężenie milimolowe. Stężenia nukleotydów w bezpośrednim sąsiedztwie komórki mogą być jednak wyższe niż w całej przestrzeni pozakomórkowej i w przypadku ATP osiągają wartości mikromolowe.<sup>9,10</sup> W układzie sercowo-naczyniowym nukleotydy mogą być uwalniane zarówno z komórek budujących ścianę naczyń i zastawkę serca, jak i z komórek oraz ich fragmentów krążących we krwi obwodowej.<sup>8</sup> Udział poszczególnych typów komórek w uwalnianiu nukleotydów w układzie sercowo-naczyniowym oraz stany predysponujące do ich zwiększonego uwalniania, opisano w pracy przeglądowej będącej częścią niniejszej rozprawy (Załącznik – Praca D) i podsumowano w Tabeli nr 1.

Źródło komórkowe	Śródbłonek	Komórki mięśniówki gładkiej	Kardiomiocyty	Płytki krwi	Erytrocyty	Komórki układu odpornościowego
Bodziec	Naprężenie ścinające, hipoksja, hiperglikemia	Hiperglikemia, hipoksja	Hipoksja	Kolagen, tromboksan, inne aktywatory płytek	Hipoksja, adrenalina, deformacje	Aktywatory zapalenia
Uwalniane nukleotydy	ATP, UTP	ATP, UTP	ATP, UTP	ADP > ATP	ATP	ATP
Transport	Pęcherzykowy	+	+	+	+	+
	Hemikanały	+	+	+	+	+
	Anionowy			+	+	
	Transporter ABC	+	+	+	+	+
Referencja	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20	21,22

**Tabela 1.** Uwalnianie nukleotydów do przestrzeni pozakomórkowej przez komórki układu sercowo-naczyniowego.

Na podstawie: „Rola nukleotydów i sygnalizacji purynergiczej w stenozie aortalnej i miażdżycy tętnic”, Kutryb-Zajac et al. *Postępy Biologii Komórki* 1/2017; Załącznik – Praca D.

### 2.1.2 Receptory nukleotydowe

Obecne w przestrzeni pozakomórkowej nukleotydy aktywują receptory purynergiczne typu P2, nazywane receptorami nukleotydowymi.<sup>23</sup> Ze względu na budowę i sposób przekazywania sygnału, opisano dwie grupy tych receptorów: P2X i P2Y.<sup>24</sup> Receptory P2X są błonowymi kanałami jonowymi dla kationów Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> oraz Ca<sup>2+</sup> i obejmują 7 podtypów (P2X<sub>1-7</sub>). Z kolei, receptory P2Y, pośród których wyróżniamy 8 podtypów (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11-14</sub>), należą do receptorów metabotropowych, związanych z białkiem G.<sup>25</sup> Mechanizmy działania powyższych receptorów, jak również ich specyficzność względem poszczególnych nukleotydów, opisano w załączonej do rozprawy pracy przeglądowej (Załącznik – Praca D). Występowanie receptorów nukleotydowych w układzie sercowo-naczyniowym podkreśla znaczenie sygnalizacji z udziałem zewnątrzkomórkowych nukleotydów w utrzymywaniu homeostazy tego układu.<sup>23</sup> Obecność poszczególnych podtypów receptorów nukleotydowych w łożysku naczyniowym, jak również efekty ich aktywacji, mogące mieć bezpośredni wpływ na rozwój schorzeń układu sercowo-naczyniowego, zostały przedstawione na Rycinie nr 1.

### 2.1.3 Przemiany nukleotydów w przestrzeni pozakomórkowej

Uwolnione z komórek nukleotydy mogą aktywować specyficzne receptory lub ulegać zewnątrzkomórkowej hydrolizie, przy udziale zakotwiczonej w błonie ekto-enzymów (Rycina 2). Jednym z nich jest ekto-dwufosfohydrolaza trójfosfonukleozydowa występująca w układzie sercowo-naczyniowym głównie w postaci izoformy 1 (eNTPD1, CD39).<sup>26</sup> Enzym ten hydrolizuje ATP do ADP, a następnie ADP do AMP z odłączeniem fosforanu nieorganicznego (Pi) na każdym z etapów. Analogicznym reakcjom hydrolizy podlega zewnątrzkomórkowy UTP, który poprzez UDP, przekształcany jest do UMP. Następnie AMP i UMP przekształcane są w reakcji katalizowanej przez ekto-5' nukleotydazę (e5'NT, CD73) do nukleotydów i Pi.<sup>27</sup> Na skutek tej reakcji, dochodzi do powstania odpowiednio, adenozyliny z AMP i urydyny z UMP. Wykazano, że nukleotydy w przestrzeni pozakomórkowej mogą być również katabolizowane alternatywną drogą

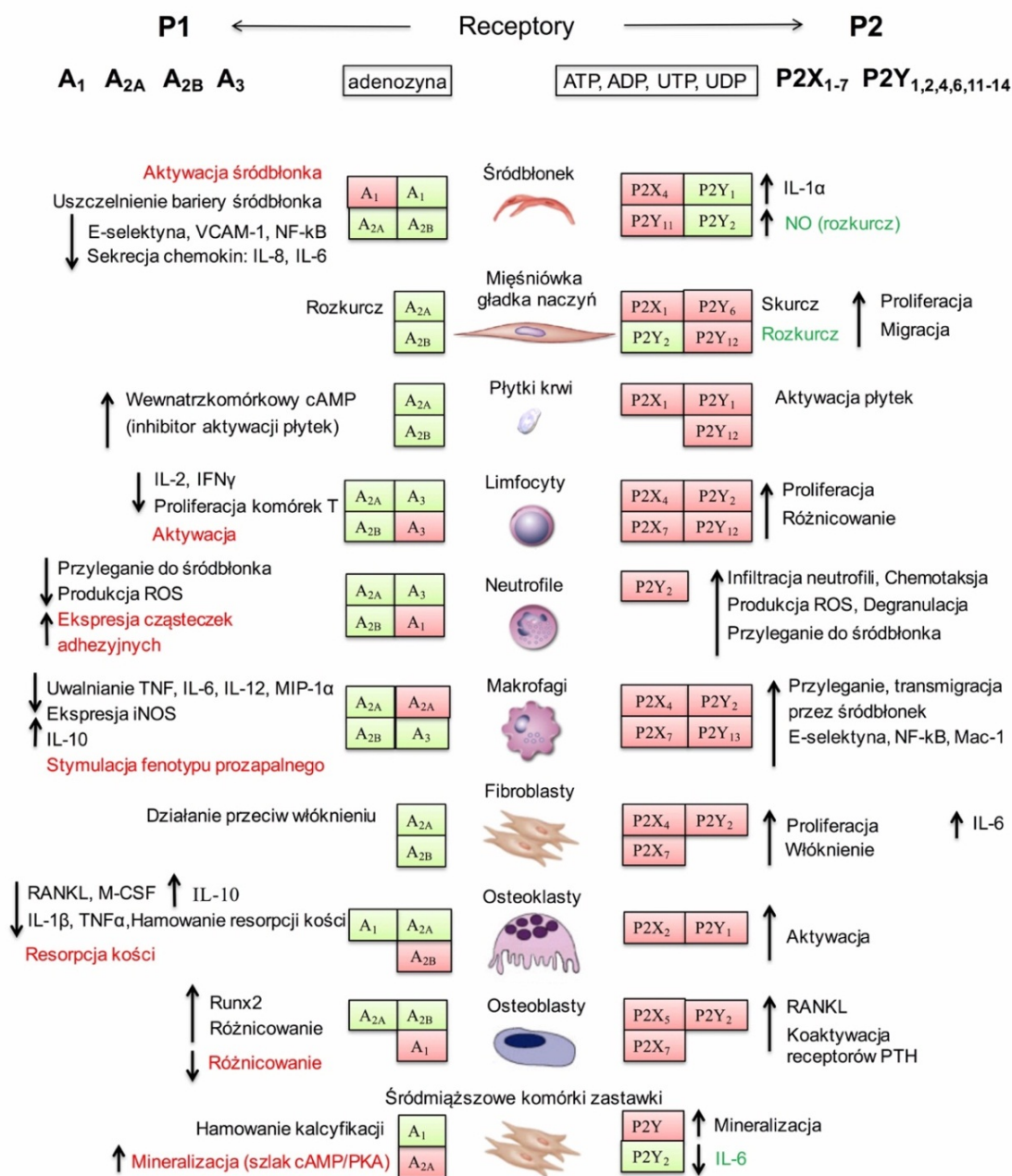
poprzez ekto-pyrofosfatazy/ fosfodiesterazy nukleotydydowe (eNPP) oraz fosfatazę alkaliczną (ALP).<sup>28,29</sup> Ponadto, wykazano obecność ekto-kinaz, katalizujących reakcje przyłączania kolejnych Pi i powstawania nukleotydydów na powierzchni komórek.<sup>30</sup> Jednak wiele doniesień, w tym naszego zespołu, wykazało kluczową rolę ekto-nukleotydydaz, szczególnie eNTPD1 i e5'NT, w katabolizmie nukleotydydów na powierzchni naczyń i zastawek serca.<sup>31-33</sup>

#### **2.1.4 Receptorowe mechanizmy fizjologicznego działania adenozyiny**

Adenozyina powstająca na drodze zewnątrzkomórkowego katabolizmu nukleotydydów również zaliczana jest do cząstek sygnałowych. Nukleozyd ten stymuluje receptory P1, obecne na powierzchni różnych typów komórek, w tym komórek układu sercowo-naczyniowego.<sup>34</sup> Wszystkie podtypy receptorów adenozyinowych (A1, A2a, A2b i A3) należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G.<sup>35</sup> Ich aktywacja (głównie podtypu A2b, stymulowanego przez wysokie stężenie adenozyiny) znosi efekty receptorów P2, co kompensuje promiażdżycowe i prostenotyczne działanie zewnątrzkomórkowych nukleotydydów, jednocześnie podkreślając protekcyjny wpływ adenozyiny (Rycina 1).

W warunkach fizjologicznych, zewnątrzkomórkowe stężenie adenozyiny osiąga wartości od około 30 do 200 nM, pobudzając receptory o niskim powinowactwie (A1, A2a, A3).<sup>35</sup> Do wzrostu stężenia tego nukleozydu w przestrzeni pozakomórkowej dochodzi wskutek aktywnie działającego szlaku hydrolizy zewnątrzkomórkowych nukleotydydów adeninowych (uwalnianych z komórek w odpowiedzi na patologiczne bodźce) lub poprzez transport adenozyiny, powstającej wewnątrzkomórkowo w wyniku przyspieszonego rozpadu ATP.<sup>27,36,37</sup> Charakterystyka receptorów adenozyinowych, mechanizmy ich aktywacji oraz powinowactwo do adenozyiny zostały dokładniej opisane w załączonej pracy przeglądowej (Załącznik – Praca D).





**Rycina 1. Efekty aktywacji receptorów dla nukleotydów i adenozyzny w procesach związanych z rozwojem stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic.**

Czerwone kwadraty przedstawiają patogeniczne efekty aktywacji poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych i nukleotydotowych. Zielone kwadraty przedstawiają protekcyjne działania związane z ich aktywacją. Czerwoną czcionką podkreślono negatywne efekty aktywacji receptorów adenozynowych, natomiast zieloną – pozytywne efekty aktywacji receptorów nukleotydotowych.

Źródło: „Rola nukleotydów i sygnalizacji purynergicznej w stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic”, Kutryb-Zajac et al. *Postępy Biologii Komórki* 1/2017; Załącznik – Praca D.

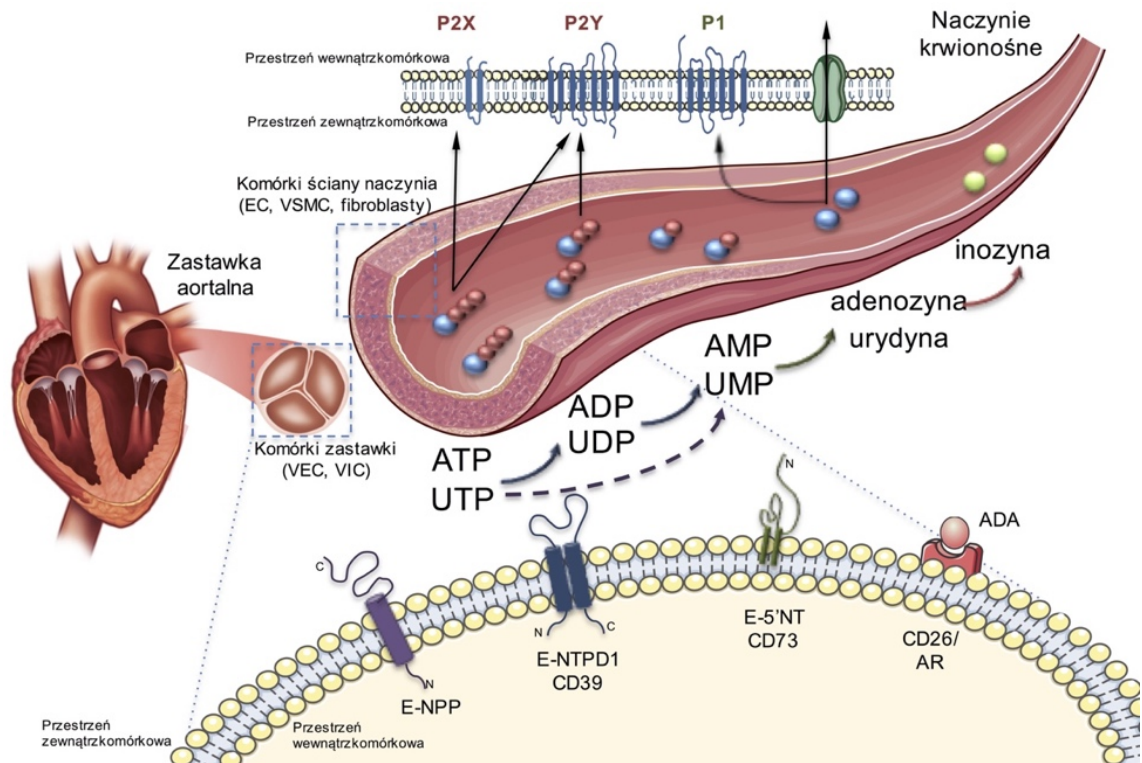
### 2.1.5 Rodzaje transportu nukleozydów

Transport adenozyiny i innych nukleozydów przez błonę komórkową może odbywać się dwukierunkowo, zgodnie z gradientem stężeń, na drodze dyfuzji ułatwionej, poprzez system transporterów ENT (ang. *Equilibrative Nucleoside Transport system*) lub jako transport do komórki w symporcie z jonem  $\text{Na}^+$ , poprzez system CNT (ang. *Concentrative Nucleoside Transport system*).<sup>38</sup> Wyszczególniono 2 podtypy transporterów ENT, wrażliwe (es – ang. *equilibrative sensitive*) oraz niewrażliwe (ei – ang. *equilibrative insensitive*) na hamowanie przez nitrobenzylotioinozynę (NBTI).<sup>39</sup> Dotychczas zidentyfikowano 4 transportery ENT (ENT1-4). Ludzki ENT1 jest wrażliwy na nanomolowe stężenie NBTI i odpowiada za translokację nukleozydów purynowych i pirymidynowych.<sup>40</sup> Ponadto, hamowany jest przez dipirydamol. Do transporterów niewrażliwych na NBTI, w stężeniu do 1  $\mu\text{M}$ , należą pozostałe transportery ENT2-4. ENT2 wykazuje słabsze powinowactwo do naturalnie występujących nukleozydów purynowych i pirymidynowych, z wyjątkiem inozyny. Z kolei, transporter ENT3 posiada strukturę charakterystyczną dla białek błonowych lizosomów i endosomów. Jego aktywność uzależniona jest od pH, a optimum wynosi 5,5, co świadczy o adaptacji do kwaśnego środowiska lizosomów. Transporter ENT4 również wykazuje najwyższą aktywność w pH kwaśnym i uważa się, że odpowiada za regulację stężenia zewnątrzkomórkowej adenozyiny w warunkach obniżonego pH, towarzyszącego ischemii.<sup>41</sup> Ze względu na różnice w przenoszonych substratach, wyróżniono 6 podtypów systemu transportowego CNT, z których zidentyfikowano i opisano 3 białka transportujące: CNT1-3. Transporter CNT1 wykazuje powinowactwo do nukleozydów pirymidynowych i adenozyiny.<sup>42</sup> CNT2 ma zdolność przenoszenia nukleozydów purynowych i urydyny, podczas gdy CNT3 charakteryzuje szeroka specyficzność względem przenoszonych substratów i obejmuje nukleozydy zarówno purynowe, jak i pirymidynowe.<sup>43</sup>

### 2.1.6 Katabolizm adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej

Mechanizmem determinującym pozakomórkowe stężenie adenozyiny, a co za tym idzie jej dostępność dla poszczególnych receptorów, jest także jej zewnątrzkomórkowy katabolizm (Rycina 2). Enzymem katalizującym reakcję hydrolitycznej deaminacji adenozyiny do inozyny lub 2' deoksyadenozyiny do 2' deoksyinozyiny jest deaminaza adenozyiny (ADA), która wykazuje swoją aktywność zarówno w komórkach, jak i na ich powierzchni.<sup>44</sup> Opisano 2 izoformy tego enzymu.<sup>45</sup> Pierwsza z nich, ADA1, kodowana jest przez gen *ADA*, znajdujący się na chromosomie 20q13.12. ADA1 jest szeroko rozpowszechniona w różnych typach komórek, w tym w komórkach układu immunologicznego i erytrocytach.<sup>46</sup> Charakteryzuje się podobnym powinowactwem do adenozyiny, jak do 2' deoksyadenozyiny ( $K_m = 52 \mu\text{M}$ ), a optimum działania osiąga przy pH 7-7,5.<sup>47</sup> Na powierzchni komórki kotwiczona jest przez białko CD26 lub receptory adenozyinowe i tworzy ekto-deaminazę adenozyiny (eADA). Obok funkcji enzymatycznej, eADA może odgrywać istotną rolę jako cząstka adhezyjna wiążąc białka powierzchniowe, występujące na różnych komórkach.<sup>45,48</sup> Ponadto, utworzenie kompleksu ADA1 z receptorami adenozyinowymi może uwrażliwiać receptory na

adenozynę indukując transdukcję przekazywanego sygnału.<sup>45</sup> Izoforma ADA2, kodowana przez gen *CECR1* znajdujący się na chromosomie 22q11.2, jest mało rozpowszechniona i współwystępuje z ADA1 tylko w monocytach i makrofagach.<sup>49,50</sup> Cechuje się kilkukrotnie wyższym powinowactwem do adenozyiny niż do 2' deoksyadenozyny, przy stosunkowo wysokiej wartości  $K_m$  dla adenozyiny ( $K_m = 2$  mM). Optymalne pH dla jej aktywności wynosi ok. 6,5.<sup>47</sup>



### **Rycina 2. Schemat sygnalizacji purynerycznej w układzie sercowo-naczyniowym.**

Uwolnione z komórek nukleotydy aktywują receptory P2 lub ulegają zewnątrzkomórkowej hydrolyzie. Pierwszym enzymem kaskady katabolizmu nukleotydów jest ekto-dwufosfohydrolaza trójfosfonukleozydowa 1 (eNTPD1, CD39), przekształcająca ATP przez ADP do AMP oraz UTP przez UDP do UMP. AMP i UMP są hydrolyzowane przez ekto-5' nukleotydzę (e5'NT, CD73), a powstająca z AMP adenozyina degradowana jest przez ekto-deaminazę adenozyiny (eADA). Hydrolyza zewnątrzkomórkowych nukleotydów może również odbywać się alternatywną drogą poprzez ekto-pyrofosfatazy/ fosfodiesterazy nukleotydydowe (eNPP1) oraz fosfatazę alkaliczną (ALP) nie uwzględnioną na schemacie ze względu na niewielki udział w hydrolyzie zewnątrzkomórkowego AMP, w stężeniach fizjologicznych.

Źródło: „Rola nukleotydów i sygnalizacji purynerycznej w stenozie aortalnej i miażdżycy tętnic”, Kutryb-Zajac et al. *Postępy Biologii Komórki* 1/2017; Załącznik – Praca D.

## 2.2 Patogeneza stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic

Choroby układu sercowo-naczyniowego przebiegające z miażdżycą tętnic i/lub ze zwężeniem zastawki aortalnej (stenozą aortalną) są jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych.<sup>51</sup> Schorzenia te przyczyniają się do rozwoju ostrego lub długotrwałego niedotlenienia narządów (miażdżyca) oraz niewydolności mięśnia sercowego (stenozą aortalną). Wykazano, że u ich podstaw leżą aktywne procesy związane z zaburzeniami funkcji regulacyjnych i metabolicznych komórki.<sup>52,53</sup> W patogenezie stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic scharakteryzowano szereg podobieństw. Oba stany inicjuje uszkodzenie śródbłonna, odpowiednio naczyniowego lub zastawkowego, stymulowane przez turbulentny przepływ krwi oraz wydłużoną ekspozycję na czynniki promiażdżycowe/prostenotyczne, np. lipoproteiny LDL czy zewnątrzkomórkowe nukleotydy.<sup>54,55</sup> Dochodzi do dyfuzji cząsteczek LDL pod warstwę śródbłonkową.<sup>56,57</sup> Ich akumulacja i modyfikacja przez oksydację oraz wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych produkowanych przez komórki śródbłonna, zapoczątkowuje kaskadę zapalną w obrębie ściany naczynia lub zastawki. Napływające monocyty i limfocyty T infiltrują strukturę tkanki, gdzie dochodzi do wchłaniania zmodyfikowanych cząsteczek LDL przez makrofagi i powstawania tzw. komórek piankowatych. Interakcja receptora CD40, występującego na makrofagach, z ligandem CD40L, obecnym na limfocytach, aktywuje klasyczną reakcję immunologiczną, będącą przyczyną rozwoju przewlekłego stanu zapalnego.<sup>58,59</sup> Zarówno w obrębie patologicznie zmienionej ściany naczynia, jak i zastawki, wykazano podwyższony poziom markerów stanu zapalnego, zwiększone uwalnianie cytokin prozapalnych oraz nacieki komórek układu immunologicznego, złożony przede wszystkim z limfocytów T i makrofagów.<sup>59-61</sup> Na dalszych etapach rozwoju miażdżycy i stenozy aortalnej dochodzi do aktywacji procesu włóknienia.<sup>62,63</sup> Produkowane, głównie przez limfocyty i makrofagi, metaloproteiny degradują białka macierzy zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do reorganizacji jej struktury i ułatwia migrację komórek budujących naczynia i zastawki (komórki mięśniówki gładkiej, komórki śródmiąższowe zastawki aortalnej, fibroblasty) oraz komórki patologicznie penetrujące ich strukturę (komórki zapalne).

W rozwoju miażdżycy i stenozy aortalnej opisano również szereg różnic, które mogą wynikać z odmienności w budowie naczyń i zastawek. W ścianie naczynia, kluczową rolę odgrywa proliferacja i migracja komórek mięśniówki gładkiej z aktywacją ich fenotypu wydzielniczego, co przyczynia się do produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, jej przebudowy i reorganizacji.<sup>64</sup> Obumierające komórki piankowate wraz z białkami macierzy tworzą włóknisto-tłuszczową stabilną blaszkę miażdżycową, której struktura może zostać naruszona poprzez wpływ aktywności metaloproteinaz.<sup>64</sup> Pęknięcie i erozja blaszki jest wówczas bezpośrednią przyczyną zatkania światła naczynia i niedotlenienia zaopatrywanego przez nie narządu.

W stenozie aortalnej, proces patologiczny przebiega inaczej. Ze względu na niewielką liczbę komórek mięśniówki gładkiej, ich proliferacja i migracja nie odgrywa tu istotnej roli. Kluczowe znaczenie przypisuje się jednak śródmiąższowym komórkom zastawki, będącym formą komórek fibroblastopodobnych.<sup>65</sup> Czynniki wzrostu i bodźce zapalne stymulują ich różnicowanie do komórek miofibroblastopodobnych (dla których

charakterystyczne jest nabycie ekspresji alfa-aktyny mięśniówki gładkiej), co promuje zależną od tych komórek produkcję i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Dalsza stymulacja cytokinami, zewnątrzkomórkowymi nukleotydami i pojawiającymi się białkami związanymi z chondro- i osteogenezą inicjuje powstawanie osteoblastopodobnych komórek śródmiąższowych zastawki, będących bezpośrednią przyczyną odkładania zwapnień.<sup>66</sup> Pomimo pewnych sukcesów w profilaktyce i leczeniu wczesnej oraz średniozaawansowanej miażdżycy, obecnie jedyną metodą leczenia stenozy aortalnej i zaawansowanych postaci miażdżycy jest interwencja chirurgiczna.<sup>67,68</sup> Podkreśla to znaczenie badań nad mechanizmami tych chorób oraz poszukiwaniem nowych możliwości terapeutycznych związanych, przede wszystkim, z działaniem na śródbłonek, regulacją stanu zapalnego oraz różnicowaniem i proliferacją specyficznych typów komórek.

### **2.3 Znaczenie sygnalizacji purynergicznej w patologii stenozy aortalnej i miażdżycy**

Jako cząstki sygnałowe, nukleotydy i ich katabolity, głównie adenozyne, odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów patologicznych, leżących u podstaw miażdżycy i stenozy aortalnej, takich jak: stan zapalny, aktywacja śródbłonek, różnicowanie i proliferacja komórek, agregacja płytek krwi oraz włóknienie i kalcyfikacja.<sup>69-71</sup> Jak przedstawiono na Rycinie 1, aktywacja większości podtypów receptorów nukleotydowych w układzie sercowo-naczyniowym stymuluje zapalenie, aktywację śródbłonek, utlenianie cząsteczek LDL, agregację płytek, włóknienie oraz remodeling kostny. Z kolei, aktywacja receptorów adenozynowych w większości kompensuje promiażdżycowe i prostenotyczne działania nukleotydów.<sup>34,72</sup> W tym aspekcie, na uwagę zasługuje zewnątrzkomórkowy metabolizm nukleotydów i adenozyne, który odpowiada za utrzymanie swoistej równowagi pomiędzy uwolnionymi z komórek nukleotydami a produkowaną drogą ekto-nukleotydaz adenozyne.

Badania z wykorzystaniem mysich modeli eksperymentalnych, potwierdzają kluczowe znaczenie ekto-enzymów zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów w zachowaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego. W Tabeli 2, pochodzącej z pracy przeglądowej będącej częścią niniejszej rozprawy, zestawiono efekty zmian aktywności poszczególnych ekto-enzymów na rozwój stanów patologicznych leżących u podstaw stenozy zastawki aortalnej i miażdżycy tętnic.

Cel terapeutyczny	Model	Wpływ na aktywność enzymatyczną	Efekt
<b>eNTPD1 (CD39)</b>	CD39+/-/ApoE-/-	↓	Promiażdżycowy <sup>32</sup>
	CD39-/-/ApoE-/-	↓↓	Prozakrzepowy, Promiażdżycowy (zwiększony wychwyt lipoprotein przez makrofagi) <sup>73</sup>
	<i>h</i> CD39 Tg	↑	Przeciwwzakrzepowy <sup>74</sup>
<b>eNPP1</b>	eNPP1+/-	↓	Rozrost neointymy <sup>75</sup>
	eNPP1-/-	↓↓	Wapnienie naczyń <sup>76,77</sup>
	eNPP1-/-	↓	Wapnienie naczyń <sup>76,77</sup>
	eNPP1-/-/ApoE-/-	↓	Zmniejszony naciek makrofagów <sup>78</sup>
	eNPP1 Tg	↑	Insulinooporność, hiperglikemia <sup>79</sup> Zespół metaboliczny <sup>80</sup>
<b>TNAP</b>	TNAP-OE	↑	Wapnienie naczyń <sup>81</sup>
<b>e5'NT (CD73)</b>	CD73-/-/ApoE-/-	↓	Promiażdżycowy <sup>82</sup>
	CD73-/-		Prozakrzepowy <sup>83</sup> Prozapalny <sup>83,84</sup> Stenoza zastawki aortalnej <sup>85</sup>
	<i>h</i> CD73-/- Tg		Wapnienie naczyń <sup>86</sup>
<b>eADA/ADA1</b>	<i>scid/scid</i> /ApoE-/-	↓	Przeciwmiażdżycowy <sup>87</sup>
	ADA-/-		Przeciwwzapalny <sup>88</sup>

**Tabela 2. Wpływ zmian aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów i adenozyliny na rozwój patologii sercowo-naczyniowych w mysich modelach eksperymentalnych.**

Kolorem pomarańczowym zaznaczono procesy promujące rozwój miażdżycy tętnic i stenozy zastawki aortalnej, a kolorem zielonym – procesy przeciwdziałające rozwojowi tych schorzeń.

Na podstawie: „Rola nukleotydów i sygnalizacji purynerygicznej w stenozie aortalnej i miażdżycy tętnic”, Kutryb-Zajac et al. *Postępy Biologii Komórki* 1/2017; Załącznik – Praca D.

Wykazano, że u myszy częściowo lub całkowicie pozbawionych aktywności eNTPD1 obserwuje się fenotyp promiażdżycowy i prozakrzepowy.<sup>32,73,89</sup> Podobnie, brak aktywności e5'NT przyczynia się do aktywacji stanu zapalnego, stymulacji kalcyfikacji naczyń oraz działania prozakrzepowego i promiażdżycowego<sup>83–85,90,91</sup>. Z kolei, wyciszenie genu kodującego deaminazę adenozyliny 1, czego efektem jest zahamowanie jej zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej aktywności, skutkuje silnym efektem przeciwwzapalnym.<sup>87,88</sup> Znaczenie tego enzymu, szczególnie w aspekcie funkcjonowania układu immunologicznego, potwierdza obraz kliniczny mutacji w obrębie genu *ADA*, objawiający się jako ciężki złożony niedobór odporności immunologicznej (SCID).<sup>92</sup> Zaburzenia aktywności innych enzymów zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów również mogą leżeć u podstaw stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic. Wykazano, że spadek lub całkowity brak aktywności eNPP1 w mysich modelach, stymuluje rozrost neointymy, wapnienie blaszki miażdżycowej i ektopową kalcyfikację naczyń, jednocześnie hamując naciek makrofagów w ścianie naczynia.<sup>75–78</sup> Jednym z mechanizmów tłumaczących to zjawisko jest obniżona produkcja pirofosforanu odłączanego od ATP podczas reakcji katalizowanej przez eNPP1. Postuluje się, że pirofosforan, będący inhibitorem kalcyfikacji, stymuluje przyleganie monocytów i makrofagów poprzez wzrost ekspresji osteopontyny.<sup>76–78</sup> Zależny od spadku aktywności eNPP1 przerost neointymy jest natomiast skutkiem innych mechanizmów i może wynikać ze wzrostu ekspresji białka homologicznego C/EBP (CHOP).<sup>75</sup> Uważa się, że ektopowe wapnienie naczyń i zastawek może być również efektem wzrostu aktywności niespecyficznego fosfatazy alkalicznej,

odpowiadającej za degradację hamującego wapnienie pirofosforanu do fosforanu nieorganicznego, będącego stymulatorem kalcyfikacji.<sup>81</sup>

Badania na tkankach ludzkich, również sugerują znaczące zmiany w aktywnościach ekto-enzymów degradujących zewnątrzkomórkowe nukleotydy i adenozyne w patologiiach sercowo-naczyniowych. W nielicznych doniesieniach wykazano spadek aktywności osoczowych ekto-nukleotydaz w przebiegu miażdżycy oraz zmiany aktywności powierzchniowych ekto-enzymów w naczyniach pochodzących z zabiegów usunięcia tętniaka aorty brzusznej.<sup>93,94</sup> Szczegółowa charakterystyka oraz zbadanie zmian aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów i adenozyne oraz ich znaczenie w miażdżycy jest nadrzędnym celem niniejszej rozprawy i zostanie omówione w dalszych częściach pracy. Z kolei, nieopublikowane badania wykonywane w naszym zespole na grupie ponad 100 pacjentów ze stenozą aortalną wykazały spadek aktywności ekto-enzymów degradujących zewnątrzkomórkowe nukleotydy na powierzchni ludzkich skalcifikowanych zastawek aortalnych, którym towarzyszył wzrost aktywności powierzchniowej ekto-deaminazy adenozyne.<sup>95</sup> Obserwowany układ enzymatyczny stymulował utrzymywanie nukleotydów na powierzchni patologicznie zmienionych zastawek oraz zwiększoną degradację adenozyne, mogącej przeciwdziałać negatywnym skutkom działania nukleotydów. Ponadto, wykazano ujemne korelacje aktywności ekto-nukleotydaz z parametrami zaawansowania stenozy aortalnej, takimi jak: prędkością maksymalną przez zastawkę, polem powierzchni ujścia zastawki i gradientem maksymalnym przez zastawkę, określonymi za pomocą dopplerowskiego badania echokardiograficznego. Wykazano także ujemną korelację ze stężeniem jonów  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  i  $PO_4^{3-}$  w tkance zastawki. Z kolei aktywność eADA na powierzchni zastawki korelowała z tymi parametrami dodatnio.

Doniesienia innych autorów sugerują, że komórki śródmiaższowe pochodzące z ludzkich stenotycznych zastawek aortalnych wykazują zwiększoną ekspresję eNPP1.<sup>96</sup> Procesowi kalcyfikacji zastawki towarzyszy również wzrost aktywności TNAP.<sup>69,97</sup> Jednocześnie wzrost aktywności obu tych enzymów może prowadzić do narastania zwapnień, poprzez zwiększoną produkcję PPI i jego wykorzystanie na drodze hydrolizy katalizowanej przez TNAP. Badania naszego zespołu z wykorzystaniem technik cytometrii przepływowej, immunohistochemii oraz pomiarów aktywności enzymatycznej z wykorzystaniem HPLC-RP wykazały, że w zewnątrzkomórkowym katabolizmie nukleotydów na powierzchni zastawek istotną rolę odgrywają również eNTPD1 i e5'NT.<sup>31,98</sup> Źródłem tych ekto-enzymów, jak również aktywności eADA w skalcifikowanych zastawkach aortalnych, mogą być obok komórek śródmiaższowych zastawki, również komórki śródbłonna oraz komórki układu immunologicznego infiltrujące zastawkę, takie jak makrofagi, limfocyty T pomocnicze i cytotoksyczne, oraz limfocyty B i granulocyty.<sup>98</sup>

Podsumowując, sugerujemy, że prostenotyczny fenotyp na powierzchni zastawek aortalnych może być generowany przez współwystępujący spadek aktywności eNTPD1 i e5'NT oraz wzrost eADA, związany ze stymulacją receptorów wrażliwych na nukleotydy i niskie stężenia adenozyne (np. receptor A2a).



## 2.4 Przemiany nukleotydów i adenozyiny na powierzchni komórki jako cel terapeutyczny w chorobach sercowo-naczyniowych

Regulacja aktywności ekto-enzymów szlaku metabolizmu nukleotydów stanowi obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu stenozy zastawki aortalnej i miażdżycy tętnic. W Tabeli 3, pochodzącej z pracy przeglądowej będącej częścią niniejszej rozprawy, przedstawiono efekty działania farmakologicznych inhibitorów i aktywatorów poszczególnych ekto-enzymów.

Cel terapeutyczny	Badany związek	Wpływ na aktywność enzymatyczną	Efekt działania
eNTPD1	Rozp. eNTPD1	↑	Hamowanie reaktywności płytek krwi <sup>99</sup>
eNTPD1-3	ARL67156	↓	Hamowanie wapnienia aorty/zastawki aortalnej <sup>100</sup>
eNPP1	eNPP1-Fc	↑	Hamowanie wapnienia naczyń <sup>101</sup>
TNAP	Lewamizol Etidronat	↓	Hamowanie wapnienia komórek mięśniówki gładkiej naczyń <sup>102</sup>
e5'NT	Rozp. e5'NT	↑	Uszczelnienie bariery śródbłonka <sup>103</sup>
	Sulfasalazyna		Przeciwwzapalny <sup>104</sup>
	Metotreksat		Przeciwwzapalny <sup>105</sup> Przeciwmiażdżycowy <sup>106</sup>
	Atorwastatyna	↑ <sup>107</sup>	Przeciwmiażdżycowy <sup>108</sup> Hamowanie wapnienia komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej <sup>109</sup>
eADA	Atorwastatyna	↓ (Załącznik – Praca A)	Przeciwmiażdżycowy <sup>108</sup>
	2'deoksykoformycyna	↓	Przeciwwzapalny, przeciwmiażdżycowy protekcyjny względem śródbłonka (Załącznik – Praca A)
	EHNA	↓	Przeciwwzapalny <sup>110</sup>
	Kemferol	↓ (Załącznik – Praca A), <sup>111</sup>	Przeciwmiażdżycowy <sup>112</sup>

**Tabela 3. Możliwości farmakologicznej regulacji aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów i adenozyiny w terapii chorób sercowo-naczyniowych.**

Kolorem zielonym zaznaczono wzrost, a kolorem niebieskim spadek aktywności enzymatycznej.

Na podstawie: „Rola nukleotydów i sygnalizacji purynergiczej w stenozie aortalnej i miażdżycy tętnic”, Kutryb-Zajac et al. *Postępy Biologii Komórki* 1/2017; Załącznik – Praca D.

Dane przedstawione w Tabeli 3 podkreślają potencjał stymulacji aktywności ekto-nukleotydaz (eNTPD1 i e5'NT) w terapii przeciwplatekowej, regulacji funkcji śródbłonka, hamowaniu zapalenia i rozwoju blaszki miażdżycowej oraz wapnienia. Ponadto, rola tych ekto-nukleotydaz na powierzchni zastawek serca może okazać się kluczowa w funkcjonowaniu protez zastawkowych, których wszczepianie jest obecnie jedyną efektywną metodą leczenia stenozy aortalnej. Zastosowanie tych białek na powierzchni bioprotez, z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej, może przyczynić się do znaczącej poprawy ich funkcji i wytrzymałości, co zostanie szerzej omówione w dalszych częściach pracy. Również regulatory aktywności TNAP oraz eNPP1 mogą znaleźć zastosowanie terapeutyczne w kalcyfikacji naczyń i zastawek. Ponadto, warty zainteresowania w leczeniu patologii sercowo-naczyniowych jest potencjał inhibitorów zewnątrzkomórkowego katabolizmu adenozyiny, który zostanie szczegółowo przedyskutowany w dalszych częściach pracy. Z uwagi na to, głównym celem niniejszej



rozprawy było zbadanie aktywności zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów i adenozyiny na powierzchni naczyń i zastawek serca oraz analiza zmian tych aktywności w przebiegu patologii naczyniowych.

### 3. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie zmian pozakomórkowych przemian nukleotydów i adenozyiny w patologjach układu sercowo-naczyniowego oraz ocena potencjału terapeutycznego farmakologicznej modulacji tych procesów.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

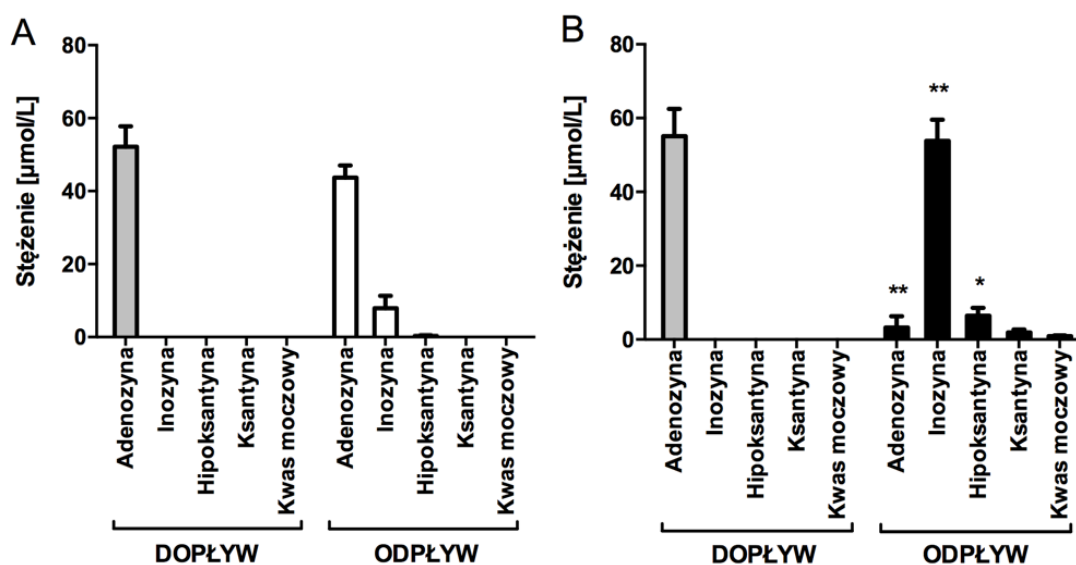
1. Zbadanie związanych z procesem miażdżycowym zmian aktywności zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów i adenozyiny na powierzchni mysich i ludzkich naczyń;
2. Identyfikację komórek będących źródłem zwiększonej aktywności ekto-deaminazy adenozyiny w mysim modelu miażdżycy;
3. Wpływ czynników pro- i przeciwmiażdżycowych na aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów w hodowlach mysich komórek śródbłónka i makrofagów;
4. Porównanie aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyiny na powierzchni świńskich naczyń i zastawek serca;
5. Analiza wpływu różnych procedur przygotowania biologicznej protezy zastawkowej na aktywności zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów;
6. Zbadanie wpływu zahamowania degradacji adenozyiny na rozwój zmian miażdżycowych w mysim eksperymentalnym modelu miażdżycy.

## 4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ

### 4.1 Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów i adenozyiny na powierzchni naczyń objętych procesem miażdżycowym

Aktywność ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyiny została zbadana na powierzchni naczyń objętych procesem miażdżycowym myszy szczepu C57Bl/6J z nokautem genów kodujących apolipoproteinę E i receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości (myszy ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>; stanowiących eksperymentalny model miażdżycy) oraz ludzkich naczyń objętych procesem miażdżycowym.

Na pierwszym etapie badań, wykonano perfuzję *ex vivo* rozgałęzienia aorty brzusznej zstępującej na tętnice biodrowe 6-miesięcznych myszy ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup> (z zaawansowaną miażdżycą), roztworem soli Hanka zawierającym substraty dla poszczególnych ekto-enzymów. Indywidualnie perfundowano naczynie 50 μM adenozyiną, a następnie 50 μM ATP oraz AMP w obecności inhibitora deaminazy adenozyiny. Po 1-minutowej perfuzji roztworem ATP i AMP w przepływie 0,4 ml/min nie wykazano znaczących różnic w przyroście produktów reakcji pomiędzy naczyniami objętymi procesem miażdżycowym, a naczyniami kontrolnymi (Praca C, Ryciny 1 i 2). Wykazano natomiast, znaczący przyrost stężenia inozyiny po perfuzji naczyń miażdżycowych roztworem adenozyiny, względem naczyń kontrolnych (Rycina 3).

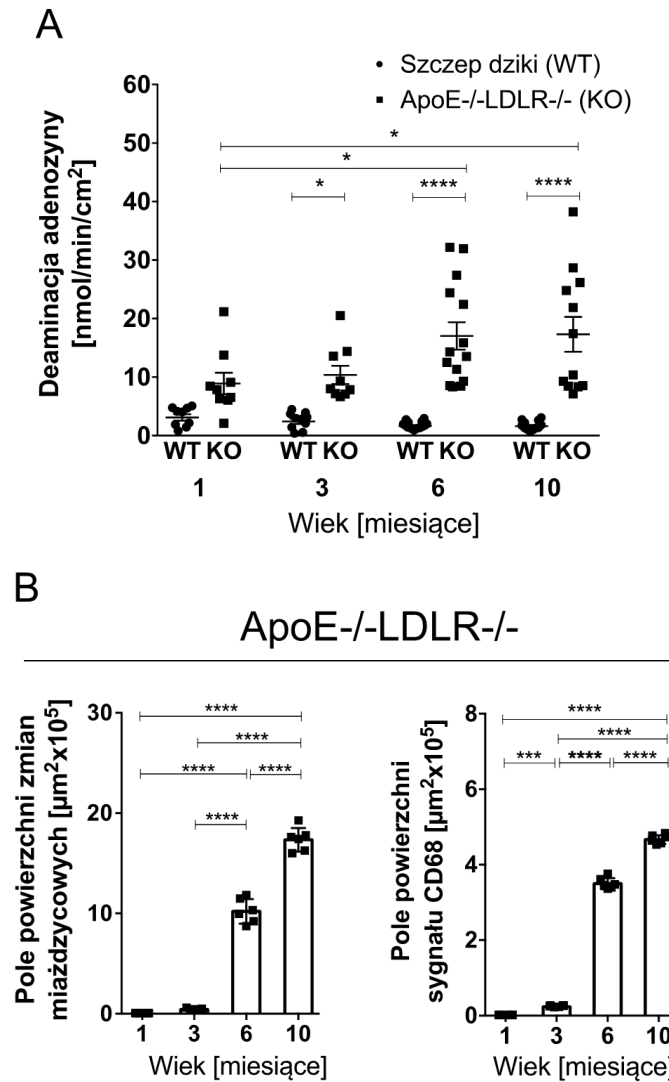


**Rycina 3.** Wzrost szybkości degradacji zewnątrzkomórkowej adenozyiny w naczyniu miażdżycowym.

Stężenie reagentów ekto-deaminazy adenozyiny w płynie perfuzyjnym przed (*dopływ*) i po 1 minucie perfuzji (*odpływ*) roztworem 50 μM adenozyiny rozgałęzienia aorty brzusznej 6-miesięcznych samców myszy szczepu C57Bl/6J typu dzikiego (A) i ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup> (B). Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM, \*p<0.05, \*\*p<0.005 vs. myszy typu dzikiego, n=5, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

Na podstawie: „Extracellular nucleotide catabolism in aortoiliac bifurcation of atherosclerotic ApoE/LDLr double knock out mice”, Kutryb-Zajac et al. *Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids*. 2014; 33: 323-328; Załącznik – Praca C.

W celu oceny zmian metabolizmu zewnątrzkomórkowych nukleotydów i adenozyiny w trakcie rozwoju procesu miażdżycowego, wykonano pomiar całkowitych aktywności ekto-enzymów w warunkach statycznych, na powierzchni reprezentacyjnego fragmentu aorty, pochodzącego od myszy ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup>, na różnych etapach rozwoju procesu patologicznego (Praca A, Rycina 1A-C).



**Rycina 4.** Wzrost aktywności zewnątrzkomórkowej deaminazy adenozyiny 1 (ADA1) w naczyniu wyprzedza i koreluje z rozwojem blaszki miażdżycowej u myszy ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup>.

Poziom deaminacji adenozyiny (A) na powierzchni aorty piersiowej myszy ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> (n=9-16) i myszy typu dzikiego (WT - *wild type*, n=9-16); \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Holm-Sidak.

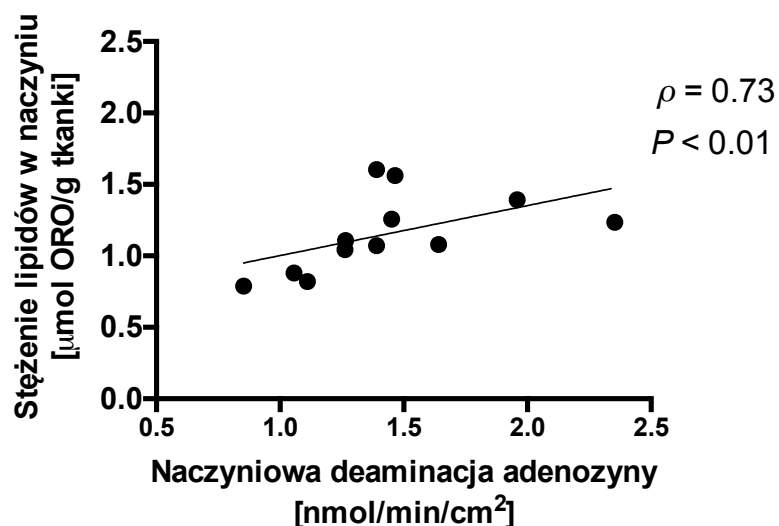
Pole powierzchni złogów lipidowych (zmiany miażdżycowe) oraz akumulacja makrofagów (sygnał CD68) w korzeniu aorty myszy ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> (n=5-6) w różnych grupach wiekowych (B); wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM; \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Holm-Sidak.

Na podstawie: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Załącznik – Praca A.

Wyniki tej części badań nie wykazały zmian w obrębie aktywności enzymów degradujących zewnątrzkomórkowy ATP (Praca A, Rycina 1A) w poszczególnych grupach. Jednak wykazano różnice w aktywności enzymów degradujących zewnątrzkomórkowy AMP, którego hydroliza na powierzchni naczyń miażdżycowych była obniżona we wszystkich grupach wiekowych (Praca A, Rycina 1B). Najistotniejszą obserwacją tej części badań była wielokrotnie zwiększona deaminacja zewnątrzkomórkowej adenozyiny do inozyny, która wzrastała wraz z rozwojem patologicznego procesu w obrębie naczynia (Rycina 4A) oraz wyprzedzała takie zmiany jak odkładanie lipidów w ścianie naczynia (zmiany miażdżycowe), czy akumulacja makrofagów (sygnał dla CD68, Rycina 4B).

W celu identyfikacji ekto-enzymów odpowiedzialnych za metabolizm nukleotydów i adenozyiny, wykonano pomiary stężenia produktów reakcji w obecności inhibitorów poszczególnych enzymów. Do tego celu posłużyły fragmenty aorty zstępującej piersiowej 6-miesięcznych myszy ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> i kontrolnych. Wykazano, że zarówno w naczyniach objętych procesem miażdżycowym jak i naczyniach kontrolnych, hydroliza ATP odbywa się głównie przy udziale eNTPD1 (Praca A, Rycina 1E, F, I, J), hydroliza AMP przy udziale e5'NT (Praca A, Rycina 1G, K), a degradacja adenozyiny przy udziale ADA1 (Praca A, Rycina 1H, L).

W kolejnych doświadczeniach na powierzchni naczyń ludzkich zbadano zmiany aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyiny zależnie od stopnia zaawansowania miażdżycy. Nie wykazano statystycznie znamiennej zależności pomiędzy aktywnością enzymów degradujących zewnątrzkomórkowe nukleotydy a zaawansowaniem miażdżycy, jednak zaobserwowano pewne tendencje w kierunku korelacji negatywnej między szybkością hydrolizy ATP i AMP a stężeniem lipidów w ścianie naczynia (Praca A, Rycina 8A, B). Z kolei aktywność naczyniowej ekto-deaminazy adenozyiny korelowała dodatnio z zaawansowaniem procesu miażdżycowego (stężeniem lipidów, Rycina 5), co potwierdza znaczenie tego enzymu w przebiegu ludzkiej miażdżycy.



**Rycina 5.** Szybkość zewnątrzkomórkowej deaminacji adenozyiny na powierzchni ludzkiej aorty koreluje dodatnio ze stopniem zaawansowania miażdżycy.

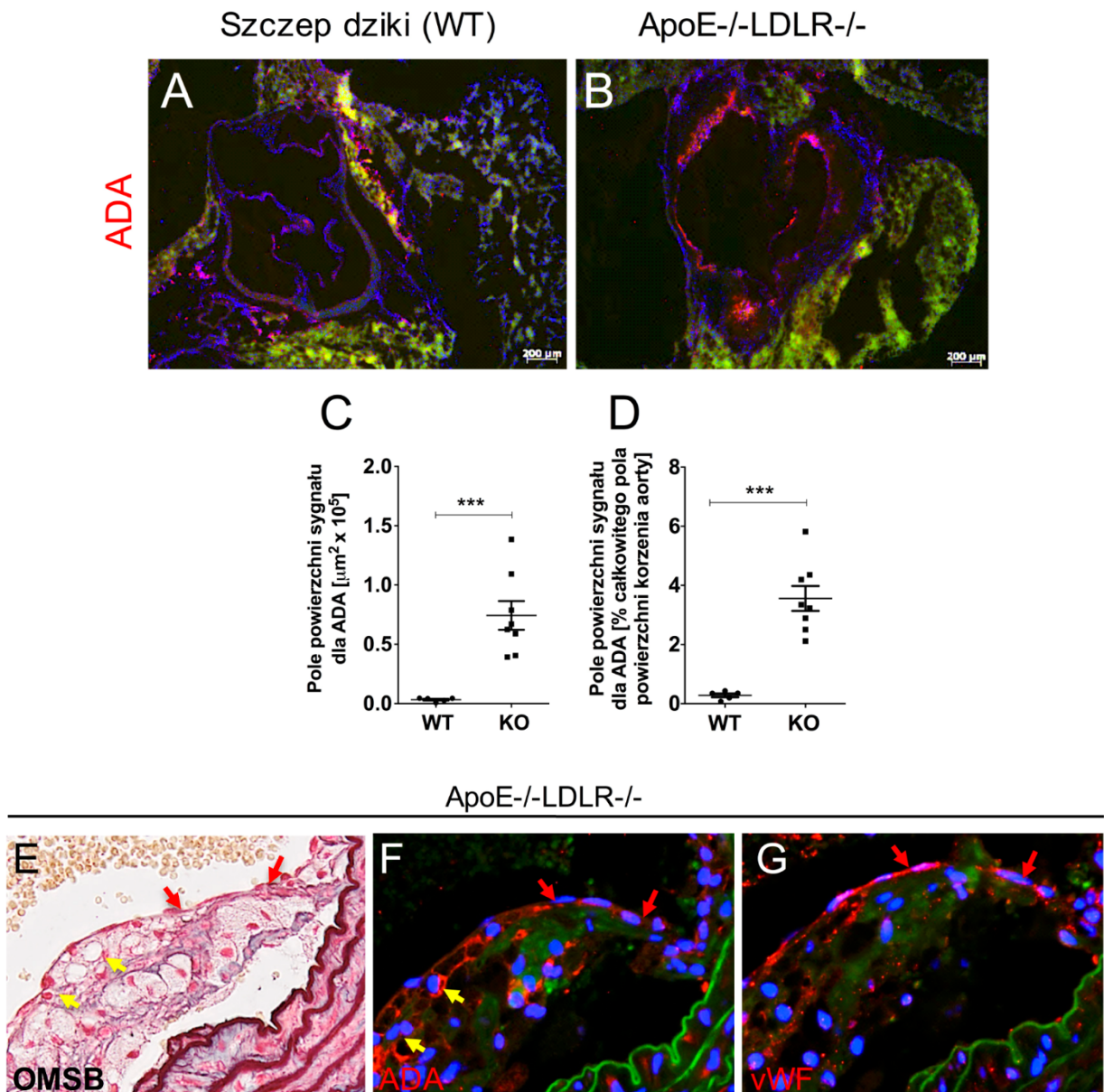
Analiza korelacji pomiędzy szybkością naczyniowej deaminacji adenozyiny a stężeniem lipidów w aorcie wstępującej (n=12). Wyniki przedstawiono jako korelacja Spearman'a, współczynnik korelacji Spearman'a (q) i poziom istotności (P).

Na podstawie: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Załącznik – Praca A.

#### 4.2 Identyfikacja komórek będących źródłem zwiększonej aktywności ekto-deaminazy adenozyiny w miażdżycy

Następnym etapem badań niniejszej rozprawy była identyfikacja komórek odpowiedzialnych za wzrost zewnątrzkomórkowej aktywności ekto-deaminazy adenozyiny. Do tego celu posłużyła analiza obecności i lokalizacji komórkowej deaminazy adenozyiny w naczyniach i blaszce miażdżycowej wykonana za pomocą technik histologicznych i znakowania immunofluorescencyjnego.

Immunofluorescencja deaminazy adenozyiny w przekroju poprzecznym korzenia aorty potwierdziła znacznie większą ilość tego białka w naczyniach 6-miesięcznych myszy ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>, w porównaniu do myszy kontrolnych w tym samym wieku (Rycina 6A-D). Sygnał dla deaminazy adenozyiny zlokalizowany był w wewnętrznej warstwie ściany naczynia, zarówno na powierzchni blaszki miażdżycowej, jak i w częściach naczynia nie objętych formującą się blaszką (Rycina 6B).



**Rycina 6. Źródłem naczyniowej deaminazy adenozyliny (ADA) w miażdżycy są komórki śródbłonna i makrofagi.**

Reprezentacyjne zdjęcia korzenia aorty (przekrój poprzeczny) barwionego immunofluorescencyjnie na obecność ADA (A, B). Pole powierzchni odpowiadające sygnałowi dla ADA (C) oraz procent całkowitego przekroju poprzecznego korzenia aorty zajęty przez sygnał dla ADA (D) u 6-miesięcznych myszy szczepu dzikiego (WT, n=5) i ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup> (n=8). Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM, \*\*\*p<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem niesparowanego testu *t*-Studenta.

Reprezentacyjne zdjęcia barwienia histologicznego OMSB oraz immunofluorescencyjnego na obecność ADA (F) i czynnika von Willebranda (vWF) blaszki miażdżycowej w pniu ramienno-głównym (BCA) 6-miesięcznych myszy ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup> (n=7) (E). Czerwone strzałki wskazują komórki śródbłonna, żółte – makrofagi.

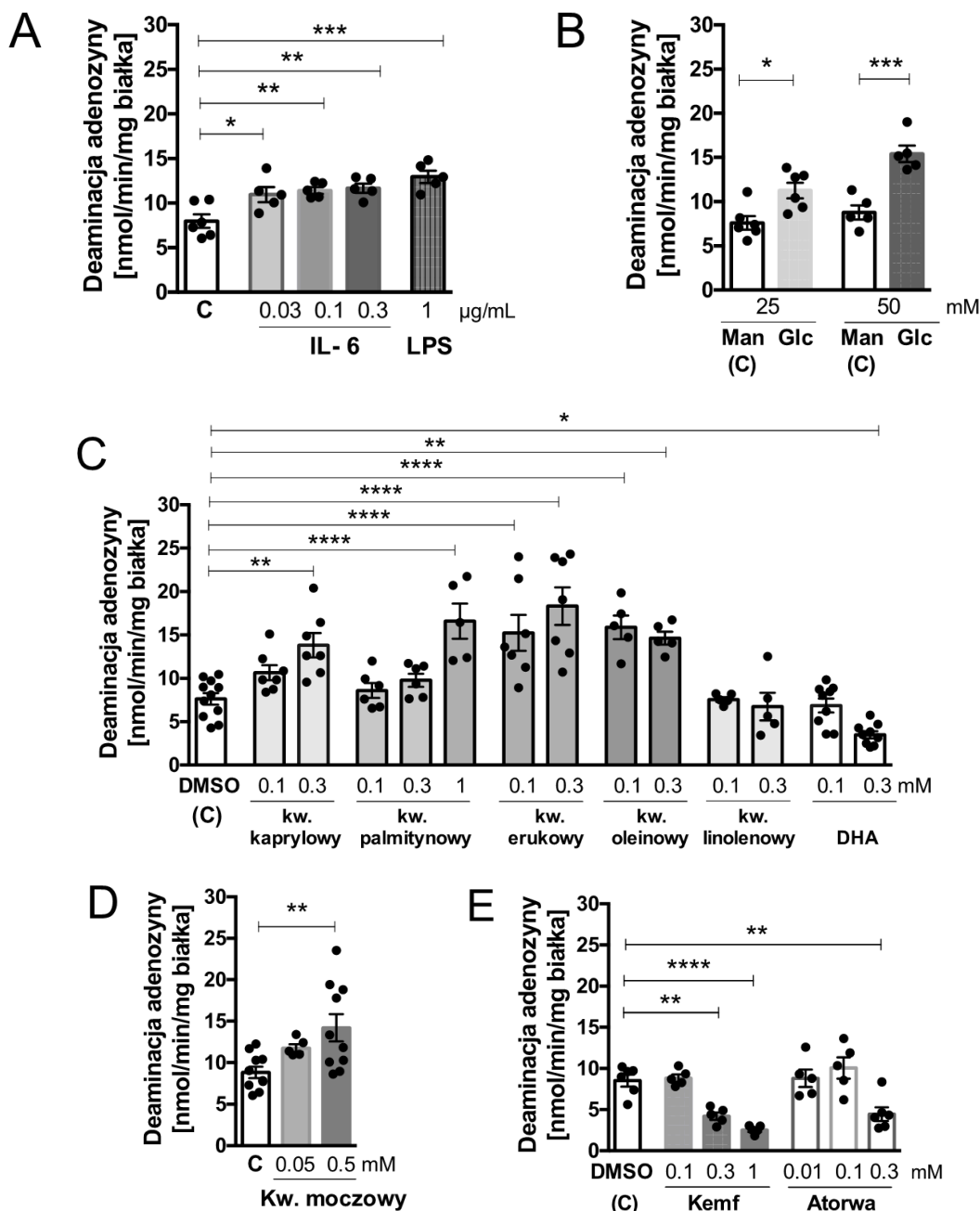
Na podstawie: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Załącznik – Praca A.

Histologiczne barwienie OMSB pnia ramiennie-głowowego (BCA) 6-miesięcznych myszy ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> pozwoliło uwidocznić strukturę naczynia i blaszki miażdżycowej, ze szczególnym uwzględnieniem komórek mięśniówki gładkiej, komórek śródbłonka, komórek piankowatych, kolagenu i blaszki sprężystej. Zestawienie zdjęć przekrojów poprzecznych BCA barwionych OMSB i znakowanych immunofluorescencyjnie wykazało, że komórki śródbłonka (Rycina 6E-G) oraz w pewnym stopniu komórki układu odpornościowego, głównie makrofagi (Praca A, Ryciny 2N-P, S3K-M) odpowiadają za obecność deaminazy adenozyiny w ścianie naczynia objętego procesem miażdżycowym. W barwieniach immunofluorescencyjnych, przeprowadzonych w pniu ramiennie-głowowym (Praca A, Ryciny 2H-S i S3A-D), korzeniu aorty (Praca A, Rycina S3E-J) oraz tętnicach wieńcowych (Praca A, Rycina S3K-P), z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych dla poszczególnych podtypów komórek, ostatecznie potwierdzono powyższe źródła deaminazy adenozyiny w mysim modelu miażdżycy.

#### **4.3 Ocena wpływu czynników pro- i przeciwmiażdżycowych na aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów na powierzchni komórek śródbłonka i makrofagów**

Badania *in vitro* z wykorzystaniem linii mysich komórek śródbłonka H5V oraz mysich makrofagów izolowanych z jamy otrzewnej posłużyły do oceny zmian aktywności ekto-enzymów wywołanych przez czynniki promiażdżycowe (takie jak nasycone kwasy tłuszczowe, cytokiny prozapalne, hiperglikemię i hiperurykemię) oraz czynniki przeciwmiażdżycowe (wielonienasycone kwasy tłuszczowe, flawonoidy i statyny). Wykazano, że czynniki zapalne i nasycone kwasy tłuszczowe stymulują aktywność eADA (Rycina 7A, C), podczas gdy wielonienasycone kwasy tłuszczowe i flawonoidy, (np. kemferol) hamują aktywność tego enzymu w komórkach śródbłonka (Rycina 7C, E) i makrofagach (Praca A, Rycina 7F, I). Inne bodźce, takie jak hiperglikemia, kwas moczowy czy jednonienasycone kwasy tłuszczowe stymulowały aktywność eADA (Rycina 7B-D; Praca A, Rycina 7I), natomiast atorwastatyna hamowała jej aktywność tylko w komórkach śródbłonka (Rycina 7E). Badane czynniki nie wpływały na aktywności enzymów hydrolizujących nukleotydy adeninowe w przestrzeni pozakomórkowej (Praca A, Ryciny S5 i S6).





**Rycina 7.** Czynniki promiażdżycowe stymulują zewnątrzkomórkową deaminację adenyzy w mysich komórkach śródbłonna, podczas gdy flawonoidy i statyny hamują szybkość tego procesu.

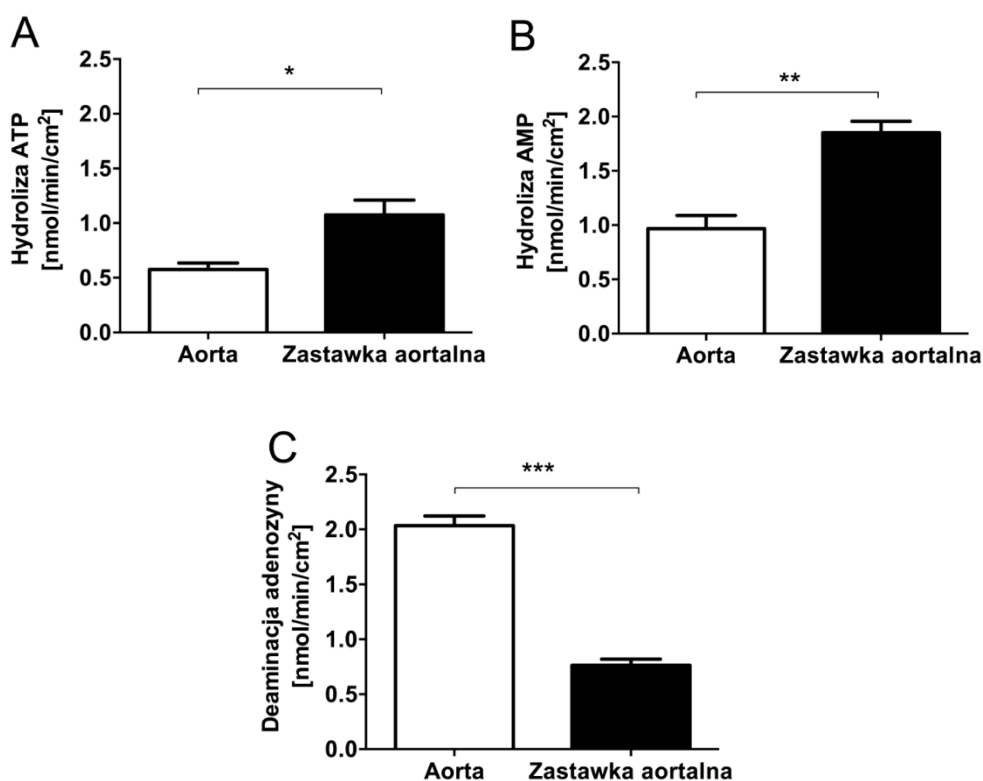
Szybkość zewnątrzkomórkowej deaminacji adenyzy w linii mysich komórek śródbłonna H5V stymulowanych przez 24h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) IL-6, lipopolisacharydem (LPS) (A), glukozą (glc) (B), kwasami tłuszczowymi (C), kwasem moczowym (D), kemferolem (kemf) i atorwastatyną (atorwa) (E); n=4-10. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs. kontrola (A, D), vs. kontrola osmotyczna (analogiczne stężenie mannitolu – man) (B) lub vs. DMSO (0.5% v/v DMSO) (C, E), analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Dunnet’a (A, C-E) lub jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Sidak’a (B); kw. – kwas; C – kontrola;

Na podstawie: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Załącznik – Praca A.

#### 4.4 Porównanie aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyiny na powierzchni naczyń i zastawek serca

W celu porównania aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów i adenozyiny między niezmienną patologicznie ścianą naczyń a powierzchnią zastawki serca, wykorzystano fragmenty aorty wstępującej i zastawki aortalne pochodzące od świń.

Wykazano, że powierzchnia zastawki aortalnej w porównaniu do ściany naczyń, charakteryzuje się dwa razy wyższą aktywnością ekto-nukleotydaz rozkładających zewnątrzkomórkowe nukleotydy (Rycina 8A) i produkujących adenozyinę (Rycina 8B). Z kolei aktywność ekto-deaminazy adenozyiny na powierzchni zastawek była niższa niż na powierzchni naczyń (Rycina 8C).



**Rycina 8.** Powierzchnia niezmiennego patologicznie zastawki aortalnej charakteryzuje się wysoką aktywnością ekto-enzymów odpowiedzialnych za usuwanie zewnątrzkomórkowych nukleotydów i produkcję adenozyiny oraz zmniejszonym katabolizmem adenozyiny w stosunku do szybkości tych przemian na powierzchni aorty.

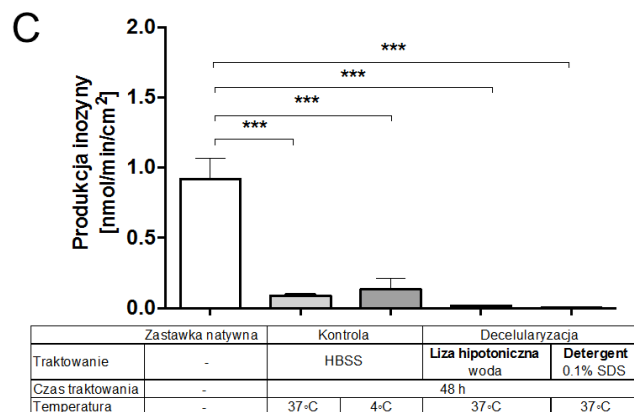
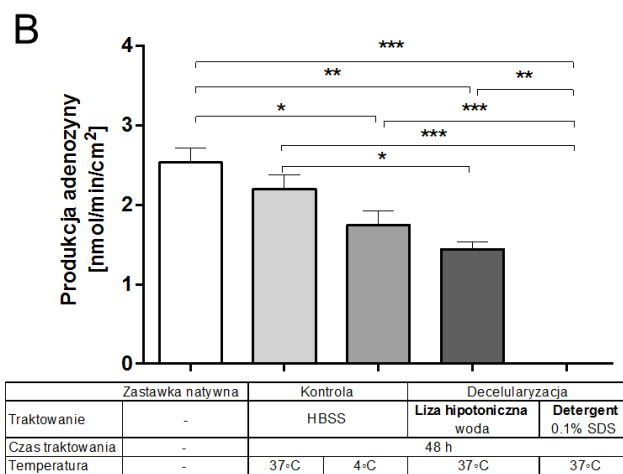
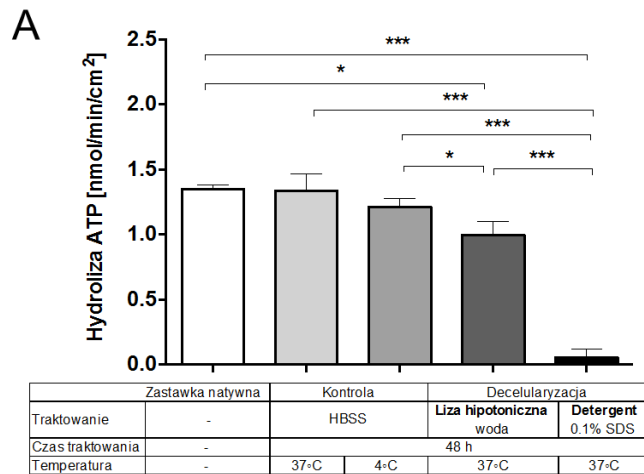
Hydroliza ATP (A), AMP (B) i deaminacja adenozyiny (C) na powierzchni świńskiej aorty wstępującej i zastawki aortalnej po inkubacji z 50  $\mu$ M ATP, AMP lub adenozyiną. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM, n=4, \*p<0.05, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem sparowanego testu t-Studenta.

Na podstawie: „Nucleotide catabolism on the surface of aortic valve xenografts; Effects of different decellularization strategies”, Kutryb-Zajac et al. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2016; 9 (2): 199-126; Załącznik – Praca B.

#### **4.5 Wpływ procedury przygotowania biologicznej protezy zastawkowej na aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów adeninowych i adenozyiny**

Leczenie chirurgiczne jest obecnie jedyną efektywną metodą leczenia stenozy aortalnej. Polega ono na wymianie lub wszczepieniu mechanicznej bądź biologicznej protezy zastawkowej. Protezy te są jednak obarczone wieloma wadami. Wszczepienie protezy mechanicznej związane jest z koniecznością włączenia terapii przeciwzakrzepowej. Ponadto jest ona podatna na infekcje. Zastosowanie biologicznych protez zastawkowych zmniejsza ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowych, jednak dostępność zastawek do przeszczepów od ludzkich dawców (alloprzeszczep) jest ograniczona. W obliczu znacznego zapotrzebowania na zabiegi wymiany i wszczepienia zastawki aortalnej, nadzieje budzi zastosowanie zastawek pochodzących od innych gatunków (ksenoprzeszczep), przede wszystkim od świń. Głównym problemem ksenotransplantacji jest jednak perspektywa odrzucenia przeszczepu, wynikająca z międzygatunkowej niezgodności tkankowej. Dlatego, odpowiednie procesowanie zastawek świńskich ma kluczowe znaczenie w uzyskiwaniu w pełni funkcjonalnych, nieimmunogennych biologicznych protez zastawkowych.

Kolejnym aspektem badań niniejszej rozprawy była także analiza wpływu powszechnie stosowanych metod decelularyzacji zastawek świńskich, wykorzystywanych w trakcie tworzenia bioprotez, na aktywność ekto-enzymów zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów i adenozyiny. Wykazano, że decelularyzacja z zastosowaniem detergentu (0.1% SDS) całkowicie eliminuje wszystkie aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów i adenozyiny, podczas gdy zastosowanie lizy hipotonicznej prowadzi do zachowania aktywności ekto-nukleotydaz (Rycina 9A-B). Niewielka aktywność ekto-deaminazy adenozyiny w stosunku do obserwowanej w zastawce natywnej nie była efektem decelularyzacji ale wynikała z czasu traktowania, co świadczy o stosunkowo nietrwałym wiązaniu tego białka do powierzchni komórek (Rycina 9C). Zachowanie aktywności ekto-nukleotydaz, degradujących zewnątrzkomórkowe nukleotydy adeninowe (o właściwościach prozapalnych i prozakrzepowych), odpowiedzialnych za produkcję adenozyiny (mogącej przeciwdziałać odrzucaniu przeszczepu) może mieć kluczowe znaczenie w tworzeniu bioprotez zastawkowych. Jedną z możliwości zachowania tych enzymów na powierzchni struktur zastawkowych jest właściwe przygotowanie zastawek świńskich. Jednak niezgodność gatunkowa pozostawionych na świńskiej zastawce białek może wywoływać efekty immunogenne. Z tego względu optymalnym rozwiązaniem jest pozyskiwanie „rusztowań” bioprotez z zastawek świńskich, ich efektywna decelularyzacja z usunięciem wszystkich immunogennych białek, a następnie recelularyzacja ludzkimi komórkami, posiadającymi na swojej powierzchni ekto-enzymy, umożliwiające efektywną degradację nukleotydów adeninowych i produkcję adenozyiny w mikrośrodowisku zastawki.



**Rycina 9.** Aktywności ekto-enzymów hydrolizujących zewnątrzkomórkowe nukleotydy adeninowe i produkujących adenosynę są zachowane po decelularyzacji zastawek świńskiej z wykorzystaniem lizy hipotonicznej, podczas gdy zastosowanie decelularyzacji z wykorzystaniem detergentu eliminuje te aktywności.

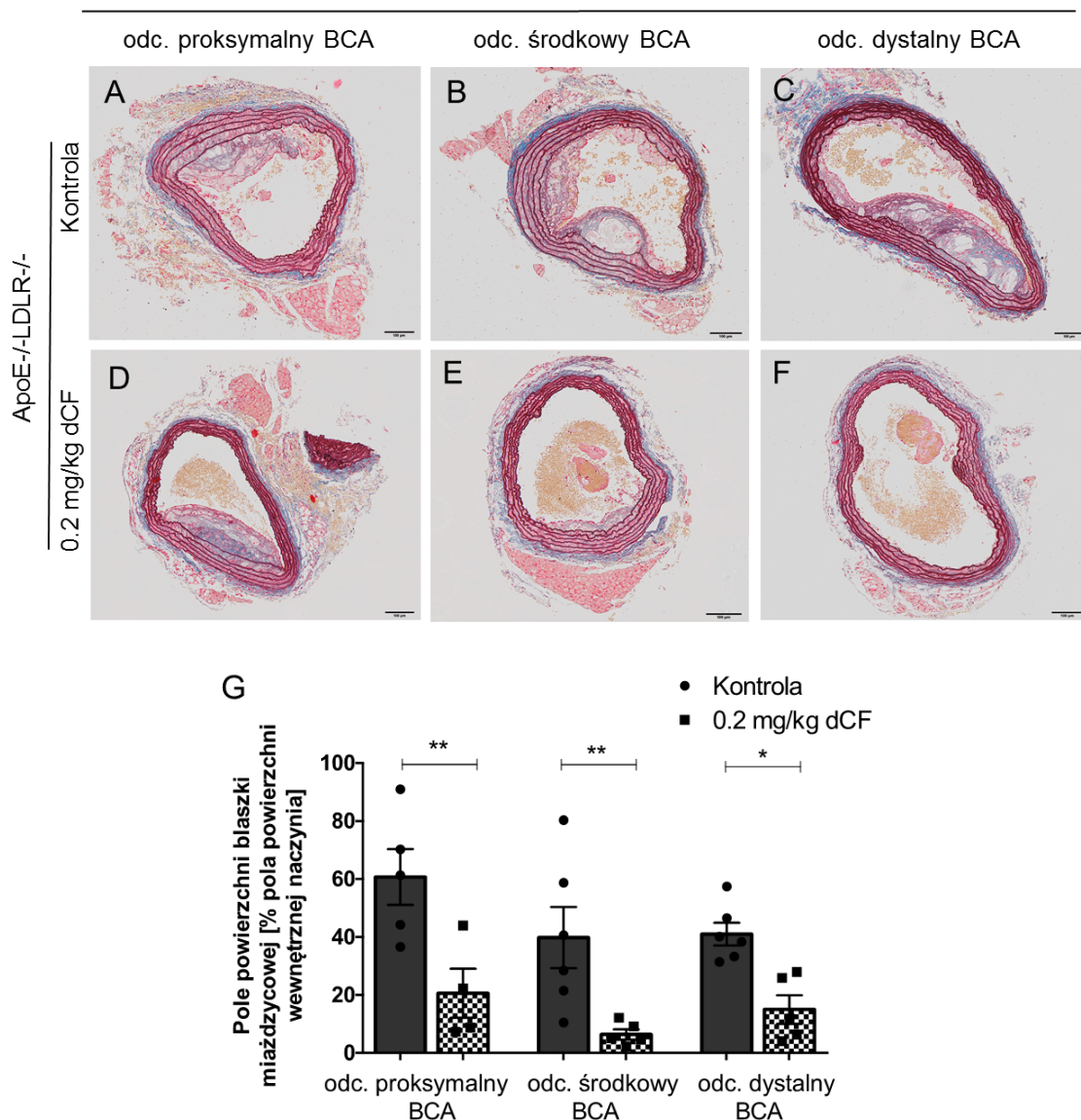
Szybkość hydrolizy ATP (A), produkcji adenosyny (B) i produkcji inozyny (C) na powierzchni natywnej i decelularyzowanej (lizą hipotoniczną i detergentem) świńskiej zastawki aortalnej po 30-min inkubacji płatków zastawki odpowiednio z 50  $\mu$ M ATP, AMP lub adenosyną. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM; n=8; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z podestem Tukey'a.

Na podstawie: „Nucleotide catabolism on the surface of aortic valve xenografts; Effects of different decellularization strategies”, Kutryb-Zajac et al. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2016; 9 (2): 199-126; Załącznik – Praca B.

#### **4.6 Wpływ hamowania ekto-deaminazy adenozyiny na rozwój miażdżycy i ocena jego potencjału terapeutycznego**

Wyniki badań zawarte w niniejszej rozprawie podkreślają znaczenie zewnątrzkomórkowego metabolizmu adenozyiny w ścianie naczynia objętego procesem miażdżycowym, obejmującego przede wszystkim wzrost aktywności ekto-deaminazy adenozyiny w komórkach śródbłonka. Potencjał terapeutyczny hamowania aktywności tego enzymu został zbadany z wykorzystaniem inhibitora deaminazy adenozyiny – 2’deoksykoformycyny (dCF). dCF stosowana jest w praktyce klinicznej w leczeniu białaczek oraz w chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi i w wysokich dawkach wykazuje silne działanie immunosupresyjne. Celem zastosowania dCF w prezentowanych badaniach była ocena jej wpływu na rozwój procesu miażdżycowego u myszy ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup>. Dla uniknięcia efektu immunosupresyjnego zminimalizowano jej dawkę do 0.2 mg/kg masy ciała. U myszy traktowanych dCF, wykazano znaczną redukcję przyrostu blaszki miażdżycowej, barwionej ORO w aorcie *en face* (Praca A, Rycina 5A-C) i korzeniu aorty (Praca A, Rycina 7D-N) oraz w barwieniu OMSB pnia ramiennie-głowego (Rycina 10). Ponadto, barwienie OMSB wykazało wpływ dCF na stabilizację już istniejącej blaszki miażdżycowej (Rycina 10A, D). Zastosowanie niskiej dawki dCF wywołało również inne efekty ogólnoustrojowe i naczyniowe, takie jak wzrost stężenia adenozyiny we krwi obwodowej (Praca A, Rycina 4A), co związane było ze zwiększeniem jej stężenia zewnątrzkomórkowego. Ponadto, dCF wpłynęła m.in. na redukcję parametrów stanu zapalnego (Praca A, Rycina 4B i C) i wykładników aktywacji śródbłonka (Praca A, Rycina 4D-J), wzrost stężenia azotynów w osoczu (Praca A, Rycina 4K), świadczących o zwiększonej produkcji tlenu azotu przez ścianę naczynia oraz spadek stężenia triacylogliceroli w osoczu (Praca A, Rycina 4P). Nie zaobserwowano immunosupresyjnego działania dCF (Praca A, Tabela 1), co byłoby głównym skutkiem hamowania wewnątrzkomórkowej deaminazy adenozyiny. Zakładamy zatem, że większość z obserwowanych efektów była wynikiem hamowania ekto-enzymu rozkładającego adenozyinę w przestrzeni pozakomórkowej.

Barwienie OMSB



**Rycina 10. Deoksykoformycyna (dCF) hamuje rozwój miażdżycy u myszy ApoE-/-LDLR-/-.**

Reprezentacyjne zdjęcia histologicznego barwienia OMSB (A-F) pnia ramiennie-głowego (BCA) myszy ApoE-/-LDLR-/- traktowanych deoksykoformycyną (dCF) oraz kontrolnych, w odcinku proksymalnym (A, D), środkowym (B, E) i dystalnym (C, F) BCA. Ilościowa analiza blaszki miażdżycowej (G) w BCA myszy ApoE-/-LDLR-/- traktowanych dCF (n=5) oraz kontrolnych (n=6). Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM; \*p<0.05, \*\*p < 0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Holm-Sidak.

Na podstawie: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Załącznik – Praca A

## 5. WNIOSKI

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej są następujące:

1. Naczynia objęte procesem miażdżycowym charakteryzują się zmianą profilu aktywności ekto-enzymów metabolizujących nukleotydy adeninowe i adenozyne, prowadząc do zmniejszonej produkcji i zwiększonej degradacji adenozyne. W szczególności dochodzi do wielokrotnego wzrostu aktywności ekto-deaminazy adenozyne (eADA), co poprzedza pojawienie się blaszki miażdżycowej.
2. Zwiększona aktywność eADA pochodzi z aktywowanych komórek śródbłónka i infiltrujących ścianę naczynia makrofagów. Podkreśla to znaczenie eADA jako markera aktywacji śródbłónka i stanu zapalnego w ścianie naczynia.
3. Czynniki promiażdżycowe (nasycone kwasy tłuszczowe i cytokiny prozapalne) działają stymulująco, a czynniki przeciwmiażdżycowe (wielonienasycone kwasy tłuszczowe i flawonoidy) hamująco na aktywność eADA na powierzchni komórek śródbłónka i makrofagów.
4. Zastawki aortalne charakteryzuje wyższa aktywność ekto-nukleotydz i niższa aktywność eADA, w porównaniu do ściany naczynia, co podkreśla szczególne znaczenie tych przemian dla funkcji zastawki.
5. Aktywności ekto-nukleotydz produkujących adenozyne na powierzchni bioprotez zastawkowych są zależne od procedury ich przygotowania - łagodniejsza decelularyzacja pozwala na zachowanie tych aktywności. Może to mieć wpływ na wytrzymałość i funkcjonalność protez zastawkowych.
6. Zahamowanie eADA prowadzi do znaczącego spowolnienia rozwoju zmian patologicznych w eksperymentalnym modelu miażdżycy. Modyfikacja aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydz adeninowych i adenozyne stanowi obiecującą strategię zapobiegania i leczenia patologii naczyniowych.

## **6. INTRODUCTION**

Nucleotides play a key role in the cell and are essential for the function of key biological processes. Nucleotides are the primary structural component of nucleic acids, contributing to storage and expression of genetic information.<sup>1</sup> Nucleotides such as ATP and GTP that have high-energy bonds act as carriers of energy which originates from cellular respiration and catabolic pathways.<sup>1</sup> In addition, nucleotides are responsible for cell signaling (cAMP, cGMP)<sup>2</sup>, act as allosteric effectors (ATP, AMP)<sup>1</sup>, are the enzyme cofactors (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FMN, FAD)<sup>3,4</sup> and participate in biosynthesis processes, including glycogen and glycosaminoglycans (UTP) or phospholipids (CTP) synthesis.<sup>5</sup> All the above effects of the nucleotides were associated with intracellular processes in the cells and their role in the extracellular space was neglected. However, in the 70s of the last century, British researcher Geoffrey Burnstock proposed the existence of membrane receptors stimulated by nucleotides and a product of adenine nucleotide catabolism - adenosine.<sup>6,7</sup> This initiated an extensive research on the role of nucleotides and adenosine as signaling molecules in communication between the cells.

### **6.1 The role of nucleotides and adenosine in the extracellular space**

#### **6.1.1 Mechanisms of nucleotide release from cells into the extracellular space**

Nucleotides appears in the extracellular space as a result of cell death, but more interesting and important mechanisms of their release include exocytosis, transport across the cell membrane (eg. via ATP-binding cassette transporters), ion channels, or pannexin and connexin hemichannels.<sup>8</sup> Extracellular concentrations of nucleotides are much lower than inside the cells. The concentration of extracellular ATP is in the nanomolar range, while inside the cell reaches millimolar values. Furthermore, nucleotides such as ATP could be maintained in pericellular space at micromolar concentrations.<sup>9,10</sup> Nucleotides could be released from both vessel- and valve-building cells or from cells and their fragments, circulating in peripheral blood within the cardiovascular system.<sup>8</sup> The contribution of individual cell types in the release of nucleotides in the cardiovascular system and conditions that predispose to their increased release are described in the review paper, which is a part of this thesis (Appendix – Paper D) and summarized in Table 1.



Cellular source	Endothelial cells	Vascular smooth muscle cells	Cardiomyocytes	Platelets	Erythrocytes	Immune cells
Stimuli	Shear stress, hypoxia, hyperglycemia	Hyperglycemia, hypoxia	Hypoxia	Collagen, thromboxane, other platelet activators	Hypoxia, adrenaline, deformations	Activators of inflammation
Released nucleotides	ATP, UTP	ATP, UTP	ATP, UTP	ADP > ATP	ATP	ATP
Transport	Vesicular	+	+	+	+	+
	Hemichannels	+	+	+	+	+
	Anion			+	+	
	ABC transporters	+	+	+	+	+
Reference	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20	21,22

**Table 1. The release of nucleotides into extracellular space from different cell types of the cardiovascular system.**

Based on: „Purinergetic signaling in aortic stenosis and atherosclerosis”, Kutryb-Zajac et al. *Advances in Cell Biology* 1/2017; Appendix – Paper D.

### 6.1.2 Nucleotide receptors

Nucleotides that are present in the extracellular space activate P2 purinergetic receptors, named nucleotide receptors.<sup>23</sup> Two groups of P2 receptors were described: P2X and P2Y.<sup>24</sup> P2X receptors are membrane ion channels for cations Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and include seven subtypes (P2X1-7). In turn, P2Y receptors are metabotropic receptors coupled to G protein and among them the eight subtypes were distinguished (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-14).<sup>25</sup> The mechanisms of action of these receptors, as well as their specificity for particular nucleotides are described in the review paper (Appendix – Paper D). Nucleotide receptors are widely distributed in cardiovascular system, which stresses the importance of extracellular nucleotide signaling in maintaining homeostasis of this system.<sup>23</sup> Specific cellular location of each receptor subtypes in the vasculature as well as the effects of their activation, which could have a direct impact to the development of cardiovascular diseases are illustrated in [Figure 1](#).

### 6.1.3 Extracellular nucleotide metabolism

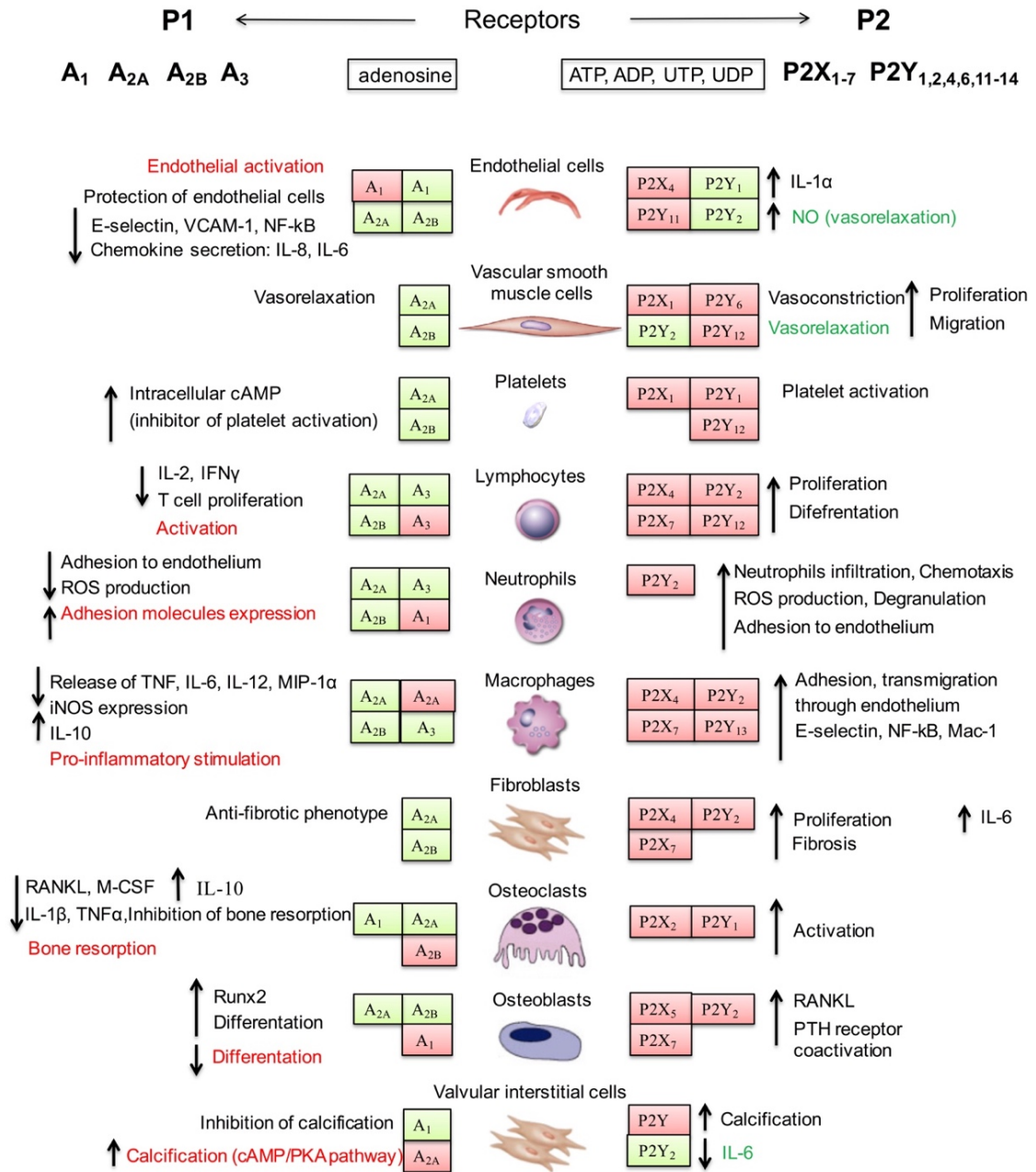
Nucleotides released from the cells activate specific receptors or could be hydrolyzed by membrane-bound ecto-enzymes ([Figure 2](#)). The first is ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, which acts in the cardiovascular system mainly as isoform 1 (eNTPD1, CD39).<sup>26</sup> This enzyme hydrolyzes ATP to ADP and ADP to AMP removing the inorganic phosphate (Pi) on each stage. The same hydrolysis reaction applies to extracellular UTP, which through UDP, is converted to the UMP. Further, AMP and UMP are converted by ecto-5'nucleotidase (e5'NT, CD73) to nucleosides and Pi.<sup>27</sup> As a result of this reaction, adenosine originates from AMP and uridine from UMP. It has been shown that extracellular nucleotides could be catabolized by an alternative route via ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase (eNPP) and alkaline phosphatase (ALP).<sup>28,29</sup> Furthermore, some evidence suggests the presence of ecto-kinases that catalyze the formation of nucleotides on the cell surface.<sup>30</sup> However, many reports

including our findings showed that ecto-nucleotidases, mainly eNTPD1 and eS<sup>1</sup>NT are the most important enzymes engaged in nucleotide metabolism on the surface of vessel wall and aortic valve.<sup>31-33</sup>

#### **6.1.4 Receptor mechanisms of physiological effects of adenosine**

Adenosine that is formed via extracellular catabolism of nucleotides is also a signaling molecule. P1 receptors (adenosine receptors) are widely distributed in different cell types, including cells of the cardiovascular system.<sup>34</sup> All subtypes of adenosine receptors (A1, A2a, A2b and A3) belong to the family of G-protein coupled receptors.<sup>35</sup> Their activation (mainly subtype A2b, which is stimulated by high concentrations of adenosine) removes the effects of P2 receptors activation and compensates pro-atherogenic and pro-stenotic effects of extracellular nucleotides, emphasizing the protective role of adenosine (Figure 1).

Under physiological conditions, the extracellular adenosine reaches a concentration of about 30 to 200 nM and activates receptors with a low affinity (A1, A2A, A3).<sup>35</sup> The increase in extracellular adenosine concentration is a result of hydrolysis of extracellular adenine nucleotides that are released from cells in response to pathological stimuli or via intracellular transport of adenosine after increased intracellular hydrolysis of ATP.<sup>27,36,37</sup> The characteristics of adenosine receptors, their mechanisms of activation and affinity for adenosine have been described in detail in the attached review paper (Appendix - Paper D).



**Figure 1. The role of nucleotide and adenosine receptor activation in the pathogenesis of aortic stenosis and atherosclerosis.**

Green highlights beneficial effects while red indicates deleterious effects of specific receptor activation in the context of cardiovascular pathologies.

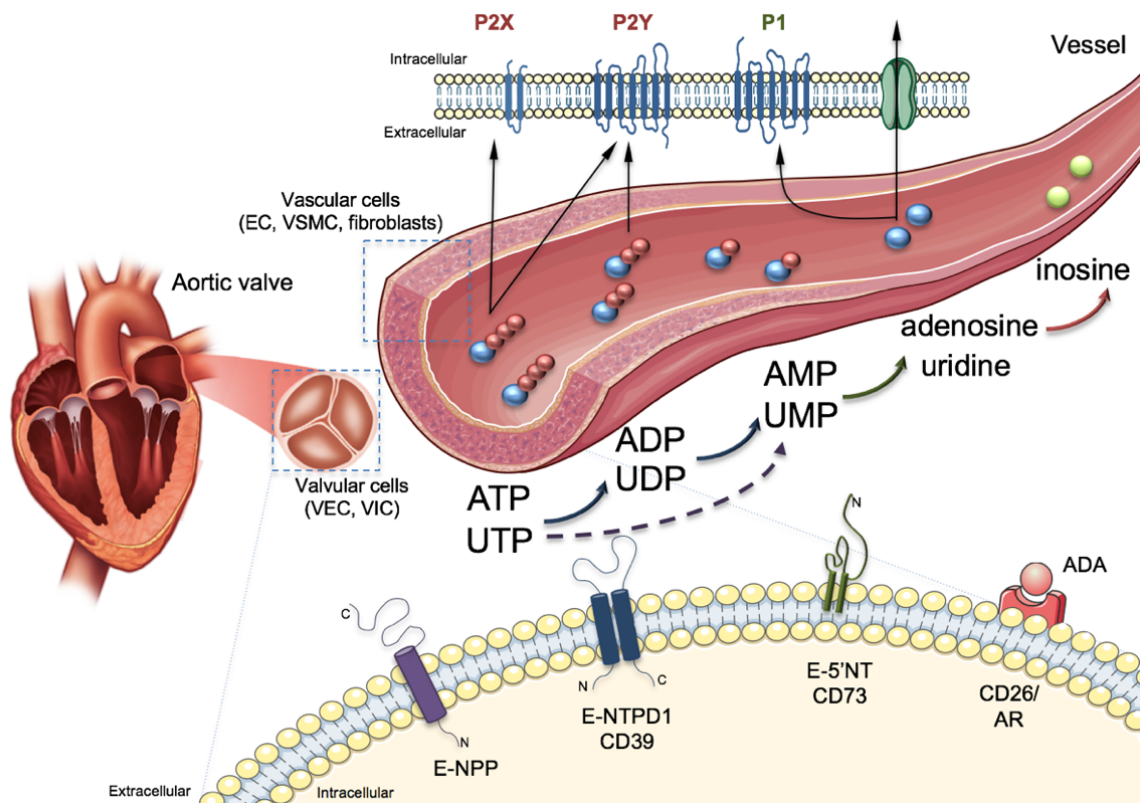
Based on: „Purinergic signaling in aortic stenosis and atherosclerosis”, Kutryb-Zajac et al. *Advances in Cell Biology* 1/2017; Appendix – Paper D.

### 6.1.5 The types of nucleoside transport

Transport of adenosine and other nucleosides across the cell membrane could be bi-directional through equilibrative system (ENT) or towards the cells in a cotransport with  $\text{Na}^+$  by concentrative system (CNT).<sup>38</sup> Two types of ENT transporters have been identified, es – equilibrative sensitive: blocked by NBTI (nitrobenzylthioinosine) and ei – equilibrative insensitive: not blocked by NBTI.<sup>39</sup> Four ENT proteins have been described (ENT1-4). Human ENT1 is sensitive to nanomolar concentrations of NBTI. ENT1 is responsible for the translocation of both purine and pyrimidine nucleosides.<sup>40</sup> Moreover, it is also inhibited by dipyrindamole. Transporters insensitive to NBTI at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  include other transporters from ENT family: ENT2-4. ENT2 has a weaker affinity for the naturally occurring purine and pyrimidine nucleosides with the exception of inosine. In turn, ENT3 has a structure characteristic for membrane proteins of lysosomes and endosomes. Its activity is dependent on pH, the optimum of 5.5 reflects the adaptation to the acidic environment of lysosomes. Transporter ENT4 also shows the highest activity at acidic pH and it is believed that this transporter is responsible for the regulation of adenosine concentration under reduced pH that accompanies ischemia.<sup>41</sup> Due to differences in the translocated substrates, CNT transporters were divided into six subtypes, but only 3 transport proteins have been identified and described: CNT1-3. CNT1 transporter has an affinity for pyrimidine nucleosides and adenosine.<sup>42</sup> CNT2 has the ability to translocate purine nucleoside and uridine. In turn, CNT3 has a broad specificity for substrates and translocates both purine and pyrimidine nucleosides.<sup>43</sup>

### 6.1.6 Extracellular adenosine catabolism

Another important mechanism responsible for the extracellular concentration of adenosine, and hence its availability for specific receptor subtypes, is extracellular catabolism of this nucleoside ([Figure 2](#)). Adenosine deaminase (ADA) catalyzes the hydrolytic deamination of adenosine to inosine or 2'deoxyadenosine to 2'deoxyinosine, and it exerts intracellular and extracellular activity.<sup>44</sup> Two isoforms of this enzyme have been described.<sup>45</sup> The first, ADA1 is encoded by the *ADA* gene located on the chromosome 20q13.12 and it is widely distributed in various types of cells, including immune cells and erythrocytes.<sup>46</sup> ADA1 has comparable affinity for adenosine as to 2'deoxyadenosine ( $K_m = 52 \mu\text{M}$ ) and its optimum is at a pH of 7-7.5.<sup>47</sup> It is anchored to the cell membrane by CD26 protein or adenosine receptors and acts on the cell surface as ecto-adenosine deaminase (eADA). Despite enzymatic function, eADA could play a role as an adhesion molecule by binding surface proteins that are present on different cells.<sup>45,48</sup> Furthermore, the complexes of ADA1 with adenosine receptors can sensitize adenosine receptors for its agonists and hence induce a receptor signal transduction.<sup>45</sup> The second isoform, ADA2 is encoded by the *CERCI* gene located on the chromosome 22q11.2.<sup>49</sup> ADA2 is expressed with ADA1 only in monocytes and macrophages.<sup>50</sup> It shows several times higher affinity for adenosine than to 2'deoxyadenosine, with a relatively high  $K_m$  value for adenosine ( $K_m = 2 \text{ mM}$ ). The optimal pH for its activity is approx. 6.5.<sup>47</sup>



**Figure 2. Purinergic signaling in the cardiovascular system.**

Released nucleotides activate P2 receptors or they are inactivated by extracellular hydrolysis. Extracellular ATP and UTP are hydrolyzed through ADP and UDP to AMP and UMP by ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (eNTPD1, CD39). AMP and UMP are hydrolyzed by ecto-5' nucleotidase (e5'NT, CD73) and AMP-derived, adenosine is degraded to inosine by ecto-adenosine deaminase (eADA). Alternative pathway for extracellular nucleotide hydrolysis engages activities of ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase (eNPP) and alkaline phosphatase (ALP) not included in the figure due to minor contribution to extracellular AMP hydrolysis at physiological concentrations of AMP.

Based on: „Purinergic signaling in aortic stenosis and atherosclerosis”, Kutryb-Zajac et al. *Advances in Cell Biology* 1/2017; Appendix – Paper D.

## 6.2 Pathogenesis of aortic stenosis and atherosclerosis

Cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and aortic stenosis are predominant causes of mortality in developed countries.<sup>51</sup> These conditions contribute to the development of acute or long-term organ hypoxia (atherosclerosis) and heart failure (aortic stenosis). It has been shown that these are active processes associated with impaired regulatory and metabolic functions of the cells.<sup>52,53</sup> A number of similarities have been described in the pathogenesis of aortic stenosis and atherosclerosis. These conditions are initiated by endothelial activation driven by the turbulent blood flow and prolonged exposure to atherogenic/ pro-stenotic factors such as LDL or extracellular nucleotides.<sup>54,55</sup> Next, LDL particles diffuse under the endothelial layer.<sup>56,57</sup> The accumulation and modification of LDL by their oxidation as well as increased expression of adhesion molecules produced by endothelial cells initiate the inflammatory cascade within the vessel wall or the valve. The incoming monocytes and T cells infiltrate tissue structure. Modified LDL are absorbed by the macrophages to form foam cells. The interaction between CD40 receptor on macrophages and a CD40L ligand that is present

on lymphocytes activates a classic immune response that causes the development of chronic inflammation.<sup>58,59</sup> Increased levels of inflammatory markers, enhanced release of proinflammatory cytokines and immune cells infiltrate, composed of T cells and macrophages, were observed in both, pathologically changed vessels and aortic valves.<sup>59-</sup><sup>61</sup> Fibrosis is characterized for the later stages of atherosclerosis and aortic stenosis.<sup>62,63</sup> Metalloproteinases that degrade extracellular matrix proteins are produced mainly by lymphocytes and macrophages, leading to the rearrangement of extracellular matrix structure, which promotes valvular, vascular and immune cell migration. However, the development of atherosclerosis and aortic stenosis differs in many aspects. They may arise from differences in the anatomical structure and cellular composition of vessels and valves. In atherosclerosis, proliferation, and migration of smooth muscle cells and the activation of their secretory phenotype play a key role. It contributes to the production of extracellular matrix proteins and hence reconstruction and reorganization of the extracellular matrix.<sup>64</sup> The stable fibro-fatty atherosclerotic plaque could be affected by the impact of metalloproteinase activity, which results in plaque rupture and erosion that is a direct cause of vessel occlusion and organ hypoxia. Due to the small number of smooth muscle cells within the aortic valve, their proliferation and migration do not play an important role in aortic stenosis. However, differentiation of valvular interstitial cells to myofibroblast-like and osteoblast-like cells stimulated by inflammatory and growth factors is one of the most relevant pathological processes in the aortic valve.<sup>65</sup> Myofibroblast-like valvular interstitial cells (with the expression of alpha smooth muscle actin) promote extracellular matrix remodeling. Further stimulation of cytokines, extracellular nucleotides and proteins associated with chondro- and osteogenesis initiates their differentiation to osteoblast-like cells, which are the direct cause of calcification.<sup>66</sup> Despite some successes in the prevention and treatment of early and moderate atherosclerosis, the only treatment for aortic stenosis and severe atherosclerosis is a surgical approach.<sup>67,68</sup> This underlines the importance of mechanistic studies of these conditions for the development of new therapies, primarily related to the endothelium protection, regulation of the inflammation, proliferation and differentiation of specific types of the cells.

### **6.3 Purinergic signaling in the pathophysiology of aortic stenosis and atherosclerosis**

As signaling molecules, nucleotides and their catabolites, mainly adenosine play a key role in the regulation of pathological processes underlying atherosclerosis and aortic stenosis, such as: inflammation, endothelial function, cell differentiation and proliferation, platelet aggregation, fibrosis and calcification.<sup>69-71</sup> As shown in [Figure 1](#), activation of nucleotide receptors in the cardiovascular system mainly stimulates inflammation, endothelial activation, oxidation of LDL, platelet aggregation, bone remodeling and fibrosis. On the other hand, activation of adenosine receptors counteracts pro-atherosclerotic and pro-stenotic actions of nucleotides.<sup>34,72</sup> This highlights the role of extracellular nucleotide and adenosine metabolism in the maintaining the balance between cell-released nucleotides and adenosine that is produced by ecto-nucleotidases.

Experimental studies using mouse models confirm the crucial role of ecto-nucleotidases in homeostasis of the cardiovascular system. Table 2 describes the main effects of the changes in individual ecto-enzymes activities on the development of pathological conditions associated with cardiovascular diseases.

Therapeutic target	Model	Impact on enzymatic activity	Effect
<b>eNTPD1 (CD39)</b>	CD39+/-/ApoE-/-	↓	Pro-atherosclerotic <sup>32</sup>
	CD39-/-/ApoE-/-	↓↓	Pro-thrombotic, Pro-atherosclerotic (enhanced lipoprotein uptake by macrophages) <sup>73</sup>
	<i>h</i> CD39 Tg	↑	Anti-thrombotic <sup>74</sup>
<b>eNPP1</b>	eNPP1+/-	↓	Neointima formation <sup>75</sup>
	eNPP1-/-	↓↓	Vascular calcification <sup>76, 77</sup>
	eNPP1-/-	↓	Diminished infiltration of macrophages <sup>78</sup>
	eNPP1-/-/ApoE-/-	↓	Insulin resistance, hyperglycemia <sup>79</sup>
	eNPP1 Tg	↑	Metabolic syndrome <sup>80</sup>
<b>TNAP</b>	TNAP-OE	↑	Vascular calcification <sup>81</sup>
<b>e5'NT (CD73)</b>	CD73-/-/ApoE-/-	↓	Pro-atherosclerotic <sup>82</sup>
	CD73-/-		Pro-thrombotic <sup>83</sup> Pro-inflammatory <sup>83, 84</sup> Aortic valve stenosis <sup>85</sup>
	<i>h</i> CD73-/- Tg		Vascular calcification <sup>86</sup>
<b>eADA/ADA1</b>	<i>scid/scid</i> /ApoE-/-	↓	Anti-atherosclerotic <sup>87</sup>
	ADA-/-		Anti-inflammatory <sup>88</sup>

**Table 2. The role of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzymes in the development of vascular pathologies in experimental animal models.**

Orange color indicated processes that promote the development of atherosclerosis and aortic stenosis, while green color – processes that counteract these effects.

Based on: „Purinergic signaling in aortic stenosis and atherosclerosis”, Kutryb-Zajac et al. *Advances in Cell Biology* 1/2017; Appendix – Paper D.

Partial or complete lack of eNTPD1 activity in mice is related with pro-atherosclerotic and pro-thrombotic phenotype.<sup>32,73,89</sup> Similarly, lack of e5'NT contributes to the activation of inflammation, vascular calcification and pro-atherosclerotic and pro-thrombotic phenotype.<sup>83,84,90,91</sup> In turn, silencing of *ADA* gene results in diminished degradation of extracellular and intracellular adenosine and has a strong anti-inflammatory effect.<sup>87,88</sup> The crucial role of this enzyme in immune system is confirmed by the mutations in *ADA* gene that is manifested as severe combined immunodeficiency syndrome (SCID).<sup>92</sup> Some of the reports refer to the role of ecto-nucleotide pyrophosphatases/ phosphodiesterases in the processes underlying aortic stenosis and atherosclerosis. It has been shown that a decrease or lack of eNPP1 activity stimulates neointimal hyperplasia, calcification of atherosclerotic plaque and ectopic vascular calcification, simultaneously inhibiting vascular infiltration of macrophages.<sup>75-78</sup> It is explained by the reduced production of pyrophosphate from ATP during a reaction catalyzed by eNPP1. It is postulated that pyrophosphate, calcification inhibitor, stimulates vascular adhesion of monocytes/ macrophages by increased expression of osteopontin.<sup>76-</sup>

<sup>78</sup> Neointimal hyperplasia in eNPP1 deficient mice is dependent on different mechanisms and may result from increased expression of C/EBP homologous protein (CHOP).<sup>75</sup> It is believed that vascular calcification may also be due to higher activity of a non-specific alkaline phosphatase, responsible for the degradation of pyrophosphate to inorganic phosphate.<sup>81</sup>

Human studies also suggest significant changes in the activities of ecto-enzymes engaged in nucleotide and adenosine metabolism in vascular pathologies. In a few reports, a decrease in ecto-nucleotidases in atherosclerosis has been found in plasma and on the surface of the vessel wall.<sup>93,94</sup> Detailed characteristics and investigation of the changes in these activities during the atherosclerotic process is a primary goal of this work and will be discussed in later sections of the thesis. On the other hand, our unpublished studies performed on a group of over 100 patients with aortic stenosis showed a decrease in the activity of ecto-enzymes degrading the extracellular nucleotides on the surface of human calcified aortic valves, which was accompanied by the increase in the surface activity of ecto-adenosine deaminase.<sup>95</sup> The observed ecto-enzyme pattern promoted the maintenance of nucleotides on the surface of stenotic valves and increased degradation of adenosine, which could counteract the negative effects of nucleotides. Moreover, we observed a negative correlation between the activity of ecto-nucleotidases with parameters that reflect the severity of aortic stenosis, such as the maximum velocity across the valve, aortic valve area and the maximum gradient through the valve, defined by Doppler echocardiography. We also demonstrated negative correlation with the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$  in valvular tissue. On the other hand, the activity of eADA on the surface of the valve correlated positively with these parameters. Other reports suggest that the interstitial cells derived from human stenotic valves exhibit increased expression of eNPP1.<sup>96</sup> Although, calcification of the valve is also accompanied by an increase in activity TNAP.<sup>69,97</sup> Simultaneous increase in the activity of these two enzymes may lead to enhanced mineralization, through increased production of PPi and its hydrolysis by TNAP. Our studies using flow cytometry, immunohistochemistry and enzyme activity measurements using RP-HPLC showed that ecto-nucleotidases (eNTPD1 and e5'NT) also play a significant role in the extracellular catabolism of nucleotides on the surface of aortic valves.<sup>31,98</sup> Cellular source of these enzymes and eADA activity in calcified valves were valvular interstitial cells, endothelial cells and immune infiltrate, mainly macrophages and T cells but also B cells and granulocytes.<sup>98</sup>

In conclusion, we suggest that pro-stenotic phenotype observed on the aortic valve surface can be generated by diminished activities of eNTPD1 and e5'NT and increased activity of eADA. It may be associated with the stimulation of nucleotide receptors and adenosine receptors that are sensitive to low concentrations of adenosine (eg. A2a receptor).



## 6.4 Enzymes of extracellular nucleotide and adenosine metabolism as therapeutic targets in cardiovascular disease

Regulation of the ecto-enzymes activities in the nucleotide metabolism pathway could be a promising therapeutic approach for the treatment of aortic stenosis and atherosclerosis. Table 3 shows the effects of pharmacological inhibitors and activators of particular ecto-enzymes in specific clinically relevant scenarios.

Therapeutic target	Compound	Impact on enzymatic activity	Effect
eNTPD1	Soluble eNTPD1	↑	Inhibition of platelet reactivity <sup>99</sup>
eNTPD1-3	ARL67156	↓	Inhibition of aorta/ aortic valve calcification <sup>100</sup>
eNPP1	eNPP1-Fc	↑	Inhibition of vascular calcification <sup>101</sup>
TNAP	Levamisole	↓	Inhibition of vascular smooth muscle cells calcification <sup>102</sup>
	Etidronate		
e5'NT	Soluble e5'NT	↑	Endothelial barrier improvement <sup>103</sup>
	Sulfasalazine		Anti-inflammatory <sup>104</sup>
	Methotrexate		Anti-inflammatory <sup>105</sup> Anti-atherosclerotic <sup>106</sup>
	Atorvastatin	↑ <sup>107</sup>	Anti-atherosclerotic <sup>108</sup> Inhibition of valvular interstitial cell calcification <sup>109</sup>
eADA	Atorvastatin	↓ (Appendix – Paper A)	Anti-atherosclerotic <sup>108</sup>
	2'deoxycoformycin	↓	Anti-inflammatory, anti-atheroclerotic, Endothelial cells protection (Appendix – Paper A)
	EHNA	↓	Anti-inflammatory <sup>110</sup>
	Kempherol	↓(Appendix – Paper A), <sup>111</sup>	Anti-atherosclerotic <sup>112</sup>

**Table 3.** Therapeutic potential of the regulation of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzymes in vascular pathologies.

Green color indicated the increase of enzymatic activity, while blue color – the decrease of enzymatic activity.

Based on: „Purinergic signaling in aortic stenosis and atherosclerosis”, Kutryb-Zajac et al. *Advances in Cell Biology* 1/2017; Appendix – Paper D.

Data presented in Table 3 highlight a potential of the stimulation of ecto-nucleotidases (eNTPD1 and e5'NT) as anti-thrombotic therapy, in endothelial protection as well as in the inhibition of inflammation, atherosclerotic plaque development, and calcification. In addition, the role of ecto-nucleotidases on the surface of heart valves may be crucial in valve prosthesis, that constitute most effective method of aortic stenosis treatment. Decoration of the surface of bioprostheses with ecto-nucleotidases, by tissue engineering may contribute to improvement of their function, that will be discussed in later sections of this work. Also, regulators of eNPP1 and TNAP activities may be beneficial in context of vascular and valvular calcification. The potential of the inhibition of extracellular adenosine catabolism in cardiovascular pathologies will be discussed in detail in the subsequent sections of this thesis. The main objective of the work presented here was to investigate the activity of extracellular nucleotide metabolism on the surface of the vessels and heart valves and the analysis of changes in these activities in vascular pathologies.

## 7. AIMS

The aim of this work was to investigate the changes in extracellular nucleotides and adenosine metabolism associated with cardiovascular pathologies and to evaluate therapeutic potential of pharmacological modulation of these activities.

Specific aims include:

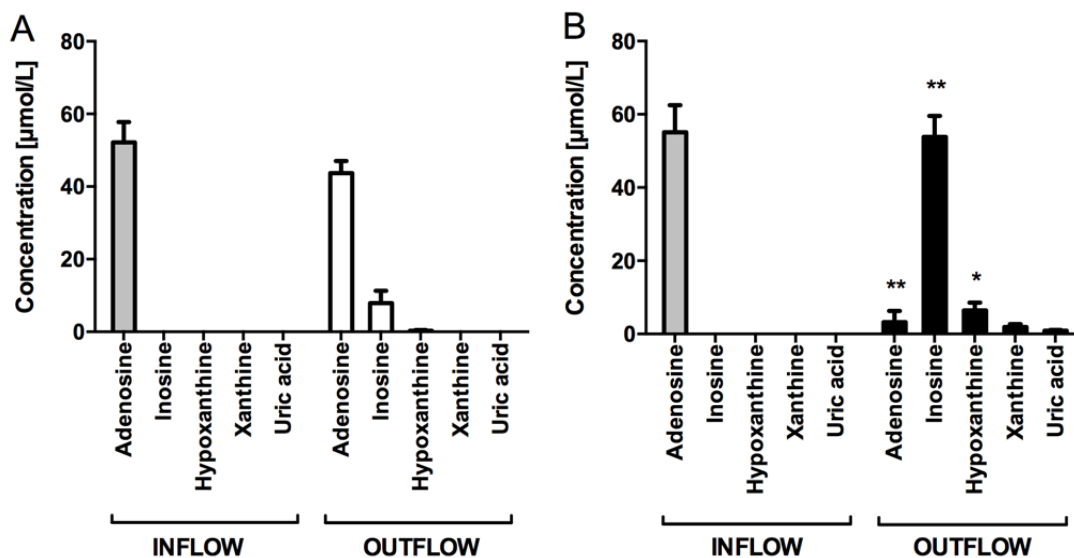
1. Evaluation of changes associated with atherosclerosis in activities of extracellular nucleotide and adenosine metabolism enzymes on the surface of mice and human vessels;
2. Identification of cellular sources of increased ecto-adenosine deaminase activity during the development atherosclerosis in mice;
3. Testing effects of pro- and anti-atherosclerotic factors on the activities of ecto-enzymes in cultures of endothelial cells and macrophages;
4. Comparison of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzyme activities on the surface of porcine vessels and aortic valves;
5. Comparison of the effect of different procedures for the preparation of biological heart valve prostheses on the activities of enzymes of extracellular nucleotide metabolism;
6. Investigation of the effect of adenosine deaminase inhibition on the development of atherosclerosis in mice.

## 8. THE MOST IMPORTANT RESULTS

### 8.1 Extracellular nucleotide and adenosine metabolism on the surface of atherosclerotic vessels

The total activities of nucleotide and adenosine metabolising ecto-enzymes have been tested on the surface of atherosclerotic vessels, derived from the mouse genetic model of atherosclerosis (C57Bl/6J mice with the knockout in genes encoding apolipoprotein E and receptor for low-density lipoproteins – ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice) and human atherosclerotic vessels.

Firstly, aortoiliac bifurcation from 6 month-old ApoE<sup>-/-</sup>DLR<sup>-/-</sup> mice (with severe atherosclerosis) was perfused *ex vivo* with Hanks balanced salt solution that contained substrates for ecto-enzymes. The vessel was individually perfused with 50  $\mu$ M adenosine and then 50  $\mu$ M ATP and AMP in the presence of an inhibitor of adenosine deaminase. After a 1-minute perfusion (flow rate 0.4 ml/min) of the atherosclerotic vessel with ATP and AMP, no significant differences were observed (Paper C, Figures 1 and 2), while after the perfusion with adenosine, the prominent increase in the activity of ecto-adenosine deaminase was determined (Figure 3).

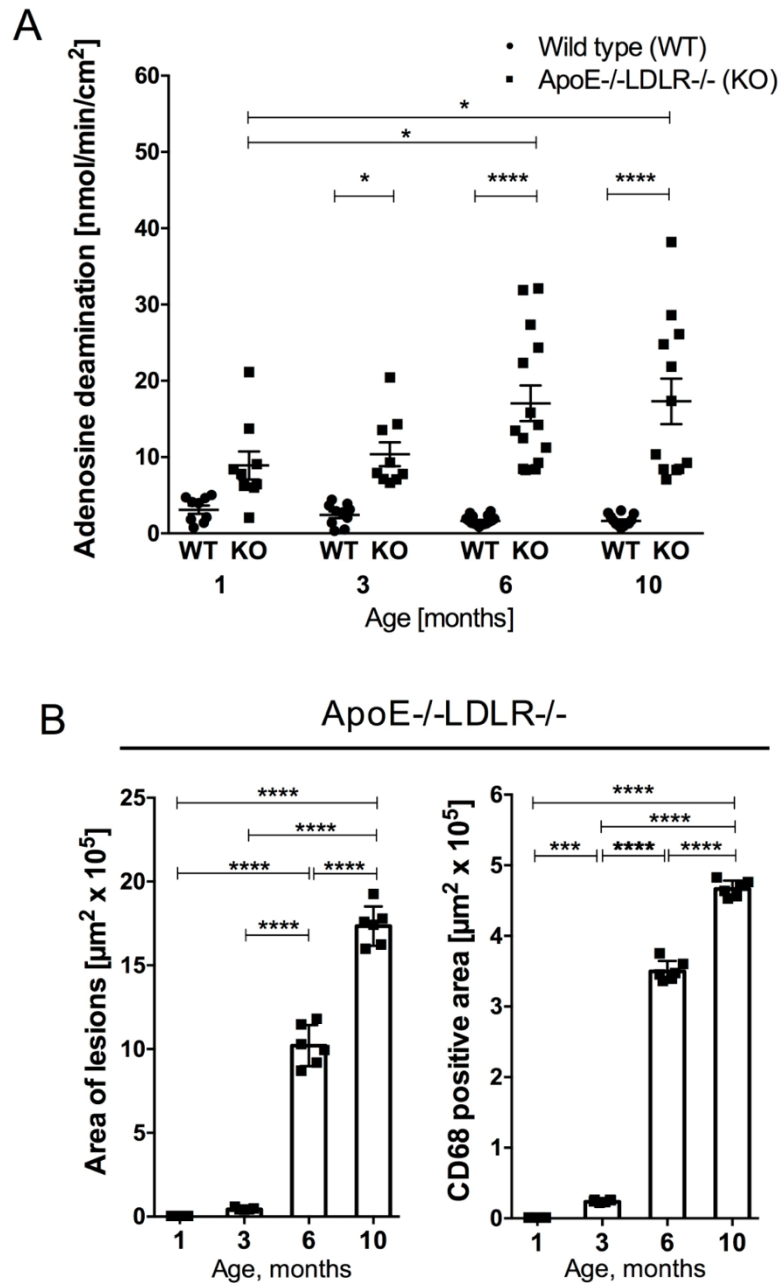


**Figure 3.** Increased degradation of extracellular adenosine in the atherosclerotic vessel.

Concentration of ecto-adenosine deaminase reactants at the inflow and outflow during 1 min perfusion with 50  $\mu$ M adenosine of the aortoiliac bifurcation of 6 month-old male C57Bl/6J wild type (A) and ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> (B). Results are shown as mean  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005 vs. wild type mice,  $n$ =5, statistical analysis was performed by Student  $t$ -test.

Based on: „Extracellular nucleotide catabolism in aortoiliac bifurcation of atherosclerotic ApoE/LDLr double knock out mice”, Kutryb-Zajac et al. *Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids*. 2014; 33: 323-328; Appendix – Paper C.

In order to evaluate changes in the metabolism of extracellular nucleotides and adenosine during atherosclerosis development, we measured total activities of ecto-enzymes in static conditions on the surface of a representative section of aorta derived from ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice at different stages of atherosclerotic process (Paper A, Figure 1A-C).



**Figure 4. An increased activity of vascular adenosine deaminase 1 (ADA1) precedes and correlates with atherosclerotic plaque development in ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice.**

The rate of adenosine deamination (A) in intact thoracic aortas of ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice (n=9-16) and age-matched wild types (n=9-16); \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001, statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed Holm-Sidak *post hoc* test.

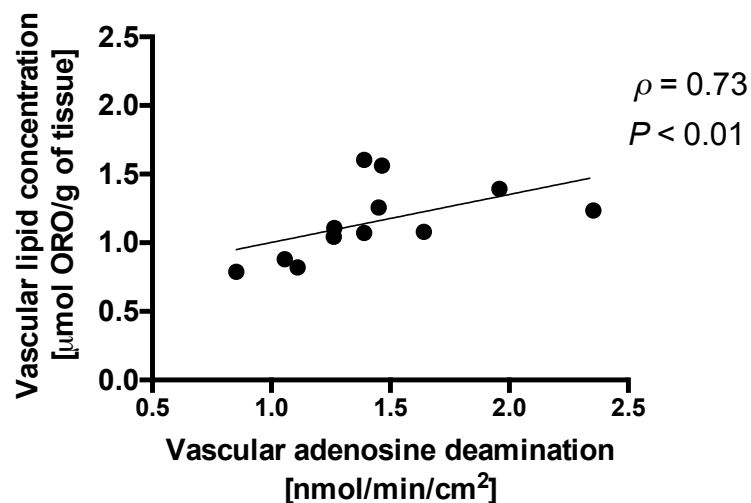
The lipid deposition (lesions) and macrophages accumulation (CD68 signal) in aortic roots of ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice (n=5-6) in different age groups (B); results are shown as mean ± SEM; \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed Holm-Sidak *post hoc* test.

Based on: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Appendix – Paper A.

The results of this part of the study revealed no changes in the activity of enzymes that degrade extracellular ATP (Paper A, Figure 1A) in each group. However, the difference in the activity of enzymes that degrade extracellular AMP was observed. The hydrolysis of AMP on the surface of atherosclerotic vessels was reduced in all age groups (Paper A, Figure 1B). The most important observation of this part of the study was a highly increased level of extracellular deamination of adenosine to inosine, which increased in parallel with the development of pathological processes within the vessel wall (Figure 4A) and preceded vascular lipid deposition (lesions) and macrophage accumulation (CD68 signal, Figure 4B).

In order to identify ecto-enzymes responsible for the metabolism of nucleotides and adenosine we determined the concentration of reaction products after the incubation of the vessel fragment in the presence of particular ecto-enzyme inhibitors. For these experiments, fragments of descending thoracic aorta from 6 month-old ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> and WT mice were used. It has been shown that in both atherosclerotic and control vessel, eNTPD1 is mainly responsible for the ATP hydrolysis (Paper A, Figure 1E, F, I, J), e5'NT for the AMP hydrolysis (Paper A, Figure 1G, K) and ADA1 for the degradation of adenosine (Paper a, Figure 1 H, L).

In the experiments with human vessels, we investigated changes in the activities of ecto-enzymes on the vessel surface and correlated them with the severity of atherosclerosis. Some trends for negative correlation were observed between ecto-nucleotidases and vascular lipid concentration (Paper A, Figure 8A, B), while the activity of vascular ecto-adenosine deaminase positively correlated with the severity of atherosclerosis (vascular lipid concentration, Figure 5), confirming the importance of this enzyme in human pathology.



**Figure 5.** The rate of extracellular adenosine deamination positively correlates with the severity of atherosclerosis in human vessels.

The correlation analysis between the rate of adenosine deamination and the tissue lipid concentration in the ascending aorta (n=12). Results are shown as plots of the Spearman correlation analysis, Spearman Rho (q) and associated P-value (P).

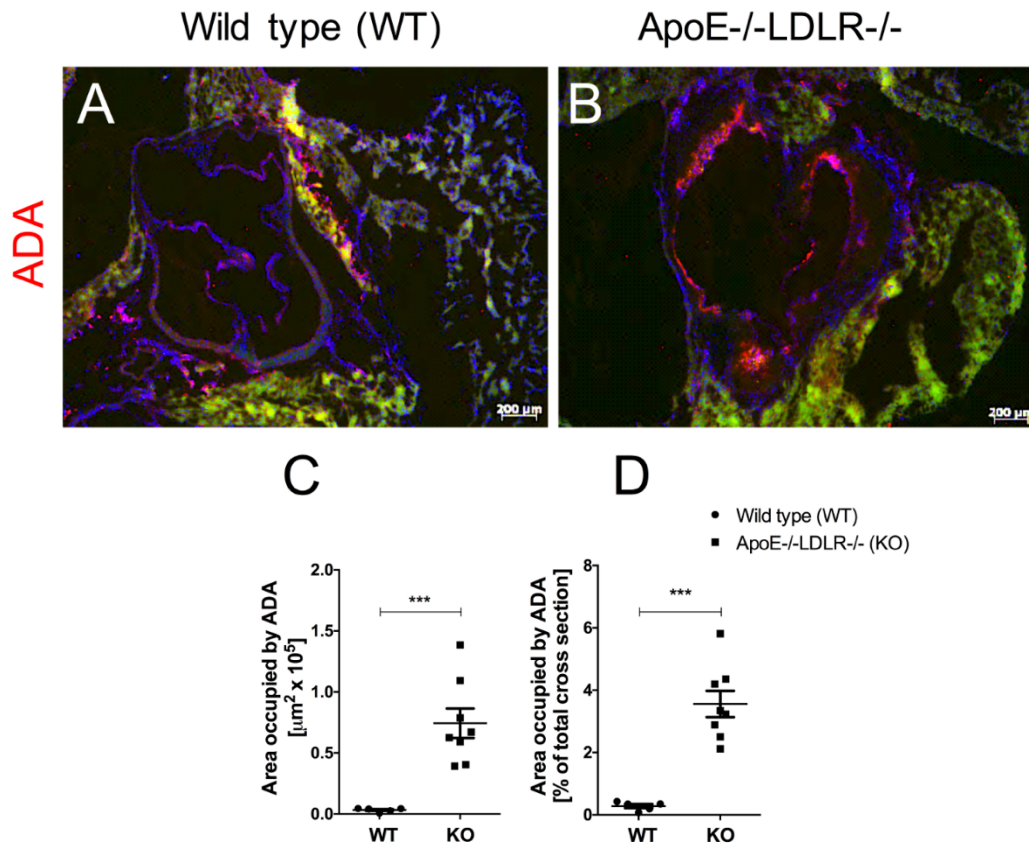
Based on: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Appendix – Paper A.

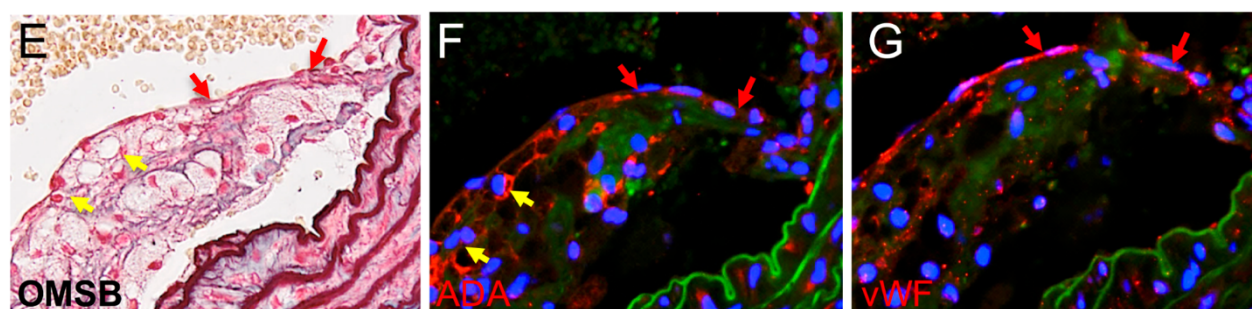
## 8.2 Cellular sources of increased activity of ecto-adenosine deaminase in atherosclerosis

At the next stage, we identified the cellular source of increased activity of ecto-adenosine deaminase. For this purpose, we analyzed the presence and cellular location of adenosine deaminase in the vessel wall and atherosclerotic plaque using histological techniques and immunofluorescence labeling.

Immunofluorescence studies confirmed much higher amount of ADA protein in aortic roots of 6 month-old ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup> in comparison to age-matched WT (Figure 6A-D). Moreover, it revealed that ADA signal was located on the inner surface of the vessel and atherosclerotic plaque (Figure 6B).

Histological OMSB staining of brachiocephalic arteries of 6 month-old ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup> mice revealed the structure of atherosclerotic plaque, with particular emphasis on smooth muscle cells, endothelial cells, foam cells, collagen and elastic lamina. The immunofluorescence labeling was performed on adjacent sections of BCA. Representative images of BCA cross-sections showed that endothelial cells (Figure 6E-G) and partially macrophages (Paper A, Figures 2N-P, S3K-M) were the major sources of adenosine deaminase in atherosclerotic vessels. The full panel of immunofluorescence stainings in BCA (Paper A, Figures 2H-S and S3A-D), aortic root (Paper A, Figure S3E-J) and coronary arteries (Paper A, Figure S3K-P) confirmed the origin of adenosine deaminase in a mouse model of atherosclerosis.





**Figure 6. Endothelial cells and macrophages located on the inner surface of the vessel contribute to the increased activity of vascular adenosine deaminase (ADA) in atherosclerosis.**

Representative images of aortic root (cross-section) stained for ADA (A, B). Calculated data for ADA positive area (C) and percentage of the total cross-sectional area occupied by ADA (D) in aortic roots of 6 month-old WT (n=5) and ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> (n=8) mice. Results are shown as mean  $\pm$  SEM, \*\*\*p<0.001, statistical analysis was performed by unpaired Student *t*-test.

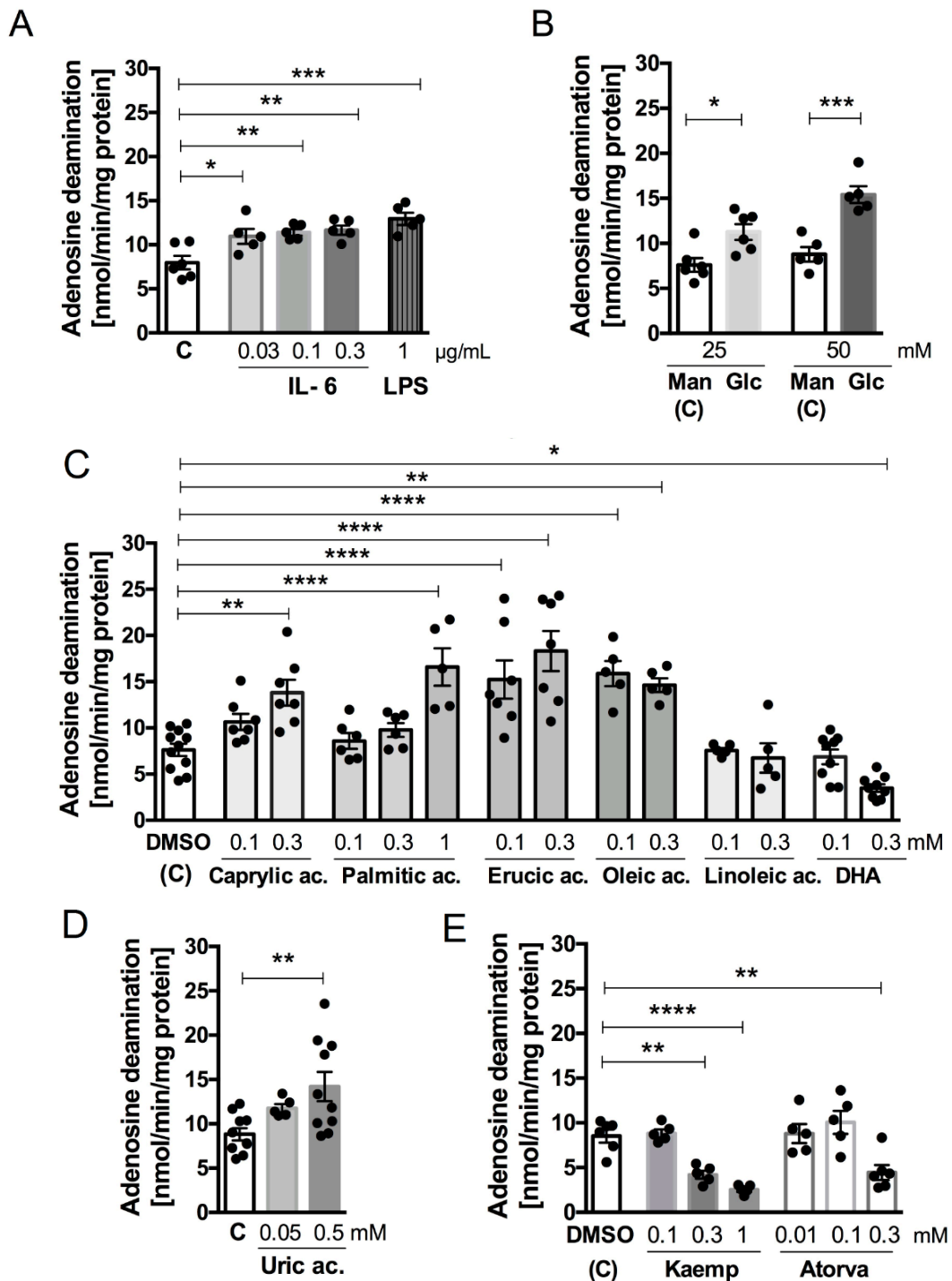
Representative images of OMSB staining and immunofluorescence for ADA (F) and von Willebrand factor (vWF) (G) in atherosclerotic plaque of brachiocephalic artery (BCA) of 6 month-old ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice (n=7) (E). Red arrows point endothelial cells, yellow – macrophages.

Based on: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Appendix – Paper A.

### 8.3 The effects of pro- and anti-atherosclerotic factors on the activities of ecto-enzymes engaged in the nucleotide metabolism on the surface of endothelial cells and macrophages

*In vitro* studies using a mouse endothelial cell line H5V and peritoneal macrophages were used to determine the impact of pro-atherosclerotic factors (saturated fatty acids, proinflammatory cytokines, hyperglycemia and hyperuricemia) and anti-atherosclerotic factors (polyunsaturated fatty acids, flavonoids and statins) on the activities of ecto-enzymes. It has been shown that inflammatory stimuli and saturated fatty acids stimulated the activity of eADA (Figure 7A, C), while polyunsaturated fatty acids and flavonoids (e.g. kaempferol) inhibited this activity in endothelial cells (Figure 7C, E) and macrophages (Paper A, Figure 7F, I). Other stimuli, such as hyperglycemia, uric acid or monounsaturated fatty acids stimulated eADA activity (Figure 7B-D; Paper A, Figure 7I), while atorvastatin inhibited this activity only in endothelial cells (Figure 7E). The impact of these factors on the activities of ecto-enzymes engaged in adenine nucleotide catabolism was less pronounced (Paper A, Figures S5 and S6).





**Figure 7. Atherogenic stimuli enhance the rate of extracellular adenosine deamination in murine endothelial cells, whereas flavonoids and statins decrease this activity.**

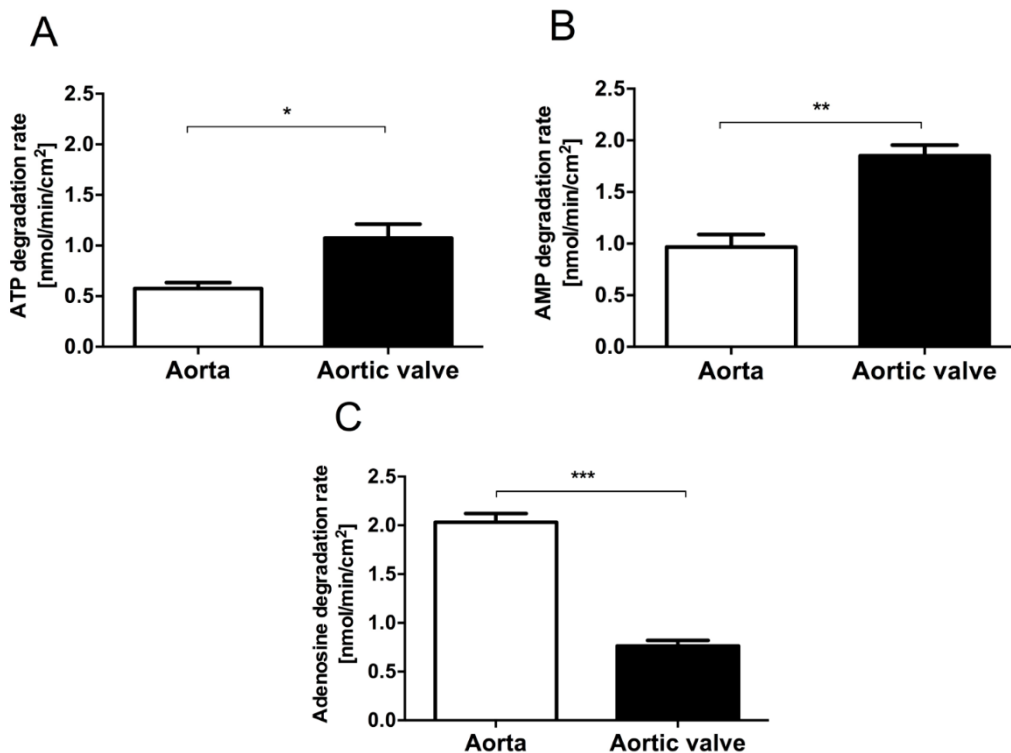
The rate of extracellular adenosine deamination in murine immortalized heart endothelial cells H5V treated for 24h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) with IL-6, lipopolysaccharide (LPS) (A), glucose (glc) (B), fatty acids (C), uric acid (D) kaempferol (kaemp) and atorvastatin (atorva) (E); n=4-10. Results are shown as mean ± SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs. control (A, D), vs. osmotic control (adequate concentration of mannitol – man) (B) lub vs. DMSO (0.5% v/v DMSO) (C, E), statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Dunnet *post hoc* test (A, C-E) or one-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* test (B); ac. – acid; C – control; DHA – docosahexaenoic acid.

Based on: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Appendix – Paper A.



## 8.4 The comparison of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzyme activities on the surface of vessels and heart valves

In order to compare the activities of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzymes on the surface of unaltered vessel wall and aortic valves, we used porcine ascending aortas and aortic valves. It has been shown that the surface of aortic valve had two-fold greater activity of ecto-nucleotidases that degrade extracellular nucleotides (Figure 8A) and produce adenosine (Figure 8B). In turn, the activity of ecto-adenosine deaminase on the surface of aortic valves was reduced in relation to the vessel wall (Figure 8C).



**Figure 8.** The surface of pathologically unchanged aortic valve is characterized by high activities of ecto-enzymes engaged in the removal of nucleotides and production of adenosine and diminished catabolism of adenosine as compared to the aortic wall.

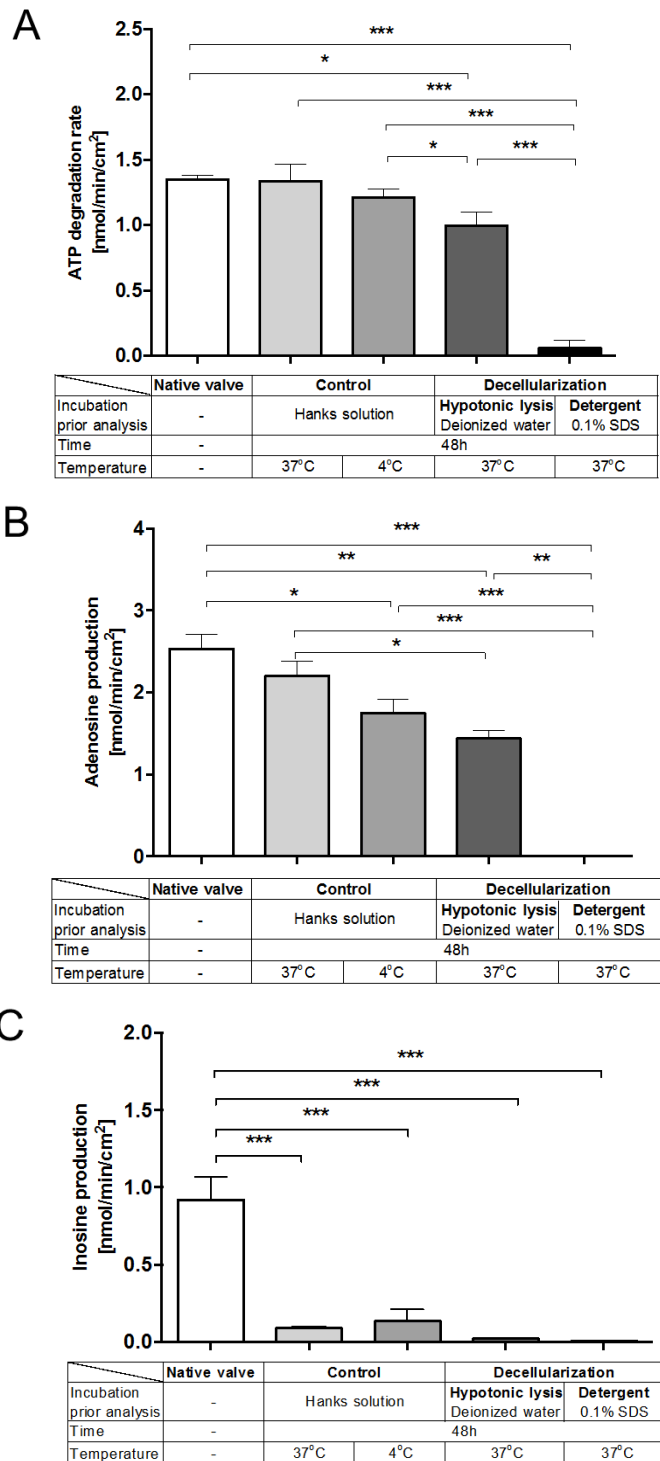
ATP hydrolysis (A), AMP hydrolysis (B) and adenosine deamination (C) on the surface of porcine ascending aorta and an aortic valve after incubation with 50  $\mu$ M ATP, AMP or adenosine. Results are shown as mean  $\pm$  SEM, n=4, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; statistical analysis was performed by paired Student *t*-test.

Based on: „Nucleotide catabolism on the surface of aortic valve xenografts; Effects of different decellularization strategies”, Kutryb-Zajac et al. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2016; 9 (2): 199-126; Appendix – Paper B.

## **8.5 The impact of the procedures for the preparation of biological heart valve prostheses on the activity of extracellular adenine nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzymes**

Currently, the surgical approach is the only effective method for aortic stenosis treatment. However, mechanical or biological prostheses used for this purpose have numerous disadvantages. Implantation of mechanical prostheses is associated with the need to include anti-thrombotic therapy and they are susceptible to infection. The use of biological prostheses reduces the risk of thrombotic complications, but the availability of valves for transplantation from a human donor (allograft) is limited. Therefore, valves from other species (xenografts), mainly from pigs could be a good solution. However, the appropriate processing of the pig valves is crucial in obtaining fully functional, non-immunogenic biological valvular prostheses.

Another aspect of the research in this thesis was to analyze the effect of commonly used methods of pig valve decellularization during the preparation of bioprostheses on the activities of nucleotides and adenosine metabolism ecto-enzymes. It has been shown that decellularization using a detergent (0.1% SDS) completely eliminated the activity of all ecto-enzymes, while the use of hypotonic lysis led to the preservation of ecto-nucleotidases ([Figure 9A-B](#)). Low activity of ecto-adenosine deaminase in relation to its level in the native valve was not a result of decellularization. It resulted from the processing time, which indicates a relatively unstable binding of this protein to the cell surface ([Figure 9C](#)). The preservation of ecto-nucleotidases could provide effective degradation of adenine nucleotide with their pro-inflammatory and pro-thrombotic properties and production of adenosine, which may prevent graft rejection. One of the possibilities to retain these enzymes on the surface of valvular structures is adequate processing of the pig valve, followed by the preservation of these extracellular proteins. However, these porcine proteins could induce immunogenic effects. The optimal solution is therefore, the acquisition of bioscaffolds from pig valves, their effective decellularization that removes all immunogenic proteins and recellularization with human cells that have adenine nucleotide-degrading ecto-enzymes, which provide adenosine production in the aortic valve microenvironment.



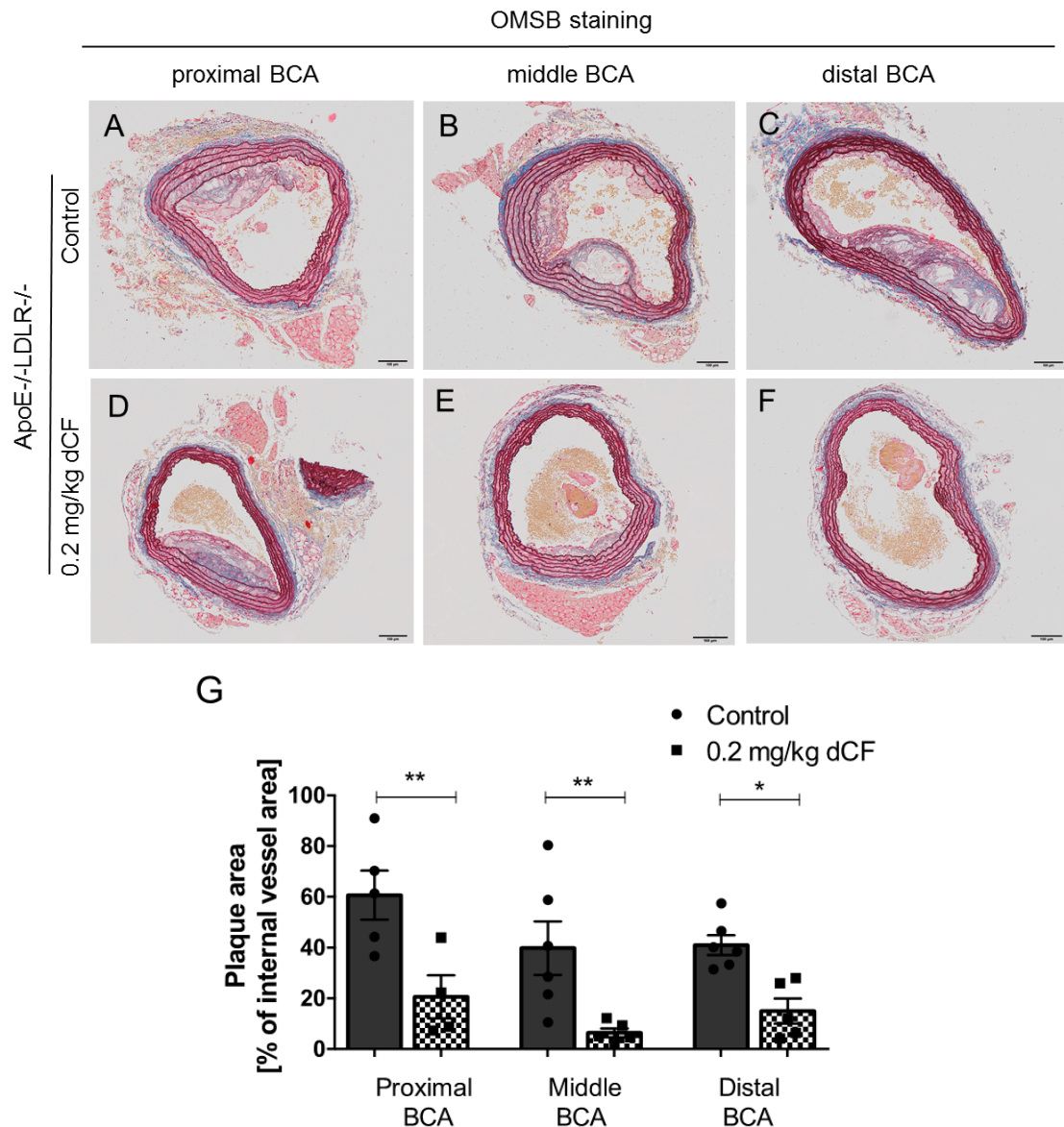
**Figure 9.** Activities of extracellular adenine nucleotide-hydrolyzing and adenosine-producing ecto-enzymes are preserved after decellularization with hypotonic lysis, while the use of a detergent entirely removes all nucleotide and adenosine metabolism activities.

The rate of extracellular ATP hydrolysis (A), adenosine production (B) and inosine production (C) in native and decellularized (with hypotonic lysis or detergent) porcine aortic valve after a 30-min incubation with 50  $\mu$ M ATP, AMP or adenosine. Results are shown as mean  $\pm$  SEM; n=8; \*p<0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p<0.001, statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Based on: „Nucleotide catabolism on the surface of aortic valve xenografts; Effects of different decellularization strategies”, Kutryb-Zajac et al. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2016; 9 (2): 199-126; Appendix – Paper B.

## 8.6 The impact of ecto-adenosine deaminase inhibition on atherosclerosis development and its therapeutic potential

Increased activity of ecto-adenosine deaminase in activated endothelial cells highlights the importance of extracellular adenosine catabolism in atherosclerosis. The therapeutic potential of the suppression in adenosine deaminase activity was examined using an inhibitor of adenosine deaminase - 2'deoxycoformycin (dCF). dCF is used in clinical practice for the treatment of leukemia and graft-versus-host-disease. In high doses, dCF has a strong immunosuppressive effect. However, the aim of presented studies was to evaluate the impact of dCF on the development of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice. In order to avoid the immunosuppressive effect, the dose of dCF was minimized to 0.2 mg/kg. Mice treated with dCF demonstrated a significant reduction in atherosclerotic plaque that was stained by ORO in aorta *en face* (Paper A, Figure 5A-C), in aortic root (Paper A, Figure 7D-N) and by OMSB in BCA (Figure 10). In addition, OMSB staining showed the effect of dCF on the stability of existing atherosclerotic plaque (Figure 10A, D). Low-dose dCF also caused other systemic and vascular effects, such as the increase in blood adenosine concentration (Paper A, Figure 4A), which indicates an increase in its extracellular concentration. In addition, dCF caused the reduction of inflammatory parameters (Paper A, Figure 4B and C) and endothelial activation (Paper A, Figure 4D-J), an increase in plasma nitrite concentration (Paper A, Figure 4K), providing increased production of nitric oxide by the vessel wall and a decrease in the plasma triglyceride concentration (Paper A, Figure 4P). There was no immunosuppressive effects of dCF (Paper A, Table 1), that would be the main result of intracellular adenosine deaminase inhibition. Therefore, we assume that most of observed effects were due to the inhibition of the ecto-enzyme that degrades adenosine in extracellular space.



**Figure 10. Deoxycorymycin (dCF) treatment attenuates the development of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice.**

Representative images of OMSB staining (A-F) of brachiocephalic arteries (BCA) of ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> control mice and ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice treated with dCF, in proximal (A, D), middle (B, E) and distal (C, F) BCA. Quantitative analysis of atherosclerotic plaque (G) in BCA of ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice treated with dCF (n=5) and ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> control mice (n=6). Results are shown as mean ± SEM; \*p<0.05, \*\*p < 0.01, statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post hoc* test.

Based on: „Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition”, Kutryb-Zajac et al. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605; Appendix – Paper A.

## 9. CONCLUSIONS

The main conclusions of the studies described in the papers included into the thesis are:

1. Atherosclerotic vessels are characterized by altered pattern of ecto-enzymes involved in adenosine and adenine nucleotide metabolism that leads to decreased production and increased degradation of adenosine. In particular, there is a prominent increase in the activity of ecto-adenosine deaminase (eADA) that precedes development of atherosclerotic plaques.
2. Enhanced activity of eADA derives from activated endothelial cells and macrophages that infiltrate the vessel wall. This emphasizes the role of eADA as a marker of endothelial activation and vascular inflammation.
3. Pro-atherosclerotic factors (saturated fatty acids and pro-inflammatory cytokines) stimulate eADA activity, while anti-atherosclerotic factors (polyunsaturated fatty acids and flavonoids) inhibit this activity on the surface of endothelial cells and macrophages.
4. The surface of aortic valve is characterized by higher activity of ecto-nucleotidases and lower activity of eADA, in comparison to the vessel wall. It emphasizes a key role of these activities for aortic valve function.
5. Activities of ecto-nucleotidases that produce adenosine on the surface of valve bioprostheses depend on procedure of preparation - mild decellularization allows to preserve these activities. This may affect valve prosthesis durability and functionality.
6. The inhibition of eADA activity leads to the attenuation of pathological changes in experimental model of atherosclerosis. Modification of adenine nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzyme activities could be a promising approach for the prevention and treatment of cardiovascular pathologies.

## 10. PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES

1. Bańkowski E. Biochemia. *Podręcznik dla studentów uczelni medycznych*. Edra Urban & Partner, Wrocław 2016 (3<sup>rd</sup> ed): 299-304
2. Fimia GM, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci* 2001;**114**:1971-1972.
3. Nikiforov A, Kulikova V, Ziegler M. The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015;**50**:284–297.
4. Giancaspero TA, 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.
5. Pelley J, Goljan E. *Rapid Review Biochemistry*. Mosby Elsevier, Philadelphia 2007 (3<sup>rd</sup> ed.): 68-75
6. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972;**24**:509–581.
7. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 1976;**62**:491–503.
8. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 2014;**66**:102–192.
9. Lecka J, Molski S, Komoszynski M. Extracellular-Purine Metabolism in Blood Vessels (Part I). Extracellular-Purine Level in Blood of Patients with Abdominal Aortic Aneurysm. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 2010;**29**:647–657.
10. Yegutkin GG, Mikhailov A, Samburski SS, Jalkanen S. The detection of micromolar pericellular ATP pool on lymphocyte surface by using lymphoid ecto-adenylate kinase as intrinsic ATP sensor. *Mol Biol Cell* 2006;**17**:3378–3385.
11. Lohman AW. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett* 2014;**588**:1379–1388.
12. Joseph EK, Green PG, Levine JD. ATP release mechanisms of endothelial cell-mediated stimulus-dependent hyperalgesia. *J Pain* 2014;**15**:771–777.
13. Prosdocimo DA, Douglas DC, Romani AM, O'Neill WC, Dubyak GR. Autocrine ATP release coupled to extracellular pyrophosphate accumulation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;**296**:C828-39.
14. Lohman AW, Billaud M, Isakson BE. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc Res* 2012;**95**:269–280.
15. Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K. Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:1714-1720.
16. Erdei Z, Lőrincz R, Szabó K, Péntek A, Varga N, Likó I, Várady G, Szakács G, Orbán TI, Sarkadi B, Apáti A. Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry B Clin Cytom* 2014;**86**:299–310.
17. Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol Rep* 2014;**2**:e12034:1-14
18. Vaiyapuri S, Flora GD, Gibbins JM. Gap junctions and connexin hemichannels in the regulation of haemostasis and thrombosis. *Biochem Soc Trans* 2015;**43**:489–494.
19. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X-and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003;**64**:785–795.
20. Huang Y-J, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A National Academy of Sciences*; 2007;**104**:6436–6441.
21. Baroja-Mazo A, Barberà-Cremades M, Pelegrín P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2013;**1828**:79–93.
22. Giraud C, Manceau S, Treluyer J-M. ABC transporters in human lymphocytes: expression, activity and role, modulating factors and consequences for antiretroviral therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;**6**:571–589.
23. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic*

- Signal* 2008;**4**:1–20.
24. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 1985;**16**:433–440.
  25. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007;**64**:1471–1483.
  26. Behdad A, Sun X, Khalpey Z, Enjyoji K, Wink M, Wu Y, Usheva A, Robson SC. Vascular smooth muscle cell expression of ectonucleotidase CD39 (ENTPD1) is required for neointimal formation in mice. *Purinergic Signal* 2009;**5**:335–342.
  27. Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal* 2012;**8**:437–502.
  28. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Res* 2008;**1783**:673–694.
  29. Sebastián-Serrano Á, Diego-García L de, Martínez-Frailes C, Ávila J, Zimmermann H, Millán JL, Miras-Portugal MT, Díaz-Hernández M. Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Regulates Purinergic Transmission in the Central Nervous System During Development and Disease. *Comput Struct Biotechnol J* 2015;**13**:95–100.
  30. Yegutkin GG, Henttinen T, Jalkanen S. Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J United States*; 2001. p. 251–260.
  31. Kaniewska E, Sielicka A, Sarathchandra P, Pelikant-Malecka I, Olkowicz M, Slominska EM, Chester AH, Yacoub MH, Smolenski RT. Immunohistochemical and functional analysis of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) in pig aortic valves. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2014;**33**:305–312.
  32. Kanthi YM, Sutton NR, Pinsky DJ. CD39: Interface Between Vascular Thrombosis and Inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2014;**16**:1–8.
  33. Zernecke A, Bidzhekov K, Özyüyan B, Fraemohs L, Liehn EA, Lüscher-Firzlaff JM, Lüscher B, Schrader J, Weber C. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 2006;**113**:2120–2127.
  34. Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 1997;**79**:2–10.
  35. Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res* 2010;**316**:1284–1288.
  36. Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML, Guieu R. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2000;**28**:3198–3202.
  37. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;**25**:33–39.
  38. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 1999;**5**:216–224.
  39. Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 2005;**52**:749–758.
  40. Griffiths M, Yao YMS, Abidi F, Phillips EVS, Cass EC, Young DJ, Baldwin AS. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J* 1997;**328**:739–743.
  41. Young JD, Yao SYM, Sun L, Cass CE, Baldwin SA. Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* 2008;**38**:995–1021.
  42. Kong W, Engel K, Wang J. Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab* 2004;**5**:63–84.
  43. Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;**7**:426–434.
  44. Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 1997;**52**:283–294.
  45. Cortés A, Gracia E, Moreno E, Mallol J, Lluís C, Canela EI, Casadó V. Moonlighting



- Adenosine Deaminase: A Target Protein for Drug Development. *Med Res Rev* 2015;**35**:85–125.
46. Franco R, Pacheco R, Gatell JM, Gallart T, Lluís C. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit Rev Immunol* 2007;**27**:495–509.
  47. Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J* 1996;**9**:632–633.
  48. Martínez-Navio JM, Casanova V, Pacheco R, Naval-Macabuhay I, Climent N, García F, Gatell JM, Mallol J, Gallart T, Lluís C, Franco R. Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Leukoc Biol* 2011;**89**:127–136.
  49. Zavialov A V, Engström A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J* Portland Press Ltd; 2005;**391**:51–57.
  50. Zavialov A V, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov A V, Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2010;**88**:279–290.
  51. Ziaieian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol* Nature Research; 2016;**13**:368–378.
  52. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011;**124**:1783–1791.
  53. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**:1876–1890.
  54. El-Hamamsy I, Balachandran K, Yacoub MH, Stevens LM, Sarathchandra P, Taylor PM, Yoganathan AP, Chester AH. Endothelium-dependent regulation of the mechanical properties of aortic valve cusps. *J Am Coll Cardiol* 2009;**53**:1448–1455.
  55. Davies PF, Remuzzitt A, Gordon EJ, Dewey CF, Gimbrone MA. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro (hemodynamic forces/endothelial growth control/atherosclerosis). *Cell Biol* 1986;**83**:2114–2117.
  56. Pentikäinen MO, Öörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med* 2000;**247**:359–370.
  57. Mohty D, Pibarot P, Despres J-P, Cote C, Arsenault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Association Between Plasma LDL Particle Size, Valvular Accumulation of Oxidized LDL, and Inflammation in Patients With Aortic Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**28**:187–193.
  58. Mazzone A, Epistolato MC, Gianetti J, Castagnini M, Sassi C, Ceravolo R, Bevilacqua S, Glauber M, Biagini A, Tanganelli P. Biologic Features (Inflammation and Neoangiogenesis) and Atherosclerotic Risk Factors in Carotid Plaques and Calcified Aortic Valve Stenosis. *Am J Clin Pathol* 2006;**126**:494–502.
  59. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115–126.
  60. Sánchez PL, Santos JL, Kaski JC, Cruz I, Arribas A, Villacorta E, Cascon M, Palacios IF, Martín-Luengo C. Relation of Circulating C-Reactive Protein to Progression of Aortic Valve Stenosis. *Am J Cardiol* 2006;**97**:90–93.
  61. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* 2007;**18**:483–491.
  62. Fic P, Zakrocka I, Kurzepa J, Stepulak A. Metaloproteiny w miażdżycy naczyń krwionośnych. *Postepy Hig Med Dosw* 2011;**65**:16–27.
  63. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994;**90**:844–853.
  64. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A

- multifactorial process. *Exp Clin Cardiol* 2002;**7**:40–53.
65. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 2007;**171**:1407–1418.
  66. Freeman R V, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005;**111**:3316–3326.
  67. Gąsior Z, Stępińska J, Podolec P, Ablewska U. *Postępy w diagnostyce i leczeniu nabytych zastawkowych wad serca*. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2011:37-65.
  68. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;**17**:1410–1422.
  69. Osman L, Chester AH, Amrani M, Yacoub MH, Smolenski RT. A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification - A potential target for atorvastatin. *Circulation* 2006;**114**:I566–I572.
  70. Zimmermann H. Extracellular ATP and other nucleotides—ubiquitous triggers of intercellular messenger release. *Purinergic Signal* 2016;**12**:25–57.
  71. Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, Sala A Ia. Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2015;**21**:184–192.
  72. Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, St Hilaire C, Seldin DC, Toselli P, Lamperti E, Schreiber BM, Gavras H, Wagner DD, Ravid K, Londos C, Cooper DM, Wolff J, Calkner D Van, Muller M, Hamprecht B, Brackett LE, Daly JW, Peakman MC, Hill SJ, Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W, Yaar R, Jones MR, et al. The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest* 2006;**116**:1913–1923.
  73. Kanthi Y, Hyman M, Liao H, Baek A, Visovatti S, Sutton N, Takabe W, Ni C-W, Jo H, Pinsky D. Suppression of Atherosclerosis by CD39. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;**34**:A13
  74. Huttinger ZM, Milks MW, Nickoli MS, Aurand WL, Long LC, Wheeler DG, Dwyer KM, d'Apice AJF, Robson SC, Cowan PJ, Gumina RJ. Ectonucleotide Triphosphate Diphosphohydrolase-1 (CD39) Mediates Resistance to Occlusive Arterial Thrombus Formation after Vascular Injury in Mice. *Am J Pathol* 2012;**181**:322–333.
  75. Serrano RL, Yu W, Terkeltaub R, Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM, Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA, Shao JS, Sierra OL, Cohen R, al. et, Sutliff RL, Walp ER, El-Ali AM, Elkhatib S, Lomashvili KA, O'Neill WC, Nitschke Y, Baujat G, Botschen U, al. et, Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, al. et, Polewski MD, Johnson KA, et al. Mono-allelic and bi-allelic ENPP1 deficiency promote post-injury neointimal hyperplasia associated with increased C/EBP homologous protein expression. *Atherosclerosis* 2014;**233**:493–502.
  76. Cecil DL, Terkeltaub RA. Arterial calcification is driven by RAGE in Enpp1<sup>-/-</sup> mice. *J Vasc Res* 2011;**48**:227–235.
  77. Lomashvili KA, Narisawa S, Millán JL, O'Neill WC. Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int* 2014;**85**:1351–1356.
  78. Nitschke Y, Weissen-Plenz G, Terkeltaub R, Rutsch F. Npp1 promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice. *J Cell Mol Med* 2011;**15**:2273–2283.
  79. Maddux BA, Chang Y-N, Accili D, McGuinness OP, Youngren JF, Goldfine ID. Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2006;**290**:746-749.
  80. Pan W, Ciociola E, Saraf M, Tumurbaatar B, Tuvdendorj D, Prasad S, Chandalia M, Abate N. Metabolic consequences of ENPP1 overexpression in adipose tissue. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2011;**301**:901-911.
  81. Sheen CR, Kuss P, Narisawa S, Yadav MC, Nigro J, Wang W, Chhea TN, Sergienko EA, Kapoor K, Jackson MR, Hoylaerts MF, Pinkerton AB, O'Neill WC, Millán JL. Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res* 2015;**30**:824–836.
  82. Buchheiser A, Ebner A, Burghoff S, Ding Z, Romio M, Viethen C, Lindecke A, Kohrer K, Fischer JW, Schrader J. Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-

- deficient mice. *Cardiovasc Res* 2011;**92**:338–347.
83. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo YQ, Zerneck A, Flogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UKM, Smith ML, Sevigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding ZP, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004;**95**:814–821.
  84. Tsukamoto H, Chernogorova P, Ayata K, Gerlach U V., Rughani A, Ritchey JW, Ganesan J, Follo M, Zeiser R, Thompson LF, Idzko M. Deficiency of CD73/ecto-5'-nucleotidase in mice enhances acute graft-versus-host disease. *Blood* 2012;**119**:4554–4564.
  85. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Jaształ A, Toczek M, Zabielska M, Borkowski T, Khalpey Z, Smolenski R, Slominska E. Deletion of CD73 in mice leads to Aortic Valve Dysfunction. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2017 (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.008>
  86. Hilaire C St., Jin H, Yuting H, Yu Z, Yang D, Negro A, Liu Y, Davaine J-M, Schwartzbeck R, Chen G, Boehm M. In vivo disease modeling patient-derived iPSCs: CD73-deficiency promotes osteogenic differentiation and calcification. *Purinergic signalling Conference Book, 24-28 Jan 2016 Vancouver, Canada January 2016*;72.
  87. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000;**102**:2919–2922.
  88. Pedroza M, Schneider DJ, Karmouty-Quintana H, Coote J, Shaw S, Corrigan R, Molina JG, Alcorn JL, Galas D, Gelinias R, Blackburn MR. Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury. *PLoS One* 2011;**6**:e22667:1-13.
  89. Kanthi Y, Hyman MC, Liao H, Baek AE, Visovatti SH, Sutton NR, Goonewardena SN, Neral MK, Jo H, Pinsky DJ. Flow-dependent expression of ectonucleotide tri(di)phosphohydrolase-1 and suppression of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2015;**125**:3027–3036.
  90. Buchheiser A, Ebner A, Burghoff S, Ding Z, Romio M, Viethen C, Lindecke A, Köhler K, Fischer JW, Schrader J. Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2011;**92**:338-347.
  91. St Hilaire C, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, Carlson-Donohoe H, Lederman RJ, Chen MY, Yang D, Siegenthaler MP, Arduino C, Mancini C, Freudenthal B, Stanescu HC, Zdebek AA, Chaganti RK, Nussbaum RL, Kleta R, Gahl WA, Boehm M. NT5E mutations and arterial calcifications. *N Engl J Med* 2011;**364**:432–442.
  92. Gaspar HB, Gilmour KC, Jones AM. Severe combined immunodeficiency -molecular pathogenesis and diagnosis. *Arch Dis Child* 2001;**84**:169–173.
  93. Jalkanen J, Yegutkin GG, Hollmen M, Aalto K, Kiviniemi TO, Salomaa V, Jalkanen S, Hakovirta HH. Aberrant Circulating Levels of Purinergic Signaling Markers are Associated with Several Key Aspects of Peripheral Atherosclerosis and Thrombosis. *Circ Res* 2015;**116**:1206–1215.
  94. Lecka J, Bloch-Boguslawska E, Molski S, Komoszynski M. Extracellular Purine Metabolism in Blood Vessels (Part II): Activity of Ecto-Enzymes in Blood Vessels of Patients With Abdominal Aortic Aneurysm. *Clin Appl Thromb* 2010;**16**:650–657.
  95. Kutryb-Zajac B, Sommerfeld P, Toczek M, Zukowska P, Lango R, Rogowski J, Slominska EM, Smolenski RT. Extracellular adenine nucleotide catabolism on the calcified aortic valve surface and its clinical correlates. *6th Biennial Meeting on Heart Valve Biology & Tissue Engineering Conference Book, 10-12 Sep 2014 London, UK, 2014*: 28.
  96. Côté N, Hussein D El, Pépin A, Guauque-Olarte S, Ducharme V, Bouchard-Cannon P, Audet A, Fournier D, Gaudreault N, Derbali H. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol* 2012;**52**:1191–1202.
  97. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation* 2003;**107**:2181–2184.

98. Kutryb-Zajac B, Friebe D, Alter C, Goerltd N, Zukowska P, Jablonska P, Kaniewska E, Slominska E, Schrader J, Smolenski R. Extracellular nucleotides metabolism and resident immune cells in human calcific aortic valve. *6th Joint German-Italian Purine Club Meeting, International Conference on Purinergic Signalling, Conference Book, 23-25 July 2015 Hamburg, Germany* 2015:62–63.
99. Fung CYE, Marcus AJ, Broekman MJ, Mahaut-Smith MP. P2X1 Receptor Inhibition and Soluble CD39 Administration as Novel Approaches to Widen the Cardiovascular Therapeutic Window. *Trends Cardiovasc Med* 2009;**19**:1–5.
100. Côté N, Hussein D El, Pépin A, Bouvet C, Gilbert L-A, Audet A, Fournier D, Pibarot P, Moreau P, Mathieu P. Inhibition of ectonucleotidase with ARL67156 prevents the development of calcific aortic valve disease in warfarin-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2012;**689**:139–146.
101. Albright RA, Stabach P, Cao W, Kavanagh D, Mullen I, Braddock AA, Covo MS, Tehan M, Yang G, Cheng Z, Bouchard K, Yu Z-X, Thorn S, Wang X, Folta-Stogniew EJ, Negrete A, Sinusas AJ, Shiloach J, Zubal G, Madri JA, La Cruz EM De, Braddock DT, Moran JJ, Rutsch F, Otero JE, Stuart G, Wren C, Bain H, Stuart AG, Galletti S, et al. ENPP1-Fc prevents mortality and vascular calcifications in rodent model of generalized arterial calcification of infancy. *Nat Commun* 2015;**6**:10006.
102. MacRae NCW, Zhu D, Longley L, Patterson CS, Kommareddy S, MacRae VE. MOVAS-1 cell line: A new in vitro model of vascular calcification. *Int J Mol Med* 2011;**27**:663–668.
103. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Wiele CJ Van De, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 2004;**200**:1395–1405.
104. Barletta KE, Ley K, Mehrad B. Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;**32**.
105. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernández P, Cronstein BN. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: Findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:1440–1445.
106. Reiss AB, Carsons SE, Anwar K, Rao S, Edelman SD, Zhang H, Fernandez P, Cronstein BN, Chan ESL. Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:3675–3683.
107. Osman L, Amrani M, Ilsley C, Yacoub MH, Smolenski RT. Atorvastatin accelerates extracellular nucleotide degradation in human endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2008;**308**:209–217.
108. Yonemura A, Momiyama Y, Fayad ZA, Ayaori M, Ohmori R, Kihara T, Tanaka N, Nakaya K, Ogura M, Taniguchi H, Kusuhara M, Nagata M, Nakamura H, Tamai S, Ohsuzu F. Effect of lipid-lowering therapy with atorvastatin on atherosclerotic aortic plaques: a 2-year follow-up by noninvasive MRI. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009;**16**:222–228.
109. Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to Atorvastatin. *Circulation* 2006;**114**.
110. Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Settimo F Da, Natale G, Kastsiuchenka O, Duranti E, Viridis A, Vassalle C, Motta C La, Mugnaini L, Breschi MC, Blandizzi C, Taca M Del. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;**322**:435–442.
111. Melzig M. Inhibition of Adenosine Deaminase Activity of Aortic Endothelial Cells by Selected Flavonoids. *Planta Med* 1996;**62**:20–21.
112. Kong L, Luo C, Li X, Zhou Y, He H. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids Heal Dis* 2013;**12**:115.

## 11. STRESZCZENIE

Choroby układu sercowo-naczyniowego są jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych. U podstaw ostrej i przewlekłej dysfunkcji mięśnia sercowego leżą najczęściej takie patologie jak miażdżycza tętnic i stenoza zastawki aortalnej. Sygnalizacja purynergiczna jest ważnym mechanizmem utrzymującym homeostazę układu sercowo-naczyniowego. Uwalniane z komórek nukleotydy i produkty ich zewnątrzkomórkowej degradacji pełnią funkcje cząstek sygnałowych regulujących skurcz naczyń, agregację płytek krwi, stan zapalny, proliferację komórek i przebudowę kości. Efekty te związane są z aktywacją receptorów purynergicznymi, występujących na powierzchni komórek naczyń krwionośnych, zastawek i krwi obwodowej. Przedmiotem pracy była ocena zmian i znaczenie aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów adeninowych i adenozyiny w patologiach sercowo-naczyniowych, takich jak miażdżycza tętnic oraz choroba zastawki aortalnej.

Przeprowadzone eksperymenty wykorzystywały hodowle komórkowe, modyfikowane genetycznie myszy podatne na miażdżycę, fragmenty ludzkich i świńskich naczyń krwionośnych oraz zastawek serca. Zastosowane techniki badawcze obejmowały wysokosprawną chromatografię cieczową, spektrometrię mas, techniki histologiczne, w tym immunofluorescencyjne oraz standardowe procedury biochemiczne.

W pracy wykazano zmiany profilu aktywności ekto-enzymów metabolizujących nukleotydy adeninowe i adenozyinę na powierzchni mysich i ludzkich naczyń objętych procesem miażdżycowym. Szczególnie interesujący był wielokrotny wzrost aktywności ekto-deaminazy adenozyiny (eADA). Zmiana ta wyprzedzała pojawienie się blaszki miażdżycowej w mysim eksperymentalnym modelu miażdżycy. Zwiększona aktywność eADA w ścianie naczynia pochodziła z aktywowanych komórek śródbłonna i infiltrujących makrofagów. Wykazano, że czynniki promiażdżycowe (cytokiny prozapalne i nasycone kwasy tłuszczowe) zwiększają aktywność eADA w mysich komórkach śródbłonna i makrofagach, podczas gdy czynniki przeciwmiażdżycowe (wielonienasycone kwasy tłuszczowe i flawonoidy) zmniejszają tę aktywność. Ponadto, badania z wykorzystaniem świńskich naczyń krwionośnych i zastawek aortalnych wykazały, że powierzchnia zastawki charakteryzuje się wyższą aktywnością ekto-nukleotydu przeksztalcających nukleotydy adeninowe w adenozyinę i niższą aktywnością eADA niż w naczyniu, co podkreśla znaczenie tych przemian dla funkcji zastawki. Dalsze badania wykazały, że aktywności ekto-nukleotydu produkujących adenozyinę na powierzchni bioprotez zastawkowych są zależne od procedury ich przygotowania - łagodniejsza decelularyzacja pozwala na zachowanie tych aktywności, co może mieć wpływ na wytrzymałość i funkcjonalność protez zastawkowych. Ponadto wykazano, że zahamowanie aktywności eADA w eksperymentalnym modelu miażdżycy u myszy prowadzi do znaczącego zmniejszenia patologicznych zmian naczyniowych.

Szlaki zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów adeninowych i adenozyiny ulegają istotnym zaburzeniom w patologiach sercowo-naczyniowych, a zmiany te mogą być markerem toczącego się procesu patologicznego oraz dobrym celem terapeutycznym.

## 12. ABSTRACT

Cardiovascular disease is the major cause of mortality in developed countries. Conditions such as atherosclerosis and aortic stenosis underlay acute and chronic heart failure. Purinergic signaling is among the key mechanisms of regulation of cardiovascular system homeostasis. Nucleotides that are released from the cells and catabolites derived from their extracellular hydrolysis act as signaling molecules regulating vasoconstriction, blood platelet aggregation, inflammation, cell proliferation and bone remodeling.

The main goal of this thesis was to characterize the changes in activities of ecto-enzymes of extracellular adenine nucleotide and adenosine metabolism that regulate interaction of these compounds with purinergic receptors in cardiovascular system pathologies, such as atherosclerosis and aortic stenosis.

The experiments were performed using such experimental models as cell cultures, genetically modified mice susceptible to atherosclerosis, fragments of human and porcine blood vessels and heart valves. The methods used include high performance liquid chromatography, mass spectrometry, histology, including immunofluorescence and standard biochemical procedures.

This work demonstrated changes in adenine nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzyme activities on the surface of murine and human atherosclerotic vessels. The most significant change was observed in ecto-adenosine deaminase (eADA) activity that was prominently increased and preceded atherosclerotic plaque development in mouse model of atherosclerosis. Increased activity of eADA originated from activated endothelial cells and macrophages that infiltrated vessel wall. It has been shown that pro-atherosclerotic factors, such as pro-inflammatory cytokines and saturated fatty acids stimulated activity of eADA, while anti-atherosclerotic factors, including polyunsaturated fatty acids and flavonoids, inhibited this activity. Moreover, using porcine blood vessels and aortic valves, it was noted that that aortic valve surface expressed higher activities of ecto-nucleotidases that convert adenine nucleotides to adenosine and diminished activity of eADA in comparison to the vessel wall. It emphasizes the importance of these enzymatic activities for the valve function. Another study identified that with specific preparation procedures it is possible to preserve ecto-nucleotidase activities on the surface of aortic valve bioprostheses. This may affect valve functionality and durability. Finally, this work identified that modification in eADA activity may provide a significant therapeutic benefit. Inhibition of this activity in mouse model of atherosclerosis resulted in the substantial reduction of pathological changes in the vessels.

Metabolic pathways of extracellular adenine nucleotides and adenosine undergo important changes in cardiovascular pathologies and these changes can be useful as potential marker of pathological process and good therapeutic target.

### 13. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ LIST OF PAPERS

- A. **Kutryb-Zajac B**, Mateuszuk L, Zukowska P, Jaształ A, Zabielska MA, Toczek M, Jabłonska P, Zakrzewska A, Sitek B, Rogowski R, Lango R, Słominska EM, Chłopicki S, Smolenski RT. [Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition.](#) *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 590-605  
IF<sub>5 letni/ 5 year</sub> = 5,815  
Punktacja ministerstwa = 40,000 /  
Ministry of Science and Higher Education Score = 40,000
- B. **Kutryb-Zajac B**, Yuen AHY, Khalpey Z, Zukowska P, Słominska EM, Taylor PM, Goldstein S, Heacox AE, Lavitrano M, Chester AH, Yacoub MH, Smolenski RT. [Nucleotide catabolism on the surface of aortic valve xenografts; Effects of different decellularization strategies.](#) *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2016; 9 (2): 199-126  
IF<sub>5 letni/ 5 year</sub> = 3,059  
Punktacja ministerstwa = 30,000 /  
Ministry of Science and Higher Education Score = 30,000
- C. **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Toczek M, Zabielska M, Lipinski M, Rybakowska I, Chłopicki S, Słominska EM, Smolenski RT. [Extracellular nucleotide catabolism in aortoiliac bifurcation of atherosclerotic ApoE/LDLr double knock out mice.](#) *Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids*. 2014; 33: 323-328  
IF<sub>5 letni/ 5 year</sub> = 0,952  
Punktacja ministerstwa = 15,000 /  
Ministry of Science and Higher Education Score = 15,000
- D. **Kutryb-Zajac B**, Smolenski RT. [Rola sygnalizacji purynergicznej w stenozie aortalnej i miażdżycy tętnic/ Purinergic signaling in aortic stenosis and atherosclerosis.](#) *Postępy Biologii Komórki/ Advances in Cell Biology* 2017; 1. (praca przyjęta do publikacji)  
IF<sub>5 letni/ 5 year</sub> = 0,126  
Punktacja ministerstwa = 5,000 /  
Ministry of Science and Higher Education Score = 5,000

Łączna wartość współczynnika IF<sub>5 letniego</sub> prezentowanych prac: **9,952**  
Total IF<sub>5 year</sub> of presented papers = **9.952**

Łączna punktacja ministerstwa prezentowanych prac: **90,000**  
Total Ministry of Science and Higher Education Score: **90.000**