

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

Magdalena Agnieszka Zabielska

ROZPRAWA DOKTORSKA

Wpływ modyfikacji przemian nukleotydów i metabolizmu energetycznego w eksperymentalnych modelach choroby niedokrwiennej serca i miażdżycy

PhD THESIS

The effect of modifications of nucleotide interconversions and energy metabolism modifications in experimental models of ischemic heart disease and atherosclerosis



GDAŃSK 2019

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

*Przede wszystkim mojemu Promotorowi, **Panu Profesorowi Ryszardowi Tomaszowi Smoleńskiemu** za opiekę merytoryczną oraz nieustanne podnoszenie poprzeczki w pogłębianiu mojej wiedzy i rozwoju warsztatu badawczego.*

***Pani dr hab. Ewie Słomińskiej** za cenne wskazówki i okazaną pomoc.*

***Współautorom prac** za pomoc w badaniach będących podstawą publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską.*

***Rodzicom i Bratu** za zrozumienie, troskę oraz motywację w dążeniu do obranego przeze mnie celu.*

***Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biochemii** za codzienne wsparcie i życzliwość.*

Magdalena Zabielska,

Gdańsk, 2019

Badania wykonano w ramach realizacji projektu Unii Europejskiej (grant koordynowany przez JCET-UJ, No POIG.01.01.02-00-069/09) 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).

This research was supported by European Union (grant coordinated by JCET-UJ, No POIG.01.01.02-00-069/09) 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).

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS.....	7
2. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ LIST OF PAPERS.....	9
3. STRESZCZENIE.....	10
4. ABSTRACT	11
5. WSTĘP.....	12
5.1. Miażdżycza i choroba niedokrwienna serca.....	12
5.2. Metabolizm energetyczny i przemiany nukleotydów w sercu	12
5.2.1. Metabolizm energetyczny i przemiany nukleotydów w sercu w warunkach fizjologicznych	12
5.2.2. Metabolizm energetyczny i przemiany nukleotydów w miażdżycy i chorobie niedokrwienną serca.....	14
5.3. Modyfikacje przemian energetycznych i metabolizmu nukleotydów jako cel terapeutyczny w chorobach sercowo-naczyniowych.....	16
5.3.1. 1-β-D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamid (4 PYR).....	19
5.3.2. Pirogronian MNA.....	20
5.3.3. Deaminaza AMP (AMPD)	21
6. CEL PRACY	23
7. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ	24
7.1. Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów adeninowych i adenozyliny na powierzchni naczyń objętych procesem miażdżycowym u myszy otrzymujących 4PYR.....	24
7.2. Wpływ pirogronianu MNA na metabolizm i funkcję serca poddanego hipoksji.....	28
7.3. Zahamowanie aktywności deaminazy AMP w terapii chorób sercowo- naczyniowych.....	35
8. WNIOSKI	38
9. INTRODUCTION.....	39
9.1. Atherosclerosis and ischemic heart disease.....	39
9.2. Energy metabolism and nucleotide interconversions in the heart	39
9.2.1. Energy metabolism and nucleotide interconversions in the heart in the physiological conditions.....	39
9.2.2. Energy metabolism and nucleotide interconversions in atherosclerosis and ischemic heart disease.....	41
9.3. Modifications of energy metabolism and nucleotide interconversions as a therapeutic target in cardiovascular diseases	43
9.3.1. 4-pyridone-3-carboxamide-1-β-D-ribonucleoside (4PYR)	46
9.3.2. MNA pyruvate	47
9.3.3. AMP deaminase (AMPD).....	48
10. AIMS.....	49
11. THE MOST IMPORTANT RESULTS.....	50
11.1. Extracellular transformations of adenine nucleotides and adenosine on the vascular surface covered by the atherosclerotic process in mice receiving 4PYR.....	50
11.2. Effect of MNA pyruvate on the metabolism and function of the hypoxic heart.....	53

11.3. Inhibition of AMP deaminase activity in the treatment of cardiovascular diseases.	60
12. CONCLUSIONS	63
13. PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES	64
14. ZAŁĄCZNIKI/ APPENDIX:.....	71
- PRACA A/PAPER A	
- PRACA B/PAPER B	
- PRACA C/PAPER C	

1. WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS

ADO	- adenozyzna/adenosine
ADP	- adozynodwufosforan/adenosine diphosphate
AMP	- adozynomonofosforan/ adenosine monophosphate
AMPD	- deaminaza AMP/AMP deaminase
AMPK	- kinaza zależna od AMP/AMP- activated protein kinase
ApoE	- apolipoproteina E/apolipoprotein E
AT	- denozynotrójfosforan/adenosine triphosphate
ATP-aza Na ⁺ /K ⁺	- pompa sodowo-potasowa/sodium-potassium pump
Cr	- kreatyna/creatine
CoA	- koenzym A/coenzyme A
CPT	- palmitoilotransferaza karnitynowa/carnitine palmitoyltransferase
DCA	- dichlorooctan /dichloroacetate
DHA	- kwas dokozaheksaenowy/docosahexaenoic acid
eADA1	- ekto-deaminaza adenozyzny 1/ecto-adenosine deaminase 1
e5'NT, CD73	- ekto-5' nukleotydaza/ecto-5' nucleotidase
EC	- komórki śródbłonna/endothelial cells
eNTPD1, CD39	- ekto-dwufosfohydrolaza trójfosfonukleozydowa 1/ ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
FA	- kwasy tłuszczowefatty acids
FAT	- transporter kwasów tłuszczowych/fatty acids transporter
FADH ₂	- dinukleotydyd flawinoadeninowy/flavin adenine dinucleotide
FMN	- mononukleotydyd flawinowy/flavin mononucleotide
Glc	- glukoza/glucose
GLUT	- transporter glukozy/glucose transporter
GTP	- guanozynotrójfosforan/guanosine triphosphate
G6P	- glukoza-6-fosforan/glucose-6-phosphate
HClO ₄	- kwas chlorowy (VII)/chloric acid (VII)
HMEC-1	- komórki ludzkiego śródbłonna naczyniowego/human microvascular endothelial cells
HPLC-RP	- wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych/reverse phase high performance liquid chromatography
Hx	- hipoksantyna/hypoxanthine
IMP	- inozynomonofosforan/inosine monophosphate
Ino	- inozyzna/inosine
IL-6	- interleukina-6/interleukin-6
kDa	- kilo-Dalton/kilo-Dalton
LDH	- dehydrogenaza mleczanowa/lactic dehydrogenase
LDL	- lipoproteiny o niskiej gęstości/low density lipoproteins
LDLR	- receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości/ low density lipoprotein receptor
LC-MS	- wysokosprawna chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas/liquid chromatography- mass spectrometry

LPS	- lipopolisacharyd/lipopolysacharide
MNA	- N-1- metylonikotynamid/N- 1- methylnicotinamide
MPC	- mitochondrialny transporter pirogronianowy/ mitochondrial pyruvate carrier
NA	- nikotynamid/nicotinamide
NAD	- dinukleotydyd nikotynoamidoadeninowy/ nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	- dinukleotydyd nikotynoamidoadeninowy forma zredukowana/ nicotinamide adenine dinucleotide reduced form
NADP	- fosforan dinukleotydydu nikotynoamidoadeninowego/ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NNMT	- N- metylotransferaza nikotynamidu/ nicotinamide N-methyltransferase
NO	- tlenek azotu/nitric oxide
ORO	- barwienie czerwienią oleistą/Oil red O staining
PCr	- fosfokreatyna/phosphocreatine
PDH	- kompleks dehydrogenazy pirogronianowej/ pyruvate dehydrogenase complex
PNP	- fosforylaza nukleozydów purynowych/ purine nucleoside phosphorylase
PPAR	- receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów/ peroxisome proliferator-activated receptor
PRPP	- 5-fosforybozylo-1-pirofosforan/ 5- phosphoribosyl-1-pyrophosphate
ROS	- reaktywne formy tlenu/reactive oxygen species
SAA	- surowicy alfa amyloid/serum alpha amyloid
SAH	- S-adenozylo-L-homocysteina/S- adenosine- L-homocysteine
SAM	- S- adenozylometonina/S-adenosylmethionine
SERCA2a	- sarkoplazmatyczna pompa wapniowa/ sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
TET	- 1-3-[2-(3-carboxy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaphthyl)ethyl]- 3,6,7,8-tetrahydroimidazo [4,5-d][1,3]diazepin-8-ol/the same
WT	- myszy szczepu dzikiego/wild type mice
4PYR	- 1-β-D-rybonukleozydyd 4-pirydono-3-karboksyamidu/ 4-pyridone-3-carboxamide-1-β-D-ribonucleoside

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

- A. **Zabielska M A**, Kutryb- Zajac B, Zukowska P, Slominska E M, Smolenski R T. Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1 β -D-ribonucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE-/-LDLR-/. *Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids*. 2016; 35:1-12; 720-725

IF_{5 letni/ 5 year} = 0.868

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego prezentowanych prac/
Ministry of Science and Higher Education Score = 15.000

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15257770.2016.1154970>

- B. **Zabielska M A**, Adamus J, Kowalski R, Gebicki J, Slominska E M, Khalpey Z, Smolenski R T. „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”.

Pharmacological Reports. 2018; 70; 378–384

IF_{5 letni/ 5 year} = 2.787

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego prezentowanych prac/
Ministry of Science and Higher Education Score = 25.000

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1734114016304649>

- C. **Zabielska M A**, Borkowski T, Slominska E M, Smolenski R T. „Inhibition of AMP deaminase as therapeutic target in cardiovascular pathology”.

Pharmacological Reports. 2015; 67; 682-688

IF_{5 letni/ 5 year} = 2.251

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego prezentowanych prac/
Ministry of Science and Higher Education Score = 25.000

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1734114015000766>

Łączna wartość współczynnika IF_{5 letniego} prezentowanych prac/Total IF_{5 year} of presented papers = 5.906

Łączna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego prezentowanych prac/
Total Ministry of Science and Higher Education Score: 65.000

3. STRESZCZENIE

Choroby układu sercowo-naczyniowego są głównym powodem śmiertelności w krajach wysoko rozwiniętych. Wśród tych patologii szczególnym problemem są miażdżyca naczyń, choroby zastawkowe oraz niewydolność serca. Ważnym mechanizmem utrzymania homeostazy sercowo-naczyniowej jest sygnalizacja purynergiczna.

Celem pracy było zbadanie modyfikacji przemian nukleotydów i metabolizmu energetycznego w eksperymentalnych modelach miażdżycy i niedokrwienia serca. Do przeprowadzenia badań wykorzystany został genetyczny model miażdżycy: myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}. Zastosowane techniki badawcze obejmowały wysokosprawną chromatografię cieczową, spektrometrię mas, testy enzymatyczne, barwienia histologiczne oraz standardowe procedury biochemiczne. W jednej serii eksperymentów zbadano wpływ metabolitu nikotynamidu- 1-β-D-rybonukleozydu 4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR) na przebieg procesu miażdżycowego u myszy. Ocena zmian miażdżycowych wykonana za pomocą barwienia ORO wykazała większą akumulację barwnika na powierzchni ściany aort myszy traktowanych 4PYR. Szczególnie interesujący był wzrost aktywności ekto-deaminazy adenozyiny 1 (eADA1) w ścianie naczyń w grupie z 4PYR, podczas gdy aktywności ekto-dwufosfohydrolazy trójfosfonukleozydowej 1 (eNTPD1) czy ekto-5'-nukleotyduazy (e5'NT) nie różniły się. Możliwe, że zwiększona aktywność eADA1 w ścianie naczynia pochodziła z aktywowanych komórek śródbłoka i infiltrujących makrofagów. W kolejnej serii eksperymentów u myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} sprawdzony został wpływ infuzji dożylniej pirogronianu MNA, pirogronianu sodu, MNA lub soli fizjologicznej w kontroli, na przebieg eksperymentalnego zawału serca indukowanego ekspozycją na obniżone stężenie tlenu w powietrzu oddechowym. W trakcie hipoksji monitorowane było EKG, a po okresie hipoksji zbadane było uwalnianie troponiny T i aktywność kinazy kreatynowej. Wyniki wykazały kardioprotekcyjny wpływ pirogronianu MNA, któremu nie towarzyszyła hipernatremia występująca po podaniu pirogronianu sodu. Na koniec pracy podkreślono wartość terapeutyczną modulacji aktywności deaminazy AMP (AMPD) - ważnego enzymu biorącego udział w przemianach nukleotydów. Wykazano, że protekcyjne efekty inhibicji AMPD dotyczyć mogą nie tylko kardiomiocytów, lecz również komórek śródbłoka.

Zaburzenia szlaków metabolizmu nukleotydów adeninowych i adenozyiny ulegają istotnym zmianom w patologjach sercowo-naczyniowych. Należy podkreślić, że ich modyfikacje mogą być markerem toczącego się procesu patologicznego, a także działać protekcyjnie, przez co mogą być ważnym celem terapeutycznym.

4. ABSTRACT

Cardiovascular disease is the main cause of mortality in developed countries. Among these pathologies, the particular problem is atherosclerosis, valvular diseases and heart failure. An important mechanism for maintaining cardiovascular homeostasis is purine signaling.

The aim of the study was to examine the modification of nucleotide changes and energy metabolism in experimental models of atherosclerosis and cardiac ischemia. A genetic model of atherosclerosis was used for the study: ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice. Research techniques that were used include high performance liquid chromatography, mass spectrometry, enzyme activity tests, histological staining and standard biochemical procedures. In one series of experiments, the effect of the nicotinamide metabolite- 4-pyridone-3-carboxamide-1- β -D-ribose (4PYR) on the course of the atherosclerotic process in mice was examined. Assessment of atherosclerotic lesions by ORO staining showed a greater accumulation of the dye on the aortic wall surface of 4PYR treated mice. Particularly interesting was the increase in the activity of ecto-adenosine deaminase 1 (eADA1) in the vascular wall in the 4PYR group, while the activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (eNTPD1) or ecto-5'-nucleotidase (e5'NT) did not differ. It is possible that the increased eADA activity in the vascular wall was derived from activated endothelial cells and infiltrating macrophages. In the next series of experiments in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice, the effect of intravenous infusions of MNA pyruvate, sodium pyruvate, MNA or saline was checked in the control of experimental myocardial infarction induced by exposure to a reduced oxygen concentration in the respiratory air. In the course of hypoxia, the ECG was monitored, and after the hypoxia period, the release of troponin T and creatine kinase was examined. The results showed a cardioprotective effect of MNA pyruvate which was not accompanied by hypernatremia occurring after administration of sodium pyruvate. Finally, the therapeutic value of modulation of AMP deaminase activity (AMPD)- an important enzyme involved in nucleotide metabolism was underlined. It has been demonstrated that the protective effects of AMPD inhibition may target not only cardiomyocytes but also endothelial cells.

Disturbances in the adenine nucleotide and adenosine metabolic pathways are common in cardiovascular pathologies. It should be emphasized that their modifications may have the protective potential or can be a marker of ongoing pathological process.

5. WSTĘP

5.1. Miażdżycza i choroba niedokrwienna serca

Choroba niedokrwienna i niewydolność serca są głównymi przyczynami zachorowalności i śmiertelności u ludzi na całym świecie, o znaczącej tendencji wzrostowej w związku ze starzeniem się społeczeństwa. Przewiduje się, że tylko w Stanach Zjednoczonych liczba przypadków niewydolności serca wzrośnie z 6.5 miliona do ponad 8 milionów przypadków do roku 2030 ¹. Do niedokrwienia mięśnia sercowego dochodzi między innymi w przypadku zablokowania przepływu wieńcowego spowodowanego miażdżycą. Zmiany miażdżycowe określane są jako ogniskowe zgrubienia o asymetrycznym kształcie na powierzchni naczyń krwionośnych. Składają się z elementów tkanki łącznej, lipidów i komórek zapalnych ². W procesie rozwoju blaszki miażdżycowej biorą udział komórki układu immunologicznego, wśród nich głównie monocyty, limfocyty B i T oraz komórki dendrytyczne. Monocyty, które w największej ilości budują blaszkę miażdżycową, przyłączają się do powierzchni uszkodzonego śródbłoka za pomocą receptora dla leukocytów, którego ekspresji nie obserwuje się w normalnych komórkach śródbłoka. Indukcja receptorów zachodzi przy przepływie turbulentnym krwi wywołującym stres oksydacyjny śródbłoka naczyniowego, w obecności cytokin adhezyjnych i prozapalnych, angiotensyny II, zewnątrzkomórkowych nukleotydów czy lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) ³. Wzrost blaszki miażdżycowej odbywa się w kierunku światła naczynia, stopniowo prowadząc do zaburzenia przepływu krwi ⁴. Pęknięcie i erozja blaszki może być natomiast bezpośrednią przyczyną zablokowania światła naczynia i niedotlenienia zaopatrywanego organu ⁵. Niedotlenienie może powodować zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, przemian kwasów tłuszczowych i utleniania węglowodanów. Ze względu na zmniejszenie szybkości odtwarzania wysokoenergetycznych fosforanów i deficyt energetyczny, niedokrwieniu towarzyszy szybka utrata siły skurczu i zaburzenia homeostazy jonowej mięśnia sercowego ⁶.

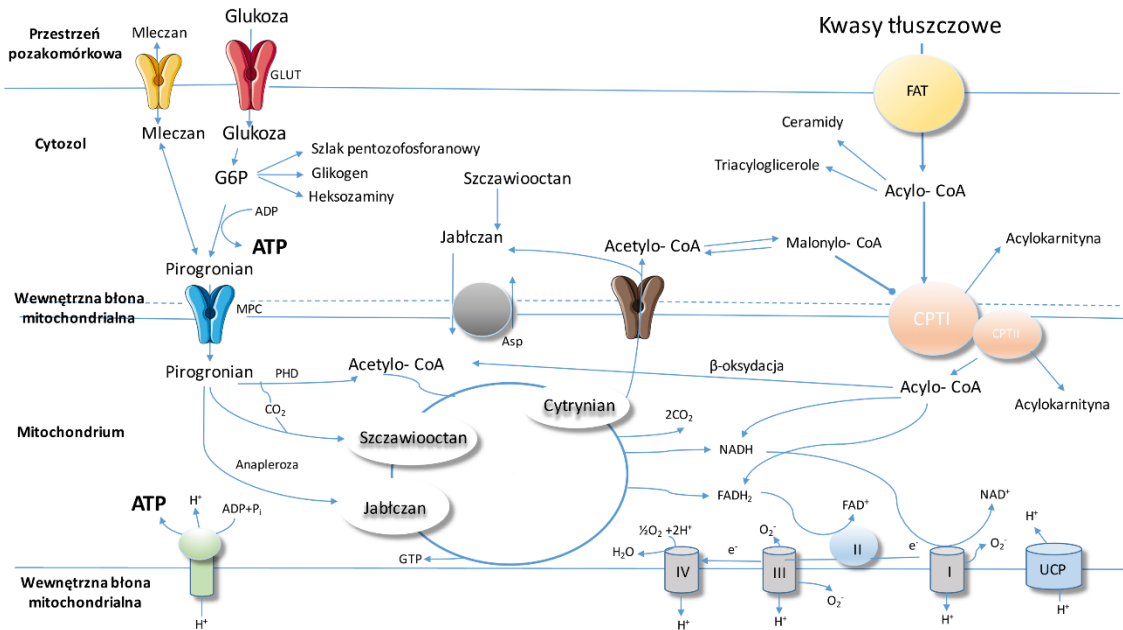
5.2. Metabolizm energetyczny i przemiany nukleotydów w sercu

5.2.1. Metabolizm energetyczny i przemiany nukleotydów w sercu w warunkach fizjologicznych

Serce ma bardzo wysokie zapotrzebowanie na energię przy bardzo ograniczonej zdolności do jej magazynowania. Ilość ATP obecna w sercu wystarcza tylko w przybliżeniu na 12 uderzeń serca. Dlatego serce musi stale wytwarzać duże ilości ATP aby utrzymać zdolność do skurczu i homeostazę jonową ^{7,8}. W warunkach normoksji, 95% ATP wytwarzanego w sercu pochodzi z fosforylacji oksydacyjnej. Pozostałe 5% pochodzi z fosforylacji substratowej ^{9,10}. Do pracy mechanicznej serce zużywa od 60% do 70% wygenerowanego ATP ¹¹. Pula metabolitów energetycznych serca składa się głównie z ATP i fosfokreatyny (PCr). PCr pełni funkcję transportową dla wysokoenergetycznego fosforanu oraz funkcję buforu energetycznego. W przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, energia wysokoenergetycznego wiązania

fosforanowego z ATP może zostać przeniesiona na kreatynę przez mitochondrialną kinazę kreatynową, czego skutkiem jest utworzenie PCr. Przy mniejszej masie cząsteczkowej niż ATP, PCr może szybciej dyfundować w okolice aparatu kurczliwego do cytozolu. W cytozolu PCr może być użyta do odtworzenia ATP z ADP przy udziale cytozolowej kinazy kreatynowej.

W zdrowym sercu w fazie spoczynku około 70% do 90% ATP powstaje w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych a preferowanymi są kwas oleinowy i kwas palmitynowy¹². Pozostałe 10% do 30% pochodzi z utleniania glukozy i mleczanu, a także z niewielkich ilości ciał ketonowych i niektórych aminokwasów¹³. Proporcje te zmieniają się w zależności od warunków. Zbadano, że po posiłku, gdy poziom glukozy i insuliny w osoczu wzrasta, zwiększa się udział glukozy w produkcji ATP w sercu¹⁴. Metabolizowana przez serce glukoza pochodzi z wychwytu egzogennej glukozy lub zmagazynowanego glikogenu. Serce ma względnie niewielką pulę glikogenu ($\approx 30\mu\text{mol/g}$ mokrej masy, co stanowi 20% masy mięśni szkieletowych), ale tempo jego obrotu jest wysokie. W szczurzym sercu glukoza pochodząca z glikogenu może stanowić nawet więcej niż 40% produkcji ATP zależnej od glukozy¹⁵. Na rycinie 1. schematycznie przedstawiono procesy metaboliczne ukierunkowane na wytwarzanie ATP z glukozy i kwasów tłuszczowych.



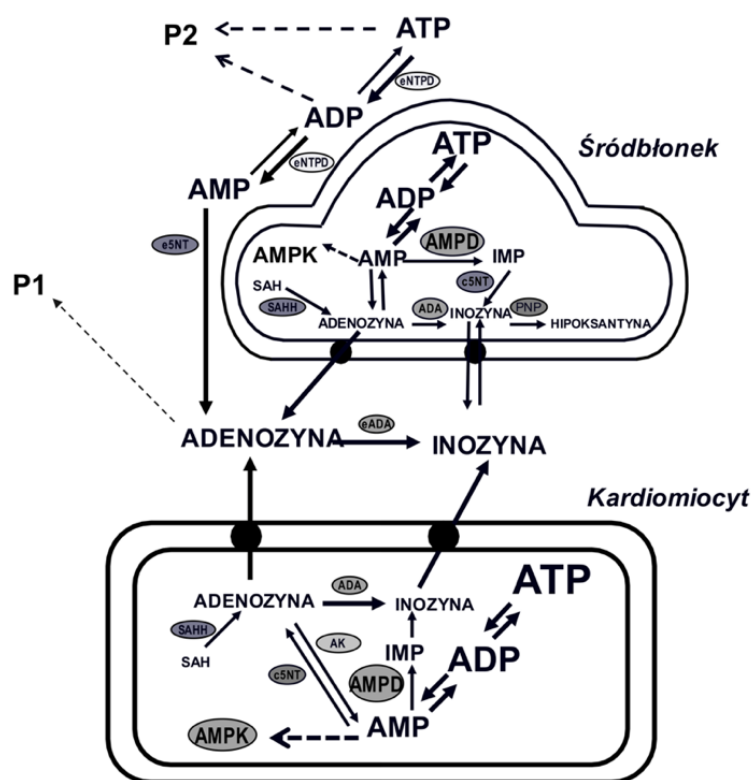
Rycina 1. Metabolizm energetyczny serca

GLUT: transporter glukozy; FAT: transporter kwasów tłuszczowych; MPC: mitochondrialny transporter pirogronianowy.

Na podstawie: „Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production: Doenst et. al.; *Circ Res.* 2013 August 30; 113(6): 709–724

W stanie fizjologicznym, w związku z dużym zapotrzebowaniem energetycznym serca, podstawowe przemiany nukleotydów i ich aktywność dostosowane są do wzmożonej pracy szlaków metabolicznych związanych z wytwarzaniem energii.

Największą aktywność wykazują enzymy zaangażowane w syntezę ATP (takie jak kinaza adenylanowa, kinaza kreatynowa), ale także zużywające ATP jako substrat (ATP-aza sodowo-potasowa, ATP-aza wapniowa czy ATP-aza miozynowa). W normoksji, kiedy serce jest w równowadze pomiędzy procesami syntezy i zużycia energii, cytozolowe stężenia najważniejszych metabolitów energetycznych miokardium wynoszą odpowiednio: ATP ok. 6-8mM, ADP ok. 40μM, AMP ok. 0,2μM i adenozyne ok. 0,05μM¹⁶. Zaobserwowano, że wzrost stężenia AMP wpływa aktywująco na katabolizujące go- deaminazę AMP (AMPD) i ekto-5' nukleotydazę (e5'NT). Powstające nukleozydy adenozyne i inozyne mogą przechodzić do przestrzeni pozakomórkowej. Adenozyne wychwytywana jest przez receptory komórek śródbłonna (65%) oraz transportery w błonie fibroblastów i kardiomiocytów (5%), a pozostała trafia do krążenia¹⁷. Schemat metabolizmu nukleotydów adeninowych przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Metabolizm nukleotydów w układzie sercowo-naczyniowym

Na podstawie: „Inhibition of AMP deaminase as therapeutic target in cardiovascular pathology”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2015; 67: 682-688; Załącznik–Praca C.

5.2.2. Metabolizm energetyczny i przemiany nukleotydów w miażdżycy i chorobie niedokrwiennej serca

Metabolizm oksydacyjny zmniejsza się proporcjonalnie do spadku podaży tlenu. Większość badań wykazała zmniejszenie użycia kwasów tłuszczowych w niewydolnym sercu¹⁸. Podczas łagodnego niedokrwienia β-oksydacja kwasów tłuszczowych przewyższa utlenianie węglowodanów⁷. Co ciekawe, po przywróceniu przepływu w naczyniu wieńcowym (reperfuzji), β-oksydacja kwasów tłuszczowych szybko wzrasta do poziomu przed niedotlenieniem, natomiast utlenianie glukozy pozostaje zahamowane¹⁹.

Choć tlen w trakcie reperfuzji nie jest już czynnikiem limitującym, preferencja β -oksydacji kwasów tłuszczowych może mieć wiele znaczących konsekwencji podczas i po ischemii. Może na przykład przyczynić się do powstania kwasicy wewnątrzkomórkowej, jak również dalszego pogłębienia zaburzeń wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów Na^+ i Ca^{2+} ^{20,21}. Do skorygowania i ponownego wyrównania gradientów jonowych wymagana jest większa ilość ATP, co zmniejsza tym samym pulę ATP dostępną dla pracy skurczowej. Badania na szczurzych modelach niewydolności serca z dysfunkcją skurczu wykazywały zmniejszenie poziomu ekspresji mRNA i białka transporterów kwasów tłuszczowych ²². Stwierdzono, że szybkość utleniania kwasów tłuszczowych i aktywność enzymów zaangażowanych w ten proces były zmniejszone we wczesnych etapach przerostu lewej komory. Wyniki te są również zgodne z badaniami u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym wywołanym zwężeniem aorty brzusznej. Tych zmian nie obserwuje się natomiast u szczurów rasy Dahl wrażliwych na sól oraz u szczurów z wyindukowanym zawałem mięśnia sercowego ²³. Badania na modelach zwierzęcych i ludzi wyraźnie dowodzą obecności zaburzenia funkcji oddechowej mitochondriów, która zachodzi jeszcze przed spostrzeżeniem dysfunkcji skurczowej. Wynikiem tego może być zmniejszona produkcja ATP w sercu.

W przeciwieństwie do wyników dotyczących metabolizmu kwasów tłuszczowych, dane o wykorzystaniu glukozy jako materiału energetycznego dla niedotlenionego serca są mniej spójne. W przypadku dysfunkcji skurczowej stwierdzono, że metabolizm glukozy zmniejszył się u myszy po zwężeniu aorty. Co ciekawe nie zmienił się u szczurów z zawałem mięśnia sercowego, natomiast zwiększył się u szczurów rasy Dahl wrażliwych na sól ²⁴. Po zwężeniu aorty u szczurów, oceniając utlenianie substratu w różnych punktach czasowych zaobserwowano, że utlenianie glukozy w sercu początkowo wzrastało, nie zmieniało się w hipertrofii i zmniejszało, gdy wystąpiła dysfunkcja skurczowa ²⁵. Upośledzenie utleniania glukozy, które jest powiązane z dysfunkcją skurczową, może być częściowo związane z dysfunkcją mitochondriów, zmniejszoną ekspresją genów zaangażowanych w glikolizę i utlenianie glukozy, lub zmniejszoną aktywnością kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) ²⁶. Co ciekawe, stwierdzono, że szczury ze spontanicznym nadciśnieniem, w stadium przerostu mięśnia sercowego, ale bez rozwiniętej niewydolności, mają wyższy poziom utleniania glukozy lub zwiększony przepływ przez kompleks PDH w porównaniu do szczurów kontrolnych ²⁷. U pacjentów z idiopatyczną kardiomiopatią rozstrzeniową wykazano wyższe wskaźniki wykorzystania glukozy przy obniżeniu wykorzystania i utleniania kwasów tłuszczowych ^{28,29}. Możliwe zatem, że w przeciwieństwie do zmian w utlenianiu kwasów tłuszczowych, utlenianie glukozy nie koreluje z funkcją kurczliwości serca w chorobie niedokrwiennej, a zmiany w utlenianiu glukozy mogą zależeć zarówno od stadium, jak i od patogenyzy tej choroby.

Badania wykazały, że zaburzenia metabolizmu energetycznego na poziomie mitochondriów, takie jak: brak wydajnej syntezy ATP, zaburzenia w transporcie ATP z mitochondriów do cytozolu, czy też zakłócenia procesów zużywania ATP, skutkują zaburzeniami funkcji mechanicznej serca. W ischemii, zużywane jest ATP i PCr, a stężenia ADP, AMP i innych metabolitów adenylanowych wzrastają. Przy

długotrwałym niedotlenieniu resynteza nukleotydów nie jest jednak możliwa i w następstwie powoduje to wzrost stężenia adenozyiny i inozyiny. Zbadano, że stężenie adenozyiny (które w kardiomiocytach i we krwi w warunkach fizjologicznych wynosi około 0,5 μ M), podczas niedotlenienia wzrasta ponad 50-krotnie^{30,31}. Dzięki dużej aktywności metabolicznej komórek śródbłónka nawet tak duże stężenia adenozyiny są sprawnie przekształcane w kolejne metabolity. Ostatnie badania pokazały, że postępujący proces miażdżycowy charakteryzuje się zmianą profilu aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów biorących udział w metabolizmie nukleotydów adeninowych i adenozyiny³². Jeszcze przed pojawieniem się blaszki miażdżycowej zaobserwowano wzrost aktywności ekto-deaminazy adenozyiny 1 (eADA1). Określono, że podwyższona aktywność eADA1 pochodzi głównie z komórek śródbłónka oraz makrofagów. Z tego powodu enzym ten może być bardzo dobrym markerem aktywacji śródbłónka naczyniowego, a w konsekwencji stanu zapalnego. Enzymem o istotnym wpływie na układ krążenia biorącym udział w metabolizmie nukleotydów purynowych jest także e5'NT. Wykazano, że zahamowanie aktywności tego enzymu powoduje rozwój dysfunkcji śródbłónka pod wpływem indukcji stanu zapalnego. Aktywacja e5'NT zwiększająca ochronę śródbłónka, może być kolejną, nową strategią leczenia^{33,34}.

5.3. Modyfikacje przemian energetycznych i metabolizmu nukleotydów jako cel terapeutyczny w chorobach sercowo-naczyniowych

Nowym podejściem terapeutycznym w leczeniu miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca może być "modulacja metaboliczna". W celu zmniejszenia skutków choroby niedokrwiennej serca możliwa jest optymalizacja metabolizmu energetycznego za pomocą modulatorów metabolicznych, co skutkuje przede wszystkim poprawą skurczowej pracy serca. Można zaproponować kilka podejść terapeutycznych: modyfikacje metabolizmu puryn, stymulowanie utleniania glukozy i/lub hamowanie utleniania kwasów tłuszczowych³⁵.

Ekto-dwufosfohydrolaza trójfosfonukleozydowa 1 (eNTPD1), e5'NT i eADA1 pełnią kluczową rolę w zewnątrzkomórkowym metabolizmie nukleotydów na powierzchni ściany naczynia³⁶. Zmiany w aktywnościach tych enzymów przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego na powierzchni naczyń krwionośnych a w konsekwencji miażdżycy³⁷. Zbadano, że aktywność eADA1 stymulują czynniki znane jako pro- miażdżycowe, takie jak niektóre kwasy tłuszczowe (kwas kaprylowy, palmitynowy, erukowy, oleinowy) i cytokiny prozapalne (IL-6, LPS). Hamujące działanie mają wielonienasycone kwasy tłuszczowe (kwas linolenowy, DHA), statyny (atorvastatyna), flawonoidy (kemferol) czy MNA. Badania prowadzone w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed wykazały, że zahamowanie aktywności eADA1 deoksykoformycyną w eksperymentalnym modelu miażdżycy z wykorzystaniem myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} spowodowało znaczne spowolnienie rozwoju miażdżycy naczyń³². Ochronna rola e5'NT wykazana była w zwapnieniu zastawek, miażdżycy, odrzucie po ksenotransplantacji i zakrzepicy żył³⁸⁻⁴⁰. Zmniejszona aktywność e5'NT spowodowana kontaktem limfocytów ze śródbłónkiem zwiększa jego przepuszczalność, co prowadzi do zwiększonej transmigracji leukocytów. Aktywacja e5'NT może mieć zatem funkcję ochronną

w szeregu patologii sercowo-naczyniowych. Taki efekt został potwierdzony w przypadku niektórych leków, takich jak statyny i może być częścią jej plejotropowego działania^{34,41}.

Modulacja metaboliczna serca możliwa jest przy zastosowaniu kilku terapii farmakologicznych⁴². Badania wykazały, że bardzo dobrym podejściem terapeutycznym u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca jest zmniejszenie wykorzystania wolnych kwasów tłuszczowych⁷. Gdy stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w krążeniu jest wysokie, zmniejsza się utlenianie glukozy i pirogronianu³⁵. W wyniku tego pirogronian zostaje przekształcony do mleczanu i uwalniany z serca. Odwrotnie, zmniejszenie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu, lub bezpośrednio hamowanie ich utleniania, zwiększa utlenianie pirogronianu i poprawia funkcję mechaniczną serca¹².

Leków, które hamując utlenianie kwasów tłuszczowych, stymulują wykorzystanie glukozy, w tym zarówno glikolizy, jak i utleniania glukozy jest kilka. Trimetazydyna i ranolazyna działają poprzez hamowanie tiolazy-1. Trimetazydyna selektywnie hamuje aktywność tiolazy 3-ketoacylo-CoA, ostatniego enzymu łańcucha oksydacyjnego. Eksperymentalnie wykazano, że jej zastosowanie zmniejsza uniesienie odcinka ST przy podwiązaniu tętnic wieńcowych serca królika i ma właściwości kardioprotekcyjne w modelach niedokrwienia *in vitro*⁴³. Stosowana jej u pacjentów z niewydolnością serca wpływa korzystnie na funkcję mechaniczną serca i poprawia pracę lewej komory⁴⁴. Związane to jest także z obserwowanym wzrostem stosunku PCr/ATP, co pozwala na zachowanie wysokich poziomów energii w sercu⁴⁵. Trimetazydyna została zarejestrowana w wielu krajach jako lek przeciw niedokrwieniu w leczeniu dusznicy bolesnej⁴⁵. Badania wykazały, że lepiej tolerowana przez organizm ranolazyna działa podobnie. Zarówno w badaniach eksperymentalnych *in vivo*, jak i *in vitro* stwierdzono jej kardioprotekcyjne działanie w niedokrwieniu i reperfuzji⁴⁶. U pacjentów z chorobą niedokrwienną serca zaobserwowano korzystny wpływ ranolazyny na poprawę wydolności fizycznej bez zmiany parametrów kurczliwości czy częstości akcji serca⁴⁷.

Dobrym podejściem eksperymentalnym wydawało się zahamowanie aktywności palmitoilotransferazy karnitynowej (CPT). Enzym ten posiada dwie izoformy: CPT1 i CPT2 zlokalizowane w mitochondrium (odpowiednio na zewnętrznej i wewnętrznej błonie). Jednak inhibitory CPT- oxfenicyna, etomoxir i pherhexilina, ze względu na wywołane efekty uboczne nie zostały wprowadzone jako leki^{48,49}.

Kolejnym ciekawym podejściem do modulacji metabolizmu, który zwiększa utlenianie glukozy jest aktywacja PDH. PDH jest kompleksem zlokalizowanym w macierzy mitochondrialnej i katalizuje nieodwracalną dekarboksylację pirogronianu do acetylo-CoA i NADH. Dla właściwej kompleksowej regulacji podjednostka E1- α enzymu działa jako przełącznik włączający/wyłączający, który regulowany jest przez fosforylację/defosforylację. W różnych typach komórek jedna z izoform kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (PDHK) może fosforylować tę podjednostkę prowadząc do inaktywacji PDH. Znanym inhibitorem PDHK jest dwuchlorooctan, który w następstwie jego działania obniża poziom mleczanu poprzez aktywację tego kompleksu. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że dwuchlorooctan znakomicie poprawiał upośledzoną funkcję mechaniczną serca po niedokrwieniu⁵⁰. Niestety milimolowe stężenia terapeutyczne i krótki okres półtrwania pirogronianu

i dwuchlorooctanu po doustnym jak i dożylnym podaniu ograniczyły ich użycie w praktyce⁵¹.

L-karnityna jest naturalnie występującym związkiem transportującym długołańcuchowe kwasy tłuszczowe do mitochondriów. Zauważono, że zmniejszone stężenie L-karnityny zwiększa utlenianie glukozy wraz ze wzrostem aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej⁵². Zaobserwowano, że na β -oksydację kwasów tłuszczowych w sercu mają wpływ także analogi L-karnityny, jak np. propionilo-L-karnityna⁵³. Klinicznie wykazano, że zarówno L-karnityna, jak i propionilo-L-karnityna zapobiegają efektom niedokrwienia. Podczas testów wysiłkowych u pacjentów z chorobą wieńcową oba związki wykazały zmniejszenie obniżenia odcinka ST i ciśnienia końcoworozkurczowego lewej komory, dlatego też zostały skutecznymi środkami przeciw dusznicy bolesnej. Ponadto zaobserwowano kardioprotekcyjne działanie L-karnityny po operacji by-passów i po ostrym zawale serca⁵⁴.

Nową substancją leczniczą jest meldonium (propionian trimetylohydrazyny), który powoduje zahamowanie aktywności hydroksylazy γ -butyrobetainy⁵⁵. Działa poprzez obniżenie stężenia L-karnityny, upośledzając transport kwasów tłuszczowych i wymuszając tym samym zwiększenie metabolizmu glukozy. Ze względu na brak odpowiednich badań klinicznych, meldonium dostępny jest tylko na Litwie. Stosowany jest przez sportowców jako doping w celu zwiększenia wydolności⁵⁶.

Inną możliwością pośredniej modyfikacji metabolizmu energetycznego serca jest hamowanie aktywności pompy sodowo-potasowej (ATP-azy Na^+/K^+), przez co zwiększa się aktywność sarkoplazmatycznej pompy wapniowej (SERCA2a). Powoduje to zwiększenie wychwytu wapnia do retikulum sarkoplazmatycznego i obniżenie stężenia wapnia dostępnego dla rozkurczu. Energetyczna korzyść takiego działania wynika z mniejszego użycia ATP wymaganego do usunięcia wapnia z cytoplazmy przez SERCA2a, niż przez sarkoplazmatyczny wymiennik jonów $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Lekiem działającym na tej zasadzie jest istaroxime, ale jego zastosowanie wymaga dalszych badań klinicznych⁵⁷.

Z kolei Omecantiv Mecarbil jest bezpośrednim aktywatorem sercowej ATPazy miozynowej. Hamuje także aktywację wtórnych przekaźników i bierze udział w regulacji stężenia wapnia⁵⁸. Badania pokazały, że Omecantiv Mecarbil ma silnie pozytywny efekt inotropowy bez zwiększania zużycia tlenu i nadwyrężania niewydolnego serca, co powoduje, że jest bardzo obiecującym kandydatem na lek⁵⁹.

Nowym farmaceutykiem jest Bendavia, która ma strukturę peptydową i jest związkiem skierowanym przeciwko kardiolinie. Kardiolina jest fosfolipidem występującym w błonie mitochondrialnej i kluczowym kofaktorem stabilizującym elementy łańcucha oddechowego⁶⁰. Bendavia zmniejsza przepuszczalność porów w mitochondriach i tworzenie reaktywnych form tlenu. W zwierzęcych modelach niedokrwienia mięśnia sercowego wywołanego podwiązaniem gałęzi międzykomorowej przedniej (LAD), Bendavia skutecznie odtworzyła mitochondrialny metabolizm energetyczny redukując uszkodzenie wywołane niedokrwieniem i reperfuzyją. W planach są badania kliniczne z udziałem pacjentów po zawale mięśnia sercowego charakteryzujących się podniesieniem odcinka ST⁶¹.

Kolejnym podejściem w kardiologii jest badanie leków związanych z modulacją aktywności transkrypcyjnej białek biorących udział w metabolizmie lipidów. Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR) i receptory estrogenowe (ERR) indukowane są w wyniku interakcji PPAR- γ z koaktywatorami-1 (PGC-1). PGC-1 α wiąże się i koaktywuje PPAR α i ERR α , prowadząc do zwiększonej zdolności wychwytywania i utleniania kwasów tłuszczowych. Niedawno odkryto, że PGC-1 β może również odgrywać ważną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego serca, ponieważ białka PGC-1 są silnymi aktywatorami biogenezy mitochondrialnej. Efekt ten związany jest z indukcją jądrowego czynnika oddechowego 1 i mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A. Aktywność PGC-1 α jest silnie regulowana zarówno na poziomie ekspresji jak i przez potranslacyjne modyfikacje, takie jak fosforylacja, acetylacja lub metylacja ⁶².

Ciekawą grupą leków modulujących metabolizm energetyczny serca jest np. metformina, która aktywuje kinazę białkową zależną od AMP (AMPK). AMPK jest kolejnym ważnym mediatorem adaptacji metabolicznej, zwiększa produkcję ATP i hamuje energochłonne szlaki biosyntezy w warunkach niedokrwienia ⁶³. Do aktywacji AMPK dochodzi przy zwiększeniu stosunku AMP/ATP w warunkach niedotlenienia w wyniku fosforylacji AMP. AMPK zwiększa produkcję ATP przez intensywne stymulowanie zarówno utleniania kwasów tłuszczowych, transportu glukozy do wnętrza komórki i glikolizy, jednocześnie spowalniając procesy zużywające ATP, takie jak synteza lipidów i białek. Ponadto AMPK może również poprawić energetykę serca w dłuższym okresie poprzez aktywację PGC-1 α , co prowadzi do zwiększonej biogenezy mitochondrialnej ⁶⁴.

Jednym z głównych kierunków badań w kardiologii eksperymentalnej jest poszukiwanie nowych leków działających ochronnie na śródbłonek i kardiomiocyty. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej skupiają się na badaniu wybranych związków wywierających wpływ na metabolizm energetyczny serca w stanie niedokrwienia. Zbadano wpływ 4PYR na śródbłonek naczyniowy w miażdżycy, pirogronianu MNA na metabolizm i funkcję serca poddanego hipoksji oraz poddano analizie wpływ inhibitorów AMPD na komórki układu sercowo-naczyniowego.

5.3.1. 1- β -D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamid (4 PYR)

4PYR jest modyfikowanym nukleozydem powstającym w reakcji katalizowanej przez oksydazę aldehydową, a jego prekursorem jest rybozyd nikotynamidu. Mimo, że odkryto go już w 1979 r., dopiero niedawno zidentyfikowano jego pochodne nukleotydydowe: mono-, dwu- i trójfosforany (4PYMP, 4PYDP, 4PYTP), jak również analog NAD- 4PYRAD ^{65,66}. U zdrowych ludzi stężenie 4PYR w osoczu wynosi 0,013 \pm 0,006 μ mol/l, natomiast wydalanie z moczem wynosi 26,7 \pm 18,2 μ mol/24h ⁶⁷. Nukleozydy wydalane z moczem mogą być markerem różnych patologii. Zmiany stężenia 4PYR zaobserwowano w przebiegu chorób nowotworowych takich jak, ostra białaczka limfoblastyczna, rak jajnika czy złośliwy międzybłoniak ⁶⁸⁻⁷¹. Zaobserwowano, że stężenie 4PYR w osoczu pozwala także na określenie rokowania dla chorych na AIDS ⁷². Ciekawym spostrzeżeniem jest ponad 40-krotne podwyższenie

stężenia tego związku w osoczu osób z przewlekłą chorobą nerek w porównaniu do osób zdrowych. Podczas badań prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed określono toksyczność tego związku na układ sercowo-naczyniowy. Już podczas pierwszych eksperymentów z zastosowaniem izolowanych erytrocytów zauważono wpływ 4PYR na metabolizm energetyczny. Co ciekawe, podobny efekt zaobserwowano w badaniach *in vitro* podczas długotrwałej ekspozycji komórek śródbłonka na 4PYR, kiedy komórki miały znacząco niższe stężenie ATP i NAD^{73,74}. *In vivo* badano wpływ 4PYR na kurczliwość mięśniówki zależną od śródbłonka. Obserwacje śródbłonka tętnicy udowej po ekspozycji na 4PYR, potwierdziły śródbłonkową toksyczność tego związku. 4PYR podczas krótkiej perfuzji serca nie wpływał na przepływ wieńcowy, funkcję mechaniczną czy metabolizm energetyczny serca. Długotrwała ekspozycja na ten związek powodowała natomiast upośledzenie funkcji śródbłonka naczyniowego poprzez zmniejszenie zdolności naczyń krwionośnych do skurczu⁷³. Ciekawe wyniki uzyskano w badaniach nad izolowanymi kardiomiocytami szczura, z użyciem lizatów erytrocytów, a także w homogenacie serca szczura, gdzie po zastosowaniu 4PYR zauważono słabą inhibicję AMPD. Dopiero dłuższy czas inkubacji wykazywał istotne zahamowanie aktywności AMPD⁷⁵.

W niniejszej pracy doktorskiej określono wpływ 4PYR na wielkość naczyniowych zmian patologicznych oraz aktywność ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyliny na powierzchni mysich aort w eksperymentalnym modelu miażdżycy.

5.3.2. Pirogronian MNA

Fizjologicznie, serce posiada "elastyczność metaboliczną", która pozwala na przełączanie się między utlenianiem kwasów tłuszczowych i węglowodanów. Preferencje zmieniają się w zależności od obciążenia serca, odżywienia organizmu oraz równowagi hormonalnej. Na przykład wzrostowi utleniania kwasów tłuszczowych w sercu towarzyszy gwałtowny spadek utleniania pirogronianu pochodzącego z glukozy i odwrotnie⁷⁶. Ta elastyczność metaboliczna umożliwia sercu wytwarzanie niezbędnej ilości ATP potrzebnej do utrzymania między innymi kurczliwości serca. W surowicy krwi człowieka, psa czy też świni znajduje się pirogronian o stężeniu około 0.2mM⁷⁸. Mimo małego stężenia krążącego pirogronianu, serce jest wysoce reaktywne funkcjonalnie i metabolicznie pod względem egzogenego pirogronianu, który zwiększa metabolizm energetyczny kardiomiocytów i wydajność ich skurczu⁷⁹. Znaczne podniesienie stężenia pirogronianu w surowicy (2-10mM) zwiększa pojemność minutową serca i zmniejsza ciśnienie końcoworozkurczowe lewej komory. Pirogronian wspomaga również transport Ca²⁺ w siateczce sarkoplazmatycznej, czym jest w stanie złagodzić odwracalne i nieodwracalne uszkodzenie mięśnia sercowego. Co więcej, wzrost stężenia pirogronianu zwiększa stosunek NAD/NADH poprzez reakcję dehydrogenazy mleczanowej (LDH)⁸⁰. Wykazano, że po niedokrwieniu, egzogeny pirogronian działa w sprzężeniu z glutationem jako antyoksydantem⁸¹. Podczas badań zaobserwowano, że pirogronian dzięki swoim właściwościom poprawia funkcję skurczową serca w normoksji, hipoksji, a także po niedotlenieniu⁷⁶. Głównym problemem w klinicznym zastosowaniu pirogronianu jest jego wysokie stężenie terapeutyczne, którego uzyskanie możliwe było tylko przez wstrzyknięcie dożylnie/

tętnicze np. bezpośrednio do naczyń wieńcowych w operacji pomostowania naczyń wieńcowych serca. Testowany pirogronian sodu podawany w tak dużych dawkach powodował hipernatremię. Nowo syntezowana sól wytworzona z pirogronianu i N-1-metylonikotynamidu (MNA)- pirogronian MNA- może być alternatywnym rozwiązaniem, eliminującym powyższe problemy.

MNA jest głównym metabolitem nikotynamidu ⁸². Cytosolowy enzym N-metylotrasferaza nikotynamidu (NNMT) katalizuje N-metylację nikotynamidu (NA) zależną od S-adenozylometioniny (SAM), w wyniku czego powstaje w N-1-metylonikotynamid (MNA) i S-adenozylhomocysteina (SAH) ⁸³. Wpływ MNA testowano do tej poru w wielu układach eksperymentalnych. Podczas badań wykazano, że MNA ma działanie przeciwzapalne w trądziku różowatym ⁸⁴. MNA wykazuje także ochronny wpływ na naczynia krwionośne u zwierząt z hipertriglicydemią i cukrzycą. Jego podawanie zwiększało przeżywalność tych zwierząt ⁸⁵. W innych badaniach zauważono, że u myszy ApoE-/-LDLR-/-, rozwój zapalenia naczyń i miażdżycy były zahamowane przy stymulacji produkcji MNA, poprzez zwiększenie aktywności NNMT. Myszy te charakteryzowały się poprawioną funkcją śródbłonna w odpowiedzi zależnej od PGI₂ i NO, zahamowaną aktywacją płytek krwi oraz zmniejszoną odpowiedzią ogólnoustrojowego zapalenia ⁸⁶. Podczas badań w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed z użyciem homogenatów serca oraz izolowanych kardiomiocytów szczura, MNA wykazywało właściwości hamujące aktywność AMPD, lecz nie całkowicie. W badaniach nad farmakokinetyką MNA zauważono, że jest on szybko wydalany wraz z moczem. Wydaje się, że w świetle przedstawionych danych, sól pirogronian MNA może być obiecującym kandydatem na nowy terapeutyk do zastosowania np. w chorobie niedokrwiennej serca.

W przedstawionej pracy doktorskiej zbadano wpływ pirogronianu MNA na metabolizm i funkcję serca poddanego hipoksji.

5.3.3. Deaminaza AMP (AMPD)

AMPD jest enzymem przekształcającym AMP do IMP i amoniaku ⁸⁷. AMPD jest enzymem współzawodniczącym z cytosolową 5'-nukleotydatazą (e5'NT) o AMP. Adenozyna, produkt e5'NT, rozszerza naczynia krwionośne, przeciwdziała jonotropowemu działaniu katecholamin, działa przeciwplytkowo, przeciwzapalnie i immunosupresyjnie ^{88,89}. Podczas badań wykazano również jej kardioprotekcyjne działanie w ostrym niedotlenieniu serca ^{90,91}. Stosunek AMPD/e5'NT określa ilość wytwarzanej adenozyny w szlaku katabolizmu nukleotydów adeninowych. Hamowanie aktywności AMPD może zmienić ten stosunek, powodując zwiększenie produkcji adenozyny. Oprócz potencjalnego wpływu na produkcję adenozyny, podniesienie stężenia AMP np. w wyniku hamowania aktywności AMPD może również dochodzić do aktywacji AMPK z wieloma dalszymi konsekwencjami obejmującymi: zwiększony metabolizm energetyczny, biogenezę mitochondriów i cytoprotekcję ⁹². Podczas gdy korzyści z tych procesów są szeroko badane w kardiomiocytach, rola AMPD w ochronie śródbłonna może być jeszcze ważniejsza. Stosowanie hamowania aktywności AMPD jest ograniczone ze względu na trudności z uzyskaniem związków o odpowiedniej biodostępności ^{93,94}. Według badań przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie

Biochemii, najsilniejszym dotąd syntezowanym inhibitorem aktywności AMPD jest związek CC1=NC(=C2C(=N1)C(=O)O)C(=O)N2 3-[2-(3-carboxy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaphthyl)ethyl]-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-d][1,3]diazepin-8-ol nazywany w skrócie TET1. Słabszymi inhibitorami tego enzymu są kofeina, MNA, 4PYR oraz purynorybozyd. TET1 podany dożylnie myszom ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} podczas eksperymentalnej hipoksji skutkowało obniżeniem odcinka ST w obrazie EKG oraz redukcją uwalniania troponiny I z serca. Ciekawą obserwacją w eksperymentalnym modelu niedokrwienia serca po podaniu MNA była poprawiona funkcja rozkurczowa oraz odwrócenie zmian struktury kolagenu niewydolnego serca^{95,96}.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza możliwości zastosowania inhibitorów aktywności deaminazy AMP w terapii chorób sercowo-naczyniowych.

6. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu modyfikacji przemian nukleotydów i metabolizmu energetycznego w eksperymentalnych modelach miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

1. Określenie wpływu 4PYR na wielkość naczyniowych zmian patologicznych oraz aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyiny na powierzchni mysich aort w eksperymentalnym modelu miażdżycy.
2. Zbadanie wpływu pirogronianu MNA na metabolizm i funkcję serca poddanego hipoksji.
3. Zahamowanie aktywności deaminazy AMP w terapii chorób sercowo-naczyniowych.

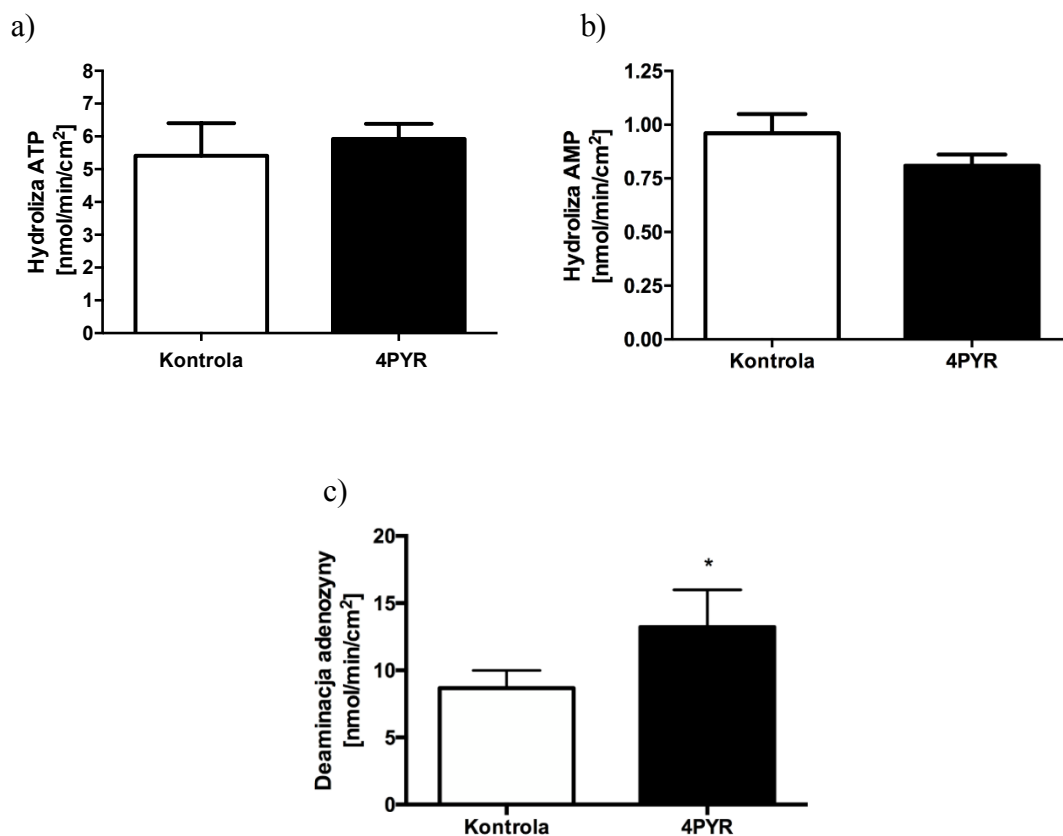
7. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ

7.1. Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów adeninowych i adenozyiny na powierzchni naczyń objętych procesem miażdżycowym u myszy otrzymujących 4PYR

Wcześniejsze badania *in vitro* wykazały, że 4PYR wywoływał efekt cytotoksyczny w komórkach linii HMEC-1, którego wynikiem było obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia NAD i ATP. Należy wspomnieć, że już wcześniej zaobserwowano dysfunkcję śródbłonna u myszy wywołaną 7- dniową infuzją 4PYR. Zależny od śródbłonna rozkurcz krążków aortalnych był istotnie mniejszy w grupie myszy otrzymujących 4PYR w porównaniu do grupy kontrolnej.

Jednym z celów badań przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej było określenie wpływu 4PYR na śródbłonek naczyniowy w perspektywie kilku dalszych miesięcy po jego zastosowaniu. Samcom myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} w wieku dwóch miesięcy, u których nie rozwinęła się jeszcze miażdżycy, co 12 godzin przez miesiąc wstrzykiwano w fałd skórny w okolicy karku 100µl 50mM roztworu 4PYR, a myszom kontrolnym sól fizjologiczną. Przez cały czas eksperymentu myszy karmione były standardową dietą przeznaczoną dla zwierząt laboratoryjnych.

Eksperyment zakończono 6 miesięcy po ostatnim podaniu 4PYR (myszy 8-miesięczne). Aktywność ekto-enzymów przemian nukleotydów i adenozyiny została zbadana na powierzchni aorty brzusznej myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}. W celu identyfikacji ekto-enzymów odpowiedzialnych za metabolizm nukleotydów i adenozyiny, we wcześniejszych badaniach wykonano pomiary stężenia produktów reakcji w obecności inhibitorów poszczególnych enzymów. Poprzednie eksperymenty jak i wyniki zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazały, że zarówno w naczyniach objętych procesem miażdżycowym, jak i naczyniach kontrolnych, hydroliza ATP odbywa się głównie przy udziale eNTPD1, hydroliza AMP przy udziale e5'NT, a degradacja adenozyiny przy udziale eADA1. Po zastosowaniu 4PYR nie zaobserwowano różnic w trakcie inkubacji aort z ATP lub AMP, co sugeruje, że aktywności eNTPD1 (Praca A., Rycina 3.a) i e5'NT (Praca A., Rycina 3.b), nie różniły się w badanych grupach. Wykazano natomiast znaczący wzrost stężenia inozyny po inkubacji z adenozyiną w naczyniach zwierząt otrzymujących 4PYR w porównaniu do naczyń zwierząt kontrolnych. Aktywność eADA1 wzrosła o około 50% w grupie otrzymującej 4PYR w porównaniu do kontroli (Praca A., Rycina 3.c). Uzyskane wyniki wskazują na brak regeneracji uszkodzonego śródbłonna nawet po 6 miesiącach od podania 4PYR.



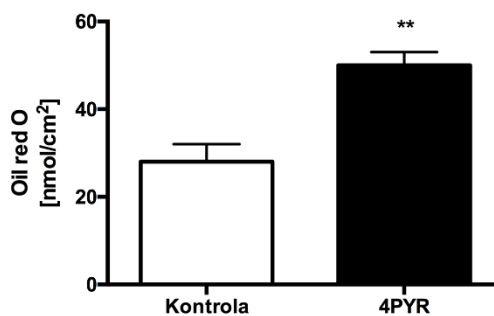
Rycina 3. Powierzchnia aorty myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}, które otrzymały 4PYR charakteryzuje się wzrostem szybkości deaminacji adenozyzny i niezmienną aktywnością związaną z hydrolizą ATP i AMP

Aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów przemian nukleotydów adeninowych: a) hydroliza ATP, b) hydroliza AMP), c), deaminacja adenozyzny- na powierzchni aorty brzusznej myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} w grupie otrzymującej 4PYR i grupie kontrolnej.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=5–7), **p*<0.05, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

Na podstawie: „Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1β -D-ribose nucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}”, Zabielska et al. *Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids*. 2016; 35:1-12; 720-725; Załącznik-Praca A.

Stężenie lipidów na powierzchni naczynia badanych zwierząt określono z wykorzystaniem barwienia ORO. W aortach myszy otrzymujących 4PYR zaobserwowano dwa razy większą absorpcję barwnika w porównaniu do aort myszy kontrolnych, co wskazuje na zwiększony obszar blaszki miażdżycowej w okolicy brzusznej. Dodatnia korelacja pomiędzy zwiększoną aktywnością eADA1 a stężeniem ORO u myszy otrzymujących przez miesiąc 4PYR dostarcza dalszych dowodów na to, że w tej grupie śródbłonek naczyniowy uległ nieodwracalnemu uszkodzeniu i jest bardziej podatny na rozwój miażdżycy (Praca A., Rycina 4.).



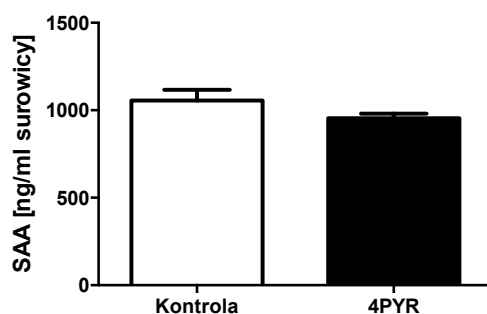
Rycina 4. Większe stężenie lipidów na powierzchni aorty myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} w grupie, która otrzymała 4PYR

Barwienie Oil Red O na powierzchni aorty brzusznej myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} w grupie otrzymującej 4PYR i grupie kontrolnej.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=6), ***p*<0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

Na podstawie: „Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1β -D-ribonucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}”, Zabielska et al. *Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids*. 2016; 35:1-12; 720-725; Załącznik-Praca A.

Oznaczenie surowiczego amyloidu A (SAA), czyli białka ostrej fazy związanego z rozwojem stanu zapalnego śródbrzońka, wykonano przy użyciu testu ELISA. Stężenie SAA nie różniło się między grupą otrzymującą 4PYR a kontrolną. Możliwym wyjaśnieniem braku korelacji pomiędzy progresją miażdżycy a stężeniem SAA w surowicy jest zakończenie podawania 4PYR 6 miesięcy wcześniej, przed zbadaniem tego wskaźnika (Praca A., Rycina 5.). Wynik wskazuje, że 6 miesięcy po otrzymaniu 4PYR u zwierząt nie obserwuje się stanu zapalnego śródbrzońka naczyniowego.



Rycina 5. Otrzymywanie 4PYR nie zmieniło stężenia surowiczego amyloidu A u myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}

Stężenie SAA w surowicy myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}, które otrzymały 4PYR i sól fizjologiczną było podobne.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=6), analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

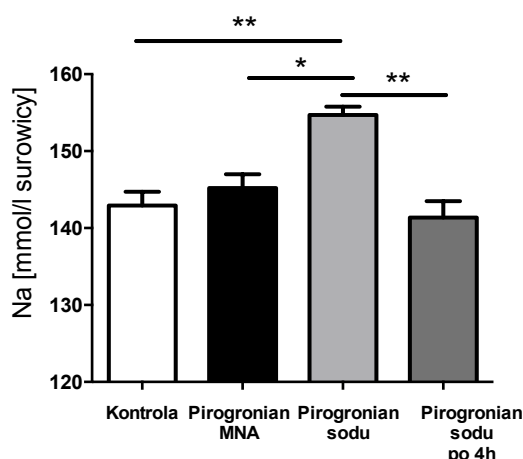
Na podstawie: „Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1β -D-ribonucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}”, Zabielska et al. *Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids*. 2016; 35:1-12; 720-725; Załącznik-Praca A.

Niniejsze wyniki wskazują na znaczący wpływ 4PYR na śródbłonek naczyniowy myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}. Wyniki wcześniejszych badań wykonanych w Katedrze i Zakładzie Biochemii na linii komórkowej śródbłonka (HMEC-1) po ekspozycji na 4PYR wykazały, znaczące zwiększenie aktywności eNTPD1 i e5'NT dopiero po 72 godzinach inkubacji, a obniżenie aktywności eADA1 już po 24 godzinach inkubacji z 4PYR. W poprzednich eksperymentach wykazano także brak wpływu na funkcję mitochondriów z jednoczesnym obniżeniem aktywności glikolizy po 72 godzinach inkubacji komórek śródbłonka z 4PYR. Przedstawione wyniki pracy doktorskiej uzupełniają wcześniejsze spostrzeżenia wskazując, że zmiana aktywności eADA1 wywołana 4PYR jest zmianą trwałą, w znaczący sposób zwiększając rozwój miażdżycy. W badaniach *in vivo* na myszach ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} określono również, że aktywność eADA1 może służyć jako potencjalny marker procesu miażdżycowego, a wzrost jej aktywności koreluje dodatnio z progresją miażdżycy na powierzchni naczynia.

7.2. Wpływ pirogronianu MNA na metabolizm i funkcję serca poddanego hipoksji

W badaniach szczepu myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} obserwuje się uszkodzenie kardiomiocytów po ekspozycji na zmniejszone stężenie tlenu w powietrzu. Takiego efektu nie zaobserwowano u myszy WT. Zbadanie wpływu pirogronianu MNA na metabolizm i funkcję serca poddanego hipoksji przeprowadzono u 7-miesięcznych samców myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}. Myszy podzielono na 4 grupy, które otrzymywały dożylnie odpowiednio: sól fizjologiczną (gr. kontrolna), 200mM pirogronian MNA, 200mM pirogronian sodu lub 200mM MNA.

Stężenie sodu we krwi zbadano za pomocą fotometrii płomieniowej 10 minut i 4 godziny po podaniu pirogronianu MNA i pirogronianu sodu (Praca B., Rycina 6.). Pirogronian sodu spowodował wzrost stężenia sodu o 12mM w stosunku do kontroli, co jest zgodne z obserwacjami innych naukowców. Po 4 godzinach od podania substancji, hipernatemii już nie obserwowano. Stężenie sodu w grupie otrzymującej pirogronian MNA nie wzrosło. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że zastosowanie nowej soli pirogronianowej jest w stanie skutecznie przeciwdziałać hipernatemii wywołanej podaniem pirogronianu sodu.



Rycina 6. Wzrost stężenia sodu 10 minut po podaniu pirogronianu sodu jest zniesiony 4 godziny od jego podania

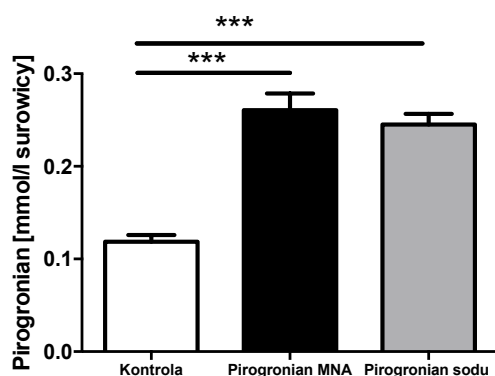
Stężenie sodu w surowicy myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} 10 minut po dożylnym podaniu odpowiednio: izotonicznej soli fizjologicznej, pirogronianu MNA, pirogronianu sodu oraz 4 godziny po podaniu pirogronianu sodu.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=7); **p*<0.05; ***p*<0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu ANOVA.

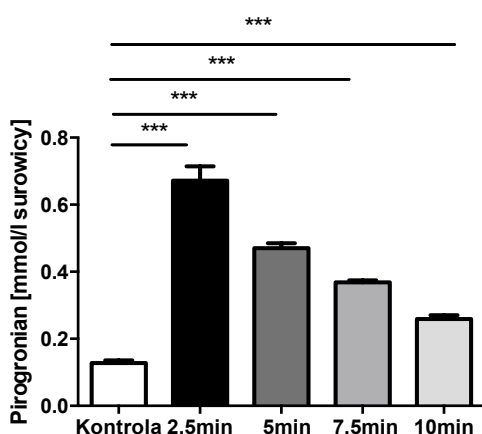
Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.

Nie zaobserwowano różnic w stężeniach pirogronianu w grupach otrzymujących pirogronian MNA i pirogronian sodu (Praca B., Rycina 7.a). Obserwowane obniżenie stężenia pirogronianu w surowicy wynika z szybkiego tempa metabolizmu pirogronianu (Praca B., Rycina 7.b).

a)



b)



Rycina 7. Stężenie pirogronianu w grupach otrzymujących pirogronian MNA i pirogronian sodu było podobne po 10 minutach od podania. Szybki metabolizm pirogronianu następuje wraz z czasem od podania substancji

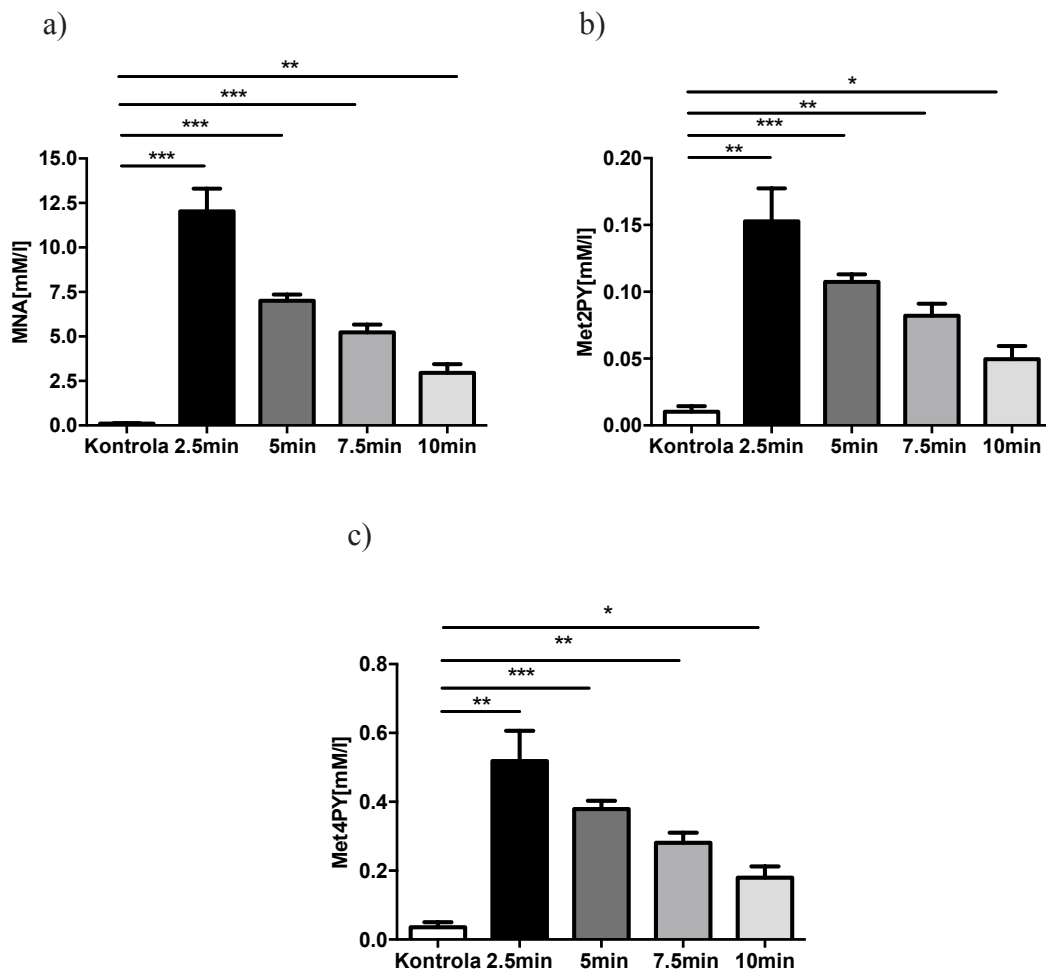
a) Stężenie pirogronianu w surowicy myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} 10 minut po dożylnym podaniu izotonicznej soli fizjologicznej, pirogronianu MNA i pirogronianu sodu,

b) Stężenie pirogronianu w surowicy myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} 2,5, 5, 7,5 i 10 minut po dożylnym podaniu pirogronianu MNA.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=7); ****p*<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu ANOVA.

Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.

Stężenie MNA i jego metabolitów zmierzono metodą LC-MS. Stężenie MNA i jego metabolitów (Met2PY i Met4PY) były istotnie wyższe w grupie otrzymującej pirogronian MNA w porównaniu do kontroli (Ryc. 8). Po 10 minutach od podania związku obserwowano nadal wysokie stężenie MNA, ale także szybki metabolizm MNA do jego metabolitów. Stężenia Met4PY i Met2PY znacząco malały od momentu podania pirogronianu MNA, jednak po 10 minutach były nadal dużo wyższe niż w grupie kontrolnej (Praca B., Rycina 8. a, b, c).



Rycina 8. Wzrost stężenia MNA i jego metabolitów: Met2PY i Met4PY w surowicy myszy obserwowano już 2,5 minutach od podania pirogronianu MNA. Stężenie MNA, Met2PY i Met4PY zmniejszały się w czasie od podania pirogronianu MNA, jednak w 10 minucie nadal były wyższe niż w grupie kontrolnej

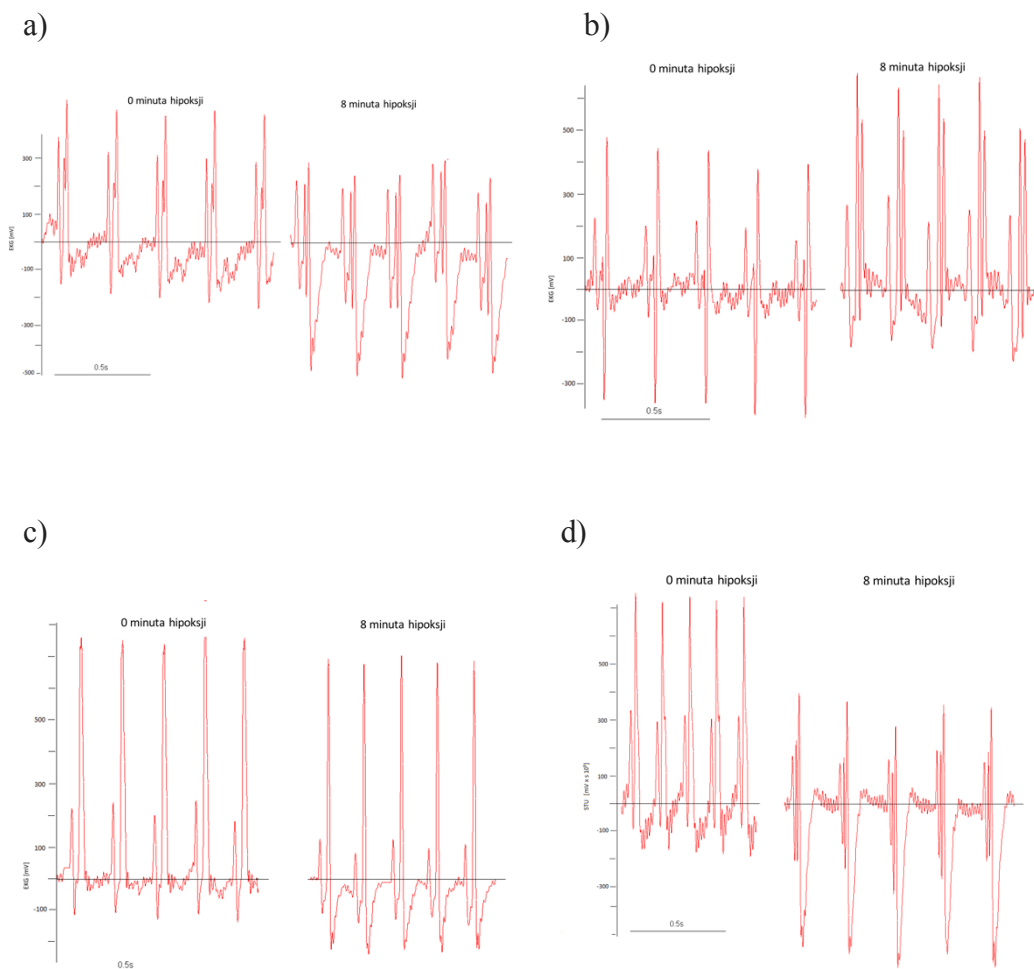
Stężenie a) MNA i metabolitów MNA b) Met2PY i c) Met4PY w surowicy myszy ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} po dożylnym podaniu pirogronianu MNA.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=7); **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu ANOVA.

Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.

Wpływ pirogronianu MNA na metabolizm i funkcję serca zbadano w eksperymentalnym modelu niedotlenienia serca. Niedotlenienie wykonane było 10 minut po rozpoczęciu testowanej interwencji farmakologicznej. Podczas stresu hipoksyjnego dopływ tlenu do komory hipoksyjnej, w której umieszczone były myszy, został zmniejszony w ciągu jednej minuty z 21% do 8% tlenu, a następnie 8% tlen utrzymywano przez 8 minut. Po 8 minut stresu hipoksyjnego zawartość tlenu w komorze została przywrócona do 21% i przeprowadzono 5 minutową reoksygenację monitorując ciągle stan zwierzęcia za pomocą EKG.

Efekt niedotlenienia u myszy manifestował się obniżeniem odcinka ST w EKG. Widoczne różnice zaobserwowano między grupami otrzymującymi pirogronian MNA i pirogronian sodu w porównaniu do grup traktowanych chlorkiem sodu i MNA. Pozytywny wpływ na pracę serca podczas niedotlenienia potwierdza brak zmian w obrazie EKG w grupach z pirogronianem (Praca B., Rycina 9.a, b, c, d). Zmiany w zapisie EKG polegające na obniżeniu odcinka ST uległy normalizacji natychmiast po ustąpieniu niedotlenienia. Prawidłowy obrazu EKG można było zaobserwować już po 5min od zakończenia niedotlenienia, co świadczy o odwracalności ischemii w tym modelu.



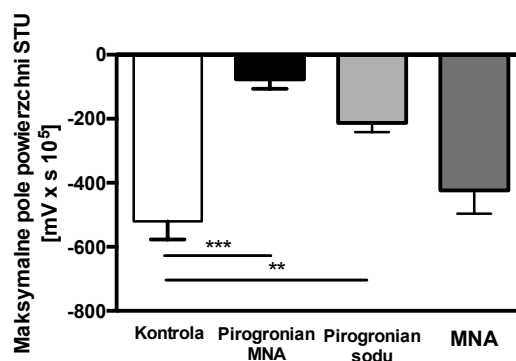
Rycina 9. Efekt niedotlenienia manifestowany był poprzez obniżenie odcinka ST w obrazie EKG. Myszy, które otrzymały pirogronian MNA i pirogronian sodu nie wykazywały zmian w odcinku ST w odpowiedzi na hipoksję tak znacząco, jak myszy kontrolne czy otrzymujące MNA

Zapis EKG myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} 10 minut po dożylnym podaniu odpowiednio:

a) izotonicznej soli fizjologicznej, b) pirogronianu MNA, c) pirogronianu sodu i d) MNA w 0 i 8-minucie hipoksji indukowanej redukcją tlenu w wentylowanym powietrzu.

Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.

Na podstawie analizy obrazów EKG badanych zwierząt możliwe było policzenie maksymalnego pola powierzchni STU w 8 minucie hipoksji. Zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie pola powierzchni STU u myszy, które otrzymały pirogronian MNA i pirogronian sodu w porównaniu do kontroli. Zastosowanie MNA nie miało wpływu na obraz EKG myszy (Praca B., Rycina 10.). Wyniki te świadczą o kardioprotekcyjnym wpływie pirogronianu w niedotlenieniu.



Rycina 10. Pole powierzchni STU w 8 minucie hipoksji było najmniejsze u myszy, które otrzymały pirogronian MNA oraz pirogronian sodu. Natomiast myszy otrzymujące MNA i sól fizjologiczną miały istotnie zwiększone pole powierzchni STU

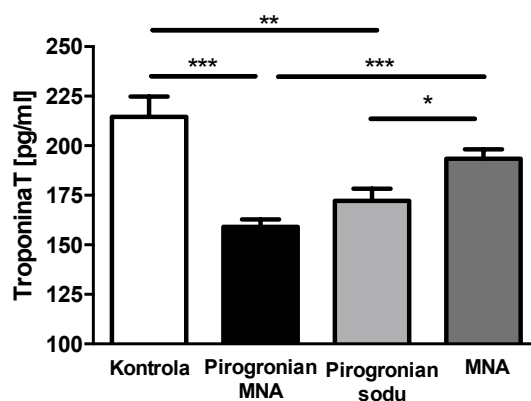
Maksymalne pole powierzchni STU myszy ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} 10 minut po dożylnym podaniu izotonicznej soli fizjologicznej, pirogronianu MNA, pirogronianu sodu i MNA w ósmej minucie hipoksji indukowanej redukcją tlenu w wentylowanym powietrzu.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=7); ***p*<0.01, ****p*<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu ANOVA.

Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.

Cztery godziny po niedotlenieniu zmierzono stężenie troponiny T w surowicy krwi. Myszy po infuzji pirogronianu MNA (o 20%) i pirogronianu sodu (o 10%) miały znacząco niższe stężenie troponiny T niż zwierzęta otrzymujące MNA i sól fizjologiczną. Uzyskane wyniki potwierdziły kardioprotekcyjny wpływ pirogronianu w niedotlenieniu serca (Praca B. Rycina 11.).

U tych zwierząt zmierzono także aktywność kinazy kreatynowej w surowicy. Była ona około 3-krotnie mniejsza w grupie, która otrzymała pirogronian MNA w porównaniu z grupą otrzymującą chlorek sodu (Praca B., Rycina 12.). Wyniki potwierdzają protekcyjne działanie pirogronianu MNA w modelu niedotlenionego serca. Połączenie pomiarów stężenia troponiny T i aktywności kinazy kreatynowej w surowicy doskonale koreluje z rozwojem niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia sercowego, w tym nawet niewielkich zmian wywołanych niedotlenieniem.

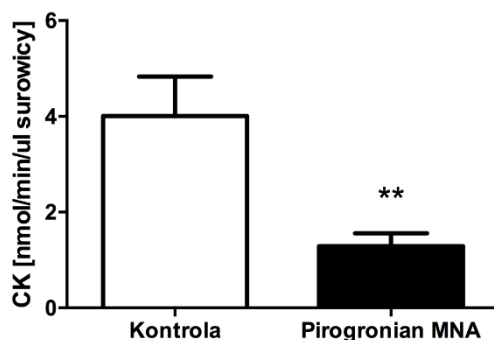


Rycina 11. Stężenie troponiny T w surowicy myszy, które otrzymały pirogronian MNA i pirogronian sodu było znacznie niższe niż w grupie zwierząt otrzymujących MNA

Stężenie troponiny T u myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} 4 godziny po dożylnym podaniu izotonicznej soli fizjologicznej, pirogronianu MNA, pirogronianu sodu oraz MNA i hipoksji indukowanej redukcją tlenu w wentylowanym powietrzu.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=7); **p*<0.05; ***p*<0.01, ****p*<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu ANOVA.

Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.



Rycina 12. Aktywność kinazy kreatynowej była istotnie mniejsza w grupie, która otrzymała pirogronian MNA

Aktywność kinazy kreatynowej u myszy ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} 4 godziny po dożylnym podaniu izotonicznej soli fizjologicznej oraz pirogronianu MNA i hipoksji indukowanej redukcją tlenu w wentylowanym powietrzu.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=7); ***p*<0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.

W pobranych od zwierząt sercach zbadano stężenia ATP, ADP, AMP. We wszystkich grupach zwierząt były one podobne. Co ciekawe, pirogronian MNA zwiększał stężenie PCr o 27%, a stosunek PCr/Cr o 19% w porównaniu do serc zwierząt kontrolnych, którym podano NaCl, czy MNA. Podobnie pirogronian sodu zwiększył stężenie PCr o 25% i współczynnik PCr/Cr o 18% w porównaniu do serc zwierząt

kontrolnych (otrzymujących NaCl lub MNA) (Praca B., Tabela 1.). Wyniki te są spójne z badaniami nad pozytywnym wpływem pirogronianu na metabolizm energetyczny serca.

Traktowanie	ATP [μmol/g suchej masy]	ADP [μmol/g suchej masy]	AMP [μmol/g suchej masy]	Fosfokreatyna [μmol/g suchej masy]	Kreatyna [μmol/g suchej masy]	PCr/Cr
Chlorek sodu	22,1±0,3	3,3±0,1	0,082 ± 0,008	27,2±1,1	11,4±0,5	2,2±0,1
Pirogronian sodu	23,6±0,3	3,2±0,2	0,095 ± 0,007	32,0±1,5*.#	12,3±0,7	2,6±0,2*
Pirogronian MNA	24,4±0,4	3,2±0,3	0,096 ± 0,012	32,8±0,8**.#	12,2±0,6	2,7±0,1**.#
MNA	21,6±0,3	2,9±0,2	0,081 ± 0,005	26,8±1,5	11,9±0,6	2,3±0,1

Tabela 1. Podanie pirogronianu MNA i pirogronianu sodu wpływało na wzrost stężenia fosfokreatyny i stosunku fosfokreatyna/kreatyna w sercach badanych myszy
Efekt podania chlorku sodu, pirogronianu sodu, pirogronianu MNA i MNA na metabolizm energetyczny serca.

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=6-7); *p<0.05 pirogronian sodu vs. chlorek sodu; **p<0.01 pirogronian MNA vs. chlorek sodu; #p<0.05 pirogronian sodu vs. MNA; ##p<0.01 pirogronian MNA vs. MNA, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

Na podstawie: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in experimental model of cardiac hypoxia”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Załącznik-Praca B.

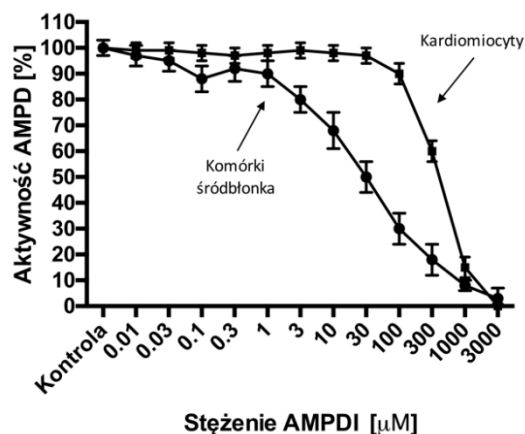
Zastosowanie pirogronianu MNA miało efekt kardioprotekcyjny w modelu niewydolności serca indukowanego hipoksją. Dzięki użyciu pirogronianu MNA nie zaobserwowano hipernatremii, którą wywoływało podanie pirogronianu sodu. Homeostaza energetyczna serca jest krytyczna dla utrzymania jego funkcji. Liczne badania potwierdziły skuteczność modulacji metabolicznej jako skutecznej terapii w chorobie niedokrwiennej serca. Aktywacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez podanie pirogronianu okazała się korzystna dla przywrócenia równowagi energetycznej serca poddanego hipoksji.

7.3. Zahamowanie aktywności deaminazy AMP w terapii chorób sercowo-naczyniowych.

Zastosowanie inhibitorów aktywności deaminazy AMP w terapii chorób sercowo-naczyniowych zostało szeroko omówione w Pracy C. Podczas badań zauważono, że zredukowana aktywność AMPD to skuteczny sposób na zwiększenie stężenia miejscowej i krążącej adenozyiny. Nukleozyd ten odgrywa rolę kardio- i naczynioprotekcyjną⁹¹. Adenozyina powoduje zwiększenie przepływu wieńcowego, tłumienie arytmii, generuje indukcję wstępnego przygotowania do niedokrwienia i supresję produkcji cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6 i TNF- α)⁹⁷. Kardioprotekcyjne działanie adenozyiny mediowane jest głównie przez receptory dla adenozyiny. Aktywacja tych receptorów uniemożliwia wydzielenie katecholamin, generowanie nadmiernego skurczu serca przy udziale receptora β -adrenergicznego i przeciążenia jonami Ca^{2+} ⁹⁸. Ochrona kardiomiocytów obserwowana była również, gdy adenozyina wytworzona została w tkance innej niż serce, a proces ten związany jest ze wstępnym „hartowaniem” serca przed niedokrwieniem i zachodzi on „na odległość”⁹⁹. W opozycji do wyżej wymienionych wyników stoją badania, gdzie stwierdzono, że adenozyina zaangażowana jest w indukcję transkrypcji prozapalnych cytokin podczas niedotlenienia i kumulację komórek zapalnych w stwardnieniu rozsianym¹⁰⁰.

W śródbłonku inhibicja aktywności AMPD doprowadzić może do wzrostu wytwarzania cytozolowej adenozyiny, jak również aktywacji AMPK, podobnie jak w innych typach komórek. Cytozolowa produkcja adenozyiny nie jest głównym szlakiem powstawania adenozyiny w śródbłonku, ale może uzupełniać adenozyinę powstającą na drodze zewnątrzkomórkowej. Adenozyina może przyłączać się na powierzchni śródbłonka lub receptorów adenozyinowych w innych typach komórek do zewnątrzkomórkowego receptora dla adenozyiny¹⁰¹. W proces ten zaangażowana jest cyklaza adenylanowa poprzez aktywację śródbłonkowych receptorów dla adenozyiny typu A2¹⁰². Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że adenozyina utrzymuje integralność tkanki poprzez zmniejszenie jej przepuszczalności i modulację układu odpornościowego¹⁰³. Co więcej zauważono, że podawanie adenozyiny do roztworu kardioplegicznego jest korzystne dla serca pacjenta poddanego operacji kardiologicznej i może mieć pozytywny wpływ podczas reperfuzji np. po zawale mięśnia sercowego^{100,104}. Najważniejszy efekt spowodowany był prawdopodobnie w połączeniu z poprawą funkcji śródbłonka.

Do leków blokujących aktywność AMPD i biorących udział w śródbłonkowym metabolizmie nukleotydów purynowych zalicza się dipirydamol, a także substancje wcześniej badane przez naszą grupę^{95,105}. Nasze dane eksperymentalne wskazują, że aktywność AMPD śródbłonka jest skuteczniej blokowana przy znacznie niższych stężeniach niż w kardiomiocytach (Praca C., Rycina 13.).



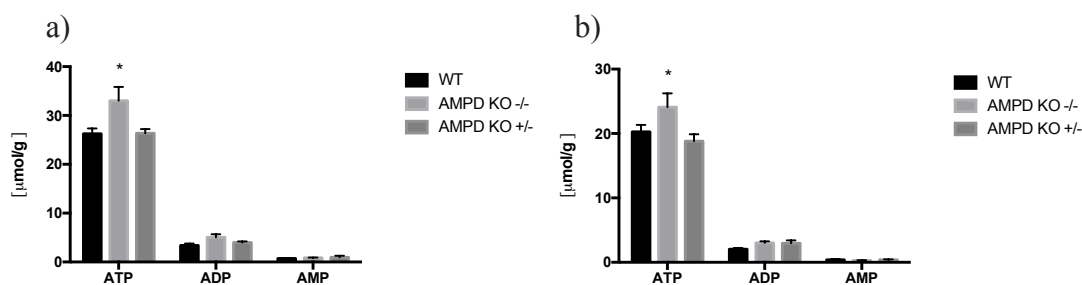
Rycina 13. Obniżenie aktywności deaminazy AMP jest skuteczniejsze w mniejszych stężeniach inhibitora na linii komórkowej śródbłonna w porównaniu do wyizolowanych kardiomiocytów

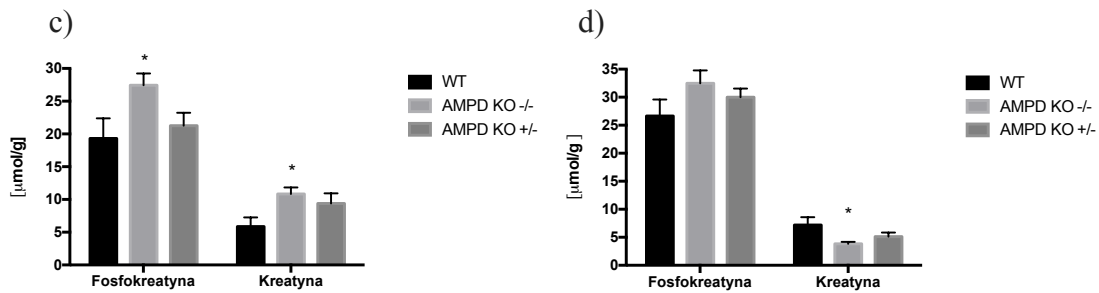
Związek między stężeniem inhibitora deaminazy AMP (AMPDI) 3-[2-(3-carboxy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaphthyl)ethyl]-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5d][1,3]diazepin-8-olu i aktywnością deaminazy AMP w komórkach śródbłonna i kardiomiocytach.

Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=3).

Na podstawie: „Inhibition of AMP deaminase as therapeutic target in cardiovascular pathology”, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2015; 67: 682-688; Załącznik-Praca C.

Ze względu na trudności w syntezie wydajnego inhibitora aktywności AMPD i na podstawie przesłanek literaturowych dotyczących lepszej funkcji serca u pacjentów z mutacją w genie kodującym AMPD, zdecydowaliśmy się na stworzenie genetycznego modelu zahamowania aktywności sercowej AMPD u myszy. Zbadaliśmy metabolizm energetyczny u myszy z częściowym (AMPD KO +/-) i całkowitym (AMPD KO -/-) zahamowaniem aktywności AMPD w normoksji jak i po niedotlenieniu. W stanie fizjologicznym myszy typu dzikiego (WT) charakteryzowały się niższymi stężeniami metabolitów energetycznych serca, a różnice te pogłębiały się po wykonaniu ischemii (dane nieopublikowane, Rycina 14.). Wyniki te wykazują wpływ inhibicji aktywności tego enzymu na metabolizm energetyczny serca w niedotlenieniu jak i w stanie fizjologicznym.





Rycina 14. W homogenatach serc myszy AMPD KO -/- i +/- zauważono znaczące podniesienie stężenia ATP i fosfokreatyny oraz tendencję do wzrostu stężenia ADP w normoksji w stosunku do serc zwierząt kontrolnych. Zaobserwowano także korzystny wpływ zahamowania aktywności AMPD na metabolizm energetyczny serc myszy z wyłączonym genem kodującym aktywność deaminazy AMP w hipoksji poprzez podniesienie stężenia ATP, fosfokreatyny i kreatyny w porównaniu do myszy typu dzikiego.

Metabolizm energetyczny serca myszy typu dzikiego (WT), AMPD KO -/- i AMPD KO +/- przed a), c) i po niedotlenieniu b), d).

Wyniki przedstawiono jako średnia±SEM (n=7); * $p < 0.05$, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu ANOVA.

Wyniki niepublikowane.

Podczas gdy zebrano istotne dowody potwierdzające korzyści hamowania AMPD w układzie sercowo-naczyniowym, konieczne są dalsze badania do rozwinięcia tej koncepcji. W kontekście użyteczności inhibitorów AMPD, śródbłonek może być najbardziej podatny na ich zastosowanie.

8. WNIOSKI

Z przeprowadzonych badań wchodzących w skład publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej wynikają następujące wnioski:

1. Podawanie 4PYR spowodowało zwiększoną akumulację lipidów w ścianie naczynia myszy, a także wzrost aktywności ekto-deaminazy adenozyiny 1 na powierzchni komórek śródbłonna, co świadczy o pro-miażdżycowym działaniu 4PYR.
2. Pirogronian MNA wpływa korzystnie na metabolizm energetyczny serca. Infuzja pirogronianu MNA nie powoduje hipernatremii (w przeciwieństwie do pirogronianu sodu). W eksperymentalnym modelu zawału serca indukowanym hipoksją u myszy, pirogronian MNA zapobiega powstawaniu zmian w EKG, a także obniża stężenie troponiny T i aktywność kinazy kreatynowej w surowicy.
3. Inhibitory deaminazy AMP skuteczniej hamują aktywność tego enzymu w komórkach śródbłonna w porównaniu z kardiomiocytami. Stężenie inhibitora deaminazy AMP ma istotny wpływ na typ komórek, na które inhibitor ten wywiera swój efekt. Delecja genu kodującego deaminazę AMP powoduje utrzymanie większej puli nukleotydów adeninowych w sercu poddanym hipoksji.

9. INTRODUCTION

9.1. Atherosclerosis and ischemic heart disease

Coronary heart disease and heart failure are leading causes of morbidity and mortality in patients around the world, with a significantly higher rate of occurrence in older populations. In the United States alone, the number of heart failure cases is projected to increase from 6.5 million to over 8 million cases by 2030 ¹. A prominent disease in this field is Myocardial ischemia, which occurs in the case of coronary blockages caused by atherosclerosis. Succinctly, atherosclerosis involves the formation of focal lesions of asymmetrical shape on the interior surface of blood vessels. These lesions consist of connective tissue elements, lipids, and inflammatory cells ². The cells of the immune system are involved in the formation of these atherosclerotic plaques, with the primary sources including monocytes, B and T lymphocytes, and dendritic cells. Monocytes are considered the largest contributors to these plaques, as they attach to the surface of damaged endothelium with a leukocyte receptor that is not expressed in normal endothelial cells. This receptor's induction occurs when turbulent blood flow induces oxidative stress in the vascular endothelium in the presence of adhesion and proinflammatory cytokines, angiotensin II, extracellular nucleotides, or low density lipoproteins (LDL) ³. This forms atherosclerotic plaques that grow over time, which may eventually occlude a significant percentage of the vessel's total cross sectional area and impinge on normal blood flow to produce hypoxic conditions of downstream organs ⁴. This plaque may also crack or erode, producing debris that could clog vessels and lead to further hypoxia⁵. This hypoxia contributes to disorders of oxidative phosphorylation, fatty acid metabolism, and carbohydrate oxidation. These disorders reduce high-energy phosphate recovery rate and cause an energy deficit in ischemic organs, leading to a rapid loss of contraction force and disturbances in myocardial ionic homeostasis ⁶.

9.2. Energy metabolism and nucleotide interconversions in the heart

9.2.1. Energy metabolism and nucleotide interconversions in the heart in the physiological conditions

The heart has a very high demand for energy but a very limited storage capacity for energy; the amount of ATP present in the heart is sufficient for approximately 12 heartbeats. Therefore, the heart must constantly produce large amounts of ATP to maintain contraction capacity and ion homeostasis ^{7,8}. Under normoxic conditions, 95% of ATP produced in the heart comes from oxidative phosphorylation, with the remaining 5% coming from substrate phosphorylation ^{9,10}. 60% to 70% of this generated ATP is consumed to perform mechanical work, but the heart maintains a pool of energy metabolites consists primarily of ATP and phosphocreatine (PCr)¹¹. PCr performs the transport function for high-energy phosphate and acts as an energy buffer. PCr is formed in the mitochondrial intermembrane space, where the energy of high-energy phosphate binding to ATP is transferred to creatine by mitochondrial creatine kinase. At lower molecular weights than ATP, PCr can diffuse faster into the cytosol into the vicinity of

the contractile apparatus. In the cytosol, PCr can be used to regenerate ATP from ADP with the involvement of cytosolic creatine kinase.

In a healthy resting heart, about 70% to 90% of ATP is formed by fatty acid oxidation, which preferentially targets oleic acid and palmitic acid as sources ¹². The remaining 10% to 30% usually comes from the oxidation of glucose, lactate, a small amount of ketone bodies, and certain amino acids ¹³. These proportions vary based on a multitude of factors. For instance, one study shows that after a meal, when plasma glucose and insulin levels increase, the glucose content in the production of ATP in the heart is increased ¹⁴.

Glucose is also metabolized in the heart, and is sourced from exogenous glucose or stored glycogen. The heart has a relatively small pool of glycogen ($\approx 30\mu\text{mol/g}$ wet weight, which is 20% of the skeletal muscle mass), but its rate of circulation is high. In the rat heart, glucose from glycogen can account for more than 40% of glucose-dependent ATP production ¹⁵. Figure 1 schematically depicts metabolic processes directed at the production of ATP from glucose and fatty acids.

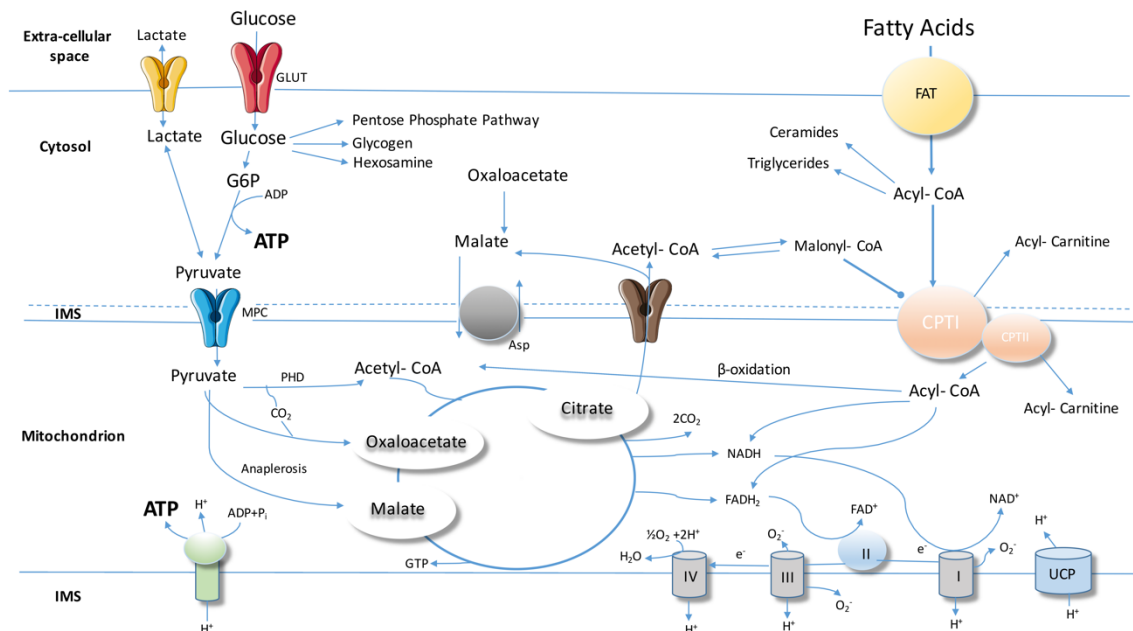


Figure 1. The energy metabolism in the heart

GLUT: glucose transporter; FAT: fatty acid transporter; MPC: mitochondrial pyruvate transporter.

Based on: „Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production”: Doenst et. al.; *Circ Res.* 2013; 113(6): 709–724.

Due to the high energy demand of the heart in a normal physiologic state, the activity and type of nucleotide basic transformations adapts to the workload of metabolic pathways associated with energy production. The enzymes involved in the synthesis of ATP (such as adenylate kinase, creatine kinase) but also ATP-consuming substrate (sodium-potassium ATPase, calcium ATPase or myosin ATPase) are the most active. In normoxia, when the heart is in the balance between the synthesis and energy consumption processes, the cytosolic concentration of major energetic metabolites of the myocardium are approximately the following: ATP 6-8mM, ADP 40 μ M, AMP 0.2 μ M and adenosine

0.05 μ M¹⁶. It has been observed that an increase in AMP concentration activates AMP catabolism via AMP deaminase (AMPD) and ecto-5'nucleotidase (e5'NT). The adenosine and inosine nucleosides formed as byproducts of this catabolism then pass into the extracellular space. Once outside of the cell, adenosine is captured by endothelial cell receptors (65%) and by transporters in the membrane of fibroblasts and cardiomyocytes (5%). The uncaptured remainder of adenosine escapes into the circulatory system¹⁷. The adenine nucleotide metabolism scheme is shown in Figure 2.

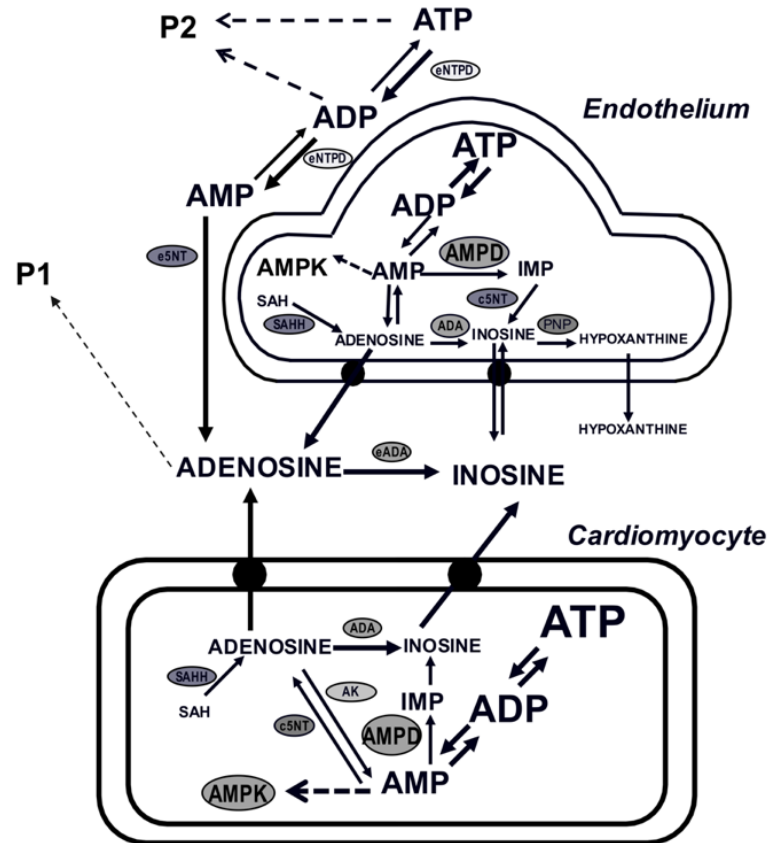


Figure 2. The nucleotide metabolism in the cardiovascular system

Based on: „Inhibition of AMP deaminase as a therapeutic target in cardiovascular pathology“, Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2015; 67; 682-688; Appendix-Paper C.

9.2.2. Energy metabolism and nucleotide interconversions in atherosclerosis and ischemic heart disease

Oxidative metabolism decreases in proportion to a decrease in oxygen supply. Furthermore, many studies have shown a reduction in the use of fatty acids in failing hearts¹⁸. During mild ischemia β -oxidation of fatty acids exceeds the oxidation of carbohydrates⁷. Interestingly, after the restoration of coronary blood flow (reperfusion), β -oxidation of fatty acids rapidly increases to the level before hypoxia, while glucose oxidation remains inhibited¹⁹. Although oxygen during reperfusion is no longer a limiting factor, preferred-oxidation of fatty acids may have many significant consequences during and after ischemia. It can, for example, contribute to the formation of intracellular acidosis, as well as further aggravation of intracellular $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ homeostasis²⁰. A larger

amount of ATP is required to correct and re-align ion gradients, which reduces the ATP pool available for contractile work²¹. Studies in rat models of heart failure with systolic dysfunction showed reduced levels of mRNA and protein expression of fatty acid transporters²². The rate of fatty acid oxidation and enzyme activity involved in this process was also found to be lower in the early stages of left ventricular hypertrophy. These results are also consistent with studies in rats with spontaneous hypertension caused by narrowing of the abdominal aorta. However, these changes are not observed in salt-sensitive Dahl rats and in rats with induced myocardial infarction²³. Clear evidence from animal models and humans shows a disturbance in the respiratory function of the mitochondria, which can be detected before the patient experiences systolic dysfunction. This may be the result of reduced ATP production in the heart.

In contrast to the results on fatty acid metabolism, data on the use of glucose as an energy source for the anoxic heart are less consistent. In the case of systolic dysfunction, it was found that glucose metabolism decreased in mice after aortic stenosis. Interestingly, it did not change in rats with myocardial infarction but increased in Dahl-sensitive rats sensitive to salt²⁴. After aortic stenosis in the rat, assessing the oxidation of the substrate at various time points, it was observed that the oxidation of glucose in the heart initially increased, did not change in hypertrophy and was decreased when systolic dysfunction occurred²⁵. Impairment of glucose oxidation, which is associated with systolic dysfunction, may be partially associated with mitochondrial dysfunction, reduced expression of genes involved in glycolysis and glucose oxidation, or reduced activity of PDH complex²⁶. Interestingly, it was found that rats with spontaneous hypertension at the stage of cardiac hypertrophy, but without advanced insufficiency, have a higher level of glucose oxidation or increased flow through the PDH complex as compared to control rats²⁷. In patients with idiopathic cardiomyopathy In the case of dilution, higher rates of glucose utilization have been demonstrated while reducing the use and oxidation of fatty acids^{28,29}. Therefore, it is possible that unlike changes in fatty acid oxidation, glucose oxidation does not correlate with the function of cardiac contractility in ischemic disease, and changes in glucose oxidation may depend on both the stage and the pathogenesis of this disease.

Studies have shown that energy metabolism disorders on the mitochondrial level result in disturbances in the mechanical function of the heart, particularly mitochondrial disorders such as the lack of efficient ATP synthesis, impaired transport of ATP from mitochondria to the cytosol, or interference with the processes of ATP consumption. In ischemia, ATP and phosphocreatine are consumed, and concentrations of ADP, AMP, and other adenylate metabolites increase. However, with prolonged hypoxia, the resynthesis of nucleotides is not possible, and as a result the concentration of adenosine and inosine increases. It was investigated that the concentration of adenosine (normally 0.5 μ M in cardiomyocytes and blood in physiological conditions) during hypoxia increases by more than 50-fold^{30,31}. Due to the high metabolic activity of the endothelial cells, even such high adenosine concentrations are efficiently transformed into further metabolites. Recent studies have shown that the progressive atherosclerotic process is characterized by a change in the profile of activity of extracellular enzymes involved in adenine nucleotide and adenosine metabolism³². Even before the onset of atherosclerotic

plaque, an increase in ectopic activity of ecto-adenosine deaminase 1 (eADA1) was observed. It was determined that the increased activity of eADA1 comes mainly from endothelial cells and macrophages. For this reason, this enzyme may be a very good marker of vascular endothelial activation and, consequently, inflammation.

One enzyme involved in the purine nucleotide metabolism with a significant impact on the circulatory system is e5'NT. It has been shown that inhibition of this enzyme activity causes the development of endothelial dysfunction due to the induction of inflammation. Activation of e5'NT enhancing endothelial protection may be another new treatment strategy ^{33,34}.

9.3. Modifications of energy metabolism and nucleotide interconversions as a therapeutic target in cardiovascular diseases

A new therapeutic approach in the treatment of atherosclerosis and ischemic heart disease may be "metabolic modulation". In order to reduce the effects of ischemic heart disease, it is possible to optimize energy metabolism using metabolic modulators, which primarily results in improved cardiac systolic function. Several therapeutic approaches can be proposed: modifications of purine metabolism, stimulation of glucose oxidation and/or inhibition of fatty acid oxidation ³⁵.

Ecto-diphosphohydrolase 1 (eNTPD1), e5'NT and eADA1 play a key role in extracellular nucleotide metabolism on the vascular wall surface ³⁶. Changes in enzyme activity contribute to the development of inflammation on the surface of blood vessels and, consequently, atherosclerosis ³⁷. It has been investigated that eADA1 activity is stimulated by factors known as pro- atherosclerotic, such as some fatty acids (caprylic, palmitic, erucic, oleic acid) and proinflammatory cytokines (IL-6, LPS). eADA1 inhibition is possible by polyunsaturated fatty acids (linolenic acid, DHA), statins (atorvastatin), flavonoids (kaempferol) or MNA. Research conducted at the Department of Biochemistry GUMed showed that inhibition of eADA1 activity of deoxycoformycin in an experimental model of atherosclerosis using the ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice caused a significant slowdown in the development of atherosclerosis ³².

The protective role of e5'NT was demonstrated in valvular calcification, atherosclerosis, rejection after xenotransplantation and venous thrombosis ^{38,39,40}. Decreased e5'NT activity due to contact of lymphocytes with endothelium increases its permeability, which leads to increased leukocyte transmigration. Activation of e5'NT may, therefore, have a protective function in a number of cardiovascular pathologies. This effect has been confirmed for some drugs, such as statins, and may be part of its pleiotropic activity ⁴¹. Metabolic modulation of the heart is possible using several pharmacological therapies ⁴². Studies have shown that a very good therapeutic approach in patients with ischemic heart disease is a reduction in the use of free fatty acids ⁷. When the concentration of free fatty acids in the circulation is high, oxidation of glucose and pyruvate decreases ³⁵. As a result, pyruvate is transformed into lactate and released from the heart. Conversely, a decrease in the concentration of free fatty acids in the plasma, or a direct inhibition of their oxidation, increases the oxidation of pyruvate and improves the mechanical function of the heart ¹².

There are several drugs that inhibit the oxidation of fatty acids, stimulate the use of glucose, including both glycolysis and glucose oxidation. Trimetazidine and ranolazine work by inhibiting thiolase-1. Trimetazidine selectively inhibits the thiolase activity of 3-ketoacyl-CoA, the last enzyme in the oxidative chain. It has been experimentally shown that it reduces ST elevation in ligation of coronary arteries of rabbit heart and has cardioprotective properties in *in vitro* ischemia models⁴³. In patients with heart failure, trimetazidine has a beneficial effect on the mechanical function of the heart and improves the work of the left ventricle. Trimetazidine produces an increase in the PCr/ATP ratio, which allows high energy levels to be maintained in the heart⁴⁴. Trimetazidine has been registered in many countries as an anti-ischemic drug for the treatment of angina pectoris⁴⁵. Studies have shown that better tolerated by the body ranolazine works similarly. In both *in vitro* and *in vivo* experimental studies, cardioprotective activity in ischemia and reperfusion was observed⁴⁶. In patients with ischemic heart disease, the beneficial effects of ranolazine on improving their physical performance were observed without changing the parameters of contractility or heart rate⁴⁷.

The inhibition of carnitine palmitoyltransferase (CPT) seemed to be a good experimental approach. This enzyme has two isoforms: CPT1 and CPT2 located in the mitochondria (on the outer and inner membranes, respectively). However, CPT-oxfenicine, etomoxir and perhexiline inhibitors were not introduced as medicines due to side effects^{48,49}.

Another interesting approach to modulation of metabolism by increasing glucose oxidation is the activation of pyruvate dehydrogenase (PDH). PDH is a complex located in the mitochondrial matrix and catalyzes the irreversible decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA and NADH. For proper comprehensive regulation, the enzyme E1- α subunit acts as an on/off switch that is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. In various cell types, one of the pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK) isoforms can phosphorylate this subunit leading to inactivation of PDH. A known inhibitor of PDHK is dichloroacetate, which as a result of its action lowers lactate by activating this complex. In experimental studies, it has been shown that dichloroacetate has greatly improved the dysfunctional mechanical function of the heart after ischemia⁵⁰. Unfortunately, millimolar therapeutic concentrations and short half-life of pyruvate and dichloroacetate after oral and intravenous administration limit their use in practice⁵¹.

L-carnitine is a naturally occurring compound that transports long-chain fatty acids into the mitochondria. It was noted that reduced L-carnitine concentration increases glucose oxidation with increasing activity of pyruvate dehydrogenase complex⁵². It has been observed that β -oxidation of fatty acids in the heart is also affected by L-carnitine analogues, such as, for example, propionyl L-carnitine⁵³. It has also been clinically demonstrated that both L-carnitine and propionyl L-carnitine prevent the effects of ischemia. During exercise tests in patients with coronary artery disease, both compounds showed a reduction in ST depression and left ventricular end-diastolic pressure, which is why they have been effective anti-angina agents. In addition, cardioprotective effects of L-carnitine were observed after bypass surgery and after acute myocardial infarction⁵⁴.

The new drug substance is meldonium (trimethylhydrazine propionate), which inhibits the hydro-butyrobetaine hydroxylase activity⁵⁵. It works by lowering L-carnitine concentration, impairing the transport of fatty acids and thus forcing increased glucose

metabolism. Due to the lack of appropriate clinical trials, meldonium is available only in Lithuania, where it is used by athletes as doping to increase performance ⁵⁶.

Another possibility of indirect modification of the energy metabolism of the heart is the inhibition of the activity of the sodium-potassium pump (Na^+/K^+ ATPase), thereby increasing the activity of the sarcoplasmic calcium pump (SERCA2a). This results in increased calcium uptake into the sarcoplasmic reticulum and lowering the concentration of calcium available for diastole. The energy benefit of this effect is due to the lower use of ATP required to remove calcium from the cytoplasm by SERCA 2a than through the sarcoplasmic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ion exchanger. The drug acting on this principle is istaroxime but its use requires further clinical trials ⁵⁷.

In turn, Omecamtiv Mecarbil is a direct activator of the cardiac myosine ATPase, also inhibits the activation of secondary messengers and is involved in the regulation of calcium ⁵⁸. Studies have shown that Omecamtiv Mecarbil has a strongly positive inotropic effect without increasing oxygen consumption and stressing the failing heart, which results in very promising drug candidate ⁵⁹.

Bendavia has a peptide structure and is a compound directed against cardiolipin. Cardiolipin is a phospholipid found in the mitochondrial membrane and a key cofactor that stabilizes the components of the respiratory chain ⁶⁰. Bendavia functions by reducing the permeability of pores in the mitochondria and also lowering the formation of reactive oxygen species. In animal models of myocardial ischemia caused by ligation of the anterior interventricular branch (LAD), Bendavia successfully regenerated mitochondrial energy metabolism, reducing ischemia and reperfusion injury. There are plans for clinical trials in patients with myocardial infarction characterized by an elevation of ST segment ⁶¹.

Another approach in cardiology is the study of drugs related to the modulation of the transcriptional activity of proteins involved in lipid metabolism. Receptors activated by peroxisome proliferators (PPARs) and estrogen receptors (ERRs) are induced by the interaction of PPAR- γ with coactivators-1 (PGC-1). PGC-1 α binds to and co-activates PPAR α and ERR α , leading to an increased ability to capture and oxidize fatty acids. Recently, it has been discovered that PGC-1 β may also play an important role in the regulation of cardiac energy metabolism since PGC-1 proteins are potent activators of mitochondrial biogenesis. This effect is associated with the induction of nuclear respiratory factor 1 and the mitochondrial factor A. The activity of PGC-1 α is strongly regulated both at the level of expression and by post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation or methylation ⁶².

Another inotropic avenue is modulating the energy metabolism of the heart. Metformin does this by activating AMP-dependent protein kinase (AMPK). AMPK is another important mediator of metabolic adaptation which increases ATP production and inhibits energy-intensive biosynthetic pathways under ischemic conditions ⁶³. AMPK activation occurs when the AMP/ATP ratio is increased under hypoxic conditions as a result of AMP phosphorylation. AMPK increases the production of ATP by intensively stimulating both fatty acid oxidation, and glucose import and glycolysis. AMPK also slows down ATP consuming processes, such as lipid and protein synthesis. In addition,

AMPK can also improve heart energy in the long term by activating PGC-1 α , which leads to increased mitochondrial biogenesis⁶⁴.

One of the main directions of research in experimental cardiology is the search for new protective drugs for endothelium and cardiomyocytes. The research presented in this doctoral thesis focuses on the study of selected compounds affecting the energy metabolism of the heart in the state of ischemia. The effect of 4PYR on the vascular endothelium in atherosclerosis, MNA pyruvate on hypoxia metabolism and heart function, and analysis of the effect of AMP deaminase (AMPD) inhibitors on cardiovascular cells was investigated.

9.3.1. 4-pyridone-3-carboxamide-1- β -D-ribose (4PYR)

4PYR is a modified nucleoside formed in a reaction catalyzed by aldehyde oxidase and its precursor is nicotinamide riboside. Although it was discovered in 1979, only recently its nucleotide derivatives have been identified: mono-, di- and triphosphates (4PYMP, 4PYDP, 4PYTP), as well as the NAD-4PYRAD analogue⁶⁵. In healthy people, the concentration of 4PYR in plasma is $0.013 \pm 0.006 \mu\text{mol} / \text{l}$, while urinary excretion is $26.7 \pm 18.2 \mu\text{mol} / 24\text{h}$ ⁶⁷. Nucleosides excreted in the urine may be a marker of various pathologies, changes in 4PYR concentration were observed in the course of neoplastic diseases such as acute lymphoblastic leukaemia, ovarian cancer or malignant mesothelioma^{68,69,70,71}. It was observed that the concentration of 4PYR in plasma allows determining the prognosis for AIDS patients⁷². An interesting observation is an over 40-fold increase in the concentration of this compound in the plasma of people with chronic kidney disease compared to healthy people. The toxicity of this compound to the cardiovascular system was determined during the research conducted at the Department of Biochemistry of GUMed. Already during the first experiments using isolated erythrocytes, the effect of 4PYR on energy metabolism was noticed. Interestingly, a similar effect was observed in *in vitro* studies during long-term exposure of endothelial cells (HMEC-1) to 4PYR, when the cells had a significantly lower concentration of ATP and NAD^{73,74}. *In vivo*, the effect of 4PYR on endothelial-dependent muscle contraction was studied. Observations of the femoral artery after exposure to 4PYR, confirmed the endothelial toxicity of this compound. 4PYR during short perfusion of the heart did not affect the coronary flow, mechanical function or energy metabolism of the heart. However, prolonged exposure to this compound resulted in impairment of vascular endothelial function by reducing the ability of blood vessels to contract. Interesting results have been obtained in studies of isolated rat cardiomyocytes using erythrocyte lysates as well as in rat heart homogenate where weak inhibition of AMPD activity was observed after 4PYR treatment. Only longer incubation time showed significant inhibition of AMPD activity⁷⁵.

This dissertation specifies the influence of 4PYR on the size of vascular pathological changes and the activity of ecto-enzymes on the metabolism of nucleotides and adenosine on the surface of the mouse aorta in the experimental model of atherosclerosis.

9.3.2. MNA pyruvate

The heart physiologically has "metabolic flexibility" that allows to switch between the oxidation of fatty acids and carbohydrates. Preferences change depending on the heart load, body's nutritional status and hormonal balance. For example, the increase in fatty acid oxidation in the heart is accompanied by a sharp decrease in the oxidation of glucose-derived pyruvate and vice versa ⁷⁶. This metabolic flexibility enables the heart to produce the necessary amount of ATP needed to maintain cardiac contractility despite energy scarcity. In human, dog or pig serum, pyruvate is found at a concentration of about 0.2mM ⁷⁸. Despite the low circulating concentration of pyruvate, the heart is highly functionally and metabolically reactive in terms of exogenous pyruvate, which increases the energy metabolism of cardiomyocytes and their contraction efficiency ⁷⁹. Significant elevation serum concentration of pyruvate (2-10mM) increases cardiac output and reduces the left ventricular end-diastolic pressure. Pyruvate also supports Ca²⁺ transport in the sarcoplasmic reticulum to alleviate reversible and irreversible damage of the myocardium. Moreover, an increase in the concentration of pyruvate increases the NAD/NADH ratio by lactate dehydrogenase (LDH) reaction ⁸⁰. Exogenous pyruvate has been shown to be coupled with glutathione as an antioxidant after ischemia ⁸¹. The studies have shown that pyruvate improves cardiac systolic function due to its properties in normoxia, hypoxia as well as hypoxia ⁷⁶. The main problem in the clinical use of pyruvate is its high therapeutic concentration, which could only be obtained by intravenous/arterial injection directly to the coronary vessels in coronary artery bypass surgery. The tested sodium pyruvate administered in such high doses caused hypernatremia. The newly synthesized salt made from pyruvate and N-1-methyl-nicotinamide (MNA)– MNA pyruvate- may be an alternative solution, eliminating the above problems.

MNA is the main metabolite of nicotinamide ⁸². Cytosolic enzyme nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) catalyzes N-methylation of nicotinamide (NA) dependent on S-adenosylmethionine (SAM), resulting in N-1-methylnicotinamide (MNA) and S-adenosylhomocysteine (SAH) ⁸³. The effect of MNA was tested in many experimental systems. During the studies, MNA has been shown to have anti-inflammatory activity in rosacea ⁸⁴. MNA also has a protective effect on blood vessels in animals with hypertriglyceridemia and diabetes. Administration of MNA increased the survival rate of animals ⁸⁵. In other studies, it was noted that in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice, the development of vasculitis and atherosclerosis was inhibited by stimulation of MNA production by increasing NNMT activity. These mice were characterized by improved endothelial function in the PGI₂ and NO-mediated response, suppressed platelet activation, and reduction of systemic inflammation ⁸⁶. During experiments conducted at the Department of Biochemistry of GUMed study using cardiac homogenates and isolated rat cardiomyocytes, MNA exhibited AMPD-inhibitory activity, but not completely. In studies of the pharmacokinetics of MNA, it was noted that it is rapidly excreted in the urine. It seems that in the light of the data presented, the MNA pyruvate salt may be a promising candidate for a new therapeutic for use in for example ischemic heart disease. In the presented dissertation, the influence of MNA pyruvate on the metabolism and function of the hypoxic heart was examined.

9.3.3. AMP deaminase (AMPD)

AMPD is an enzyme that converts AMP to IMP and ammonia⁸⁷. AMPD is an enzyme that competes with the cytosolic 5'-nucleotidase (e5'NT) of AMP. Adenosine, a e5'NT product, dilates blood vessels, counteracts the ionotropic effect of catecholamines, acts as an antiplatelet, anti-inflammatory and immunosuppressive agent^{88,91}. During the tests, it was also shown to be cardioprotective in acute hypoxia of the heart^{90, 89}. The AMPD/e5'NT ratio determines the amount of adenosine produced in the adenine nucleotide catabolism pathway⁹¹. Inhibiting AMPD activity can change this ratio, resulting in increased production of adenosine. In addition to the potential effects on adenosine production, elevation of AMP, e.g. by inhibiting AMPD activity, may also lead to AMPK activation with many further consequences including increased energy metabolism, mitochondrial biogenesis and cytoprotection⁹². While the benefits of these processes are extensively studied in cardiomyocytes, the role of AMPD in endothelial protection may be even more important. The use of AMPD activity inhibition is limited due to difficulties in obtaining compounds with an appropriate bioavailability^{93,94}. According to research conducted at the Department of Biochemistry, the strongest synthesized inhibitor of AMPD activity is the compound 3-[2-(3-carboxy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaphthyl)ethyl]-3,6,7,8-tetrahydroimidazo [4,5-d][1,3]diazepin-8-ol, called TET1. The weaker inhibitors of this enzyme are caffeine, MNA, 4PYR, and purine riboside. TET1 administered intravenously to ApoE^{-/-}LDLr^{-/-} mice during experimental hypoxia resulted in lowering the ST segment in the ECG picture and reducing the release of troponin I from the heart. An interesting observation in the experimental model of myocardial ischemia with MNA administration was improved diastolic function and reversal of the collagen structure changes of the failing heart^{95,96}.

The aim of this doctoral thesis was to analyze the possibility of using inhibitors of AMP deaminase activity in the treatment of cardiovascular diseases.

10. AIMS

The aim of this study was to investigate the effect of modifications of nucleotide changes and energy metabolism in experimental models of atherosclerosis and ischemic heart disease.

The detailed objectives of the work included:

1. Determination of the effect of 4PYR on the scale of vascular pathological changes and the activity of ecto-enzymes on the metabolism of nucleotides and adenosine on the surface of the mouse aorta in the experimental model of atherosclerosis.
2. Investigation of the effect of MNA pyruvate on the hypoxic metabolism and function of the heart.
3. Inhibition of AMP deaminase activity in the treatment of cardiovascular diseases

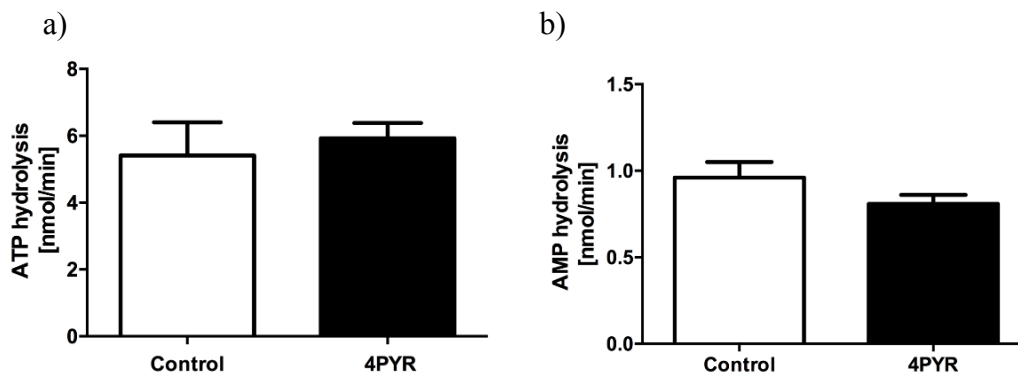
11. THE MOST IMPORTANT RESULTS

11.1. Extracellular transformations of adenine nucleotides and adenosine on the vascular surface covered by the atherosclerotic process in mice receiving 4PYR

Previous *in vitro* studies showing that 4PYR induced a cytotoxic effect in HMEC-1 cells resulted in a decrease in intracellular concentrations of NAD and ATP. It should be mentioned here that endothelial dysfunction was previously observed in mice after 7 day 4PYR infusion. Endothelium-dependent diastolic relaxation was significantly lower in the group of mice receiving 4PYR compared to the control group.

One of the objectives of the research conducted in this doctoral thesis was to determine the effect of 4PYR on the vascular endothelium in the perspective of several months after its application. Male ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice at two months of age who have not yet developed atherosclerosis were injected for one month every 12h in the skin fold in the neck region with 100µl of 50mM 4PYR solution, with saline injected in the same manner in another population of mice as a control group. Throughout the experiment, mice were fed a standard diet for laboratory animals.

The experiment was terminated 6 months after the last 4PYR administration (8 months old mice). The activity of ecto-enzymes in the metabolism of nucleotides and adenosine was examined on the surface of the abdominal aorta of ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice. In order to identify ecto-enzymes responsible for the metabolism of nucleotides and adenosine, measurements of the concentration of reaction products in the presence of inhibitors of individual enzymes were performed in previous studies. Previous experiments, as well as the results contained in this doctoral dissertation, have shown that both in vessels affected by atherosclerosis and control vessels, ATP hydrolysis takes place mainly with the participation of eNTPD1, hydrolysis of AMP with the participation of e5'NT and degradation of adenosine with the participation of ADA1. After 4PYR treatment, no differences were observed during incubation of the aorta with ATP or AMP, suggesting that the eNTPD1 activities (Paper A, Figure 3.a) and e5'NT (Paper A, Figure 3.b) did not differ in the study groups. However, a significant increase in inosine concentration after incubation with adenosine has been demonstrated in the vessels of animals receiving 4PYR in comparison to the vessels of control animals. eADA1 activity increased by approximately 50% in the 4PYR group compared to the control (Paper A, Figure 3.c). The obtained results indicate that the damaged endothelium is not regenerated even 6 months after administration of 4PYR.



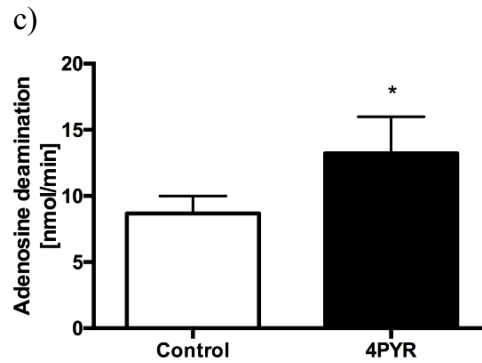


Figure 3. The aortic surface of ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice that received 4PYR is characterized by an increase in the rate of deamination of adenosine and unchanged activity associated with the hydrolysis of ATP and AMP

The activity of extracellular adenine nucleotide transformation enzymes: a) ATP hydrolysis, b) AMP hydrolysis) and c) adenosine deamination, on the abdominal aorta of ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice in the 4PYR group and control group.

Values represent mean±SEM (n=5-7), **p*<0.05, comparison of the means was done by Student's *t*-test.

Based on: „Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1β -D-ribose nucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}”, Zabielska et al. Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids. 2016; 35:1-12; 720-725; Appendix-Paper A.

The concentration of lipids on the vessel surface of the test animals was determined using ORO staining. In the aortas of mice receiving 4PYR, the absorption of the dye was observed compared to the aorta of control mice, indicating an increased area of atherosclerotic plaque in the abdominal region. The positive correlation between increased eADA1 activity and ORO concentration in mice receiving 4PYR for one month provides further evidence that vascular endothelium in this group has been irreversibly damaged and is more susceptible to atherosclerosis (Paper A., Figure 4.).

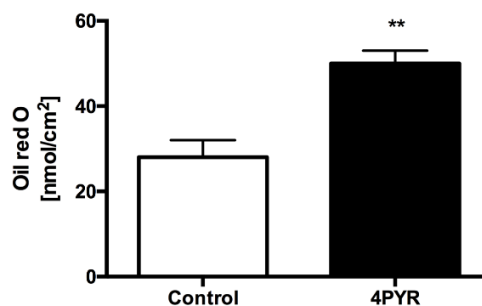


Figure 4. Higher lipid concentration on the aortic surface of ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice in the group that received 4PYR

Oil Red O staining on the abdominal aorta of ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice in the 4PYR and control group.

Values represent mean±SEM (n=6), ***p*<0.01, comparison of the means was done by Student's *t*-test.

Based on: „Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1β -D-ribose nucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}”, Zabielska et al. Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids. 2016; 35:1-12; 720-725; Appendix-Paper A.

The determination of serum amyloid A (SAA), an acute phase protein associated with the development of endothelial inflammation, was performed using the ELISA test. The concentration of SAA was not different between the 4PYR and control group. A possible explanation for the lack of correlation between atherosclerosis progression and SAA serum concentration is the end of 4PYR administration 6 months earlier prior to testing this indicator (Paper A., Figure 5.). The result indicates that 6 months after receiving 4PYR in animals no inflammation of the vascular endothelium is observed.

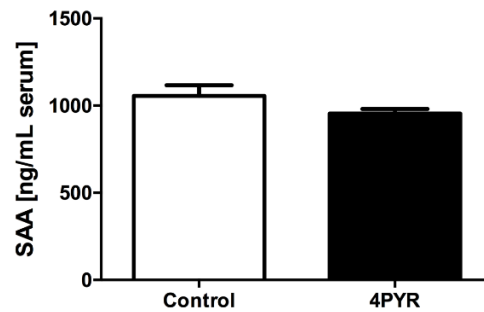


Figure 5. 4PYR production did not change the serum amyloid A concentration in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice

The concentration of SAA in the serum of ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice that received 4PYR and saline was similar.

Values represent mean±SEM (n=6), comparison of the means was done by Student's *t*-test.

Based on: „Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1β-D-ribose on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}”, Zabiłska et al. Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids. 2016; 35:1-12; 720-725; Appendix-Paper A.

These results indicate a significant effect of 4PYR on the vascular endothelium of the ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice. The results of previous studies performed at the Chair and Department of Biochemistry on HMEC-1 cells after exposure to 4PYR showed a significant increase in eNTPD1 and e5'NT activity after 72h incubation and a decrease in eADA1 activity after 24h incubation with 4PYR. In previous experiments, it was also shown that there was no effect on the function of mitochondria with a simultaneous decrease in glycolysis after 72h of incubation of endothelial cells with 4PYR. The presented results of the doctoral thesis complement the previous observations indicating that the change in eADA1 activity caused by 4PYR is a permanent change, significantly increasing the development of atherosclerosis. *In vivo* studies in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice were also determined that eADA1 activity may serve as a potential marker of the atherosclerotic process and the increase in its activity correlates positively with the progression of atherosclerosis at the surface of the vessel.

11.2. Effect of MNA pyruvate on the metabolism and function of the hypoxic heart

In studies of ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} mice, cardiomyocytes damage is observed after exposure to a reduced oxygen concentration in the breathing air. This effect was not observed in WT mice. The study of the effects of MNA pyruvate on the metabolism and function of the heart undergoing hypoxia was performed in 7 month old male ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} mice. Mice were divided into 4 groups, which received intravenously respectively: physiological saline (control group), 200mM MNA pyruvate, 200mM sodium pyruvate, or 200mM MNA.

The concentration of sodium in the blood was examined by flame photometry 10min and 4h after administration of MNA pyruvate and sodium pyruvate (Paper B., Figure 6.). Sodium pyruvate caused an increase in the sodium concentration of 12mM compared to the control, which is consistent with the observations of other scientists. 4h after the administration of sodium pyruvate, the sodium concentration change was no longer observed. The sodium concentration in the MNA pyruvate group did not increase. These results support the hypothesis that the use of the new pyruvate salt is able to effectively counteract the hypernatremia induced by the administration of sodium pyruvate.

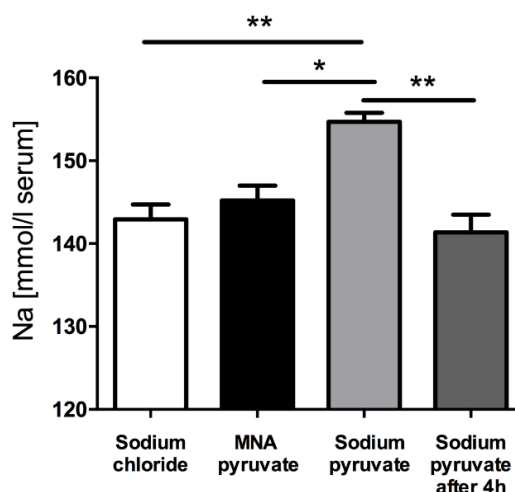


Figure 6. An increase in sodium concentration 10 minutes after administration of sodium pyruvate abolished 4h after its administration

Serum sodium concentration of ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} mice 10 minutes after intravenous administration of isotonic saline, MNA pyruvate, sodium pyruvate and 4 hours after sodium pyruvate administration, respectively.

Values represent mean±SEM (n=7); **p*<0.05; ***p*<0.01, ****p*<0.001, comparison of the means was done by ANOVA.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

No differences were observed in the concentrations of pyruvate in the groups receiving MNA pyruvate and sodium pyruvate (Paper B., Figure 7.a). The observed decrease in serum pyruvate concentration results from the rapid rate of pyruvate metabolism (Paper B., Figure 7.b).

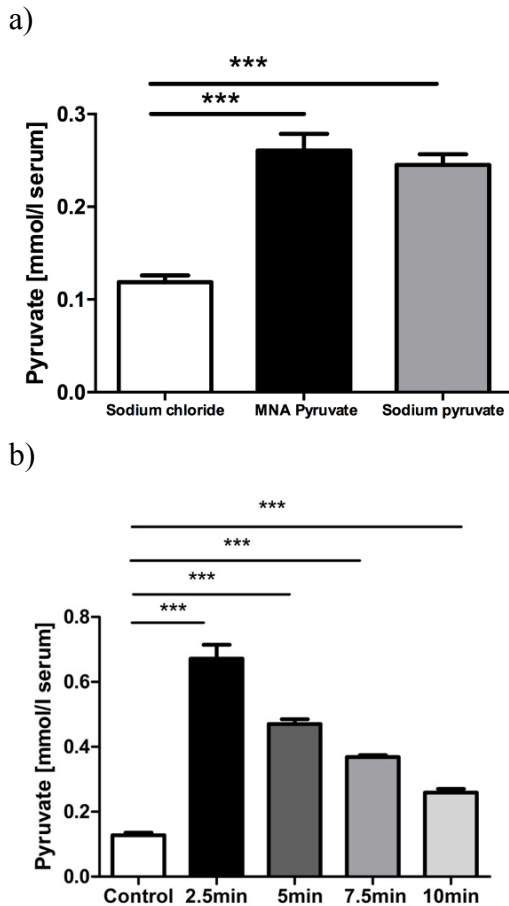


Figure 7. The concentration of pyruvate in the groups including MNA pyruvate and sodium pyruvate was similar after 10 minutes after administration. The rapid metabolism of pyruvate occurs over time with substance administration

- a) Serum pyruvate concentration of ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} mice 10 minutes after intravenous administration of isotonic saline, MNA pyruvate and sodium pyruvate,
 b) Concentration of pyruvate in the serum of ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} mice 2.5, 5, 7.5 and 10 minutes after intravenous administration of MNA pyruvate.

Values represent mean ± SEM (n=7); ***p<0.001, comparison of the means was done by ANOVA.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

The concentrations of MNA and its metabolites were measured by LC-MS. The concentrations of MNA and its metabolites (Met2PY and Met4PY) showed a significant increase in the MNA pyruvate group compared to controls. After 10min from the administration of the compound, a high concentration of MNA was observed, but also a rapid metabolism of MNA to its metabolites. The concentration of Met4PY and Met2PY during the time of administration of MNA pyruvate significantly decreased, however after 10min they were still much higher than in the control group (Paper B., Figure 8. a, b, c).

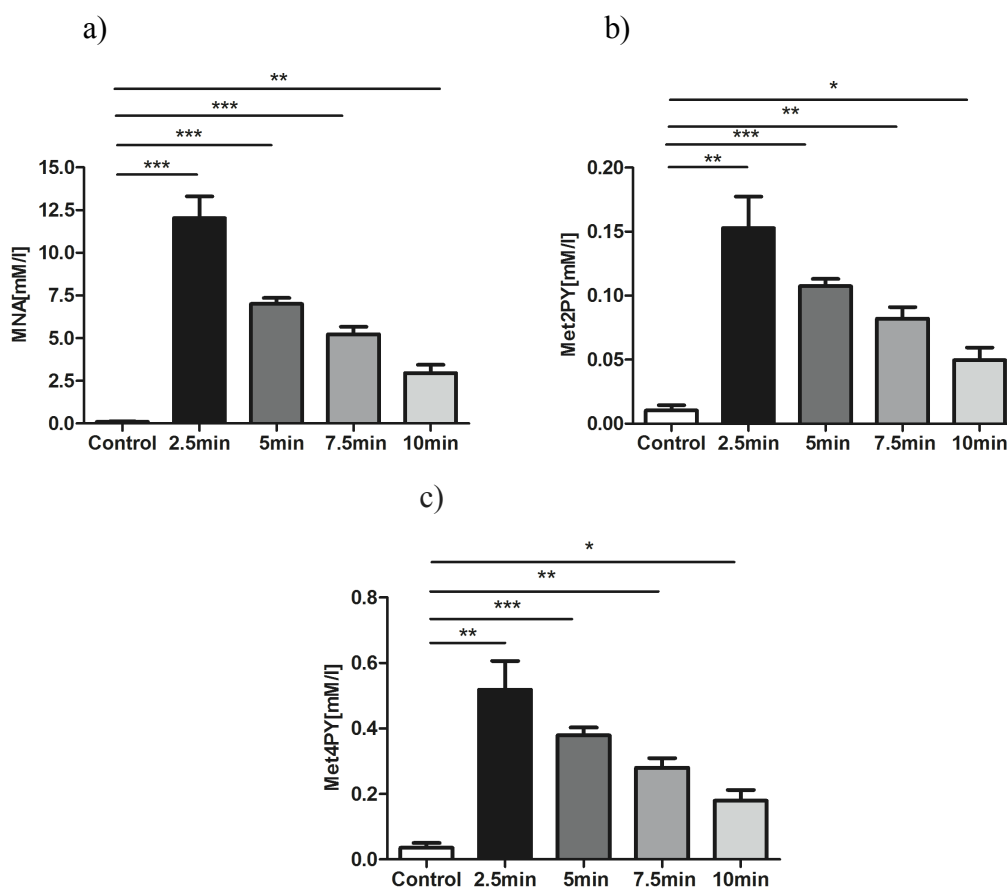


Figure 8. The increase in the concentration of MNA and its metabolites: Met2PY and Met4PY in mouse serum were already observed 2.5min after administration of MNA pyruvate. The MNA, Met2PY and Met4PY concentrations decreased with the administration of MNA pyruvate but were still higher in the 10th minute than in the control group

The concentration of a) MNA and MNA metabolites b) Met2PY and c) Met4PY in the serum of ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} mice after intravenous administration of MNA pyruvate.

Values represent mean±SEM (n=7); * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001, comparison of the means was done by ANOVA.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

The effects of MNA pyruvate on the metabolism and function of the heart were examined in an experimental model of cardiac hypoxia. Hypoxia was performed 10min after the start of the pharmacological intervention under test. During hypoxic stress, the oxygen supply to the hypoxic chamber in which the mice were placed was reduced in one minute from 21% to 8% oxygen, followed by 8% oxygen for 8min. After 8min of hypoxic stress, the oxygen content in the chamber was restored to 21% and a 5min reoxygenation was performed by constantly monitoring the condition of the animal using ECG.

The hypoxic effect in mice was manifested by a decrease in the ST segment in the ECG. Visible differences were observed between the MNA pyruvate and sodium pyruvate groups compared to the groups treated with sodium chloride and MNA. Positive

effects on heart function during hypoxia are confirmed by the lack of changes in the ECG image in groups with pyruvate (Paper B., Figure 9.a, b, c, d). ECG changes consisting of a reduction of the ST cut-off were normalized immediately after the hypoxia subsided. The correct ECG image could be observed just after 5min from the end of hypoxia, which indicates the reversibility of ischemia in this model.

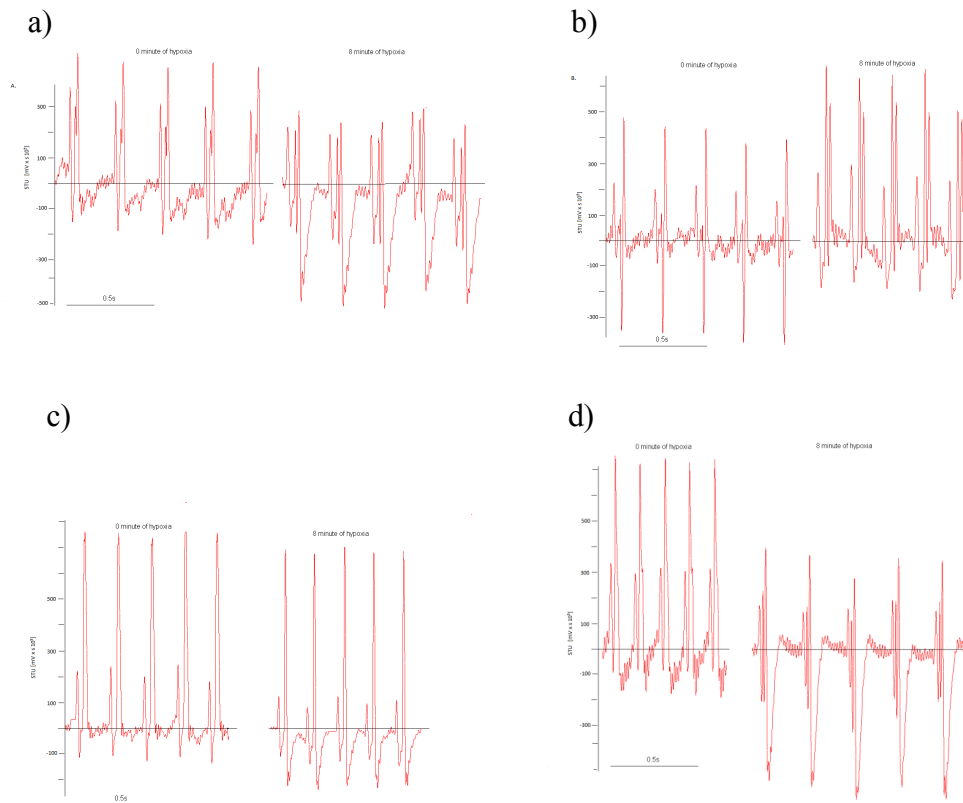


Figure 9. The hypoxic effect was manifested by lowering the ST segment in the ECG picture. Mice that received MNA pyruvate and sodium pyruvate did not show changes in the ST segment in response to hypoxia as significantly as control or MNA receiving mice

ECG recording of ApoE^{-/-}-LDLR^{-/-} mice 10 minutes after intravenous administration of a) isotonic saline, b) MNA pyruvate, c) sodium pyruvate and d) MNA at 0 and 8-minute hypoxia induced by oxygen reduction in ventilated air.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

Based on the ECG analysis of the animals examined, it was possible to count the maximum area of STU in the 8th min of hypoxia. A statistically significant reduction in the STU surface area was observed in mice that received MNA pyruvate and sodium pyruvate compared to controls. The use of MNA had no effect on the mouse ECG image (Paper B., Figure 10.). These results demonstrate the cardioprotective effect of pyruvate in hypoxia.

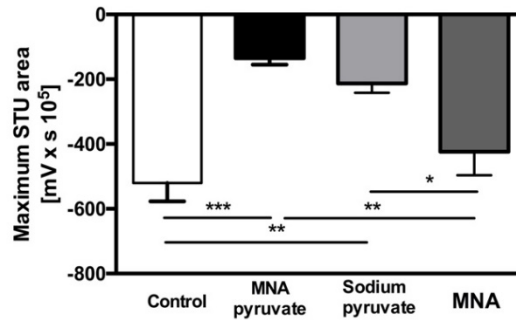


Figure 10. The STU surface area in the 8th minute of hypoxia was the smallest in mice that received MNA pyruvate and sodium pyruvate. In contrast, mice receiving MNA and saline had a visibly increased surface area of STU

The maximum surface area of STU ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice 10 minutes after intravenous administration of isotonic saline, MNA pyruvate, sodium pyruvate and MNA in the eighth minute of hypoxia induced by oxygen reduction in ventilated air.

Values represent mean±SEM (n=7); **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, comparison of the means was done by ANOVA.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

Four hours after hypoxia, the serum troponin T concentration was measured. Mice after infusion of MNA pyruvate (20%) and sodium pyruvate (10%) had a significantly lower troponin T concentration than animals receiving MNA and saline. The obtained results confirmed the cardioprotective effect of pyruvate in hypoxia of the heart (Paper B., Figure 11.).

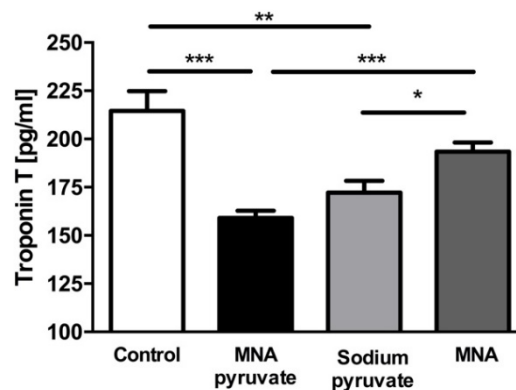


Figure 11. The concentration of troponin T in the serum of mice that received MNA pyruvate and sodium pyruvate was significantly lower than in the group of animals receiving MNA

Troponin T concentration in ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice 4 hours after intravenous administration of isotonic saline, MNA pyruvate, sodium pyruvate and MNA and hypoxia induced by oxygen reduction in ventilated air.

Values represent mean±SEM (n=7); **p*<0.05; ***p*<0.01, ****p*<0.001, comparison of the means was done by ANOVA test.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

Serum creatine kinase activity was also measured in these animals. It was about 3-fold lower in the group that received MNA pyruvate compared to the sodium chloride group (Paper B., Figure 12.). The results confirm the protective effect of MNA pyruvate in the hypoxic heart model. The combination of troponin T concentration and creatine kinase activity in the serum correlates perfectly with the development of ischemic myocardial damage, including even small changes caused by hypoxia.

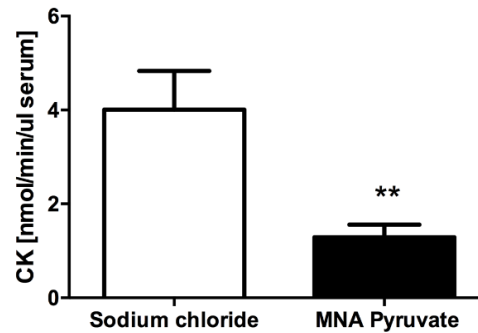


Figure 12. Creatine kinase activity was significantly lower in the group that received MNA pyruvate

Creatine kinase activity in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice 4 hours after intravenous administration of isotonic saline and MNA pyruvate and hypoxia induced by oxygen reduction in ventilated air.

Values represent mean±SEM (n=7); ***p*<0.01, comparison of the means was done by Student's *t*-test.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

The concentrations of ATP, ADP and AMP were examined in animal hearts. They were similar in all groups of animals. Interestingly, MNA pyruvate increased the concentration of phosphocreatine by 27% and the ratio of phosphocreatine/creatine by 19% compared to the hearts of control animals administered NaCl or MNA. Similarly, sodium pyruvate increased the phosphocreatine concentration by 25% and the phosphocreatine/creatine ratio by 18% compared to the hearts of control animals (receiving NaCl or MNA) (Paper B., Table 1). These results are consistent with studies on the positive effects of pyruvate on the energy metabolism of the heart.

Condition	ATP [$\mu\text{mol/g}$ dry mass]	ADP [$\mu\text{mol/g}$ dry mass]	AMP [$\mu\text{mol/g}$ dry mass]	Phosphocretine [$\mu\text{mol/g}$ dry mass]	Creatine [$\mu\text{mol/g}$ dry mass]	PCr/Cr
Sodium chloride	22.1 \pm 0.3	3.3 \pm 0.1	0.082 \pm 0.008	27.2 \pm 1.1	11.4 \pm 0.5	2.2 \pm 0.1
Sodium pyruvate	23.6 \pm 0.3	3.2 \pm 0.2	0.095 \pm 0.007	32.0 \pm 1.5*, #	12.3 \pm 0.7	2.6 \pm 0.2*
MNA pyruvate	24.4 \pm 0.4	3.2 \pm 0.3	0.096 \pm 0.012	32.8 \pm 0.8**, ##	12.2 \pm 0.6	2.7 \pm 0.1**, ##
MNA	21.6 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2	0.081 \pm 0.005	26.8 \pm 1.5	11.9 \pm 0.6	2.3 \pm 0.1

Table 1. Administration of MNA pyruvate and sodium pyruvate contributed to an increase in the concentration of phosphocreatine and the phosphocreatine/creatinine ratio in the hearts of the mice

The effect of administration of sodium chloride, sodium pyruvate, MNA pyruvate and MNA on energy metabolism of the heart.

Values represent mean \pm SEM (n=6-7); *p<0.05 sodium pyruvate vs. sodium chloride; **p<0.01 MNA pyruvate vs. sodium chloride; #p<0.05 sodium pyruvate vs. MNA; ##p<0.01 MNA pyruvate vs. MNA, comparison of the means was done by ANOVA.

Based on: „Cardioprotective effect of N-methylnicotinamide salt of pyruvate in an experimental model of cardiac hypoxia", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2018; 70; 378–384; Appendix-Paper B.

The use of MNA pyruvate had a cardioprotective effect in the hypoxia-induced heart failure model. Due to the use of MNA pyruvate, there was no hypernatremia which was caused by the administration of sodium pyruvate. Energy homeostasis of the heart is critical for maintaining its function. Numerous studies have confirmed the effectiveness of metabolic modulation as an effective therapy in ischemic heart disease. Activation of the pyruvate dehydrogenase complex by administration of pyruvate has been shown to be beneficial for restoring the hypoxic energy balance of the heart.

11.3. Inhibition of AMP deaminase activity in the treatment of cardiovascular diseases.

The use of AMP deaminase inhibitors in the treatment of cardiovascular diseases has been extensively discussed in Work C. During the study, it was noted that reduced AMPD activity is an effective way to increase the concentration of local and circulating adenosine. This nucleoside plays cardio- and vasoprotective role⁹¹. Adenosine causes an increase in coronary flow, suppression of arrhythmia generates induction of pre-ischemic preparation and suppression of proinflammatory cytokines production (IL-1, IL-6 and TNF- α)⁹⁷. Cardioprotective action of adenosine is mediated mainly through receptors for adenosine. Activation of these receptors prevents separation of catecholamines, generation of excessive cardiac contraction with the β -adrenergic receptor and overload with Ca²⁺ ions⁹⁸. Cardiomyocyte protection was also observed when adenosine was produced in a tissue other than the heart and this process is associated with the initial "quenching" of the heart before ischemia and it occurs "at a distance"⁹⁹. In contrast to the above-mentioned results, there are studies where it was found that adenosine is involved in the induction of transcription of pro-inflammatory cytokines during hypoxia and the accumulation of inflammatory cells in multiple sclerosis¹⁰⁰.

In the endothelium, inhibition of AMPD activity may lead to an increase in the production of cytosolic adenosine as well as activation of AMPK, as in other types of cells. The cytosolic production of adenosine is not the main pathway for the formation of adenosine in the endothelium, but may complement the adenosine produced by the extracellular route. Adenosine may bind to the extracellular adenosine receptor on the surface of endothelial light or adenosine receptors in other cell types¹⁰¹. Adenylate cyclase is involved in this process by activating endothelial adenosine A2 receptor receptors. *In vitro* and *in vivo* studies indicate that adenosine maintains the integrity of the tissue, reducing its permeability and modulation of the immune system¹⁰³. Moreover, it has been noticed that adding adenosine to the cardioplegic solution is beneficial to the heart of a patient undergoing cardiac surgery and may have a positive effect during reperfusion, e.g. after myocardial infarction^{100,104}. The most important effect observed from increase adenosine concentration was the improvement of endothelial function.

The that drugs blocking the activity of AMPD and involved in the endothelial metabolism of purine nucleotides include dipyridamole and substances previously tested by our group^{45,105}. Our experimental data indicate that endothelial AMPD activity is more effectively blocked at much lower concentrations than in cardiomyocytes (Paper C., Figure 13.).

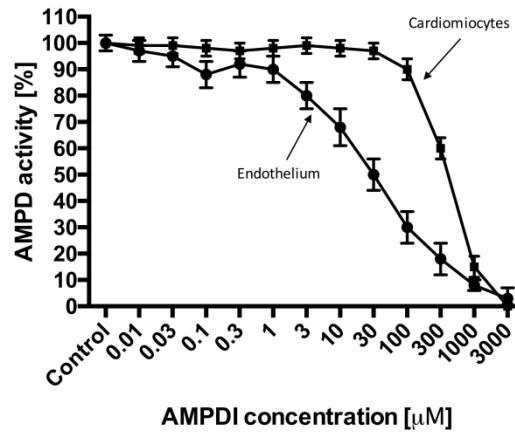


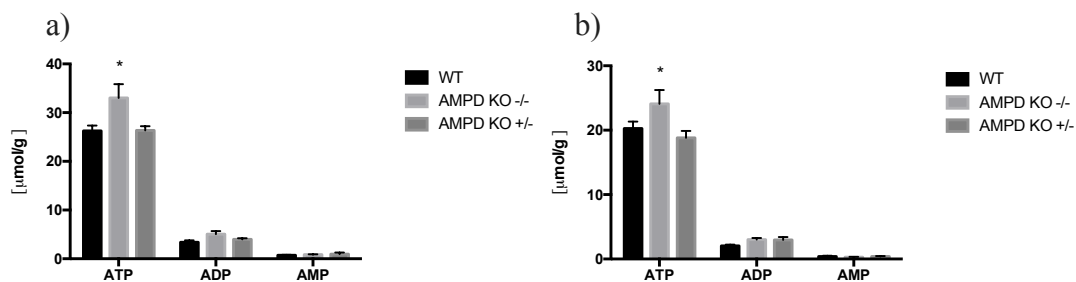
Figure 13. Decreasing AMP deaminase activity is more effective at lower concentrations in the endothelial cell line compared to isolated cardiomyocytes

Relationship between AMPD (AMPDI) 3- [2- (3-carboxy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaphthyl) ethyl] -3,6,7,8-tetrahydroimidazo [4,5d] inhibitor concentration [1,3] diazepin-8-ol and AMP deaminase activity in endothelial cells and cardiomyocytes.

The results are shown as mean±SEM (n = 3).

Based on: „Inhibition of AMP deaminase as a therapeutic target in cardiovascular pathology", Zabielska et. al., *Pharmacological Reports*. 2015; 67: 682-688; Appendix-Paper C.

Due to the difficulties in the synthesis of an efficient inhibitor of AMPD activity and based on literature about better heart function in patients with a mutation in the AMPD-encoding gene, we had decided to create a genetic model of AMPD cardiac specific knock- out in mice. We examined energy metabolism in partial (AMPD KO+/-) and total (AMPD KO-/-) inhibition of AMPD activity in normoxia as well as after hypoxia. In the physiological state, wild-type (WT) mice were characterized by lower concentrations of energy metabolites of the heart, and the differences deepened after ischemia (unpublished data, Figure 14). These results show the effect of inhibiting the activity of this enzyme on the energy metabolism of the heart in hypoxia (Figure 14.b, d) as well as in the physiological state (Figure 14.a, c).



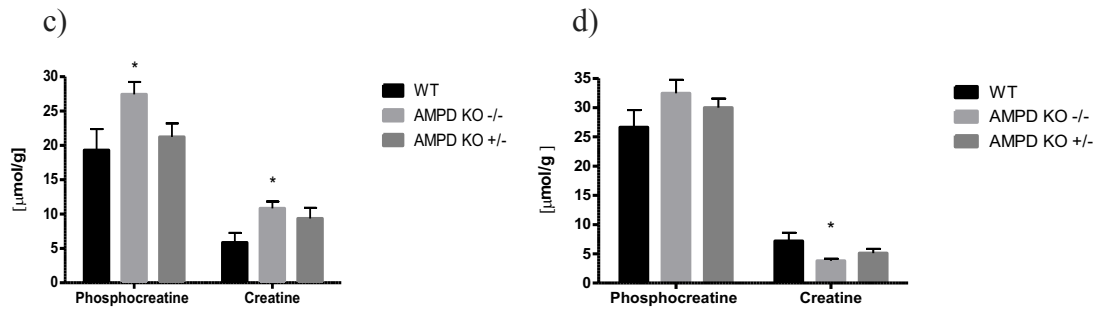


Figure 14. In the homogenates of the AMPD KO $-/-$ and $+/-$ mouse, a significant increase in ATP and phosphocreatine concentrations and a tendency to increase the ADP concentration in normoxia relative to the hearts of control animals was noticed. A beneficial effect of inhibiting AMPD activity on the energy metabolism of the hearts of mice with the switched gene coding for AMP deaminase activity in hypoxia by increasing ATP, phosphocreatine, and creatine concentrations as compared to wild-type mice was also observed

Energy metabolism of a wild-type mouse (WT), AMPD KO $-/-$ and AMPD KO $+/-$ before a), c) and after hypoxia, b), d).

Values represent mean \pm SEM (n=7); * $p < 0.05$, comparison of the means was done by ANOVA test.

It is a combination of unpublished observations.

While important evidence has been gathered confirming the benefits of AMPD inhibition in the cardiovascular system, further research is needed to develop this concept. In the context of the usefulness of AMPD inhibitors, the endothelium may be the most reactive to their use.

12. CONCLUSIONS

The results of the research included in the publications being the basis for the doctoral dissertation are as follows:

1. Administration of 4PYR resulted in increased accumulation of lipids in the wall of the mouse vessel, as well as an increase in ecto-adenosine deaminase activity on the surface of endothelial cells, which indicates pro-inflammatory action of 4PYR.
2. MNA pyruvate positively affects the energy metabolism of the heart. The MNA pyruvate infusion does not cause hypernatremia (unlike sodium pyruvate). In an experimental model of myocardial infarction induced by hypoxia in mice, MNA pyruvate prevents ECG changes and reduces the concentration of troponin T and creatine kinase activity in the mice serum.
3. AMP deaminase inhibitors more effectively inhibit the activity of this enzyme in endothelial cells compared to cardiomyocytes. The concentration of the AMP deaminase inhibitor has a significant effect on the type of cells to which this inhibitor exerts its effect. Deletion of the AMP deaminase encoding gene results in the maintenance of a larger pool of adenine nucleotides in the hypoxic heart.

13. PIŚMIENICTWO/ REFFERENCES

1. Banerjee MN, Bolli R, Hare JM. Clinical Studies of Cell Therapy in Cardiovascular Medicine. *Circ Res.* 2018;123(2):266-287. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.311217
2. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med.* 2002;8(11):1257-1262. doi:10.1038/nm1102-1257
3. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-1695. doi:10.1056/NEJMra043430
4. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. 2011. doi:10.1038/nature10146
5. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(23):2129-2138. doi:10.1016/j.jacc.2009.09.009
6. Martin C, Schulz R, Rose J, Heusch G. Inorganic phosphate content and free energy change of ATP hydrolysis in regional short-term hibernating myocardium. *Cardiovasc Res.* 1998;39(2):318-326. doi:10.1016/S0008-6363(98)00086-8
7. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(1):207-258. doi:10.1152/physrev.00015.2009
8. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res.* 2013;113(6):709-724. doi:10.1161/circresaha.113.300376
9. Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):412-419. doi:10.1093/cvr/cvn301
10. Opie LH, Knuuti J. The adrenergic-fatty acid load in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(18):1637-1646. doi:10.1016/j.jacc.2009.07.024
11. Gibbs CL. Cardiac Energetics. *Physiol Rev.* 1978;58(1). <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.1978.58.1.174>. Accessed July 5, 2018.
12. Saddik M, Lopaschuk GD. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *J Biol Chem.* 1991;266(13):8162-8170.
13. Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Mayr M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with ¹⁴C-labeled substrates in humans. *J Clin Invest.* 1987;79(2):359-366. doi:10.1172/JCI112820
14. Abel ED. Glucose transport in the heart. *Front Biosci.* 2004;9:201-215. <https://www.bioscience.org/fbs/getfile.php?FileName=/2004/v9/af/1216/1216.pdf>. Accessed July 5, 2018.
15. Henning SL, Wambolt RB, Schönekeess BO, Lopaschuk GD, Allard MF. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. *Circulation.* 1996;93(8):1549-1555. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608624>. Accessed July 5, 2018.
16. Perings SM, Schulze K, Decking U, et al. *Age-Related Decline of PCr/ATP-Ratio in Progressively Hypertrophied Hearts of Spontaneously Hypertensive Rats.* Vol 15.; 2000. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/PL00007270.pdf>. Accessed August 31, 2018.
17. Deussen A, Stappert M, Schaefer S, Kelm M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous

- concentration gradient. *undefined*. 1999. <https://www.semanticscholar.org/paper/Quantification-of-extracellular-and-intracellular-Deussen-Stappert/1dfc6fbe40c96845d43ba52810137d2a10dc42b6>. Accessed August 31, 2018.
18. Lopaschuk GD, Stanley WC. Glucose metabolism in the ischemic heart. *Circulation*. 1997;95(2):313-315. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008441>. Accessed July 5, 2018.
 19. Lopaschuk GD, Clanachan AS. The Source and Fate of Protons in the Reperfused Ischemic Heart. In: *The Ischemic Heart*. Boston, MA: Springer US; 1998:199-213. doi:10.1007/978-0-585-39844-0_16
 20. Hasenfuss G, Maier LS, Hermann HP, et al. Influence of pyruvate on contractile performance and Ca(2+) cycling in isolated failing human myocardium. *Circulation*. 2002;105(2):194-199.
 21. Hermann HP, Zeitz O, Keweloh B, Hasenfuss G, Janssen PM. Pyruvate potentiates inotropic effects of isoproterenol and Ca(2+) in rabbit cardiac muscle preparations. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2000;279(2):H702-8.
 22. Heather L, Cole M, Lygate C, et al. Fatty acid transporter levels and palmitate oxidation rate correlate with ejection fraction in the infarcted rat heart. *Cardiovasc Res*. 2006;72(3):430-437. doi:10.1016/j.cardiores.2006.08.020
 23. Christie ME, Rodgers RL. Altered Glucose and Fatty Acid Oxidation in Hearts of the Spontaneously Hypertensive Rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26(10):1371-1375. doi:10.1006/JMCC.1994.1155
 24. Zhabyeyev P, Gandhi M, Mori J, et al. Pressure-overload-induced heart failure induces a selective reduction in glucose oxidation at physiological afterload. *Cardiovasc Res*. 2013;97(4):676-685. doi:10.1093/cvr/cvs424
 25. Kalsi KK, Smolenski RT, Pritchard RD, Khaghani A, Seymour A-ML, Yacoub MH. Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest*. 1999;29(6):469-477. doi:10.1046/j.1365-2362.1999.00468.x
 26. Dodd MS, Ball DR, Schroeder MA, et al. In vivo alterations in cardiac metabolism and function in the spontaneously hypertensive rat heart. *Cardiovasc Res*. 2012;95(1):69-76. doi:10.1093/cvr/cvs164
 27. Christie ME, Rodgers RL. Altered Glucose and Fatty Acid Oxidation in Hearts of the Spontaneously Hypertensive Rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26(10):1371-1375. doi:10.1006/JMCC.1994.1155
 28. Osorio JC, Stanley WC, Linke A, et al. Impaired Myocardial Fatty Acid Oxidation and Reduced Protein Expression of Retinoid X Receptor-in Pacing-Induced Heart Failure. 2002. doi:10.1161/01.CIR.0000023531.22727.C1
 29. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, et al. Altered Myocardial Fatty Acid and Glucose Metabolism in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. 2002. doi:10.1016/S0735-1097(02)01967-8
 30. Mullane K, Bullough D. Harnessing an endogenous cardioprotective mechanism: Cellular sources and sites of action of adenosine. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(4):1041-1054. doi:10.1016/0022-2828(95)90073-X
 31. Moser GH, Schrader J, Deussen A. *Turnover of Adenosine in Plasma of Human and Dog Blood.*; 1989. www.physiology.org/journal/ajpcell. Accessed August 31, 2018.
 32. Kutryb-Zajac B, Mateuszuk L, Zukowska P, et al. Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovasc Res*. 2016;112:590-605. doi:doi:10.1093/cvr/cvw203

33. Niemelä J, Henttinen T, Yegutkin GG, et al. IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol.* 2004;172(3):1646-1653. doi:10.4049/JIMMUNOL.172.3.1646
34. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Toczek M, Smolenski RT, Slominska EM. The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacol Reports.* 2015;67(4):675-681. doi:https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.05.002
35. Lopaschuk GD. Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future. *Can J Cardiol.* 2017;33(7):838-849. doi:10.1016/j.cjca.2016.12.013
36. Pelikant-Malecka I, Sielicka A, Kaniewska E, Smolenski RT, Slominska EM. 4-Pyridone-3-carboxamide-1beta-D-ribose nucleoside metabolism in endothelial cells and its impact on cellular energetic balance. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2014;33(4-6):338-341. doi:10.1080/15257770.2014.889303
37. Zabielska M, Kutryb-Zajac B, Żukowska P, Slominska E, Smoleński R. Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1β-D-ribose nucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE-/-LDLR-/- mice. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2016;35(10-12):720-725. doi:10.1080/15257770.2016.1154970
38. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Jaształ A, et al. Deletion of CD73 in mice leads to aortic valve dysfunction. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2017. doi:10.1016/j.bbadis.2017.02.008
39. Khalpey Z, Yuen AHY, Lavitrano M, et al. Mammalian mismatches in nucleotide metabolism: implications for xenotransplantation. *Mol Cell Biochem.* 2007;304(1-2):109-117. doi:10.1007/s11010-007-9491-9
40. Siddaramappa Umamathy N, Kaczmarek E, Fatteh N, et al. Adenosine A1 Receptors Promote Vasa Vasorum Endothelial Cell Barrier Integrity via Gi and Akt-Dependent Actin Cytoskeleton Remodeling. Eltzschig HK, ed. *PLoS One.* 2013;8(4):e59733. doi:10.1371/journal.pone.0059733
41. Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med.* 1998;188(8):1433-1443. doi:10.1084/JEM.188.8.1433
42. Heggermont WA, Papageorgiou A-P, Heymans S, van Bilsen M. Metabolic support for the heart: complementary therapy for heart failure? *Eur J Heart Fail.* 2016;18(12):1420-1429. doi:10.1002/ejhf.678
43. Lopaschuk GD. Beneficial Effects of Trimetazidine in Ex Vivo Working Ischemic Hearts Are Due to a Stimulation of Glucose Oxidation Secondary to Inhibition of Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase. *Circ Res.* 2003;93(3):33e-37. doi:10.1161/01.RES.0000086964.07404.A5
44. Libersa C, Honor E, Adamantidis M, Rouet E, Dupuis B. Antiischemic effect of trimetazidine: Enzymatic and electric response in a model of in-vitro myocardial ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990;4(S4):808-809. doi:10.1007/BF00051279
45. Fragasso G, Perseghin G, De Cobelli F, et al. Effects of metabolic modulation by trimetazidine on left ventricular function and phosphocreatine/adenosine triphosphate ratio in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 2006;27(8):942-948. doi:10.1093/eurheartj/ehi816
46. Stone PH, Chaitman BR, Stocke K, Sano J, DeVault A, Koch GG. The Anti-Ischemic Mechanism of Action of Ranolazine in Stable Ischemic Heart Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):934-942. doi:10.1016/j.jacc.2010.04.042

47. Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, et al. Anti-Ischemic Effects and Long-Term Survival During Ranolazine Monotherapy in Patients With Chronic Severe Angina. 2004. doi:10.1016/j.jacc.2003.11.045
48. Jodalen H, Ytrehus K, ... PM-J of molecular, 1988 undefined. Oxfenicine-induced accumulation of lipid in the rat myocardium. *jmmc-online.com*. [https://www.jmmc-online.com/article/S0022-2828\(88\)80060-9/abstract](https://www.jmmc-online.com/article/S0022-2828(88)80060-9/abstract). Accessed September 1, 2018.
49. Drake-Holland A, cardiology JP-B research in, 1983 undefined. The effect of oxfenicine on cardiac carbohydrate metabolism in intact dogs. *Springer*. https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/BF01923190&casa_token=g3a6LNJPjf4AAAAA:11-Bburk_QNAxezumKUhimdjhZnh7gwyWt84FsFBdSkV5LE_XYypsME6xiicocI TpcQMoG-3czQFlwMqzg. Accessed September 1, 2018.
50. McVeigh JJ, Lopaschuk GD. Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. *Am J Physiol*. 1990;259(4 Pt 2):H1079-85. doi:10.1152/ajpheart.1990.259.4.H1079
51. Stacpoole PW. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism*. 1989;38(11):1124-1144. doi:10.1016/0026-0495(89)90051-6
52. Demeyere R, Lormans P, Van Aken H, Flameng W. Cardioprotective effects of carnitine in extensive aorto-coronary bypass grafting. *J Cardiothorac Anesth*. 1989;3(5):5. doi:10.1016/0888-6296(89)90748-5
53. Schonekess B, Allard M, research GL-C, 1995 undefined. Propionyl l-Carnitine Improvement of Hypertrophied Heart Function Is Accompanied by an Increase in Carbohydrate Oxidation. *Am Hear Assoc*. <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/res.77.4.726>. Accessed September 1, 2018.
54. Iliceto S, Scrutinio D, Bruzzi P, et al. Effects of l-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the l-Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico (CEDIM) trial. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26(2):380-387. doi:10.1016/0735-1097(95)80010-E
55. Dambrova M, Makrecka-Kuka M, Vilskersts R, Makarova E, Kuka J, Liepinsh E. Pharmacological effects of meldonium: Biochemical mechanisms and biomarkers of cardiometabolic activity. *Pharmacol Res*. 2016;113:771-780. doi:10.1016/J.PHRS.2016.01.019
56. Görgens C, Guddat S, Dib J, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Mildronate (Meldonium) in professional sports - monitoring doping control urine samples using hydrophilic interaction liquid chromatography - high resolution/high accuracy mass spectrometry. *Drug Test Anal*. 2015;7(11-12):973-979. doi:10.1002/dta.1788
57. Mattera GG, Lo Giudice P, Loi FMP, et al. Istaroxime: A New Luso-Inotropic Agent for Heart Failure. *Am J Cardiol*. 2007;99(2):S33-S40. doi:10.1016/J.AMJCARD.2006.09.004
58. Morgan BP, Muci A, Lu P-P, et al. Discovery of *Omecamtiv Mecarbil* the First, Selective, Small Molecule Activator of Cardiac Myosin. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1(9):472-477. doi:10.1021/ml100138q
59. Cleland JG, Teerlink JR, Senior R, et al. *Articles The Effects of the Cardiac Myosin Activator, Omecamtiv Mecarbil, on Cardiac Function in Systolic Heart Failure: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover, Dose-Ranging Phase 2 Trial*. Vol 378.; 2011. doi:10.1016/S0140-6736(11)61126-4
60. Shi J, Dai W, Hale SL, et al. Bendavia restores mitochondrial energy metabolism

- gene expression and suppresses cardiac fibrosis in the border zone of the infarcted heart. *Life Sci.* 2015;141:170-178. doi:10.1016/J.LFS.2015.09.022
61. Brown DA, Hale SL, Baines CP, et al. Reduction of Early Reperfusion Injury With the Mitochondria-Targeting Peptide Bendavia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014;19(1):121-132. doi:10.1177/1074248413508003
 62. Philp A, Perez-Schindler J, Green C, Hamilton DL, Baar K. Pyruvate suppresses PGC1alpha expression and substrate utilization despite increased respiratory chain content in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(2):C240-50. doi:10.1152/ajpcell.00438.2009
 63. Hardie DG. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes.* 2008;32 Suppl 4:S7-12. doi:10.1038/ijo.2008.116
 64. Qi D, Young LH. AMPK: Energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(8):422-429. doi:10.1016/j.tem.2015.05.010
 65. Slominska EM, Carrey EA, Foks H, et al. A novel nucleotide found in human erythrocytes, 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate. *J Biol Chem.* 2006;281(43):32057-32064. doi:10.1074/jbc.M607514200
 66. Dutta SP, Crain PF, McCloskey JA, Chheda GB. Isolation and characterization of 1-beta-D-ribofuranosylpyridin-4-one-3-carboxamide from human urine. *Life Sci.* 1979;24(15):1381-1388.
 67. Slominska EM, Adamski P, Lipinski M, Swierczynski J, Smolenski RT. Liquid chromatographic/mass spectrometric procedure for measurement of NAD catabolites in human and rat plasma and urine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2006;25(9-11):1245-1249. doi:10.1080/15257770600894725
 68. Speer J, Gehrke CW, Kuo KC, Waalkes ? T Phillip, Borek E. *TRNA breakdown products as markers for cancer.* Vol 44.; 1979. 1097-0142(197912)44: d August 31, 2018.
 69. Fischbein A, Sharma O, Selikoff I, research EB-C, 1983 undefined. Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma. *AACR.* <http://cancerres.aacrjournals.org/content/43/6/2971.short>. Accessed September 1, 2018.
 70. Oerlemans F, Lange F. Major and modified nucleosides as markers in ovarian cancer: a pilot study. *Gynecol Obstet Invest.* 1986;22(4):212-217. doi:10.1159/000298916
 71. Trewyn RW, Glaser R, Kelly DR, Jackson DG, Graham WP, Speicher CE. *Eleva Fed Nucleoside Excretion by Patients with Nasopharyngeal Carcinoma Preliminary Diagnostic / Prognostic Evaluations.* Vol 49.; 1982. August 31, 2018.
 72. Intrieri M, Calcagno G, Oriani G, et al. *Pseudouridine and 1-Ribosylpyridin-4-One-3-Carboxamide (PCNR) Serum Concentrations in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Are Independent Predictors for AIDS Progression.* Vol 174.; 1996. <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/174/1/199/958840>. Accessed August 31, 2018.
 73. Romaszko P, Slominska EM, Smolenski RT. Effect of 4-pyridone-3-carboxamide ribonucleoside (4PYR)-potential cardiovascular toxin in perfused rat heart. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2014;33(4-6):333-337. doi:10.1080/15257770.2013.872793
 74. Romaszko P, Slominska EM, Orlewska C, Lipinski M, Smolenski RT. Metabolism of 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside (4PYR) in rodent tissues and in vivo. *Mol Cell Biochem.* 2011;351(1-2):143-148. doi:10.1007/s11010-011-0721-9

75. Slominska EM, Borkowski T, Rybakowska I, Abramowicz-Glinka M, Orlewska C, Smolenski RT. In vitro and cellular effects of 4-pyridone-3-carboxamide riboside on enzymes of nucleotide metabolism. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014;33(4-6):353-357. doi:10.1080/15257770.2014.889304
76. DeBoer LW, Bekx PA, Han L, Steinke L. Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *Am J Physiol*. 1993;265(5 Pt 2):H1571-6.
77. Lopaschuk GD, Stanley WC. Glucose metabolism in the ischemic heart. *Circulation*. 1997;95(2):313-315.
78. Mallet RT. Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;223(2):136-148.
79. Mentzer R. M. J, Van Wylen DG, Sodhi J, et al. Effect of pyruvate on regional ventricular function in normal and stunned myocardium. *Ann Surg*. 1989;209(5):624-629.
80. Meierhenrich R, Jedicke H, Voigt A, Lange H. The effect of erythropoietin on lactate, pyruvate and excess lactate under physical exercise in dialysis patients. *Clin Nephrol*. 1996;45(2):90-97.
81. Bassenge E, Sommer O, Schwemmer M, Bunger R. Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2000;279(5):H2431-8.
82. Aksoy S, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *J Biol Chem*. 1994;269(20):14835-14840.
83. Chlopicki S, Swies J, Mogielnicki A, et al. 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. In: *Br J Pharmacol*. Vol 152. England; 2007:230-239. doi:10.1038/sj.bjp.0707383
84. Wozniacka A, Wieczorkowska M, Gebicki J, Sysa-Jedrzejowska A. Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot study. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30(6):632-635. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01908.x
85. Mateuszuk L, Jaształ A, Maslak E, et al. Anti-atherosclerotic effects of 1-methylnicotinamide (MNA) in ApoE/LDLR^{-/-} mice: a comparison with nicotinic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015. doi:10.1124/jpet.115.228643
86. Bartus M, Lomnicka M, Kostogryś RB, et al. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol Rep*. 2008;60(1):127-138.
87. Sabina RL, Mahnke-Zizelman DK. Towards an understanding of the functional significance of N-terminal domain divergence in human AMP deaminase isoforms. *Pharmacol Ther*. 2000;87(2-3):279-283.
88. Hu B, Altschuld RA, Hohl CM. Adenosine stimulation of AMP deaminase activity in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1993;264(1 Pt 1):C48-53.
89. Daval JL, Nehlig A, Nicolas F. Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. *Life Sci*. 1991;49(20):1435-1453.
90. Meghji P, Middleton KM, Newby AC. Absolute rates of adenosine formation during ischaemia in rat and pigeon hearts. *Biochem J*. 1988;249(3):695-703.
91. Hori M, Kitakaze M. Adenosine, the heart, and coronary circulation. *Hypertension*. 1991;18(5):565-574.
92. Dyck JR, Lopaschuk GD. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol*. 2006;574(Pt 1):95-112. doi:10.1113/jphysiol.2006.109389

93. Zabielska MA, Borkowski T, Slominska EM, Smolenski RT. Inhibition of AMP deaminase as therapeutic target in cardiovascular pathology. *Pharmacol Reports*. 2015;67(4):682-688. doi:10.1016/j.pharep.2015.04.007
94. Smolenski RT, Rybakowska I, Turyn J, et al. AMP deaminase 1 gene polymorphism and heart disease-a genetic association that highlights new treatment. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2014;28(2):183-189. doi:10.1007/s10557-013-6506-5
95. Borkowski T, Lipinski M, Kaminski R, et al. Modulation of AMP deaminase in rat hearts subjected to ischemia and reperfusion by purine riboside. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008;27(6):876-880. doi:10.1080/15257770802146551
96. Borkowski T, Slominska EM, Orlewska C, et al. Protection of mouse heart against hypoxic damage by AMP deaminase inhibition. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2010;29(4-6):449-452. doi:10.1080/15257771003741364
97. Loh E, Rebbeck TR, Mahoney PD, DeNofrio D, Swain JL, Holmes EW. Common variant in AMPD1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation*. 1999;99(11):1422-1425.
98. Kitakaze M, Hori M, Kamada T. Role of adenosine and its interaction with alpha adrenoceptor activity in ischaemic and reperfusion injury of the myocardium. *Cardiovasc Res*. 1993;27(1):18-27.
99. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193-2200.
100. Cieslak M, Kukulski F, Komoszynski M. Emerging role of extracellular nucleotides and adenosine in multiple sclerosis. *Purinergic Signal*. 2011;7(4):393-402. doi:10.1007/s11302-011-9250-y
101. Aherne CM, Kewley EM, Eltzschig HK. The resurgence of A2B adenosine receptor signaling. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2011;1808(5):1329-1339. doi:10.1016/J.BBAMEM.2010.05.016
102. Nees S, Gerlach E, Des Rosiers C, Bock M, Becker BF, Herzog V. [Recent knowledge about the metabolic regulation of coronary circulation, with a contribution on adenine nucleotide metabolism of coronary endothelial cells]. *Z Kardiol*. 1985;74 Suppl 7:87-91.
103. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*. 2004;25(1):33-39.
104. Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, et al. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood*. 2006;108(5):1602-1610. doi:10.1182/blood-2006-02-001016
105. Borkowski T, Orlewska C, Slominska EM, et al. Pharmacological inhibition of AMP-deaminase in rat cardiac myocytes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008;27(6):867-871. doi:10.1080/15257770802146536

14. ZAŁĄCZNIKI/ APPENDIX:

- PRACA A
- PRACA B
- PRACA C