

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK



Ewa Kaniewska-Bednarczuk

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Ektodifosfohydrolaza trifosfonukleozydowa-1 i ekto-5'-nukleotydaza
w komórkach zastawki aortalnej serca – analiza biochemiczna |
i immunohistochemiczna**

PhD THESIS

**Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 and ecto-5'-nucleotidase
in aortic valve cells – biochemical and in immunohistochemical analysis**

GDAŃSK 2018

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Issued with the consent of
Dean of Medical Faculty
Medical University of Gdansk

Katedra i Zakład Biochemii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Department of Biochemistry
Medical University of Gdansk

Promotor / Supervisor
prof. dr hab. med. Ryszard T. Smoleński

*Serdeczne podziękowania składam
Promotorowi Panu prof. dr hab. med. Ryszardowi T. Smoleńskiemu
za opiekę naukową, okazaną pomoc, poświęcony czas,
umożliwienie poszerzania horyzontów naukowych,
cierpliwość i zaangażowanie podczas tworzenia pracy.*

*Serdecznie dziękuję
Pani dr hab. Ewie M. Słomińskiej
za cenne wskazówki i naukową inspirację.*

*Podziękowania kieruję także ku pracownikom
Katedry i Zakładu Biochemii,
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
za towarzyszenie w tej przygodzie przez ostatnie lata.*

*Dziękuję za niezłomną wiarę okazywaną mi przez mojego
męża Konrada, za okazaną cierpliwość i wsparcie
bez których praca nad ukończeniem badań
byłaby o wiele trudniejsza.*

Spis treści

1. WYKAZ SKRÓTÓW / ABBREVIATIONS.....	6
2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ / LIST OF PAPERS INCLUDED IN PHD THESIS	8
3. WSTĘP	9
3.1. Zastawka aortalna serca i jej mineralizacja	9
3.2. Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów w organizmie oraz ich rola w mechanizmach patologicznych	10
3.3. Rola ektodifosfohydrolazy trifosfonukleozydowej-1 w fizjologii i patologii	14
3.4. Rola ekto-5'-nukleotydyazy w fizjologii i patologii	14
4. CEL PRACY	16
5. WYNIKI	17
5.1. Lokalizacja i aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów adeninowych w świńskiej zastawce aortalnej	17
5.2. Immunohistochemiczna i biochemiczna analiza CD39 i CD73 w ludzkiej zastawce aortalnej oraz ich zmiany w zastawce skalkyfikowanej	19
5.3. Wpływ ox-LDL na ekspresję i aktywność CD39 i CD73 w śródbłonku zastawki aortalnej ludzkiej	25
6. WNIOSKI	28
7. INTRODUCTION.....	29
7.1. Aortic heart valve and its mineralization	29
7.2. Extracellular nucleotides breakdown in the organism and their role in	30
7.3. The role of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in	33
7.4. The role of ecto-5'-nucleotidase in physiology and pathology	33
8. THE AIM OF THE THESIS	35
9. RESULTS.....	36
9.1 Localization and activity of extracellular enzymes of adenine nucleotide transformations in the porcine aortic valve	36
9.2. Immunohistochemical and biochemical analysis of CD39 and CD73 in.....	38
the human aortic valve and their changes during valve mineralization	38
9.3. Effect of ox-LDL on the expression and activity of CD39 and CD73 in.....	44
the endothelium of the human aortic valve	44
10 CONCLUSIONS	47

11	STRESZCZENIE	48
12	ABSTRACT	49
13	PIŚMIENNICTWO / REFERENCES.....	50

1. WYKAZ SKRÓTÓW / ABBREVIATIONS

Ado	adenozyna / <i>adenosine</i>
ADP	adenozyno-5'-difosforan / <i>adenosine 5'-diphosphate</i>
AMP	adenozyno-5'-monofosforan / <i>adenosine 5'-monophosphate</i>
apoB	alipoproteina B / <i>alipoprotein B</i>
ATP	adenozyno-5'-trifosforan / <i>adenosine 5'-triphosphate</i>
CAVD	zwężenie zastawki aortalnej ze zwapnieniem / <i>calcific aortic valve disease</i>
CAVS	stwardnienie zastawki aortalnej ze zwapnieniem / <i>calcific aortic valve sclerosis</i>
Cbfa1	podjednostka alfa 1 czynnika wiążącego / <i>core-binding factor subunit alpha-1</i>
E5NT (CD73)	ekto-5'-nukleotydaza / <i>ecto-5'-nucleotidase</i>
eADA	ekto-deaminaza adenozyne / <i>ecto-adenosine deaminase</i>
EHNA	erythro-9- (2-hydroksy-3-nonylo) adenina / <i>erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine</i>
eNPP1	pirofosfodiesteraza/pirofosfoataza ektonukleotydomowa 1 / <i>Ectonucleotide phosphodiesterase/pyrophosphatase 1</i>
ENTPD1 (CD39)	ektodifosfohydrolaza trifosfonukleozydomowa-1 / <i>ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1</i>
GPI	glikozylofosfatydyloinozytol / <i>glycosylphosphatidylinositol</i>
hAVEC	ludzkie komórki śródbłonna zastawki aortalnej / <i>human aortic valve endothelial cells</i>
hAVIC	ludzkie komórki śródmiąższowe zastawki aortalnej / <i>human aortic valve interstitial cells</i>
HBSS	zbalansowany roztwór soli Hanka / <i>hank's balanced salt solution</i>
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa / <i>high-performance liquid chromatography</i>
Ino	inozyna / <i>inosine</i>
LDL	lipoproteina o małej gęstości / <i>low-density lipoprotein</i>

mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy / <i>messenger ribonucleic acid</i>
ox-LDL	utleniona lipoproteina o małej gęstości / <i>oxidized low-density lipoprotein</i>
pAVEC	świńskie komórki śródbłonna zastawki aortalnej / <i>pig aortic valve endothelial cells</i>
pAVIC	świńskie komórki śródmiąższowe zastawki aortalnej / <i>pig aortic valve interstitial cells</i>
P1	receptory purynowe typu 1 / <i>purinergic receptors type 1</i>
P2	receptory purynowe typu 2 / <i>purinergic receptors type 2</i>
P2X	receptory purynowe 2X / <i>purinergic receptors 2X</i>
P2Y	receptory purynowe 2Y / <i>purinergic receptors 2Y</i>
RANK	aktywator receptora jądrowego czynnika κB / <i>receptor activator of nuclear factor κB</i>
SEM	standardowy błąd średniej / <i>standard error of the mean</i>
VEC	komórki śródbłonna zastawki aortalnej / <i>aortic valve endothelial cells</i>
VIC	komórki śródmiąższowe zastawki aortalnej / <i>aortic valve interstitial cells</i>

2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ / LIST OF PAPERS INCLUDED IN PHD THESIS

A. **Kaniewska E**, Sielicka A, Sarathchandra P, Pelikant-Małecka I, Olkowicz M, Słomińska EM, Chester AH, Yacoub MH, Smoleński 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, vol. 33, 305-312. DOI: [10.1080/15257770.2014.885985](https://doi.org/10.1080/15257770.2014.885985)

$IF_{5\text{letni}/5\text{year}} = 0,952$

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 15

B. **Kaniewska-Bednarczuk E**, Kutryb-Zajac B, Sarathchandra P, Pelikant-Małecka I, Sielicka A, Piotrowska I, Słomińska EM, Chester AH, Yacoub MH, Smolenski RT; CD39 and CD73 in the aortic valve – biochemical and immunohistochemical analysis in valve cell populations and its changes in valve mineralization. *Cardiovascular Pathology*, 2018, vol. 36, 53-63. DOI: [10.1016/j.carpath.2018.05.008](https://doi.org/10.1016/j.carpath.2018.05.008)

$IF_{5\text{letni}/5\text{year}} = 2,349$

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 25

C. **Kaniewska-Bednarczuk E**, Mielcarek M, Chester AH, Słomińska EM, Yacoub MH, Smolenski RT; Oxidized low-density lipoproteins enhance expression and activity of CD39 and CD73 in the human aortic valve endothelium. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2016, vol. 35, 713-719. doi: [10.1080/15257770.2016.1163377](https://doi.org/10.1080/15257770.2016.1163377)

$IF_{5\text{letni}/5\text{year}} = 0,952$

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 15

Łączna wartość współczynnika $IF_{5\text{letni}} / \text{Total } IF_{5\text{year}} = 4,253$

Łączna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Total Ministry of Science and Higher Education Score = 55

3. WSTĘP

3.1. Zastawka aortalna serca i jej mineralizacja

Zastawka aortalna serca składa się z trzech płatków półksiężycowatych: tylnego, prawego i lewego, którym na ścianie aorty odpowiadają uwypuklenia tworząc razem trzy zatoki aorty. Histologicznie zastawka aortalna składa się z trzech warstw: skierowanej ku komorze serca, środkowej i warstwie zwróconej ku światłu aorty¹ z wyraźnie zaznaczonymi warstwami zastawkowych komórek śródbłonna (*ang. valve endothelial cells*, VEC) i komórek śródmiąższowych (*ang. valve intrestital cells*, VIC)². Warstwa komórek śródbłonna pokrywa powierzchnię aortalną i komorową zastawki, natomiast warstwa środkowa zawiera komórki śródmiąższowe i macierz pozakomórkową³. Wykazano, że różnicowanie komórek śródmiąższowych do komórek podobnych do miofibroblastów nasila zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej. Z kolei ich różnicowanie w kierunku osteoblastów jest jedną z przyczyn zwapnienia zastawki aortalnej^{4, 5}. Różnicowanie komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej jest wynikiem ich patologicznej stymulacji przez cytokiny. Uważa się, że ważną rolę w procesie zwapnienia zastawki odgrywają także nukleotydy zewnątrzkomórkowe⁴.

Stenoza zastawki aortalnej serca (CAVD) jest jedną z najczęstszych patologii serca w starzejącej się populacji Europy Zachodniej i Ameryki Północnej⁶. U około 30% osób powyżej 60 roku życia występuje zwapnienie zastawki aortalnej serca (*ang. calcific aortic valve sclerosis*, CAVS), która jest wczesną postacią CAVD. Wiele czynników ryzyka, w tym płeć, wiek, hipercholesterolemia, nadciśnienie czy palenie tytoniu, przyczynia się do rozwoju choroby⁷. Choroba postępuje w kilku etapach: od początkowych zmian w biologii komórek zastawki do stanu zwapnienia powodującego niedrożność wypływu krwi z lewej komory serca. CAVS obserwowane jako zwapnienie lub zgrubienie listków z zachowaną jeszcze prawidłową funkcją zastawki jest pierwszą wykrywalną zmianą makroskopową, ale wiadomo, że początki procesu chorobowego występują znacznie wcześniej. Pierwsze patologiczne procesy zaangażowane w rozwój CAVD są związane z upośledzoną regulacyjną i metaboliczną funkcją komórek śródbłonna i osteoprogenitorów uczestniczących w mineralizacji zastawki aortalnej^{4,8}. Histopatologiczna analiza eksplantowanych zastawek aortalnych wskazuje, że w CAVD często obserwuje się nie tylko zwapnienie tkanki, ale również infiltrację i akumulację lipidów oraz stan zapalny tkanki. Procesy patologiczne mogą być zainicjowane poprzez aktywację komórek

śródbłonka zastawki pod wpływem turbulentnego przepływu krwi, przedłużonej ekspozycji na czynniki prozapalne i prostenotyczne (np. cytokiny, zewnątrzkomórkowe nukleotydy, lipoproteiny niskiej gęstości - LDL)⁹. Akumulacja i utlenianie LDL inicjują miejscowy proces zapalny w zastawce aortalnej poprzez infiltrację monocytów i limfocytów T. Komórki piankowate powstałe z makrofagów upakowanych utlenionym LDL (ox-LDL) wywołują zapalenie i inicjują przegrupowanie macierzy pozakomórkowej za pośrednictwem metaloproteinaz, co prowadzi do zwłóknienia zastawki. ox-LDL są czynnikiem prozapalnym, powstają na skutek spontanicznego, pozakomórkowego, chemicznego utleniania LDL¹⁰. Wykazano związek między obecnością ox-LDL, a wyższą ekspresją cząsteczek adhezyjnych, czynników wzrostu, chemoatraktantów i wazoaktywnych cytokin w komórkach śródbłonka¹¹.

Nukleotydy zewnątrzkomórkowe są zaangażowane w regulację wyżej wymienionych procesów patologicznych w zastawce serca na wielu poziomach: od regulacji procesów zapalnych na powierzchni zastawki, poprzez wpływ na metaboliczną funkcję komórki aż po wpływ na zmiany fenotypowe komórek śródmiąższowych. W związku z tym badania nad obecnością i aktywnością enzymów regulujących zewnątrzkomórkowe stężenie nukleotydów ma duże znaczenie dla zrozumienia roli tych związków w mechanizmach prowadzących do stenozы zastawki aortalnej.

3.2. Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów w organizmie oraz ich rola w mechanizmach patologicznych

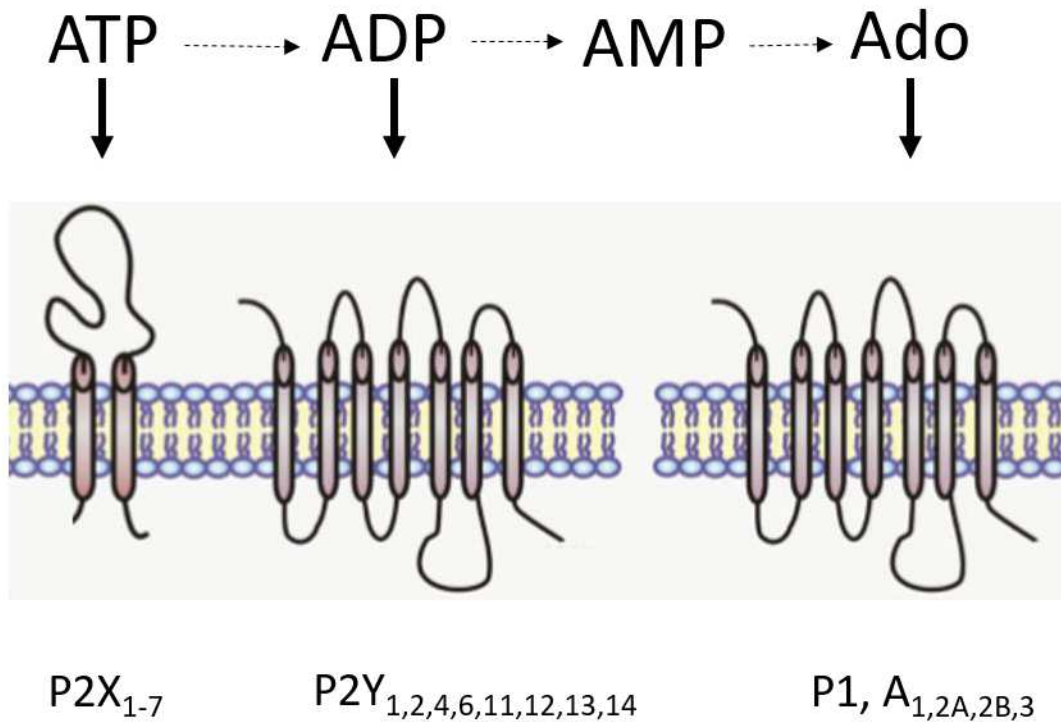
Adenozyno-5'-trifosforan (ATP) oraz inne nukleotydy i nukleozydy występują we wszystkich tkankach, w których pełnią kluczowe funkcje nie tylko wewnątrzkomórkowo, ale są również zaangażowane w mechanizmy pozakomórkowe. Wewnątrzkomórkowy ATP jest głównie wykorzystywany w procesach wymagających energii, takich jak aktywny transport, ruchliwość i syntezy. Zewnątrzkomórkowy ATP natomiast, jest uważany za ważną cząsteczkę sygnałową. ATP jest neuroprzekaźnikiem w ośrodkowym układzie nerwowym; ma wpływ na niezależną od sygnalizacji adrenergicznej czy cholinergiczej regulację kurczliwości mięśni gładkich¹²; wywołuje inotropowe, chronotropowe i arytmogenne efekty w mięśniu sercowym¹³; reguluje odpowiedź komórek nabłonkowych¹⁴; odpowiedź immunologiczną i kontrolę transportu leukocytów między krwią i tkankami¹⁵ oraz aktywację i agregację płytek krwi w miejscach urazu naczyniowego¹⁶. Oprócz powyższej roli, zewnątrzkomórkowe puryny i pirymidyny pełną

ważną funkcję w regulacji proliferacji i wzrostu komórek¹⁷, indukcji apoptozy¹⁸, tworzeniu blaszki miażdżycowej¹⁹, gojeniu się ran i tworzeniu kości²⁰.

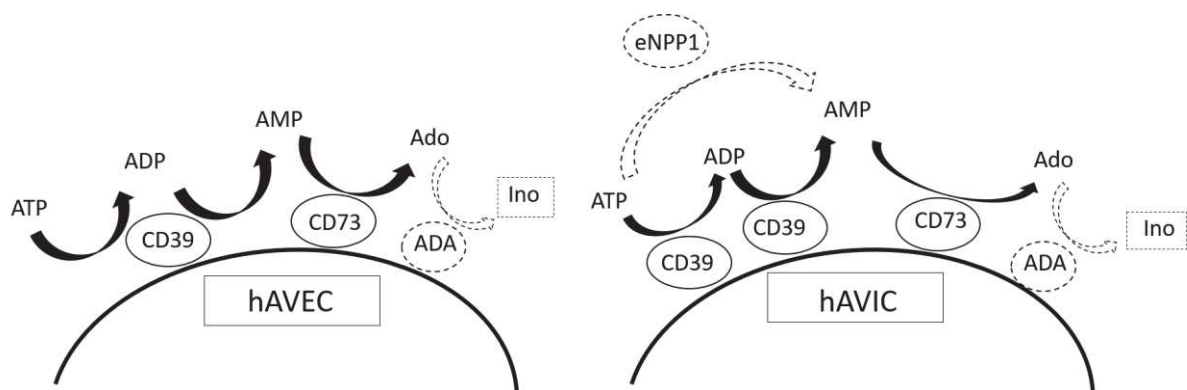
Nukleotydy zewnątrzkomórkowe są uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej z różnych typów komórek, w tym z komórek śródbłonna czy komórek krwi na drodze egzocytozy i poprzez kanały jonowe²¹. Uwalnianie to następuje pod wpływem takich czynników jak: siły fizyczne naprężenia ścinającego, hipoksja, hiperglikemia, obecność aktywatorów płytek krwi i czynników prozapalnych²¹. Uwolnione do przestrzeni międzykomórkowej nukleotydy aktywują receptory purynergiczne P2, obecne na powierzchni wszystkich rodzajów komórek, nawet erytrocytów²². Uwolnione w stanach zapalnych nukleotydy, takie jak ATP, uczestniczą w dalszym nasileniu odpowiedzi immunologicznej głównie poprzez receptory P2X7, P2Y2, P2Y4, P2Y11 i P2Y14²². Natomiast stymulacja receptorów P2X4, P2X7 lub P2Y6 obecnych na powierzchni komórek śródbłonna wpływa na aktywację tych komórek (RYCINA1). Stymulacja receptorów nukleotydowych może odgrywać kluczową rolę w rozwoju stenozy zastawki aortalnej serca (*ang. calcific aortic valve disease, CAVD*)²³. ATP poprzez receptory P2X może indukować różnicowanie komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej w kierunku komórek osteoblastopodobnych, podczas gdy adenozyzna (Ado), produkt hydrolizy nukleotydów adeninowych, przeciwdziała temu procesowi²⁴. Adenozyzna jest również cząsteczką sygnałową, która przez receptory purynergiczne P1 obniża napięcie ściany naczyń, hamuje agregację płytek krwi, reguluje stan zapalny²⁵, stymuluje transport zwrotny cholesterolu²⁶ i hamuje tworzenie komórek piankowatych²⁷. Ado uwalniana jest z komórek lub generowana z nukleotydów dzięki aktywności ektoenzymów na powierzchni komórki. Ado wiąże się do czterech różnych receptorów adenozyznowych sprzężonych z białkiem G. W płytkach krwi wiązanie do receptorów A2 (A2A lub A2B) prowadzi do wyższej zawartości wewnątrzkomórkowego cyklicznego monofosforanu adenozyzny, hamując agregację²⁸.

Delikatna równowaga pomiędzy pozakomórkowym stężeniem ATP i adenozyzny jest kluczowym elementem w regulacji procesów pro- i antystenotycznych w obrębie zastawki aortalnej. Na powierzchni komórek równowaga ta jest regulowana poprzez uwalnianie nukleotydów oraz ich hydrolizę²⁹. W układzie sercowo-naczyniowym przemiany zewnątrzkomórkowych nukleotydów odbywają się za pośrednictwem kaskady ektoenzymów znajdujących się na powierzchni komórki, w tym ektodifosfohydrolazy trifosfonukleozydowej-1 (ENTPD1, CD39), ekto-5'-nukleotyduazy (E5NT, CD73) oraz ekto-deaminazy adenozyzny (eADA)³¹. Dodatkowo, w ludzkich komórkach obecne są

pirofosfodiesterazy/pirofosfatazy ektonukleotydydowe 1 (eNPP1) odgrywające także rolę w metabolizmie nukleotydów^{23,30}. Sugerowany mechanizm przemian zewnątrzkomórkowych nukleotydów przedstawiono na RYCINIE 2³⁰.



RYCINA 1 Zewnątrzkomórkowe nukleotydy aktywują receptory purynergiczne P2X oraz P2Y znajdujące się w błonie komórkowej, a powstała w wyniku działania szlaku katabolizmu zewnątrzkomórkowych nukleotydów adenozyzna oddziałuje na selektywne wobec nukleozydów receptory purynergiczne P1²⁸.



RYCINA 2. Przemiany nukleotydów na powierzchni ludzkich, aortalnych komórek śródbłonna (hAVEC) i śródmiaższowych (hAVIC). Szlak hydrolizy nukleotydów obejmuje cztery ektoenzymy: eNPP1, E-NTPDazę (CD39) i ekto-5'-nukleotydzę (CD73) oraz ekto-deaminazę adenozyzny (eADA). CD39 hydrolizuje ATP do ADP a następnie do AMP, CD73

następnie hydrolizuje AMP do Ado, a eADA hydrolizuje Ado do inozyny (Ino). Dodatkowo w ludzkim organizmie eNPP1 hydrolizuje ATP do AMP^{23,30}.

3.3. Rola ektodifosfohydrolazy trifosfonukleozydowej-1 w fizjologii i patologii

Ektodifosfohydrolaza trifosfonukleozydowa-1 (CD39) jest białkiem transbłonowym obecnym w różnych typach komórek, między innymi w komórkach śródbłonna, kardiomiocytach czy komórkach układu immunologicznego³¹. CD39 sekwencyjnie hydrolizuje trifosforany nukleozydów przez difosforany nukleozydów do monofosforanów nukleozydów (na przykład ATP do ADP a następnie do AMP) w obecności Mg^{2+} i Ca^{+2} ³².

CD39 staje się aktywna katalitycznie po zakotwiczeniu na powierzchni komórki, a reakcje glikozylacji tego białka wydają się kluczowe w procesie jego aktywacji³³. Ponadto białko znajdując się już na powierzchni komórki ulega ograniczonej proteolizie, która zwiększa jego aktywność enzymatyczną³⁴.

CD39 jest główną ektonukleotydazą w układzie naczyniowym³⁵. CD39 poprzez hydrolizę ATP i ADP wpływa na ograniczenie aktywacji płytek krwi, która jest zależna od parakrynnego uwalniania ADP i aktywacji omówionych wcześniej, specyficznych receptorów purynergicznych³⁶. Uważa się, że utrata aktywności CD39 odgrywa kluczową rolę w uszkodzeniu naczyń krwionośnych, zakrzepicy i odrzuceniu narządów po ksenotransplantacji³⁷.

Na obniżoną obecność i aktywność tego białka może mieć wpływ m.in. hipoksja, stres oksydacyjny i obecność prozapalnych cytokin. W warunkach stresu oksydacyjnego aktywność CD39 na powierzchni komórki maleje. Podobny wpływ na to białko ma akumulacja nienasyconych kwasów tłuszczowych³⁶. Udowodniono ponadto, że hamowanie ekspresji i aktywności CD39 w ludzkich komórkach śródbłonna może prowadzić do ich zwiększonej odporności na uszkodzenia DNA³⁸.

3.4. Rola ekto-5'-nukleotydazy w fizjologii i patologii

Ekto-5'-nukleotydaza (CD73, E5NT) jest glikoproteiną zakotwiczoną za pomocą glikozylofosfatydylinozytolu (GPI) w błonie komórkowej³⁹. Jest obecna na powierzchni wielu komórek, w tym w całym układzie krwionośnym⁴⁰. Jednak niektóre typy komórek, takie jak fibroblasty, charakteryzują się niską zawartością i aktywnością CD73⁴¹. CD73 hydrolizuje zewnątrzkomórkowe monofosforany nukleozydów do nukleozydów (na przykład AMP do adenozyne) aktywując przedstawione wcześniej receptory P1 wywołując efekt antyagregacyjny i przeciwzapalny⁴².

Podstawową funkcją przypisywaną śródbłonkowemu CD73 jest katabolizm zewnątrzkomórkowych monofosforowych nukleozydów⁴². Niewiele wiadomo na temat regulacji śródbłonkowej ekspresji CD73 i udziału tego białka w regulacji przepuszczalności śródbłonka. Wykazano, że aktywacja receptorów adenozyiny (np. za pośrednictwem adenozyiny uwolnionej na skutek działania CD73) zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, a jego podwyższona zawartość w śródbłonku sprzyja zachowaniu funkcji barierowej śródbłonka⁴³. Istnieją także doniesienia, że ekspresja CD73 jest regulowana przez niedotlenienie tkanek⁴⁴. Ponadto aktywność CD73 w komórkach śródbłonka może być regulowana poprzez obecność czynników prozapalnych. Wyższa aktywność CD73, a w konsekwencji wyższe stężenie zewnątrzkomórkowej adenozyiny (działającej jako czynnik przeciwzapalny) mają wpływ na odpowiedź immunologiczną organizmu. Dobrze opisana w piśmiennictwie jest rola CD73 w regulowaniu funkcji wielu typów komórek odpornościowych, w tym: limfocytów, neutrofilii, monocytów/makrofagów, komórek dendrytycznych i komórek śródbłonka²³.

Aktywność CD73 nie tylko różni się pomiędzy typami komórek, ale także pomiędzy ich pochodzeniem. Badania wykazały wyższą aktywność CD73 w ludzkich komórkach śródbłonka w porównaniu do świńskich komórek śródbłonka, co może mieć istotny znaczenie w przypadku ksenotransplantacji⁴⁵.

Mutacja genu E5NT została stwierdzona u osób z trzech rodzin z objawami zwapnienia naczyń krwionośnych, a podobne mechanizmy i czynniki ryzyka są zaangażowane w rozwój wielu patologii układu krwionośnego⁴⁰. Na podstawie przedstawionych danych z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że istnieje ważny związek między obecnością i aktywnością CD39 i CD73 w komórkach zastawki aortalnej serca a mechanizmem rozwoju CAVD.

4. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była analiza lokalizacji i aktywności CD39 oraz CD73 w zastawce aortalnej serca, a także zbadanie zmian zachodzących w procesie kalcyfikacji.

Szczegółowe cele obejmowały:

1. Analizę lokalizacji CD39 oraz CD73 w świńskiej zastawce aortalnej
2. Analizę aktywności enzymatycznej CD39 i CD73 w komórkach śródbłonna oraz komórkach pierwotnych śródmiąższowych wyizolowanych ze świńskiej zastawki aortalnej.
3. Analizę lokalizacji CD39 oraz CD73 w ludzkiej, niezmienionej patologicznie zastawce aortalnej oraz w zastawce skalcyfikowanej.
4. Analiza lokalizacji CD39 i CD73 w komórkach pierwotnych śródbłonna oraz komórkach pierwotnych śródmiąższowych wyizolowanych z ludzkiej, niezmienionej patologicznie zastawki aortalnej.
5. Analizę aktywności enzymatycznej CD39 i CD73 w komórkach pierwotnych śródbłonna oraz komórkach pierwotnych śródmiąższowych wyizolowanych z ludzkiej, niezmienionej patologicznie zastawki aortalnej.
6. Zbadanie wpływu utlenionego LDL na aktywność CD39 oraz CD73, w komórkach pierwotnych śródbłonna wyizolowanych z ludzkiej, niezmienione patologicznie zastawki aortalnej serca.

5. WYNIKI

5.1. Lokalizacja i aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów adeninowych w świńskiej zastawce aortalnej

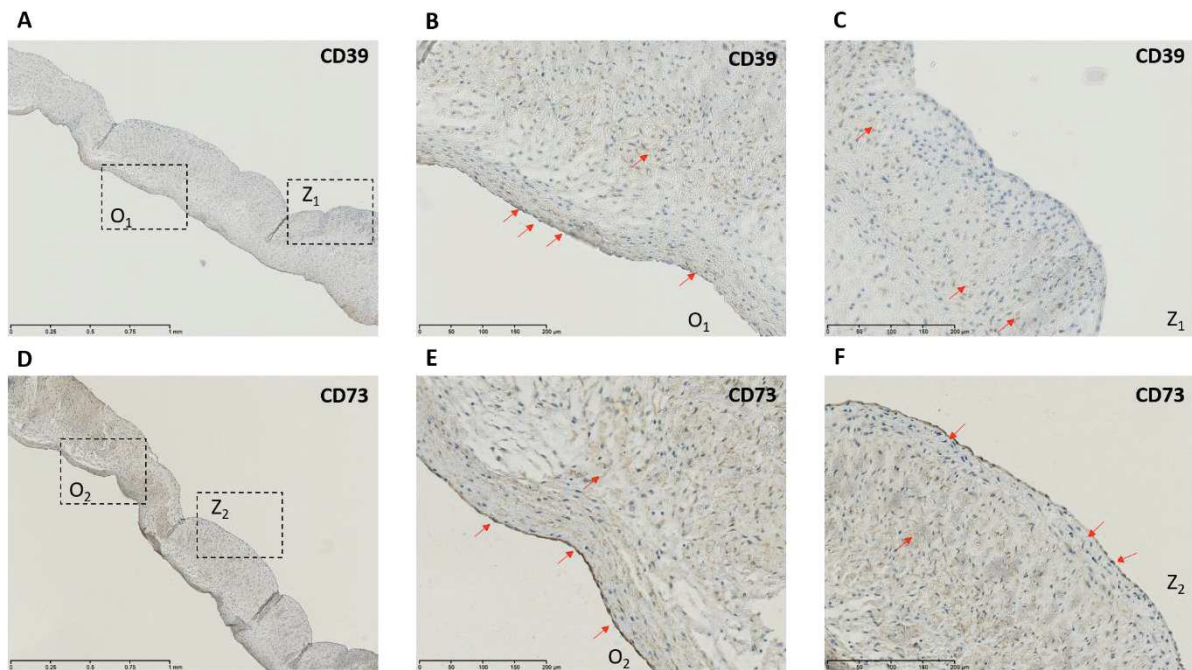
Udział CD39 oraz CD73 w przemianach zewnątrzkomórkowych nukleotydów w świńskiej zastawce aortalnej został oceniony na podstawie analizy immunohistochemicznej. Badania immunohistochemiczne przeprowadzono z wykorzystaniem zastawek aortalnych świń domowych. Przygotowane skrawki tkanek wycięte z bloków parafinowych inkubowano z pierwszorzędowym, a następnie drugorzędowym przeciwciałem przeciwko CD39 lub CD73. Obecność CD39 i CD73 zaobserwowano w dwóch typach komórek: śródbłonkowych i śródmiąższowych zastawki. Obecność CD39 w komórkach śródbłonka była obserwowana po stronie zwróconej ku światłu aorty, podczas gdy rozkład CD73 w komórkach śródbłonka był podobny po obu stronach zastawki. Obecność CD39 i CD73 w komórkach śródmiąższowych wyglądała podobnie (RYCINA 3).

Analizę aktywności CD39 i CD73 przeprowadzono na wyizolowanych z aortalnych zastawek świńskich dwóch typów komórek pierwotnych: śródbłonka i śródmiąższowych (PRACA A). W celu sprawdzenia efektywności izolacji po drugim pasażu komórki sprawdzono metodą cytometrii przepływowej weryfikując obecność markerów komórek śródbłonkowych i śródmiąższowych: CD31 oraz CD90.

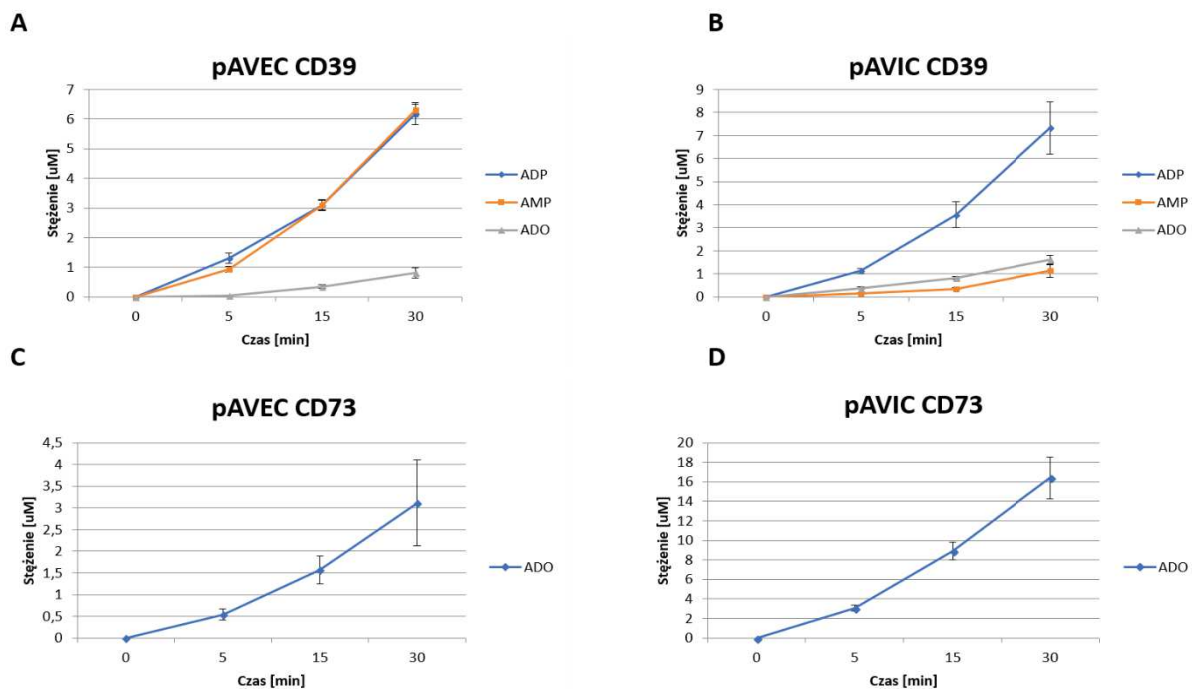
Wyizolowane komórki inkubowano z AMP i ATP (niezależnie) i dodatkiem inhibitora deaminazy adenozyiny (EHNA). W środowisku inkubacyjnym komórek mierzono stężenie ATP, ADP, AMP i adenozyiny z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Badania wykazały, że w komórkach śródbłonka i śródmiąższowych zastawki aortalnej oba enzymy mają wysoką aktywność. Porównując aktywność CD39 ($[ADP] + 2 \times ([AMP] + [Ado])$) pomiędzy tymi dwoma typami komórek zaobserwowano wyższą aktywność w komórkach śródbłonka (pAVEC) niż w komórkach śródmiąższowych (pAVIC), (RYCINA 4A i 4B). Porównując aktywność CD73 na podstawie przyrostu [Ado] wykazano większą aktywność CD73 w komórkach pAVIC w stosunku do pAVEC (RYCINA 4C i 4D). Akumulacja AMP w trakcie katabolizmu ATP przez pAVEC (RYCINA 4A i 4B) jest spowodowana różnicą w aktywności CD73.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wskazanie, iż badane enzymy są obecne we wszystkich warstwach zastawki aortalnej, a ich aktywność jest wysoka w stosunku to

innych typów komórek takich jak np. fibroblasty⁴¹. Sugeruje to prawdopodobny, negatywny wpływ braku równowagi (a w konsekwencji wyższe stężenie prozapalnego ATP, w stosunku do obniżonego stężenia przeciwzapalnej adenozyiny) w ich pracy na zastawkę aortalną serca. Badania te wraz z wcześniejszymi doniesieniami na temat roli ATP i adenozyiny w stanach zapalnych⁴⁶ stanowiły podstawę do kolejnego etapu badań dotyczących roli CD39 i CD73 w stanach patologicznych takich jak zwapnienie zastawki aortalnej (PRACA B i C), które były prowadzone na materiale pochodzenia ludzkiego.



RYCINA 3. Przykładowe zdjęcia z analizy immunohistochemicznej CD39 i CD73 w świńskiej zastawce aortalnej. (A) Obecność CD39 przy małym powiększeniu w świńskiej zastawce aortalnej. (B) Obecność CD39 po stronie komorowej świńskiej zastawki aortalnej. (C) Obecność CD39 po stronie aortalnej świńskiej zastawki aortalnej. (D) Obecność CD73 przy małym powiększeniu w świńskiej zastawce aortalnej. (E) Obecność CD73 po stronie komorowej świńskiej zastawki aortalnej. (F) Obecność CD73 po stronie aortalnej świńskiej zastawki aortalnej. Na podstawie Fig. 1 i 2 z PRACY A.



RYCINA 4. Zewnątrzkomórkowe przemiany ATP i AMP w świńskich komórkach śródbłonna (pAVEC) i śródmiąższowych (pAVIC) z zastawki aortalnej w czasie 30 minutowych inkubacji. (A) Przemiany ATP w pAVEC. (B) Przemiany ATP w pAVIC. (C) Przemiany AMP w pAVEC. (D) Przemiany AMP w pAVIC. Wynik przedstawiono jako średnią \pm SD (n=3). Na podstawie Fig. 3 i 4 z PRACY A.

5.2. Immunohistochemiczna i biochemiczna analiza CD39 i CD73 w ludzkiej zastawce aortalnej oraz ich zmiany w zastawce skalcyfikowanej

Stenoza zastawki aortalnej serca (CAVD) jest patologią obejmującą stan zapalny, zwłóknienie i zwapnienie płatków zastawki aortalnej. Na wszystkie te procesy mogą wpływać zmiany w szlaku zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów, które zależą od aktywności ektonukleotydaz, głównie ektodifosfohydrolazy trifosfonukleozydowej-1 (CD39) i ekto-5'nukleotydyazy (CD73). Aby określić rolę CD39 i CD73 w procesie kalcyfikacji zastawki aortalnej za pomocą immunohistochemii zbadano lokalizację białek CD39 i CD73 w niezmiennych patologicznie i skalcyfikowanych ludzkich zastawkach aortalnych.

W niezmiennych zastawkach zaobserwowano obecność białek CD39 i CD73 zarówno w komórkach śródbłonna, jak i śródmiąższowych, a ich ilość była porównywalna w obu typach komórek. Obecność białek zaobserwowano po obu stronach zastawki oraz w warstwie środkowej zastawki nie zmienionej patologicznie. Natomiast w zastawkach patologicznych (skalcyfikowanych) ilość CD39 i CD73 była znacznie obniżona w obu typach komórek (RYCINA 5,6). Wyjątek stanowiły regiony

zastawki aortalnej zmienione patologicznie (z widoczną kalcyfikacją tkanki), w których obecność CD73 była porównywalna z ilością w zastawce niezmienionej (RYCINA 7). Scharakteryzowano dokładną lokalizację CD39 i CD73 w komórkach pierwotnych śródbłonna i śródmiaższowych wyizolowanych z ludzkiej, niemiennej patologicznie zastawki aortalnej. W trakcie analiz komórek pierwotnych zaobserwowano obecność CD39 i CD73 głównie w błonie komórkowej hAVEC, natomiast w hAVIC białka te występowały również wewnątrzkomórkowo (w cytoplazmie) (RYCINA 8,9).

Przeprowadzona analiza aktywności NTPDaz i E5NT w homogenatach zastawki aortalnej była możliwa za pomocą oznaczenia stężeń powstających produktów

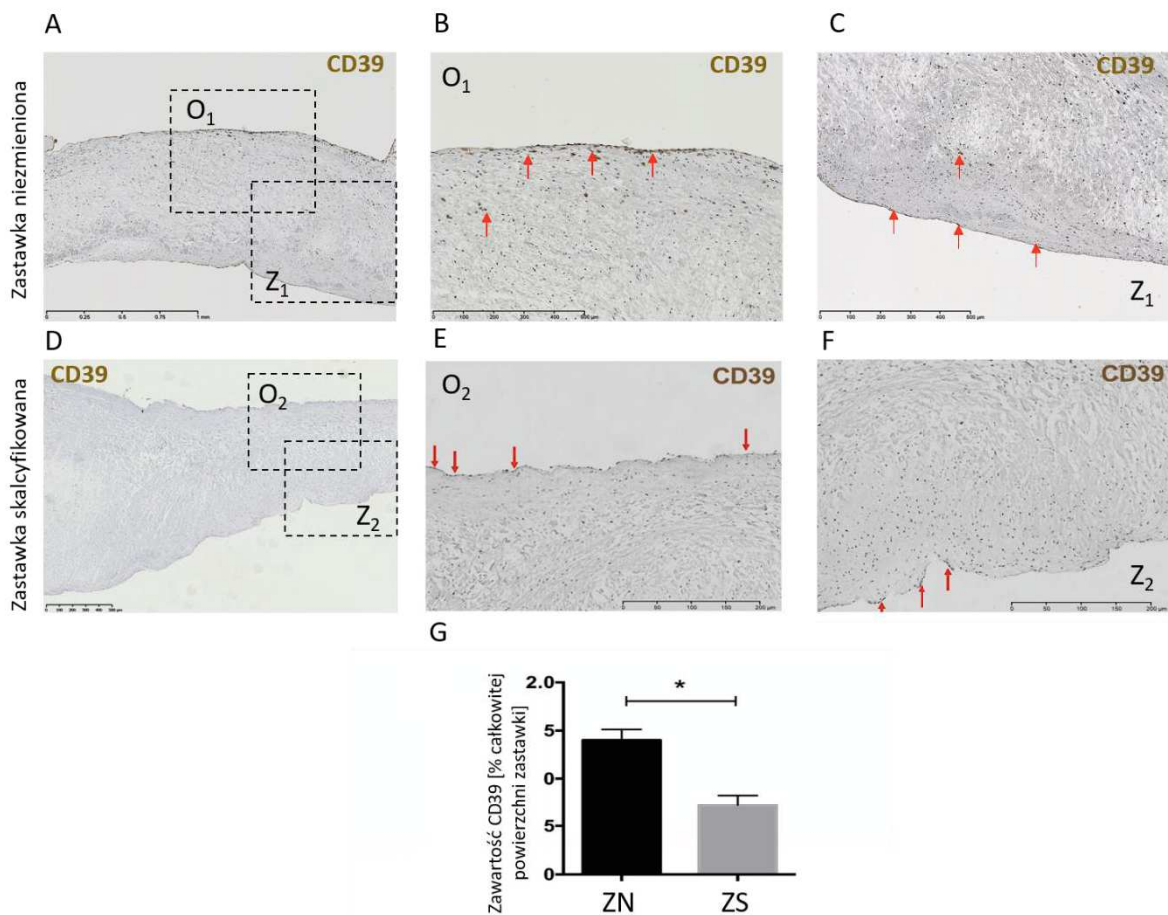
z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej. Zaobserwowane zmiany w obecności badanych białek w zastawce patologicznej były skorelowane z aktywnością ektoenzymów w homogenatach zastawek. Aktywność NTPDazowa była zmniejszona o 35%, a aktywność E5NT o 50% w zmienionej patologicznie zastawce (PRACA B).

Mierzono również szybkość pozakomórkowych przemian nukleotydów adeninowych na powierzchni izolowanych komórek pierwotnych śródbłonna zastawki aortalnej (hAVEC) i komórek pierwotnych śródmiaższowych (hAVIC) (inkubację przeprowadzono z inhibitorem EHNA oraz substratami ATP i AMP identycznie jak opisano w podpunkcie 5.2). Przemiany zewnątrzkomórkowego ATP i AMP w izolowanych hAVEC i hAVIC były porównywalne (RYCINA 10), (PRACA B).

Obecność ektonukleotydz w zastawkach, a zwłaszcza w komórkach śródmiaższowych zastawki aortalnej, podkreśla ważną lokalną rolę metabolizmu nukleotydów zewnątrzkomórkowych w zastawkach aortalnych. Zmiany w lokalnym rozkładzie białek, a tym samym aktywności CD39 i CD73 wpływają na wyższy poziom czynnika prozapalnego jakim jest ATP i ADP, a jednocześnie obniżają ilość przeciwzapalnej adenozyiny w zastawkach skalcyfikowanych. W patologicznych warunkach jakimi jest m. in. miażdżycy czy zwapnienie zastawki aortalnej obserwuje się wyższą aktywność ekto-deaminazy adenozyiny (eADA), co dodatkowo wpływa na obniżenie poziomu adenozyiny⁴⁷. Wykazano, że zewnątrzkomórkowy ATP jest zdolny do indukowania różnicowania ludzkich komórek śródmiaższowych w kierunku komórek osteoblastopodobnych. W opisanych efektach pośredniczą receptory purynergiczne P2Y powiązane ze szlakiem fosfolipazy C. W konsekwencji, obserwuje

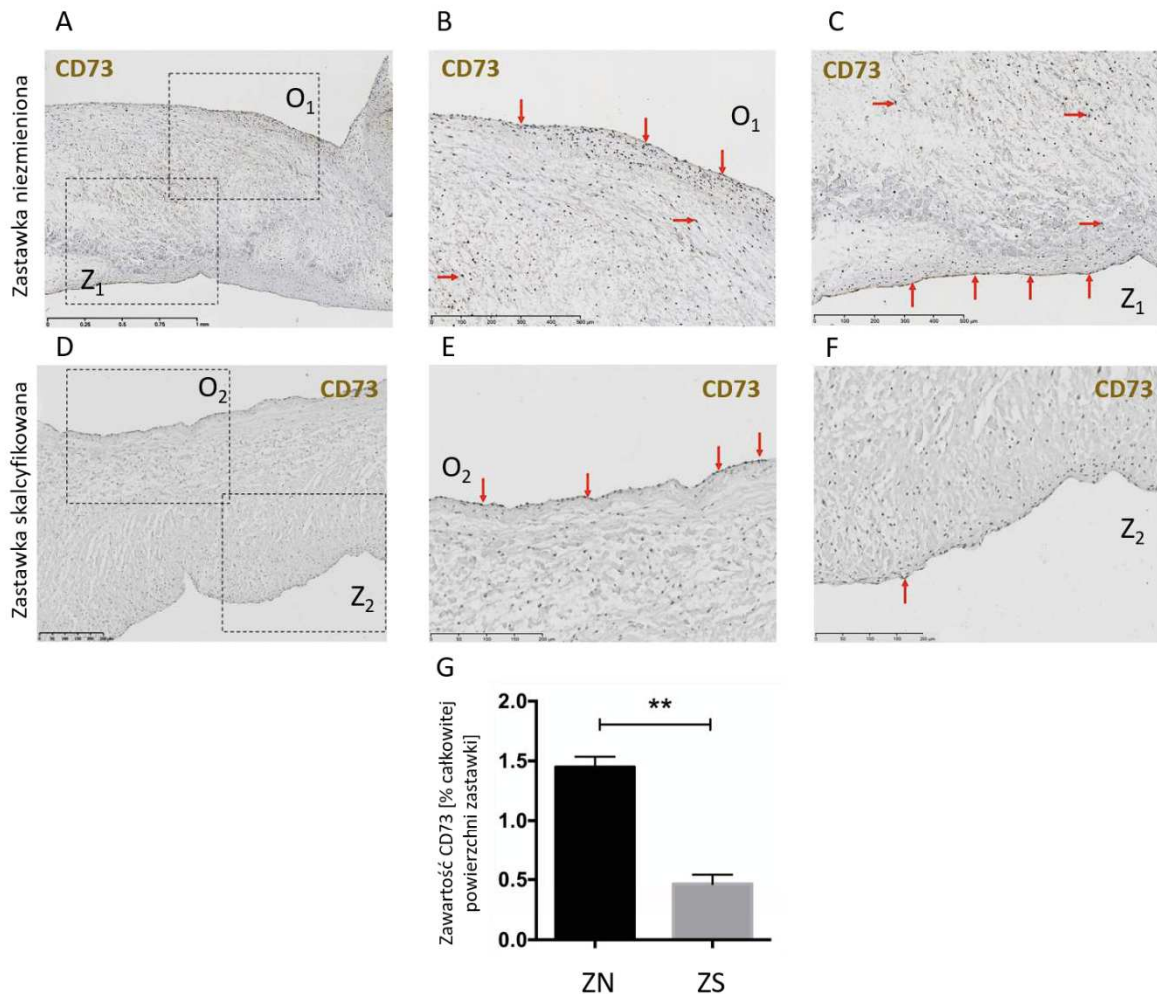
się wyższy poziom wewnątrzkomórkowego wapnia co może regulować i aktywować czynniki transkrypcyjne, takie jak: Cbfa1 (ang. *core binding factor 1*) czy RANK (ang. *receptor activator of nuclear factor κ B*). Ekspresję obu czynników transkrypcyjnych wskazano w CAVD⁴⁶. Nasze wcześniejsze badania, wskazały że obecność adenozyiny zmniejszała aktywność zasadową fosfataza (marker różnicowania osteoblastów)

w komórkach śródmięszowych podczas inkubacji z czynnikiem osteogennym⁴⁶. Powyższe wyniki wraz z danymi opisanymi w literaturze sugerują potencjalną rolę CD39 i CD73 w mechanizmach patologicznych zaangażowanych w rozwój CAVD.

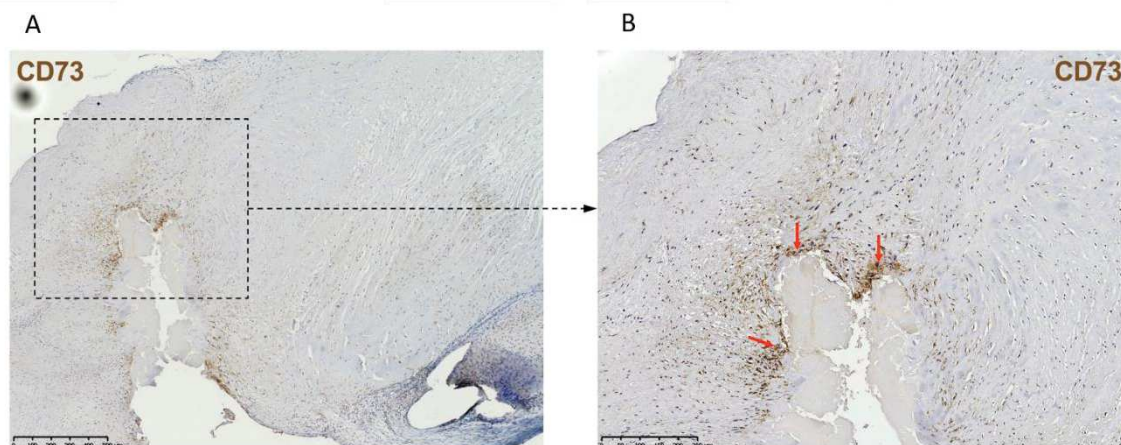


RYCINA 5. Analiza immunohistochemiczna CD39 w ludzkiej zastawce aortalnej. (A) Obecność CD39 przy małym powiększeniu w niezmiennionej patologicznie zastawce aortalnej, (B) Obecność CD39 po stronie komorowej niezmiennionej patologicznie zastawce aortalnej, (C) Obecność CD39 po stronie aortalnej niezmiennionej patologicznie zastawce aortalnej, (D) Obecność CD39 przy małym powiększeniu w skalcyfikowanej ludzkiej zastawce aortalnej, (E) Obecność CD39 po stronie komorowej skalcyfikowanej ludzkiej zastawki aortalnej. (F) Obecność CD39 po stronie aortalnej skalcyfikowanej ludzkiej zastawki aortalnej. (G) Porównanie oszacowanej densytometrycznie zawartości CD39 w zastawce

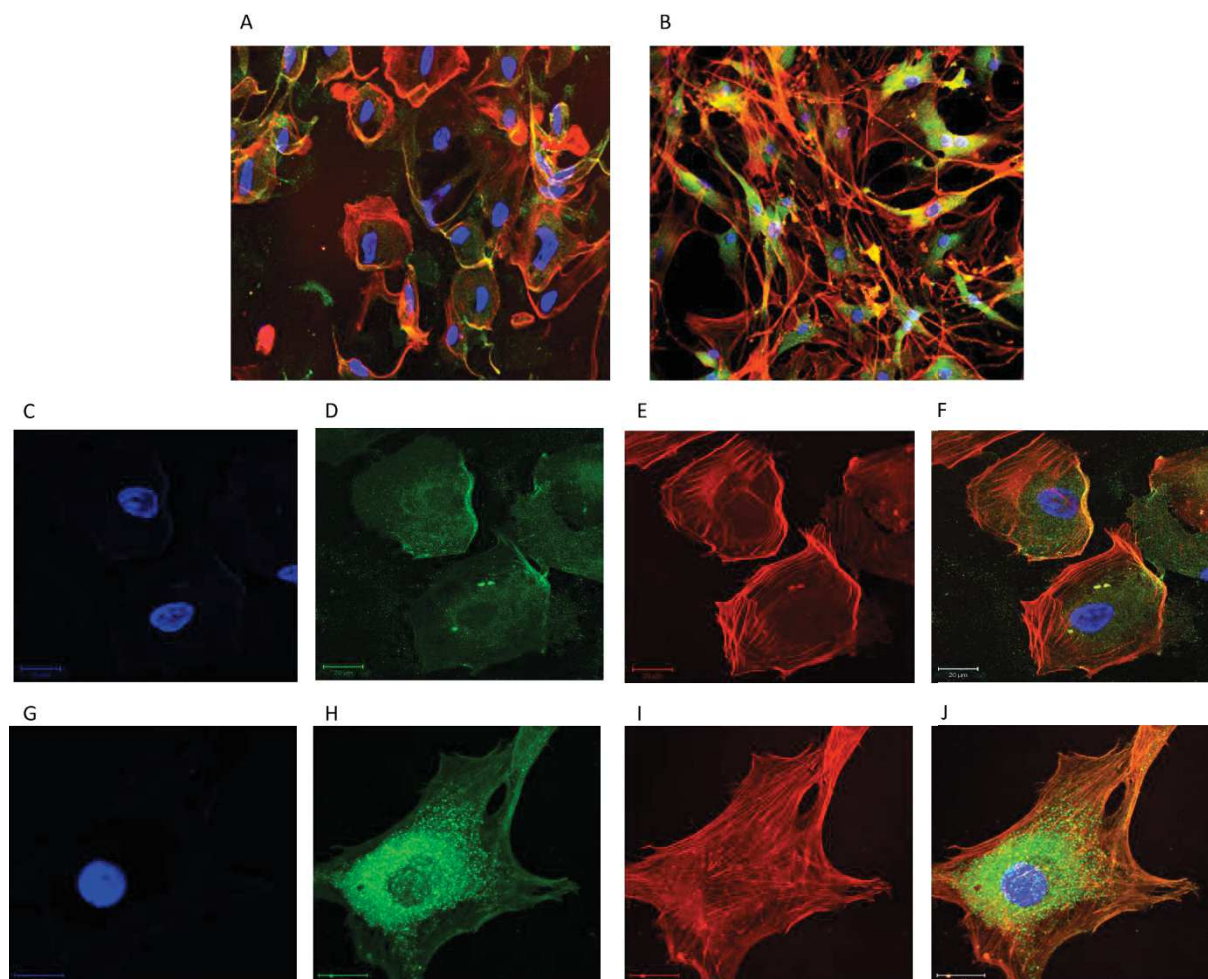
niezmienionej patologicznie (ZN) i zastawce skalcyfikowanej (ZS). Wynik przedstawiono jako średnią \pm SEM (n=6). Na podstawie Fig. 2 z **PRACY B.**



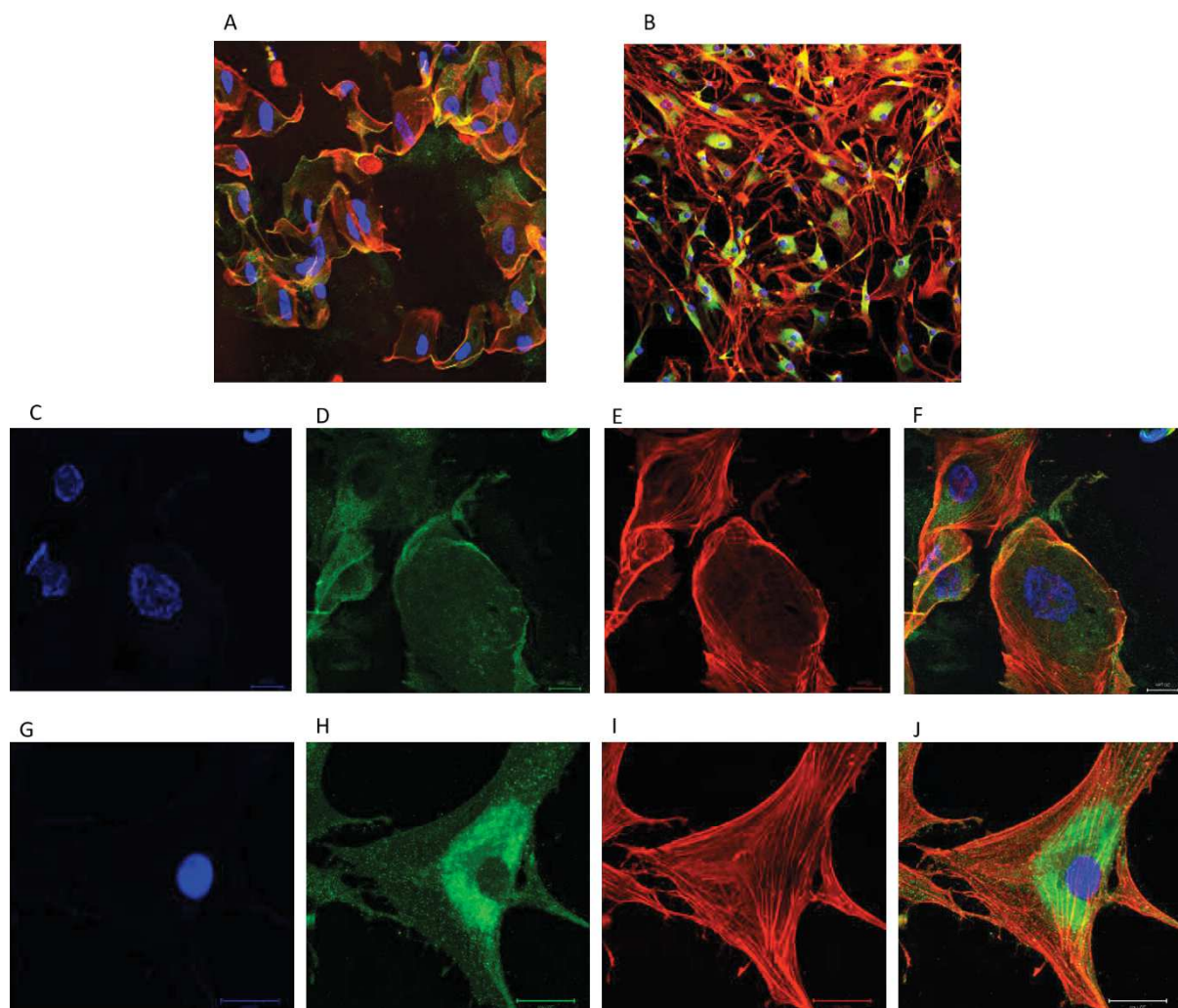
RYCINA 6. Analiza immunohistochemiczna CD73 w ludzkiej zastawce aortalnej. (A) Obecność CD73 przy małym powiększeniu w niezmienionej patologicznie, ludzkiej zastawce aortalnej. (B) Obecność CD73 po stronie komorowej w niezmienionej patologicznie ludzkiej zastawce aortalnej. (C) Obecność CD73 po stronie aortalnej w niezmienionej patologicznie, ludzkiej zastawce aortalnej. (D) Obecność CD73 przy małym powiększeniu w skalcyfikowanej ludzkiej zastawce aortalnej. (E) Obecność białka po stronie komorowej skalcyfikowanej ludzkiej zastawki aortalnej. (F) Obecność białka po stronie aortalnej skalcyfikowanej ludzkiej zastawki aortalnej. (G) Porównanie oszacowanej densytometrycznie zawartości białka w zastawce niezmienionej patologicznie (ZN) i zastawce skalcyfikowanej (ZS). Wynik przedstawiono jako średnią \pm SEM (n=6). Na podstawie Fig. 3 z **PRACY B.**



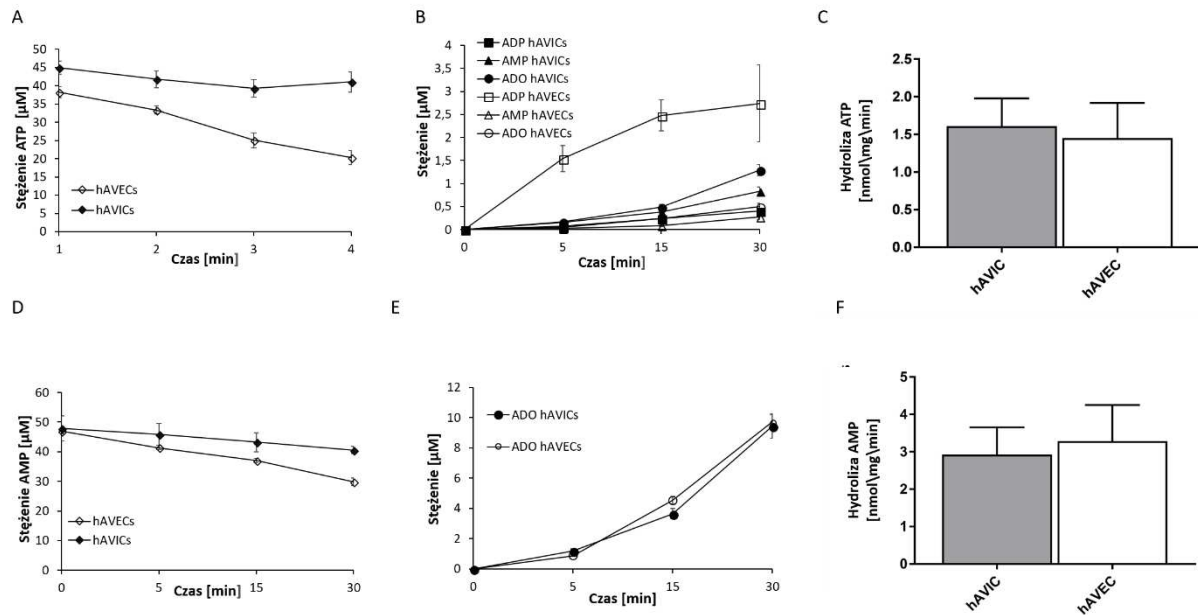
RYCINA 7. Analiza immunohistochemiczna regionu skalcyfikowanego dla CD73. Obecność CD73 jest zachowana w zmienionych patologicznie regionach zastawki aortalnej. Na podstawie Fig. 4 z **PRACY B.**



RYCINA 8. Przykładowe zdjęcia immunofluorescencyjne obrazujące obecność CD39 w komórkach hAVEC (A) i hAVIC (B) oraz komórkową lokalizację CD39 w hAVEC (C-D) i hAVIC (G-J). Barwienie fluorescencyjne: DAPI w jądrze (C, G), anty-CD39 (D, H), filamentów aktyny (E, I) i połączone (F, J). Na podstawie Fig. 6 z **PRACY B.**



RYCINA 9. Przykładowe zdjęcia immunofluorescencyjne obrazujące obecność CD73 w komórkach hAVEC (A) i hAVIC (B) oraz komórkową lokalizację CD73 w hAVEC (C-D) i hAVIC (G-J). Barwienie fluorescencyjne: DAPI w jądrze (C, G), anti-CD73 (D, H), filamentów aktyny (E, I) i połączone (F, J). Na podstawie Fig. 7 **PRACY B.**



RYCINA 10. Analiza hydrolizy zewnątrzkomórkowych nukleotydów adeninowych na powierzchni komórek śródbłonna (hAVEC) i śródmiąższowych (hAVIC) zastawek w czasie 30 minutowej inkubacji. Zewnątrzkomórkowa hydroliza ATP (aktywność CD39), (A, B) oraz obliczona szybkość zewnątrzkomórkowej hydrolizy ATP ($[ADP]+2([AMP]+[ADO])$), (C). Zewnątrzkomórkowa hydroliza AMP (aktywność CD73), (D, E) oraz obliczona szybkość zewnątrzkomórkowej hydrolizy AMP (F). Wartości przedstawiono jako średnie \pm SEM (n=6). Na podstawie Fig. 8 i 9 z **PRACY B.**

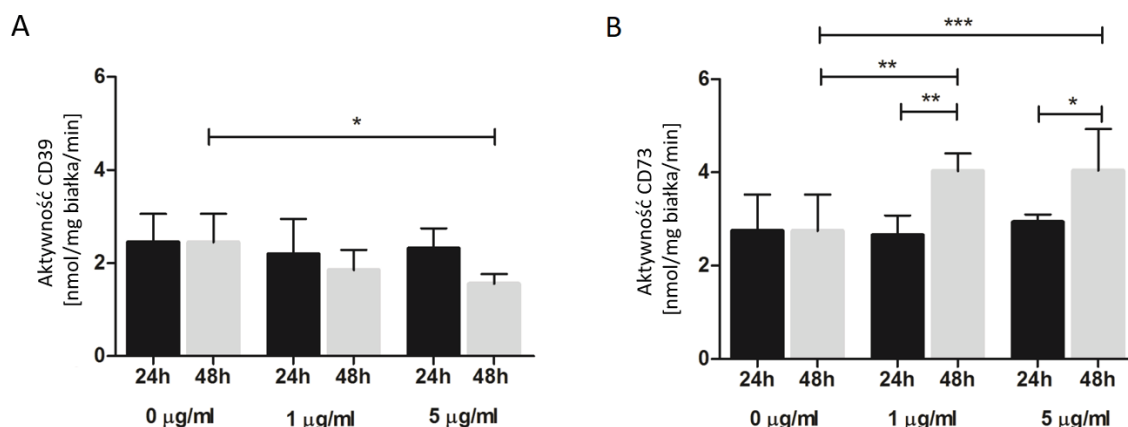
5.3. Wpływ ox-LDL na ekspresję i aktywność CD39 i CD73 w śródbłonku zastawki aortalnej ludzkiej

Jednym z czynników wpływających na rozwój CAVD jest podwyższony poziom ox-LDL akumulowanego w zastawce aortalnej serca. Z tego powodu w kolejnym etapie badań zbadano wpływ tego prozapalnego czynnika na poziom ekspresji mRNA i aktywności CD39 i CD73 w komórkach śródbłonna ludzkiej zastawki aortalnej.

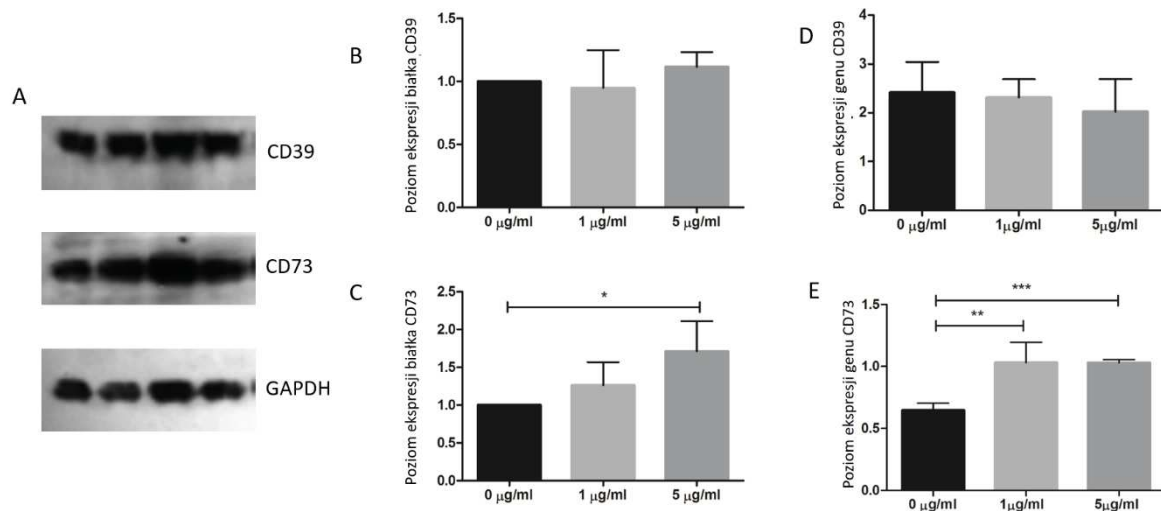
Ludzkie komórki śródbłonna zastawki aortalnej inkubowano z ox-LDL przez 24 i 48 godzin. Następnie sprawdzono poziom transkryptów mRNA oraz ilość i aktywność CD39 i CD73.

Aktywność CD73 w ludzkich komórkach śródbłonna zastawki po 48 godzinnej inkubacji była zwiększona w obecności ox-LDL w porównaniu z kontrolą (RYCINA 11). Nie zaobserwowano znaczącego statystycznie wpływu ox-LDL na aktywność CD39. Podobny efekt wykazano na poziomie ekspresji mRNA i ilości białka CD73, które były zwiększone po 48 godzinnej inkubacji (RYCINA 12). Nie zaobserwowano wpływu ox-LDL na poziom ekspresji mRNA, ilość białka i aktywność CD39.

Wcześniejsze wyniki wskazały, że w skalkyfikowanych zastawkach aortalnych jest znacznie więcej zgromadzonych lipidów niż w zastawkach zdrowych, a korelacja pomiędzy akumulacją lipidów a immunoreaktywnością apoB w obszarze śródbłonkowym patologicznej zastawki została wcześniej opisana⁴⁸. Uzyskane wyniki wykazały stymulujący wpływ ox-LDL na ekspresję i aktywność CD73. Wynik ten pokazuje, że aktywność CD73 dynamicznie zmienia się w środowisku zapalnym. Wzrost aktywności można interpretować jako efekt kompensacyjny służący tłumieniu reakcji zapalnej. Być może ox-LDL odpowiedzialne są za utrzymanie aktywności CD73 w okolicach zwapnień (RYCINA 7). Konieczne są dalsze badania, szczególnie przy dłuższym czasie ekspozycji na ox-LDL w celu ustalenia czy ten wzrost aktywności się utrzyma. Pozwoli to uzyskać pełny obraz roli ox-LDL i CD73 w kalcyfikacji zastawki aortalnej. Konieczne są również dalsze poszukiwania czynników powodujących zaobserwowany w uprzednio przedstawionych badaniach spadek aktywności CD73 w patologicznych zastawkach. (PRACA C).



RYCINA 11. Aktywność CD39 i CD73 w komórkach śródbłonka zastawki aortalnej ilustrująca stymulację aktywności CD73 po 48h inkubacji. Aktywność CD39 (A) w śródbłonkowych komórkach zastawki aortalnej po inkubacji z 1 µg/ml i 5 µg/ml ox-LDL przez 24h i 48h. Aktywność CD73 (B) w śródbłonkowych komórkach zastawki aortalnej po inkubacji z 1 µg/ml i 5 µg/ml ox-LDL przez 24h i 48h. Dane wyrażono jako średnią ± SEM (n=3). Na podstawie Fig. 1 z **PRACY C**.



RYCINA 12. Ekspresja mRNA i zawartość białka dla CD39 i CD73 w komórkach śródbłonna zastawki aortalnej ilustrująca indukcję CD73 po 48h inkubacji. Ekspresja mRNA i białka CD39 (A,B,D) w śródbłonkowych komórkach zastawki aortalnej po inkubacji z 1 µg/ml i 5 µg/ml ox-LDL przez 24h i 48h. Ekspresja mRNA i białka dla CD73 (A,C,E) w śródbłonkowych komórkach zastawki aortalnej po inkubacji z 1 µg/ml i 5 µg/ml ox-LDL przez 24h i 48h. Dane wyrażono jako średnią ±SEM (n=3). Na podstawie Fig. 2 i 3 z **PRACY C.**

6. WNIOSKI

Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że CD39 i CD73 są obecne na powierzchni zastawki aortalnej serca oraz charakteryzują się wysoką aktywnością enzymatyczną.

Szczegółowe wnioski są następujące:

1. CD39 oraz CD73 są obecne we wszystkich warstwach zastawki aortalnej świńskiej, a ich aktywność enzymatyczna związana z zewnątrzkomórkową hydrolizą ATP jest nieco wyższa w komórkach śródbłonka niż w komórkach śródmiąższowych zastawki, natomiast zewnątrzkomórkowa hydroliza AMP jest bardziej aktywna w komórkach śródmiąższowych niż w śródbłonku.
2. CD39 oraz CD73 są obecne we wszystkich warstwach ludzkiej zastawki aortalnej.
3. CD39 oraz CD73 są zlokalizowane głównie w błonie komórkowej w komórkach śródbłonka oraz w komórkach śródmiąższowych ludzkiej zastawki aortalnej; w komórkach śródmiąższowych dodatkowo obserwuje się ich obecność w cytoplazmie.
4. Aktywności enzymatyczne związane z zewnątrzkomórkową hydrolizą ATP i AMP w ludzkich komórkach śródbłonka oraz śródmiąższowych są na bardzo podobnym, wysokim poziomie.
5. Ilości białka CD39 i CD73 w ludzkich zastawkach aortalnych zmienionych patologicznie są znacznie obniżone w stenozie aortalnej w porównaniu z zastawkami niezmienionymi. Wyjątek stanowią regiony skalcyfikowane gdzie ilość CD73 jest zachowana.
6. Aktywność, ekspresja mRNA oraz ilość białka CD73 wzrastają pod wpływem utlenionego LDL w ludzkich komórkach śródbłonka zastawki aortalnej.

7. INTRODUCTION

7.1. Aortic heart valve and its mineralization

The aortic heart valve consists of three crescent cusps: the posterior, right and left, which on the aortic wall correspond to convexities forming together the three aortic sinuses. Histologically, the aortic valve consists of three layers: fibrosa directed at the aorta, spongiosa in the middle and ventricularis directed towards the ventricle¹ with clearly marked layers of valve endothelial cells (VEC) and valve interstitial cells (VIC)². The endothelial cell layer covers aortic and valvular surfaces of the valve, while the middle layer contains interstitial cells and extracellular matrix³. It has been shown that the differentiation of interstitial cells into myofibroblast-like cells intensifies changes in the extracellular matrix. In turn, their differentiation towards osteoblasts is one of the causes of calcification of the aortic valve^{4,5}. Differentiation of aortic valve interstitial cells results from their pathological stimulation by cytokines. It is also assumed that extracellular nucleotides are a part of the valvular calcification process⁴.

Calcific aortic valve disease (CAVD) is one of the most common cardiac pathologies in the aging population of Western Europe and North America⁶. About 30% of people over 60 years have calcified aortic valve stenosis (CAVS), which is an early form of CAVD. Many risk factors, including sex, age, hypercholesterolemia, hypertension or smoking, contribute to the development of the disease⁷. The disease progresses in several stages: from the initial changes in the biology of valve cells to the calcified state causing obstruction of the outflow from the left ventricle. CAVS observed as calcification or thickening of the cusps with the normal valvular function still present is the first detectable macroscopic lesion, but it is known that the onset of the disease occurs much earlier. First pathological processes involved in the development of CAVD are associated with impaired regulatory and metabolic function of endothelial cells and osteoprogenitors involved in aortic valve mineralization^{4,8}. Histopathological analysis of explanted aortic valves indicates that in CAVD not only tissue calcification is observed, but also lipid infiltration and accumulation and tissue inflammation. Pathological processes can be initiated by activating endothelial cells of the valve due to turbulent blood flow, prolonged exposure to proinflammatory and pro-stenotic factors (e.g. cytokines, extracellular nucleotides, low density lipoproteins - LDL)⁹. LDL accumulation and oxidation initiate local inflammation in the aortic

valve by infiltration of monocytes and T lymphocytes. Foam cells formed from macrophages packed with oxidized LDL (ox-LDL) cause inflammation and initiate regrouping of extracellular matrix by metalloproteinases leading to valve fibrosis. ox-LDL is a pro-inflammatory factor, resulting from spontaneous, extracellular chemical oxidation of LDL¹⁰. The relationship between the presence of ox-LDL and the higher expression of adhesion molecules, growth factors, chemoattractants and vasoactive cytokines in endothelial cells has been proven¹¹.

Extracellular nucleotides are involved in the regulation of above-mentioned pathological processes in the heart valve at many levels: from the regulation of inflammatory processes on the valve surface, through the influence on the metabolic function of the cell to phenotypic changes of interstitial cells. Therefore, research on the expression and activity of enzymes regulating the extracellular level of nucleotides is important for understanding the role of these compounds in the pathological mechanisms of aortic valve calcification.

7.2. Extracellular nucleotides breakdown in the organism and their role in pathological mechanisms

Adenosine-5'-triphosphate (ATP) and other nucleotides and nucleosides are found in all tissues in which they perform key intracellular functions. What is more they are also involved in extracellular mechanisms. Intracellular ATP is mainly used in energy-requiring processes, such as active transport, motility and cell biosynthesis, while extracellular ATP is considered to be an important signalling molecule. ATP is a neurotransmitter in the central nervous system; affects the non-adrenal and non-collagenous smooth muscle contractility¹²; causes inotropic, chronotropic and arrhythmogenic effects in the myocardium¹³; regulates epithelial cells response¹⁴; affects immune response and a control of leukocyte transportation between blood and tissues¹⁵, causes activation and aggregation of platelets at sites of vascular injury¹⁶. In addition to the role of signalling in the above-mentioned examples, extracellular purines and pyrimidines have an important role in the cell proliferation and growth¹⁷, induction of apoptosis¹⁸, atherosclerotic plaque formation¹⁹, wound healing and bone formation²⁰.

Extracellular nucleotides are released into the extracellular space by exocytosis and through ion channels from various cell types, including endothelial cells or blood cells²¹. This release occurs under the influence of such factors as: shear stress forces,

hypoxia, hyperglycemia, presence of platelet activators and proinflammatory factors²¹. Released into the intercellular space, nucleotides activate purinergic P2 receptors that are widely distributed on the surface of different cells types, even erythrocytes²². Nucleotides released in inflammation, such as ATP, participate in the further development of the immune response mainly through the P2X7, P2Y2, P2Y4, P2Y11 and P2Y14 receptors²². In contrast, stimulation of the P2X4, P2X7 or P2Y6 receptors that are present on the surface of endothelial cells promotes their pathological activation (FIGURE 1). The stimulation of nucleotide receptors may play a key role in the development of calcific aortic valve disease (CAVD)²³. ATP can induce differentiation of aortic valve cells towards osteoblast-like cells through P2X receptors, while adenosine (Ado), an adenine nucleotide hydrolysis product, counteracts this process²⁴. Adenosine is also known as a signalling molecule that plays a role in the regulation of inflammation, stimulation of the reverse cholesterol transport²⁶ and inhibition of foam cell formation through purinergic P1 receptors. In addition, Ado is an important regulatory factor and an inhibitor of platelet aggregation. Ado is released from cells or generated from nucleotides due to the activity of ectoenzymes on the cell surface. Ado binds to four different adenosine G protein-coupled receptors. In the platelets, binding to A2 receptors (A2A or A2B) leads to a higher content of intracellular cyclic adenosine monophosphate, inhibiting platelet aggregation²⁸.

The delicate balance between the extracellular concentration of ATP and adenosine is a key element in the regulation of pro- and anti-stenotic processes within the aortic valve. On the surface of cells, this balance is regulated by the release of nucleotides and their hydrolysis²⁹. In the cardiovascular system, the transformation of extracellular nucleotides takes place via the cascade of ectoenzymes located on the cell surface, including ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (ENTPD1, CD39), ecto-5'-nucleotidase (E5NT, CD73) and ecto-adenosine deaminase (eADA)³¹. In addition, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (eNPP1), that also take part in nucleotide metabolism, are present in human cells (eNPP1)²³. A suggested mechanism for the transformation of extracellular nucleotides is presented in FIGURE 2³⁰.

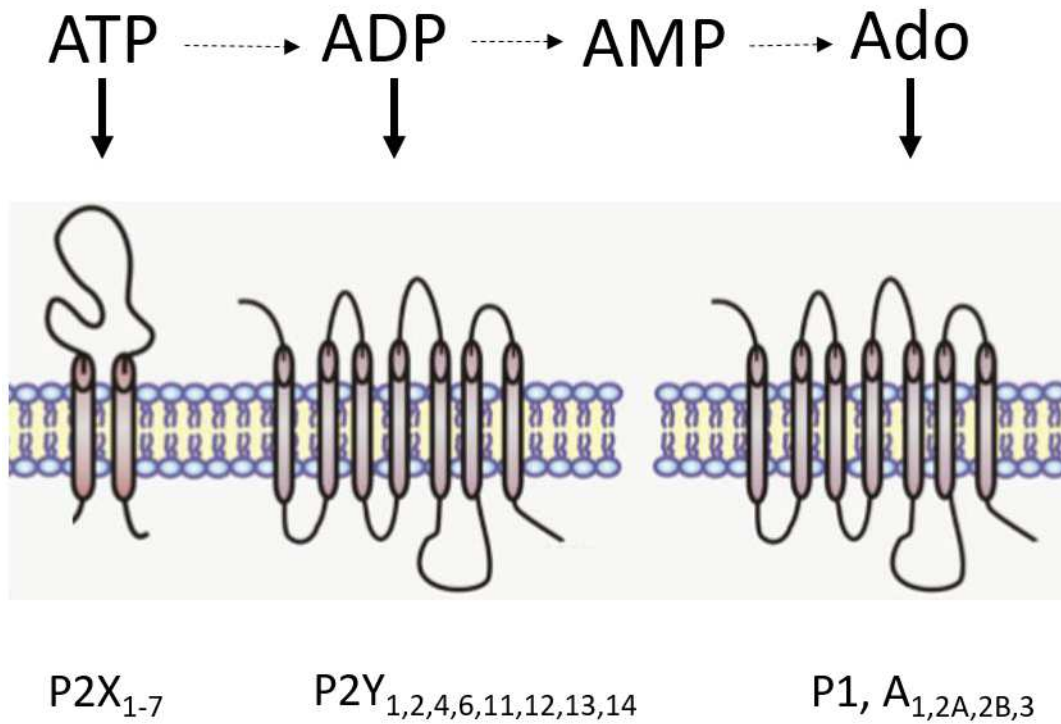


FIGURE 1 Extracellular nucleotides activate the P2X and P2Y receptors located in the cell membrane, while adenosine formed in the extracellular nucleotide breakdown pathway, acts on the nucleoside selective receptors²⁸.

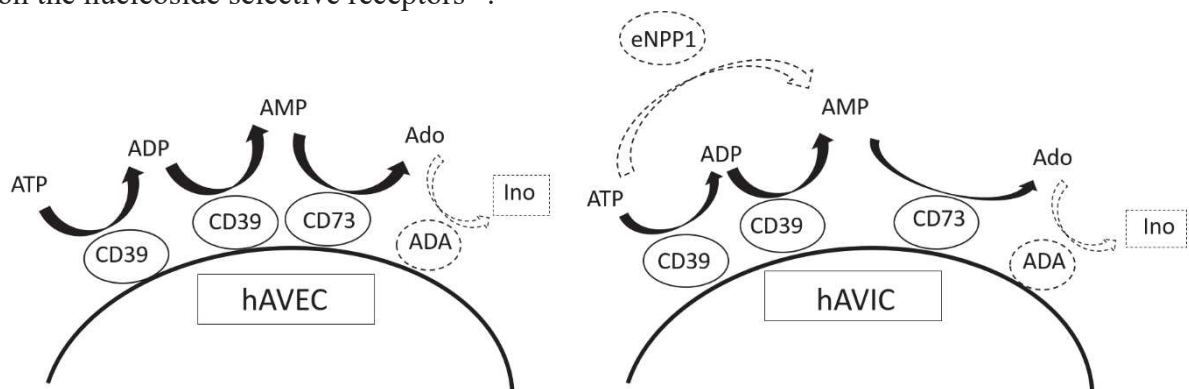


FIGURE 2. Nucleotides breakdown on the surface of human aortic endothelial cells (hAVEC) and interstitial cells (hAVIC). The nucleotide hydrolysis pathway includes four ectoenzymes: eNPP1, E-NTPDase (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73) and ecto-adenosine daeminase (eADA). CD39 hydrolyzes ATP to ADP and then to AMP, CD73 then hydrolyses AMP to Ado, and ADA hydrolyses Ado to inosine (Ino)³⁰.

7.3. The role of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in physiology and pathology

Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39) is a transmembrane protein present in various cell types e.g. in endothelial cells, cardiomyocytes or cells of the immune system³¹. CD39 sequentially hydrolyses nucleoside triphosphates by nucleoside diphosphates and then to nucleoside monophosphates (e.g. ATP through ADP to AMP) in the presence of Mg^{2+} and Ca^{2+} ³².

CD39 becomes catalytically active after reaching the cell surface. Glycosylation of the protein seems to be crucial in the process of its activation³³. In addition, the protein, already on the surface of the cell, undergoes a limited proteolysis, which increases its enzymatic activity³⁴.

CD39 is the major ectonucleotidase in the vascular system³⁵. CD39 affects the limitation of platelet activation by hydrolysis of ATP to ADP. This process is dependent on paracrine release of ADP and activation of the previously discussed specific purinergic receptors³⁶. It is suggested that the loss of CD39 activity plays a crucial role in damaging blood vessels, thrombosis and organ rejection after xenotransplantation³⁷.

Reduced expression and activity of this protein may be influenced by hypoxia, oxidative stress and the presence of proinflammatory cytokines. Under conditions of oxidative stress, CD39 activity on the cell surface decreases. The accumulation of unsaturated fatty acids affects CD39 activity by the same way³⁶. In addition, it has been proven that inhibition of CD39 expression and activity may lead to increased resistance to DNA damage in human endothelial cells³⁸.

7.4. The role of ecto-5'-nucleotidase in physiology and pathology

Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a glycoprotein anchored with glycosylphosphatidylinositol (GPI) in the cell membrane³⁹. CD73 is present on the surface of many cells, including the entire circulatory system⁴⁰. However, some cell types, such as fibroblasts, are characterized by low expression and activity of CD73⁴¹. CD73 hydrolyses extracellular nucleoside monophosphates to nucleosides (e.g. AMP to adenosine) by activating the previously presented P1 receptors causing platelets anti-aggregation and anti-inflammatory effects⁴².

The primary function of the endothelial CD73 is the catabolism of extracellular monophosphoric nucleosides⁴². Little is known about the regulation of endothelial

CD73 expression and whether this molecule contributes to regulation of endothelial permeability. Considering that activation of adenosine receptors (e.g. mediated by adenosine released by CD73) increases the intracellular level of cAMP and its increased endothelial content promotes barrier function of endothelium⁴³. Hence, it is believed that CD73 regulates endothelial permeability. To support this hypothesis, it has been shown that CD73 expression is regulated by tissue hypoxia⁴⁴. In addition, CD73 activity in endothelial cells can be regulated by the presence of proinflammatory factors. Higher activity of CD73, and consequently a higher concentration of extracellular adenosine (acting as an anti-inflammatory factor), both have an effect on the immune response of the body. CD73, as a regulator of the function of many types of immune cells, including: lymphocytes, neutrophils, monocytes/macrophages, dendritic cells and endothelial cells is well described in the literature²³.

The activity of CD73 not only differs between cell types, but also between their origins. It has been shown that CD73 has higher activity in human endothelial cells compared to porcine endothelial cells, which may be important in the case of xenotransplantation⁴⁵.

The mutation of the E5NT gene has been found in three families with symptoms of blood vessel calcification. Similar mechanisms and risk factors are involved in the development of both pathologies (CAVD and vessel calcification) of the circulatory system⁴⁰. Based on the presented data, it can be concluded that there is an important relationship between the expression and activity of CD39 and CD73 in the aortic valve cells and CAVD development.

8. THE AIM OF THE THESIS

The aim of this study was to analyse the location and activity of CD39 and CD73 in the aortic heart valve as well as changes occurring in the calcification process.

Specific aims were:

1. Analysis of the CD39 and CD73 location in the porcine aortic valve.
2. Analysis of the enzymatic activity of CD39 and CD73 in endothelial and interstitial cells isolated from the porcine aortic valve.
3. Analysis of the CD39 and CD73 location in the human, unchanged aortic valve and in the human calcified valve.
4. Analysis of enzymatic activity of CD39 and CD73 in primary endothelial cells and primary interstitial cells isolated from human, unchanged aortic valve.
5. Analysis of the effect of oxidized LDL on the activity of CD39 and CD73 in endothelial cells of the aortic valve.

9. RESULTS

9.1 Localization and activity of extracellular enzymes of adenine nucleotide transformations in the porcine aortic valve

The participation of CD39 and CD73 in the extracellular changes of nucleotides in the porcine aortic valves has been assessed on the basis of immunohistochemical analysis. Immunohistochemistry was performed using aortic valves of domestic pigs. Prepared tissue sections excised from paraffin blocks were incubated with primary and then secondary antibody against CD39 or CD73. The presence of CD39 and CD73 was observed in two cell types: endothelial and interstitial valvular cells. The presence of CD39 in endothelial cells was observed on the aortic side of the valve, whereas the distribution of CD73 in endothelial cells was similar on both sides of the valve. The presence of CD39 and CD73 in interstitial cells were similar (FIGURE 3).

Biochemical analysis was performed using two types of primary cells isolated from pig aortic valves: endothelial and interstitial cells (PAPER A). In order to check the efficiency of isolation after the second passage, cells were tested by flow cytometry and the presence of endothelial and interstitial cell markers (CD31 and CD90) was verified.

The isolated cells were incubated with AMP and ATP (independently) with addition of adenosine deaminase inhibitor (EHNA). In a cell incubation environment, ATP, ADP, AMP and adenosine concentrations were measured using a high performance liquid chromatography (HPLC). Studies have shown that in endothelial and interstitial cells both enzymes have high activity. However, when comparing activity of CD39 ($[ADP] + 2x ([AMP] + [Ado])$) between the two cell types, the higher activity in endothelial cells (pAVEC) was observed than in the interstitial cells (pAVIC) (FIGURE 4A and 4B). Comparing CD73 activity based on the increase of Ado concentration, greater CD73 activity was demonstrated in pAVIC cells than in pAVEC (FIGURE 4C and 4D). Accumulation of AMP during ATP catabolism by pAVEC (FIGURE 4A and 4B) is due to the difference in CD73 activity.

The obtained results show that the tested enzymes are present in all aortic valve layers and their activity is high in comparison to other types of cells e.g. fibroblasts⁴¹. This suggests a probable negative effect of the imbalance in ectoenzymes activity (and consequently a higher concentration of proinflammatory ATP, relative to a reduced

concentration of anti-inflammatory adenosine) in the aortic valve. These studies, along with previous reports on the role of ATP and adenosine in inflammation⁴⁶ were the basis for the next stage of work and hypothesis of the role of CD39 and CD73 in pathological conditions of the heart such as aortic valve calcification (PAPER B and C), which were carried out on the human origin tissue.

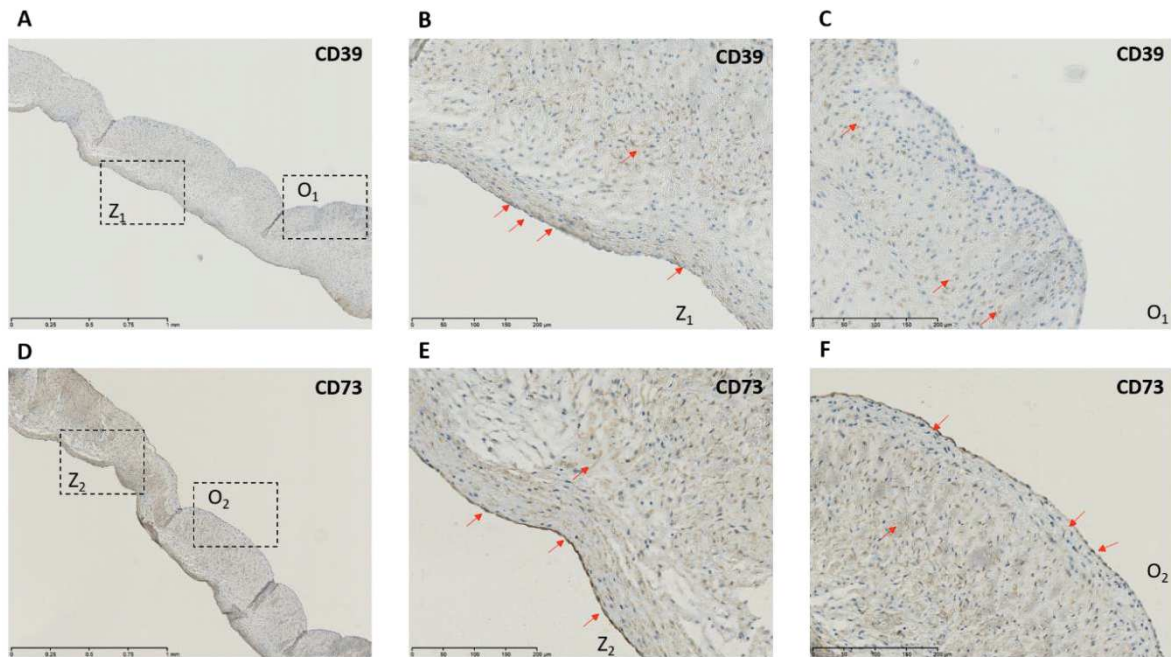


FIGURE 3. Example of pictures from the CD39 and CD73 immunohistochemistry analysis in the porcine aortic valve. (A) The presence of CD39 at low magnification in the porcine aortic valve. (B) The presence of CD39 on the ventral side of the porcine aortic valve. (C) The presence of CD39 on the aortic side of the porcine aortic valve. (D) The presence of CD73 at low magnification in the porcine aortic valve. (E) The presence of CD73 on the ventricular side of the porcine aortic valve. (F) Presence of CD73 on the aortic side of the porcine aortic valve. Based on Figures 1 and 2 from **PAPER A**.

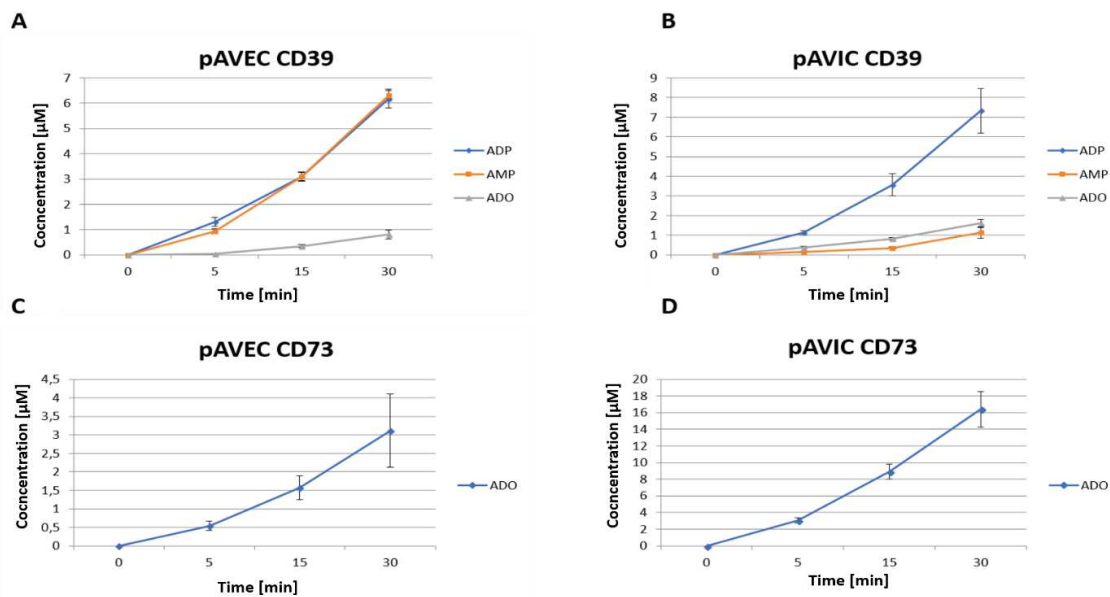


FIGURE 4. Extracellular breakdown of ATP and AMP in porcine endothelial cells (pAVEC) and interstitial cells (pAVICs) from the aortic valve after 30 minutes incubation. (A) ATP breakdown in pAVEC. (B) ATP breakdown in pAVIC. (C) AMP breakdown in pAVEC. (D) AMP breakdown in pAVIC. Values represent the mean \pm SD (n=3). Based on Figures 3 and 4 from [PAPER A](#).

9.2. Immunohistochemical and biochemical analysis of CD39 and CD73 in the human aortic valve and their changes during valve mineralization

Calcific aortic valve disease (CAVD) is a pathology that involves inflammation, fibrosis and calcification of the aortic valve leaflets. All of these processes may be affected by changes in extracellular pathways of nucleotides that depend on the activity of ectonucleotidases, mainly ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39) and ecto-5'nucleotidase (CD73). To determine the role of CD39 and CD73 in the aortic valve calcification process, the localisation of the CD39 and CD73 proteins in unchanged and calcified human aortic valves was investigated by immunohistochemistry.

In the unchanged valves, the expression of CD39 and CD73 was observed in both endothelial and interstitial cells and their level was comparable. The presence of proteins was observed on both sides of the valve and in the middle layer of the non-calcified valve. While, in pathological (calcified) valves, the amount of CD39 and CD73 was significantly reduced in both types of cells (FIGURE 5,6). The exception were pathologically changed regions of the aortic valve, (visible tissue calcification) in which the presence of CD73 was preserved (FIGURE 7). Exact location of CD39 and CD73 in primary endothelial and interstitial cells isolated from human, non-calcified valves was characterized. During the analysis of primary cells, the presence of CD39

and CD73 was observed mainly in the hAVEC cell membrane, whereas in hAVIC these proteins were also found intracellularly (in cytoplasm) (FIGURE 8,9).

The analysis of the activity of NTPDase and e5NT in aortic valve homogenates was possible using the determination of concentrations of the products using high performance liquid chromatography. Observed changes in the presence of proteins in the pathological valve were correlated with the activity of ectoenzymes in valve homogenates. NTPDase activity was reduced by 35%, and e5NT activity by 50% in calcified valves (PAPER B)

Extracellular breakdowns of nucleotides on the surface of isolated aortic valve endothelial cells (hAVEC) and interstitial vascular cells (hAVIC) were also measured (incubation was performed with EHNA inhibitor and ATP and AMP substrates identically as described in section 5.2). Level of the extracellular ATP and AMP breakdown in isolated hAVEC and hAVIC was comparable (FIGURE 10) (PAPER B).

Presence of ectonucleotidases in the aortic valve, and especially in the aortic valve interstitial cells, underlines the important local role of extracellular nucleotide metabolism and purinergic signalling in aortic valves. Changes in the local distribution of proteins, and thus the activity of CD39 and CD73, affect the higher level of proinflammatory factor which is ATP and ADP, and at the same time reduce the amount of anti-inflammatory adenosine in the calcified valves. In pathological conditions such as atherosclerosis or aortic valve calcification we observe a higher activity of adenosine ecto-deaminase (eADA), which additionally reduces the level of adenosine⁴⁷. It has been demonstrated that extracellular ATP is able to induce differentiation of human interstitial cells towards osteoblast-like cells. The described effects are mediated by P2Y purinergic receptors associated with the phospholipase C pathway.

Consequently, a higher level of intracellular calcium is observed, which can regulate and activate transcription factors, such as Cbfa1 (core binding factor 1) or RANK (receptor activator of nuclear factor κ B). Expression of both transcription factors is indicated in CAVD⁴⁶. Our previous studies have indicated that the presence of adenosine reduced the activity of alkaline phosphatase (a marker of osteoblast differentiation) in interstitial cells during incubation with an osteogenic factor⁴⁶. Above-mentioned results together with data described in the literature suggest a potential role of CD39 and CD73 in the pathological mechanisms involved in the development of CAVD.

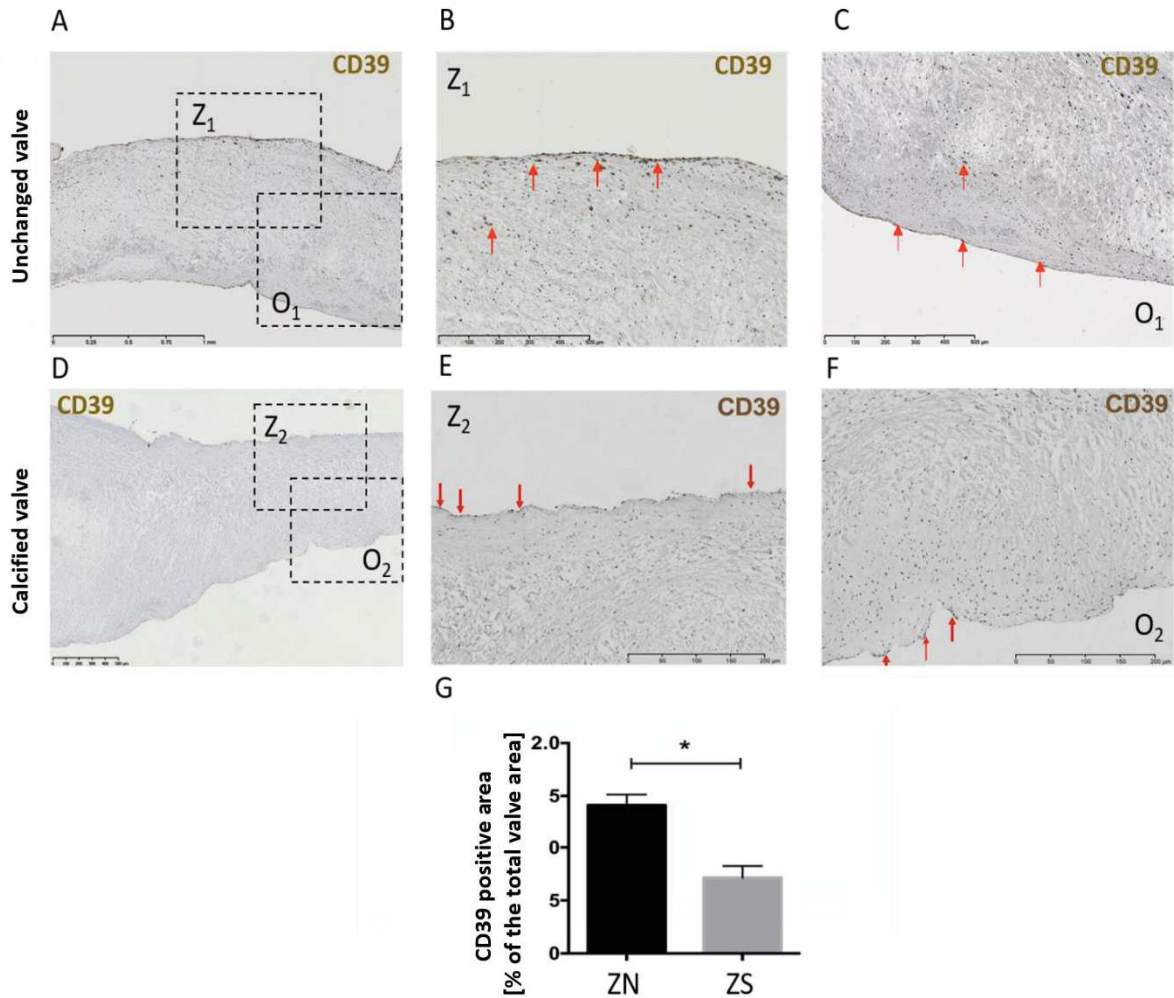


FIGURE 5. Immunohistochemical analysis of CD39 in the human aortic valve. (A) The presence of CD39 at low magnification in the unchanged pathologically aortic valve (B) The presence of CD39 on the ventricular side of unchanged pathologically aortic valve (C) The presence of CD39 on the aortic side of unchanged pathologically aortic valve, (D) Expression of CD39 in a calcified human aortic valve, (E) The presence of CD39 at low magnification in a calcified human aortic valve, (F) The presence of CD39 on the aortic side of the calcified human aortic valve. (G) Comparison of the densitometric estimated content of CD39 in the pathologically unchanged valve (ZN) and the calcified valve (ZS). The result is expressed as the mean \pm SEM (n=6). Based on Fig. 2 from PAPER B.

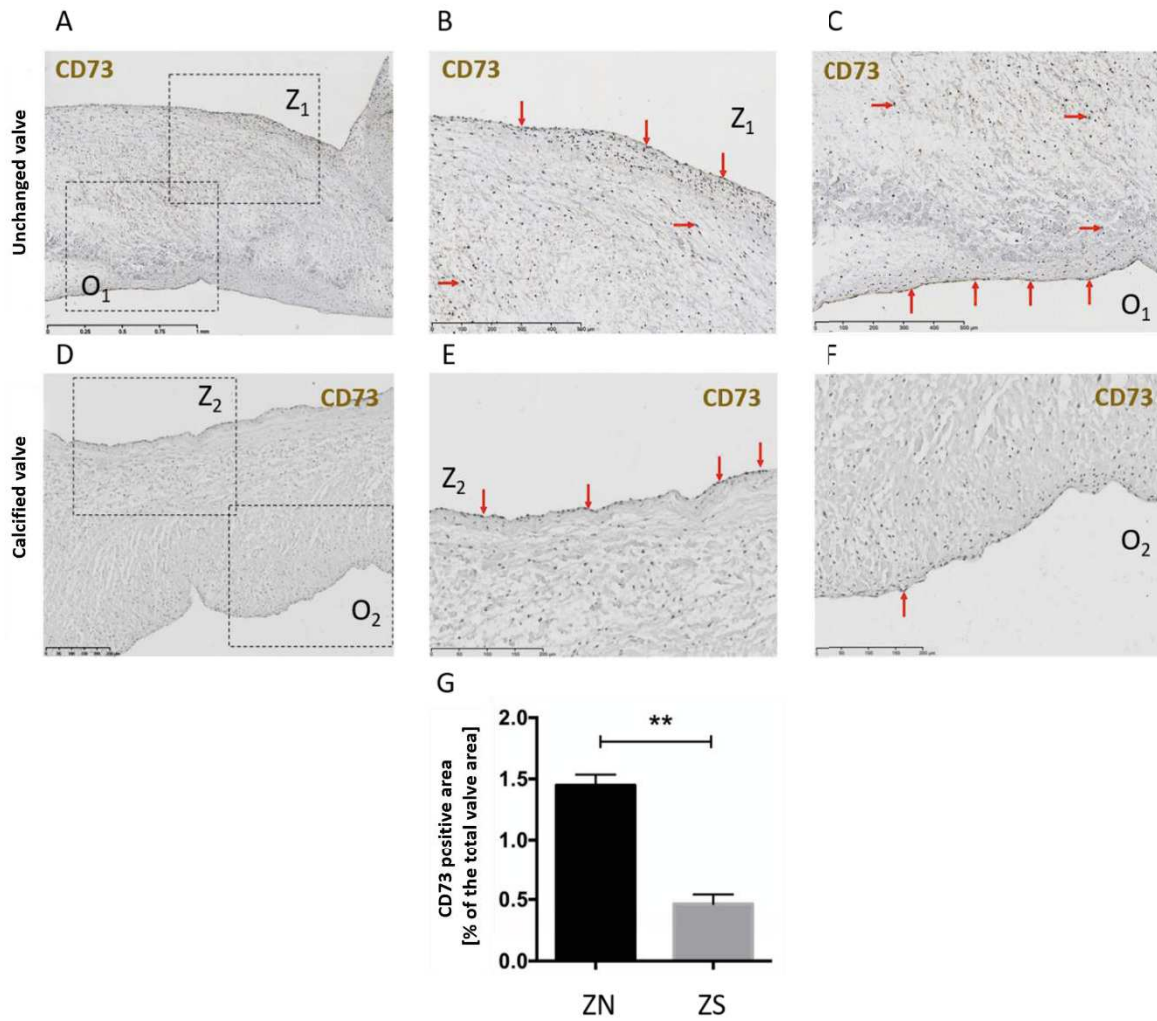


FIGURE 6. Immunohistochemical analysis of CD73 in the human aortic valve. (A) The presence of CD73 at low magnification in the unchanged pathologically aortic valve (B) The presence of CD73 on the ventricular side of unchanged pathologically aortic valve (C) The presence of CD73 on the aortic side of unchanged pathologically aortic valve, (D) Expression of CD73 in a calcified human aortic valve, (E) The presence of CD73 at low magnification in a calcified human aortic valve, (F) The presence of CD73 on the aortic side of the calcified human aortic valve. (G) Comparison of the densitometric estimated content of CD73 in the pathologically unchanged valve (ZN) and the calcified valve (ZS). The result is expressed as the mean \pm SEM (n=6). Based on Fig. 3 from PAPER B.

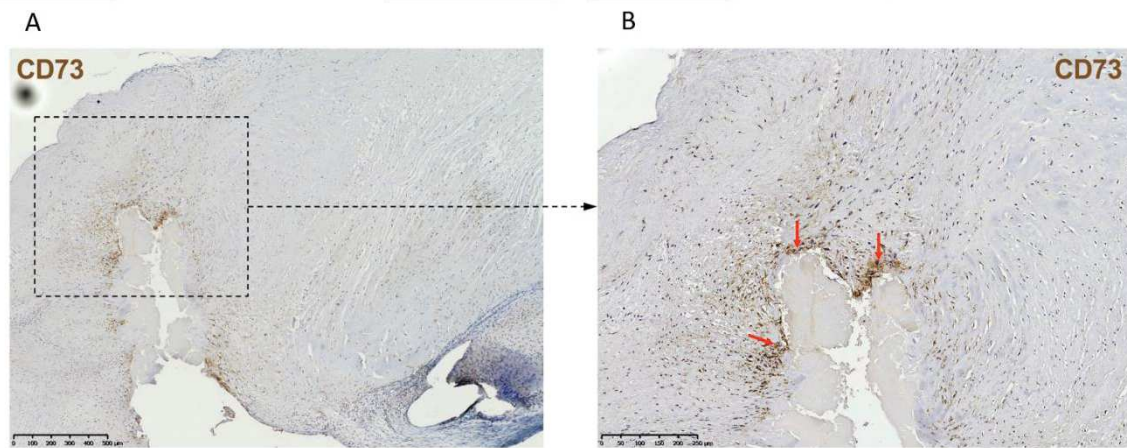


FIGURE 7. Immunohistochemical analysis of the calcified aortic valve region for CD73. The presence of CD73 is preserved in the pathologically altered regions of the aortic valve. Based on Fig. 4 from **PAPER B**.

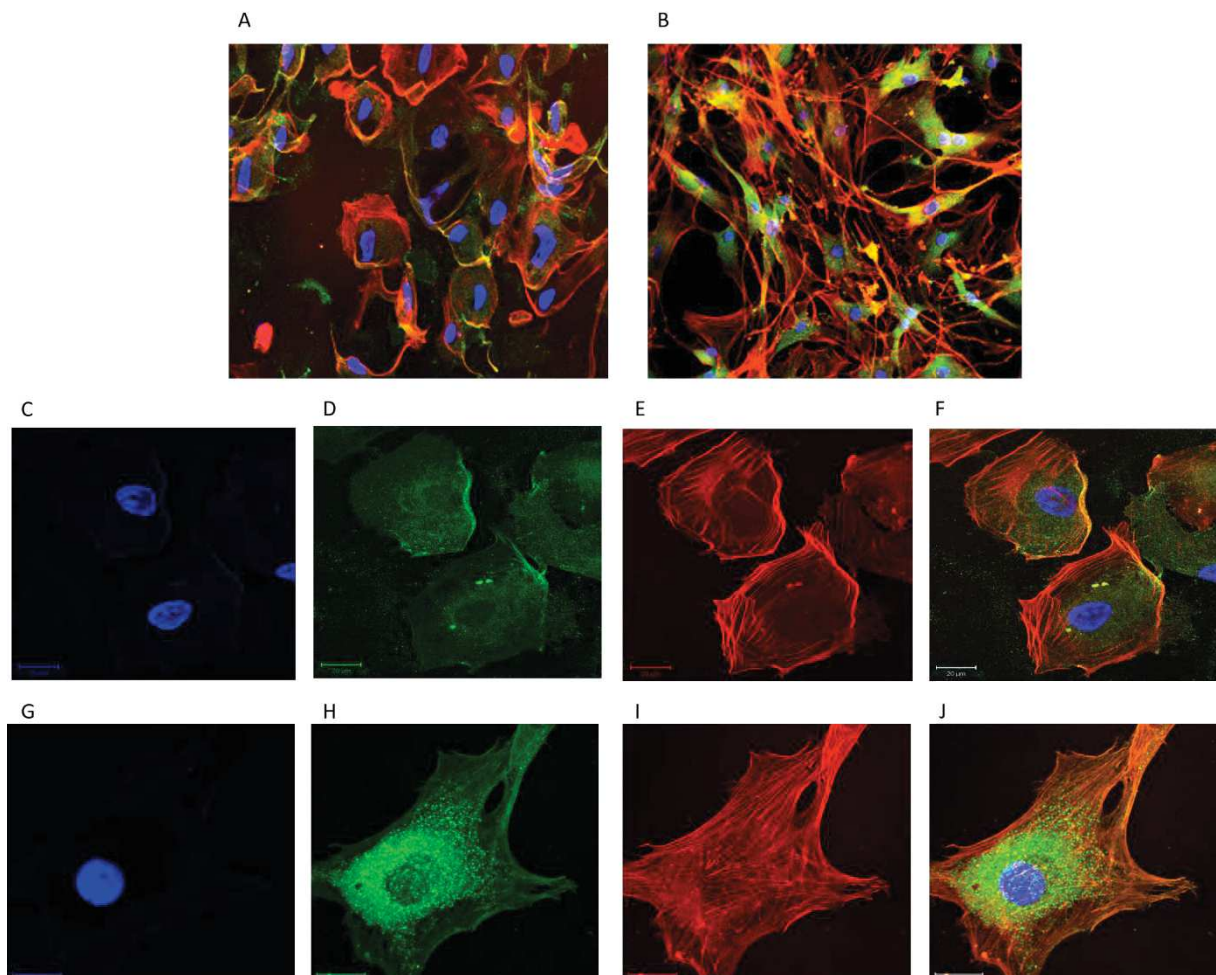


FIGURE 8. Example of immunofluorescence image showing the presence of CD39 in hAVEC (A) and hAVIC (B) cells and the cellular location of CD39 in hAVEC (C-D) and hAVIC (G-J). Fluorescent staining: DAPI in the nucleus (C, G), anti-CD39 (D, H), actin filaments (E, I) and combined (F, J). Based on Fig. 6 from **PAPER B**.

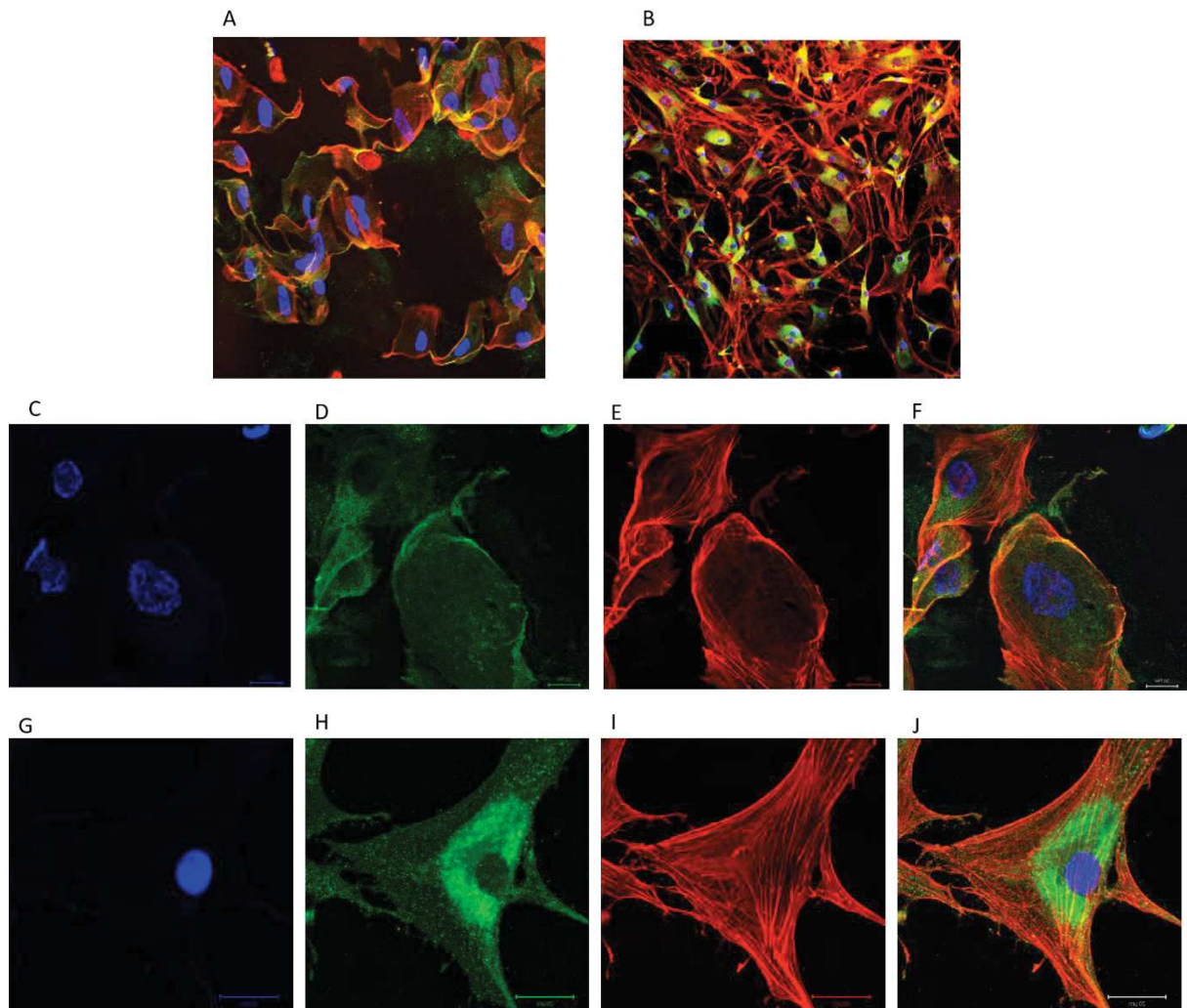


FIGURE 9. Example of immunofluorescence image showing the presence of CD73 in hAVEC (A) and hAVIC (B) cells and the cellular location of CD73 in hAVEC (C-D) and hAVIC (G-J). Fluorescent staining: DAPI in the nucleus (C, G), anti-CD73 (D, H), actin filaments (E, I) and combined (F, J). Based on Fig. 7 from **PAPER B**.

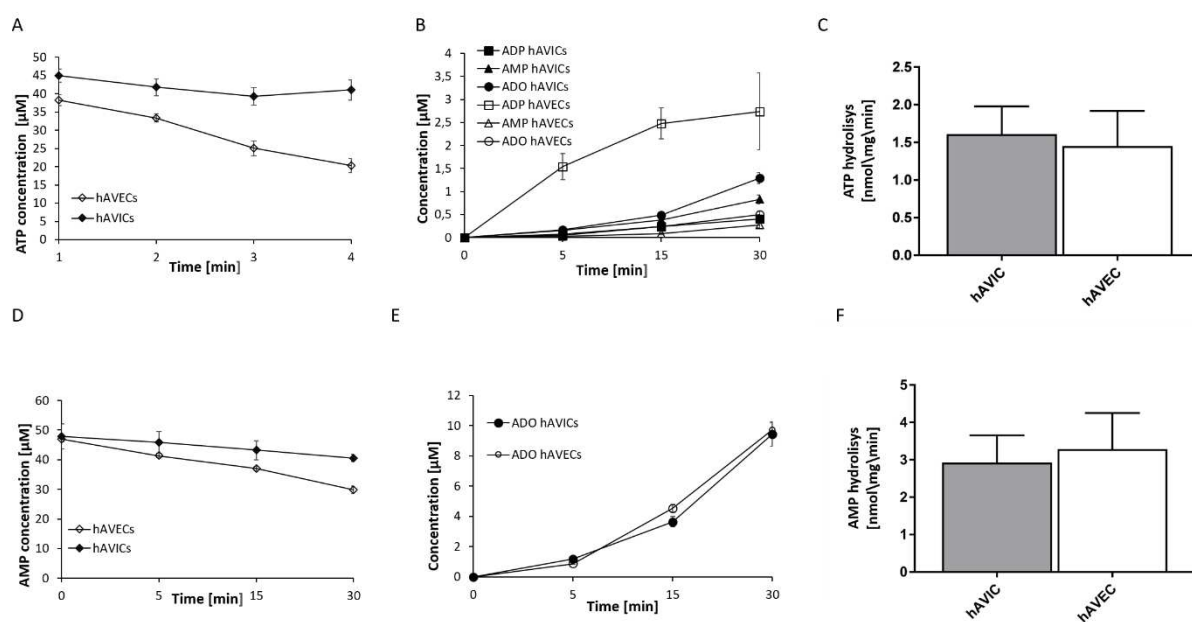


FIGURE 10. Analysis of hydrolysis of extracellular adenine nucleotides on the surface of endothelial cells (hAVEC) and interstitial (hAVIC) valves during a 30-minute incubation. Extracellular ATP hydrolysis (CD39 activity), (A, B) and calculated rate of extracellular ATP hydrolysis ($[ADP] + 2([AMP] + [ADO])$), (C). Extracellular hydrolysis of AMP (CD73 activity), (D, E) and calculated rate of extracellular AMP hydrolysis (F). The values are shown as means \pm SEM ($n = 6$). Based on Fig. 8 and 9 from **PAPER B**.

9.3. Effect of ox-LDL on the expression and activity of CD39 and CD73 in the endothelium of the human aortic valve

One of the CAVD risk factors factors is the increased level of ox-LDL accumulated in the aortic valve. For this reason, the next stage of the study examined the effect of this pro-inflammatory factor on the level of mRNA expression and CD39 and CD73 activity in endothelial cells of the human aortic valve

Human aortic valve endothelial cells were incubated with ox-LDL for 24 and 48 hours. The level of mRNA transcripts, protein expression and activity of the CD39 and CD73 proteins were then tested.

CD73 activity in human endothelial cells of the valve after 48 hour incubation was increased in the presence of ox-LDL as compared to the control (FIGURE 11). There was no statistically significant effect of ox-LDL on CD39 activity. A similar effect was demonstrated at the level of mRNA expression and the amount of protein. Expression of mRNA and the amount of CD73 were increased after 48 hours of incubation (FIGURE 12). No effect of ox-LDL on the level of mRNA expression, amount of protein and CD39 activity was observed. Earlier results indicate that there

are much more lipids accumulated in the calcified aortic valves than in healthy valves, and the correlation between lipid accumulation and apoB immunoreactivity in the endothelial region of the pathological valve has been previously described⁴⁸. The obtained results showed the stimulating effect of ox-LDL on the expression and activity of CD73. This result shows that CD73 activity dynamically changes in the inflammatory environment. The increase in activity can be interpreted as a compensatory effect to suppress the inflammatory response. Perhaps ox-LDL are responsible for maintaining CD73 activity in the area of calcifications (FIGURE 7). Further studies are required, especially with longer exposure times to ox-LDL to determine if this increase in activity will persist. This will give a full picture of the role of ox-LDL and CD73 in the calcification of the aortic valve. Further studies to find factors causing the decrease in CD73 activity observed in the previously presented studies is necessary. (PAPER C).

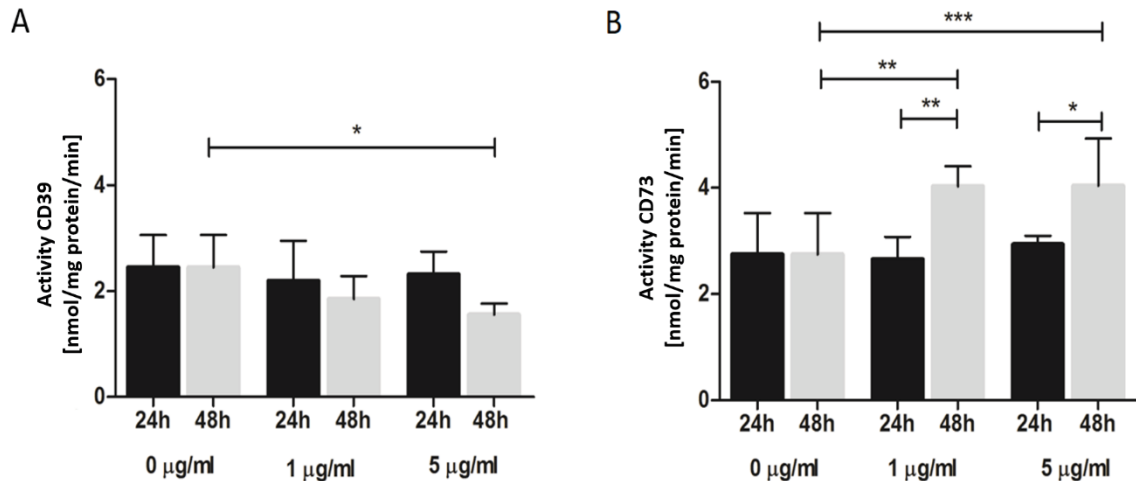


FIGURE 11. CD39 and CD73 activity in aortic valve endothelial cells illustrating stimulation of CD73 activity after 48h incubation. CD39 activity (A) in endothelial aortic valve cells after incubation with 1 µg/ml and 5 µg/ml ox-LDL for 24 hrs and 48 hrs. CD73 activity (B) in endothelial aortic valve cells after incubation with 1 µg/ml and 5 µg/ml ox-LDL for 24 hrs and 48 hrs. Data are expressed as mean ± SEM (n=3). Based on Fig. 1 from [PAPER C](#).

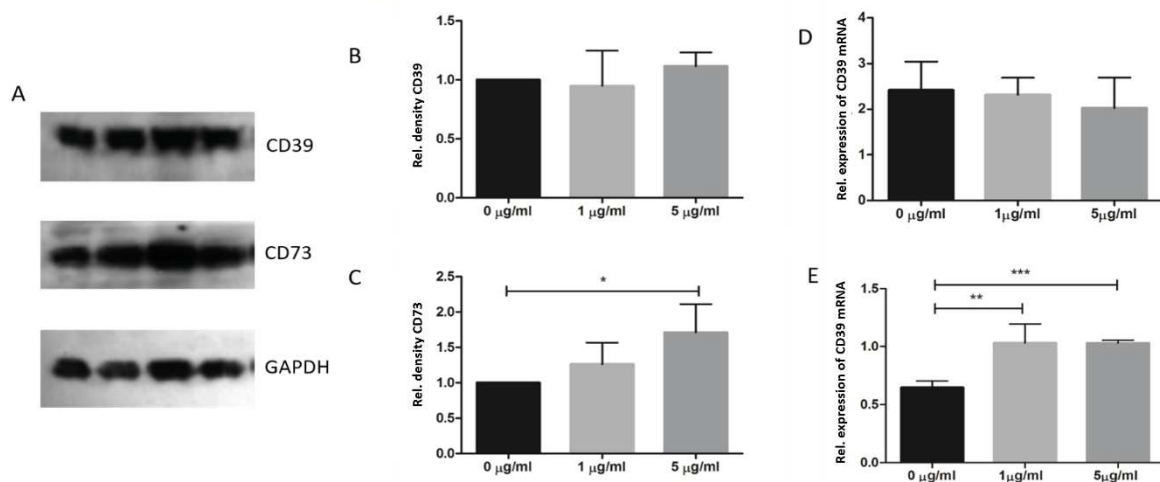


FIGURE 12. Expression of mRNA and protein content for CD39 and CD73 in aortic valve endothelial cells illustrating CD73 induction after 48h incubation. Expression of CD39 mRNA and protein (A, B, D) in endothelial aortic valve cells after incubation with 1 µg/ml and 5 µg/ml ox-LDL for 24 hrs and 48 hrs. Expression of mRNA and protein for CD73 (A, C, E) in endothelial aortic valve cells after incubation with 1 µg/ml and 5 µg/ml ox-LDL for 24 hrs and 48 hrs. Data are expressed as mean ± SEM (n=3). Based on Figures 2 and 3 from [PAPER C](#).

10 CONCLUSIONS

This study highlights that CD39 and CD73 are present on the surface of the aortic valve and are characterized by high enzymatic activity.

The detailed conclusions are as follows:

1. CD39 and CD73 are present in all layers of porcine aortic valve and their enzymatic activity associated with extracellular hydrolysis of ATP is slightly higher in endothelial cells than in the cells of interstitial cells, while extracellular hydrolysis of AMP is more active in interstitial cells than in endothelium.
2. CD39 and CD73 are present in all layers of the human aortic valve.
3. CD39 and CD73 are mainly located in the cell membrane in endothelial cells and in the interstitial cells of the human aortic valve; in interstitial cells, their presence in the cytoplasm is additionally observed.
4. Enzymatic activities associated with extracellular hydrolysis of ATP and AMP in human endothelial and interstitial cells are at a very similar, high level.
5. The amounts of CD39 and CD73 proteins in human aortic pathologically changed valves are significantly reduced in aortic stenosis compared to valves unchanged. An exception are the calcified regions where the number of CD73 is preserved.
6. Activity, mRNA expression and amount of CD73 protein are increased under the influence of oxidized LDL in human aortic valve endothelial cells.

11 STRESZCZENIE

Nukleotydy zewnątrzkomórkowe są uważane za ważne cząsteczki sygnałowe, które odgrywają rolę w rozwoju procesów patologicznych. Uwolnione do przestrzeni zewnątrzkomórkowej nukleotydy aktywują receptory purynergiczne, obecne na powierzchni wszystkich rodzajów komórek. Zaburzona regulacja związana z tymi receptorami może odgrywać kluczową rolę w rozwoju stenozy zastawki aortalnej serca. Nukleotydy w przestrzeni zewnątrzkomórkowej są przekształcane za pośrednictwem kaskady ektoenzymów znajdujących się na powierzchni komórek, w tym ekto-difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej-1 (CD39) oraz ekto-5'-nukleotydyazy (CD73) sekwencyjnie hydrolizujących trifosforany nukleozydów przez difosforany do monofosforanów nukleozydów (CD39) and następnie do nukleozydów (CD73).

Celem pracy była analiza lokalizacji i aktywności CD39 oraz CD73 w zastawce aortalnej serca oraz zbadanie zmian zachodzących w procesie kalcyfikacji zastawki. W tym celu przeprowadzono badania z wykorzystaniem tkanek i komórek pierwotnych pochodzenia świńskiego i ludzkiego. Przeprowadzono immunohistochemiczną analizę lokalizacji obu białek w świńskiej zastawce aortalnej, w niezmienionej patologicznie ludzkiej zastawce aortalnej oraz w ludzkiej zwapniałej zastawce aortalnej. Następnie przeprowadzono badania pozwalające określić lokalizację i aktywności ektoenzymów w komórkach pierwotnych wyizolowanych z zastawki aortalnej świńskiej i ludzkiej. Ponadto zbadano wpływ utlenionych LDL na przemiany nukleotydów w pierwotnych komórkach śródbłonna wyizolowanych z ludzkiej zastawki aortalnej.

Badania z wykorzystaniem świńskiej zastawki aortalnej wykazały, że CD39 oraz CD73 są obecne we wszystkich warstwach zastawki, a ich aktywność enzymatyczna związana z zewnątrzkomórkową hydrolizą ATP jest nieco wyższa w komórkach śródbłonna niż w komórkach śródmiąższowych zastawki, natomiast zewnątrzkomórkowa hydroliza AMP jest bardziej aktywna w komórkach śródmiąższowych niż w śródbłonku.

Badania ludzkiej zastawki aortalnej wykazały, że CD39 oraz CD73 są obecne we wszystkich warstwach oraz, że CD39 oraz CD73 są zlokalizowane głównie w błonie komórkowej w komórkach śródbłonna oraz w komórkach śródmiąższowych ludzkiej zastawki aortalnej. Ponadto w komórkach śródmiąższowych zaobserwowano obecność CD39 i CD73 w cytoplazmie. Aktywności enzymatyczne związane z zewnątrzkomórkową hydrolizą ATP i AMP w ludzkich komórkach śródbłonna oraz śródmiąższowych były na bardzo podobnym, wysokim poziomie.

Ilości białka CD39 i CD73 w ludzkich zastawkach aortalnych zmienionych patologicznie były znacznie obniżone w stenozie aortalnej w porównaniu z zastawkami niezmienionymi. Wyjątek stanowiły regiony skalcyfikowane gdzie ilość CD73 była zachowana. Wykazano również, że aktywność, ekspresja mRNA oraz ilość białka CD73 wzrasta pod wpływem utlenionego LDL w ludzkich komórkach śródbłonna zastawki aortalnej.

Badania prowadzone w niniejszej rozprawie pozwoliły na poznanie dokładnej lokalizacji CD39 i CD73 w zastawce aortalnej serca oraz w wyizolowanych komórkach pierwotnych. Ponadto, badania te dostarczyły informacji o aktywnościach enzymatycznych wykazując w szczególności zdolność do hydrolizy AMP przez komórki śródmiąższowe zastawki. Zmiany ilości białek ektoenzymów, heterogenność tych zmian oraz modyfikacje aktywności przez czynniki patogenne podkreślają znacznie CD39 i CD73 w rozwoju choroby zastawkowej. Przeprowadzone badania stanowią istotny wkład w zrozumienie roli nukleotydów zewnątrzkomórkowych w tej patologii.

12 ABSTRACT

Extracellular nucleotides are considered as important signalling molecules that play a role in the development of pathological processes. The nucleotides released into the intercellular space activate the purinergic receptors, widely distributed on the cell surface. The stimulation of nucleotide receptors may play a key role in the development of cardiac aortic valve stenosis. In the cardiovascular system, the conversion of extracellular nucleotides takes place via the cascade of ectoenzymes located on the cell surface, including ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73). CD39 sequentially hydrolyses nucleotide triphosphates by diphosphates to nucleoside monophosphates (CD39) and then to nucleosides (CD73).

The aim of the study was to analyse the location, activity and changes taking place in the calcification process for CD39 and CD73 in the valve. Research was carried out using the cells and tissues of porcine and human origin. Immunohistochemical analysis of the location of both proteins in the porcine aortic valve, in the pathologically unchanged human aortic valve and in the human calcified aortic valve was performed. Then, tests were carried out to determine the location and activity of the ectoenzymes in primary cells isolated from porcine and human aortic valves. In addition, the effect of oxidized LDL on the nucleotide hydrolysis in primary endothelial cells isolated from the human aortic valve was investigated.

Studies using the porcine aortic valve showed that CD39 and CD73 are present in all layers of the valve, and their enzymatic activity associated with extracellular ATP hydrolysis is slightly higher in endothelial cells than in interstitial valvular cells, whereas extracellular hydrolysis of AMP is more active in interstitial cells than in endothelium.

Studies of the human aortic valve revealed that CD39 and CD73 are present in all layers and that CD39 and CD73 are located mainly in the cell membrane in endothelial cells and in the interstitial cells of the human aortic valve. In addition, the presence of CD39 and CD73 in the cytoplasm was observed in interstitial cells. The enzymatic activities associated with the extracellular hydrolysis of ATP and AMP in human endothelial and interstitial cells were at a very similar, high level.

The amounts of CD39 and CD73 proteins in pathologically changed human aortic valves were significantly reduced in aortic stenosis compared to unchanged valves. The exception was the calcified regions where the presence of CD73 was preserved. It was also shown that the activity, expression of mRNA and the amount of CD73 protein increases under the influence of the oxidized LDL in human aortic valve endothelial cells.

The research conducted within this thesis allowed to establish the exact location of CD39 and CD73 in the aortic heart valve and in isolated primary cells. In particular, these studies provided information on substantial capacity for AMP hydrolysis in the valvular interstitial cells. Changes in the amount of ectoenzymes, heterogeneity of these changes, and modifications of activity by pathogenic factors underline significance of CD39 and CD73 in the development of valve disease. The research conducted is an important contribution to understanding the role of extracellular nucleotides in this pathology.

13 PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

1. Towler, D. *et al.* Molecular and Cellular Aspects of Calcific Aortic Valve Disease. *Circ. Res.* (2013). doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300155
2. Dweck, M. R. *et al.* Calcific aortic stenosis: A disease of the valve and the myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2012). doi:10.1016/j.jacc.2012.02.093
3. Chester, A. H. *et al.* The living aortic valve: From molecules to function. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* (2014). doi:10.5339/gcsp.2014.11
4. Freeman, R. V. *et al.* Spectrum of calcific aortic valve disease: Pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* (2005). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738
5. Otto, C. M. *et al.* Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* (1994). doi:10.1161/01.CIR.90.2.844
6. Ziaecian, B. *et al.* Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nature Reviews Cardiology* (2016). doi:10.1038/nrcardio.2016.25
7. Rajamannan, N. M. Calcific aortic valve disease: Cellular origins of valve calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2011). doi:10.1161/ATVBAHA.111.237610
8. Mohler, E. R. *et al.* Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* (2001). doi:10.1161/01.CIR.103.11.1522
9. Farrar, E. J. *et al.* Endothelial-derived oxidative stress drives myofibroblastic activation and calcification of the aortic valve. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0123257
10. Lerman, D. A. *et al.* Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Eur. Cardiol.* (2015). doi:10.15420/ecr.2015.10.2.108
11. Linton, M. F. *et al.* *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis.* *Endotext* (2000). doi:10.2307/1676938
12. Burnstock, G. *et al.* Receptors for Purines and Pyrimidines. in *Purinergic Signalling and the Nervous System* (2012). doi:10.1007/978-3-642-28863-0_5
13. Burnstock, G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol. Rev.* (2007). doi:10.1152/physrev.00043.2006
14. Schwiebert, E. M. *et al.* Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2003). doi:10.1016/S0005-2736(03)00210-4
15. Bours, M. J. L. *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology and Therapeutics* (2006). doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013
16. Marcus, A. J. *et al.* Heterologous cell-cell interactions: Thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2003). doi:10.1111/j.1538-7836.2003.00479.x
17. Burnstock, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling.

- Pharmacol. Rev.* (2006). doi:10.1124/pr.58.1.5
18. White, N. *et al.* P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* (2006). doi:10.1016/j.tips.2006.02.004
 19. Di Virgilio, F. *et al.* P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.* (2002). doi:10.1038/sj.bjp.0704524
 20. Hoebertz, A. *et al.* Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends in Pharmacological Sciences* (2003). doi:10.1016/S0165-6147(03)00123-8
 21. Burnstock, G. *et al.* ATP-gated P2X receptors in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* (2014). doi:10.3389/fncel.2014.00204
 22. Rees, D. A. *et al.* Novel insights into how purines regulate pituitary cell function. *Clin. Sci. (Lond).* (2003). doi:10.1042/CS20030053
 23. Antonioli, L. *et al.* Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer* (2013). doi:10.1038/nrc3613
 24. Osman, L. *et al.* A Novel Role of Extracellular Nucleotides in Valve Calcification. *Circulation* (2006). doi:10.1161/circulationaha.105.001214
 25. Atkinson, B. *et al.* Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells, Mol. Dis.* (2006). doi:10.1016/j.bcmd.2005.12.025
 26. Reiss, A. B. *et al.* Interferon-gamma impedes reverse cholesterol transport and promotes foam cell transformation in THP-1 human monocytes/macrophages. *Med. Sci. Monit.* (2004).
 27. Reiss, A. B. *et al.* Regulation of foam cells by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2012). doi:10.1161/ATVBAHA.111.226878
 28. Johnston-Cox, H. A. *et al.* Adenosine and blood platelets. *Purinergic Signalling* (2011). doi:10.1007/s11302-011-9220-4
 29. Cohen, M. V. *et al.* Adenosine: Trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Research in Cardiology* (2008). doi:10.1007/s00395-007-0687-7
 30. Mahmut, A. *et al.* Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. *Cardiovasc. Res.* (2015). doi:10.1093/cvr/cvv027
 31. Enjyoji, K. *et al.* Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* (1999). doi:10.1038/12447
 32. Heine, P. *et al.* The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *Eur. J. Biochem.* (2001). doi:10.1046/j.1432-1033.2001.01896.x
 33. Smith, T. M. *et al.* Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. *Biochim. Biophys. Acta* (1998).
 34. Zimmermann, H. Two novel families of ectonucleotidases: Molecular structures,

- catalytic properties and a search for function. *Trends in Pharmacological Sciences* (1999). doi:10.1016/S0165-6147(99)01293-6
35. Robson, S. C. *et al.* The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* (2006). doi:10.1007/s11302-006-9003-5
 36. Deaglio, S. *et al.* Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. *Adv. Pharmacol.* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2
 37. Beldi, G. *et al.* The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. *Front. Biosci.* (2008). doi:10.2741/2868
 38. Aho, J. *et al.* Extracellular ATP protects endothelial cells against DNA damage. *Purinergic Signal.* (2016). doi:10.1007/s11302-016-9508-5
 39. Bono, M. R. *et al.* CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* (2015). doi:10.1016/j.febslet.2015.07.027
 40. St. Hilaire, C. *et al.* NT5E Mutations and Arterial Calcifications. *N. Engl. J. Med.* (2011). doi:10.1056/NEJMoa0912923
 41. Shimauchi, E. *et al.* Expression of CD73/ecto-5'-nucleotidase on human gingival fibroblasts and contribution to the inhibition of interleukin-1 α -induced granulocyte-macrophage colony stimulating factor production. *J Periodontal Res* (2004). doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00698.x
 42. Antonioli, L. *et al.* CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine* (2013). doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005
 43. Moore, T. M. *et al.* Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP. *Am J Physiol* (1998).
 44. Synnestvedt, K. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* (2002). doi:10.1172/JCI0215337
 45. Osborne, F. N. *et al.* Expression of human ecto 5' nucleotidase in pig endothelial cells and its implication for adenosine production and xenotransplantation. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* (2005). doi:10.1081/NCN-59716
 46. Osman, L. *et al.* A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification: A potential target for atorvastatin. *Circulation* (2006). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001214
 47. Kutryb-Zajac, B. *et al.* Extracellular nucleotide catabolism in aortoiliac bifurcation of Atherosclerotic ApoE/LDLr double knock out mice. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* (2014). doi:10.1080/15257770.2014.880478
 48. Nadlonek, N. A. *et al.* Ox-LDL induces PiT-1 expression in human aortic valve interstitial cells. *J. Surg. Res.* (2013). doi:10.1016/j.jss.2013.05.001