

**Tomasz Borkowski**

**Wpływ inhibitorów deaminazy AMP na metabolizm  
i czynność serca w eksperymentalnych modelach  
niewydolności i niedokrwienia**

Rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii: Prof. dr hab. Julian Świerczyński

**Promotor: Dr hab. n med. Ryszard Tomasz Smoleński**

**Gdańsk 2009**

**Dziękuję za pomoc  
w przygotowaniu niniejszej pracy  
Panu dr hab. n med. Ryszardowi T. Smoleńskiemu  
Pani dr n med. Ewie Słomińskiej**

Spis treści	3
Objaśnienia skrótów	5
<b>1. Wstęp</b>	6
1.1. Wpływ mutacji C34T genu <i>AMPDI</i> na przebieg chorób serca	6
1.2. Rodzina genów deaminazy AMP	7
1.3. Właściwości deaminazy AMP	7
1.4. Fizjologiczna rola deaminazy AMP	9
1.5. Niedobór deaminazy AMP	10
1.6. Metabolizm nukleotydów adeninowych	11
1.7. Adenozyna	13
1.8. Kinaza białek zależna od AMP	16
1.9. Farmakologiczna inhibicja deaminazy AMP	17
<b>2. Cel pracy</b>	18
<b>3. Materiały i metody</b>	19
3.1. Zwierzęta doświadczalne	19
3.2. Modele eksperymentalne oraz protokoły doświadczeń	19
3.2.1. Izolowana deaminaza AMP i homogenat serca szczura	19
3.2.2. Izolowane kardiomiocyty	21
3.2.3. Perfuzja izolowanego serca	23
3.2.4. Farmakokinetyka TET01 <i>in vivo</i>	25
3.2.5. Eksperymentalny zawał serca wywołany hipoksją	26
3.2.6. Eksperymentalna niewydolność serca	28
3.3. Metody analityczne	31
3.3.1. Analiza przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją w ultrafiolecie	31
3.3.2. Analiza przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową	33
3.3.3. Pozostałe procedury analityczne	36
3.4. Odczynniki	37
3.5. Analiza statystyczna	38
<b>4. Wyniki</b>	39

4.1.	Wpływ TET01 i kofeiny na aktywność wyizolowanej deaminazy AMP	39
4.2.	Porównanie hamowania aktywności AMPD przez TET01 w homogenatach serc i izolowanych kardiomiocytach szczura	40
4.3.	Wpływ TET01 na metabolizm adenylanów, ocena jego toksyczności w wyizolowanych kardiomiocytach	41
4.4.	Wpływ czasu inkubacji izolowanych kardiomiocytów z TET01 na efekt inhibicji AMPD i parametry toksyczności	44
4.5.	Wpływ purynorybozydu oraz pochodnych nikotynamidu na aktywność deaminazy AMP w izolowanych kardiomiocytach	47
4.6.	Ocena wewnątrzkomórkowego stężenia TET01 w kardiomiocytach	49
4.7.	Ocena stopnia wiązania się TET01 z albuminą	49
4.8.	Wpływ TET01 na aktywność deaminazy AMP w izolowanym sercu	50
4.9.	Ocena farmakokinetyki TET01 <i>in vivo</i> na podstawie stężenia inhibitora i jego efektu metabolicznego	53
4.10.	Wpływ TET01 na metabolizm adenylanów w czasie ischemii <i>in vivo</i>	56
4.11.	Wpływ TET01 na parametry niedokrwienia i martwicy mysiego miokardium w modelu zawału serca indukowanego hipoksją	57
4.12.	Wpływ MNA na funkcję i metabolizm serca oraz na strukturę kolagenu w modelu pozawałowej niewydolności serca	58
<b>5.</b>	<b>Dyskusja</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>Wnioski</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Piśmiennictwo</b>	<b>71</b>

**Objaśnienia skrótów:**

<b>ADA</b>	-	deaminaza adenozyiny
<b>Ado</b>	-	adenozyina
<b>AMP</b>	-	adenozyino-5'-monofosforan
<b>AMPD</b>	-	deaminaza AMP
<b>AMPD 1, 2, 3</b>	-	geny 1, 2 i 3 deaminazy AMP
<b>AMPKK</b>	-	kinaza kinazy zależnej od AMP
<b>ATP</b>	-	adenozyino-5'-trójfosforan
<b>BSA</b>	-	albumina surowicy bydłej (bovine serum albumine)
<b>ChNS</b>	-	choroba niedokrwienna serca
<b>EHNA</b>	-	erytro-9-(2-hydroksy-3-nonyl)adenina
<b>GDP</b>	-	guanozyino-5'-difosforan
<b>GTP</b>	-	guanozyino-5'-trójfosforan
<b>HClO<sub>4</sub></b>	-	kwask chlorowy (VII)
<b>HEPES</b>	-	kwask 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazyino]etanosulfonowy
<b>HGPRT</b>	-	fosforybozylotransferaza hipoksantyno-guaninowa
<b>HPLC</b>	-	wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>Hx</b>	-	hipoksantyna
<b>IMP</b>	-	inozyno-5'-monofosforan
<b>Ino</b>	-	inozyina
<b>kDa</b>	-	kilo-Dalton
<b>K<sub>i</sub></b>	-	stała inhibitorowa
<b>K<sub>m</sub></b>	-	stała Michaelisa
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	-	diwodorofosforan (V) potasu
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	-	wodorofosforan (V) potasu
<b>LDH</b>	-	dehydrogenaza mleczanowa
<b>MNA</b>	-	N-metylonikotynamid
<b>NA</b>	-	nikotynamid
<b>NAD<sup>+</sup></b>	-	utleniony dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
<b>Pi</b>	-	fosforan nieorganiczny
<b>PNP</b>	-	fosforylaza nukleozydów purynowych
<b>PNS</b>	-	przewlekła niewydolność serca
<b>PRPP</b>	-	5-fosforybozylo-1-pirofosforan
<b>RBC</b>	-	erytrocyty (red blood cells)
<b>SAH</b>	-	S-adenozylo-L-homocysteina
<b>TET01</b>	-	3-[2-(3-karboksy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydraftylo)etyl]-3,6,7,8-tetrahydroimidazo-[4,5]-[1,3]diazepin-8-ol
<b>TRIS</b>	-	kwask 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazyino]etanosulfonowy
<b>WHO</b>	-	Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organisation)
<b>V<sub>max</sub></b>	-	maksymalna prędkość reakcji
<b>XOD</b>	-	oksydaza ksantynowa
<b>4PYR</b>	-	1-β-D-rybonukleozyd 4-pirydono-3-karboksyamidu

# 1. Wstęp

W ostatnim raporcie WHO choroba niedokrwienna serca (ChNS) została sklasyfikowana jako najczęstsza przyczyna śmierci, stanowi 12,2% ogółu zgonów na świecie i 16,3% w krajach wysokorozwiniętych (WHO, 2004). Pomimo znacznego postępu w rozwoju nowoczesnych metod leczenia ChNS tj.: zabiegi przezskórnej angioplastyki wieńcowej i operacje pomostowania aortalno-wieńcowego a także opracowanie standardu postępowania w ostrym zespole wieńcowym (rekomendowanym przez Europejskie i Amerykańskie Towarzystwa Kardiologiczne) szacuje się, że śmiertelność z powodu ChNS nadal będzie rosła. Zjawisko to tłumaczone jest starzeniem się społeczeństwa oraz obecnością wielu krajów w fazie intensywnego rozwoju gospodarczego. Wymienione uwarunkowania, a także zwiększona przeżywalność po incydentach wieńcowych leczonych metodami rewaskularyzacji, predysponuje do rozwoju przewlekłej niewydolności serca (PNS). Szacuje się, że obecnie występuje ona u 1 – 2% populacji w wieku 50 – 59 lat i ponad 10% wśród ludzi powyżej 75 roku życia (Mosterd i Hoes, 2007). Ze względu na duże znaczenie kliniczne, prowadzone są nieustannie badania, które mają na celu nie tylko optymalizację algorytmów postępowania w leczeniu ChNS i PNS, ale także poszukiwanie nowych środków farmakologicznych działających w oparciu o innowacyjne mechanizmy kardioprotekcyjne. Jednym z celów jest poszukiwanie inhibitorów deaminazy AMP.

## 1. 1. Wpływ mutacji C34T genu *AMPD1* na przebieg chorób serca

Poprawę przeżywalności u pacjentów z rozpoznaną PNS i posiadającymi mutację C34T przynajmniej w jednym allelu genu *AMPD1* zaobserwował jako pierwszy Loh (Loh i wsp., 1999). Spostrzeżenie to zostało potwierdzone także przez innych badaczy (Yazaki i wsp., 2004; Gastmann i wsp., 2004). Na podstawie analizy ponad tysiąca pacjentów z PNS będącej skutkiem ChNS zaobserwowano trend w kierunku poprawy przeżywalności u heterozygot z mutacją C34T (Kolek i wsp., 2005). Istotnie wyższą przeżywalność zaobserwowano także u heterozygot C34T z rozpoznaną na podstawie badania koronarograficznego ChNS (Anderson i wsp., 2000). Ukazały się również publikacje, które nie wykazały zależności pomiędzy polimorfizmem genu

*AMPD1* a poprawą przeżywalności w ChNS i w PNS (de Groote i wsp., 2006; Collins i wsp., 2006).

## **1. 2. Rodzina genów deaminazy AMP**

Deaminaza AMP (AMPD; EC 3.5.4.6) u zwierząt kodowana jest przez rodzinę trzech genów: *AMPD1*, *AMPD2* i *AMPD3* (Sabina i wsp., 1990; Morisaki i wsp., 1990; Mahnke-Zizelman i Sabina, 1992). Geny AMPD podlegają regulacji na poziomie transkrypcji (Morisaki i Holmes, 1993). W wyniku procesu alternatywnego składania powstają różne izoformy tego enzymu, które tworzą trzy zasadnicze grupy: mięśniową, wątrobową oraz erytrocytarną (Mineo i wsp., 1990; Mineo i Holmes, 1991). U człowieka oznacza je się skrótami kolejno: M, L i E (Ogasawara i wsp., 1982), a u szczura A, B i C (Ogasawara i wsp., 1978). Gen *AMPD1* jest zlokalizowany na chromosomie 1, odpowiedzialny jest za kodowanie izoformy mięśniowej, a jego ekspresja u człowieka i szczura zachodzi głównie w mięśniach szkieletowych, w sercu oraz w mniejszej ilości w płucach, nerkach i jelitach (Morisaki i wsp., 1990). Gen *AMPD2* jest umiejscowiony w okolicy genu *AMPD1*, koduje izoformę wątrobową, a jego ekspresja u człowieka ma miejsce głównie w wątrobie, ale jest obserwowana także w mózgu, sercu, śledzionie, łożysku, płucach, nerce i trzustce (Van den Bergh i Sabina, 1995). Gen *AMPD3* znajduje się u człowieka na chromosomie 11, koduje izoformę erytrocytarną i poza krwinkami czerwonymi ulega ekspresji w sercu, mięśniach szkieletowych, nerce oraz śledzionie (Mahnke-Zizelman i wsp., 1996).

## **1. 3. Właściwości deaminazy AMP**

Wszystkie izoformy AMPD są tetrametrami. Podjednostki enzymu mają zróżnicowane masy w zależności od genu i procesu alternatywnego składania. Pierwsze obserwacje uzyskane w oparciu o elektroforezę w żelu poliakrylamidowym wykazywały masy cząsteczkowe podjednostek ludzkiej AMPD w granicach 68-85 kDa. Jednak ostatnie dane uzyskane w oparciu o analizę sklonowanych podjednostek wykazały ich większą masę (86-101 kDa). Rozbieżność ta tłumaczona jest utratą części białka w procesie proteolizy podczas izolacji enzymu (Sabina i Mahnke-Zizelman, 2000). Deaminaza AMP występuje we wszystkich komórkach organizmu, ale proporcje izoform w poszczególnych narządach są różne i zmieniają się one w obrębie jednego

narządu w czasie ontogenezy (Kaletha i Żydowo, 1971; Ogasawara i wsp., 1975; Marquetant i wsp., 1987). W mięśniach szkieletowych aktywność tego enzymu jest kilkadziesiąt razy wyższa niż w innych tkankach (Lowenstein, 1972). Deaminaza AMP podczas wysiłku fizycznego w 50–60% swoim N-końcowym fragmentem przyłączona jest do łańcucha miozyny, natomiast podczas fazy spoczynku występuje głównie w formie wolnej w cytozolu (Rundell i wsp., 1992; Mahnke-Zizelman i Sabina, 2001). Połączenie AMPD z miozyną nie wpływa na długość i kształt włókien miozynowych, powoduje natomiast aktywację enzymu (Byrnes i Suelter, 1965; Ashby i Frieden, 1977). Domena katalityczna zlokalizowana jest na końcu karboksylowym łańcucha polipeptydowego i katalizuje nieodwracalną reakcję hydrolizy kwasu adenyloвого (AMP) do kwasu inozynowego (IMP) i amoniaku (Parnas i wsp., 1927; Schmidt, 1928). W erytrocytach izoformy E mogą występować w formie wolnej lub mogą być przyłączone do cytoplazmatycznej strony błony komórkowej (Mahnke-Zizelman i Sabina, 2002).

Deaminaza AMP jest enzymem allosterycznym o sigmoidalnej zależności szybkości reakcji od stężenia substratu (Żydowo, 1960; Smiley, Jr. i wsp., 1967). Optimum pH dla aktywności tego enzymu mieści się w zakresie 6,5–6,8 (Zielke i Suelter, 1971). Aktywność AMPD zależna jest od temperatury (osiągając maksimum w 45°C) (Żydowo i wsp., 1965). Stała Michaelisa deaminazy AMP wyizolowanej z miokardium królika wynosi  $K_m=5,6$  mM dla AMP a prędkość maksymalna  $V_{max}=10,6\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg białka}^{-1}$  (Thakkar i wsp., 1993). Aktywność AMPD odwrotnie koreluje z fizjologiczną wartością ładunku energetycznego (0,75–0,95) (Solano i Coffee, 1978). Aktywatorami allosterycznymi AMPD są kationy metali jednowartościowych (głównie  $K^+$  w stężeniu 100–150 mM, ale także  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ) oraz nukleotydy ATP i ADP (Smiley i Suelter, 1967; Setlow i Lowenstein, 1967; Ronca-Testoni i wsp., 1970). Inhibitorami allosterycznymi są: GTP, GDP, oraz fosforan nieorganiczny (Setlow i Lowenstein, 1968; Kaletha i wsp., 1976). Niektóre produkty glikolizy a także bisfosforan 4,5-fosfatydiloinozytolu również hamują jej aktywność (Sims i wsp., 1999). AMPD jest metaloproteiną zawierającą głównie  $Zn^{2+}$ , a także pewne ilości  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  (Zielke i Suelter, 1971). Aktywująco na AMPD działa fosforylacja poprzez kinazę proteinową C jak i przyłączenie do niej  $Ca^{2+}$ –kalmodulina (Thakkar i wsp., 1993; Mahnke i Sabina, 2005). AMPD wyizolowana z serca szczura ma 3–5 razy większą aktywność niż u człowieka (Kochan i wsp., 1994; Tavenier i wsp., 1995).



#### 1. 4. Fizjologiczna rola deaminazy AMP

W warunkach fizjologicznych, w pracującym mięśniu deaminaza AMP stabilizuje ładunek energetyczny adenylanów poprzez nieodwracalne przekształcanie AMP do IMP, co przesunęła równowagę reakcji katalizowanej przez miokinazę w kierunku produkcji ATP (Chapman i Atkinson, 1973). Jednocześnie wraz z powstawaniem IMP tworzy się amoniak, który aktywując fosfofruktokinazę-2 prowadzi do zwiększonej produkcji ATP poprzez aktywację szlaku glikolizy (Yoshino i Murakami, 1983). W mięśniach szkieletowych nagromadzony w wyniku intensywnego wysiłku IMP jest ponownie przekształcany do AMP przez syntetazę adenylobursztynianową oraz liazę adenylobursztynianową, tworzących wspólnie z AMPD cykl nukleotydów purynowych (Tornheim i Lowenstein, 1972). Wytworzony w wyniku tego cyklu fumaran zostaje włączony w cykl kwasów karboksylowych i stanowi istotne źródło energii w mięśniu podczas spoczynku (Scislowski i wsp., 1982). Podczas forsownego wysiłku fizycznego nagromadzenie w komórce IMP zabezpiecza wewnątrzkomórkową pulę nukleotydów adenylanowych, nie dopuszczając do ich degradacji do nukleozydów i utraty poza komórkę w procesie dyfuzji (Vincent i wsp., 1982).

Fizjologiczna rola deaminazy AMP w mięśniach szkieletowych oceniana była za pomocą intensywnego 30 sekundowego testu wysiłkowego Wingate'a na cykloergometrze. Wyniki testu pokazały, że pacjenci z niedoborem deaminazy AMP charakteryzują się około 10% redukcją średniej rozwijanej mocy i wyższymi parametrami zmęczenia podczas badania w stosunku do osób zdrowych, natomiast nie stwierdzono różnic u heterozygot z mutacją C34T (Rico-Sanz i wsp., 2003; Fischer i wsp., 2007). Analiza biochemiczna ujawniła, że u osób z niedoborem deaminazy AMP poddanych intensywnemu wysiłkowi fizycznemu występował brak akumulacji amoniaku i IMP oraz ponad 25-krotne zwiększenie produkcji adenozyiny przez mięśnie szkieletowe. W porównaniu do osób zdrowych nie stwierdzono istotnych zmian w wielkości ładunku energetycznego w mięśniach szkieletowych, ani stężenia mleczanu we krwi podczas wysiłku (Norman i wsp., 2001; Tarnopolsky i wsp., 2001). W światowej klasie sportowców wytrzymałościowych (kolarze i biegacze długodystansowi) zaobserwowano istotnie mniejszą częstotliwość występowania mutacji C34T i wpływu tej mutacji na wydolność w sportach wytrzymałościowych (Rubio i wsp., 2005).

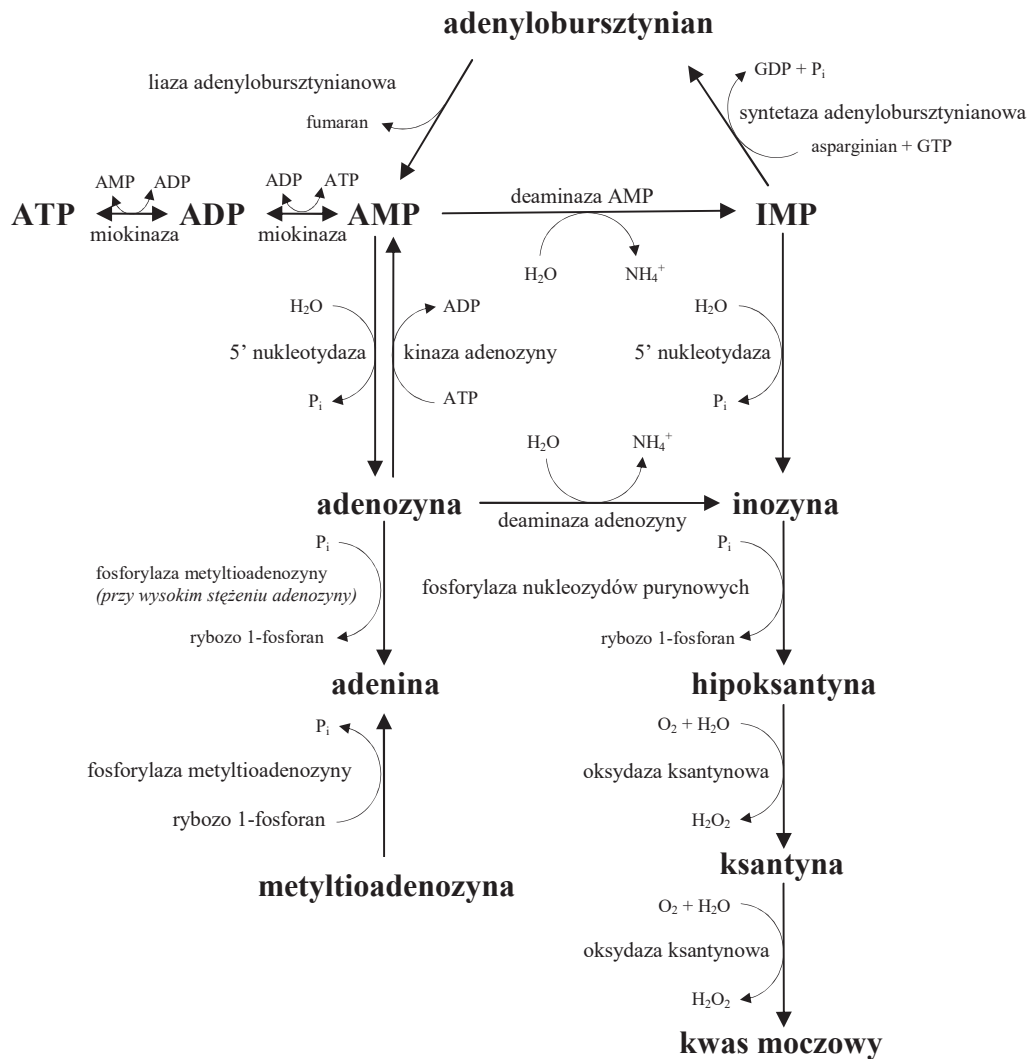
## 1. 5. Niedobór deaminazy AMP

Fishbein jako pierwszy (Fishbein i wsp., 1978) opisał nową jednostkę chorobową charakteryzującą się słabością mięśni szkieletowych i skurczami mięśniowymi występującymi po wysiłku fizycznym. W biopsjach tych mięśni stwierdził brak obecności deaminazy AMP. Kilka lat później Morisaki (Morisaki i wsp., 1992) wykazał, że przyczyną niedoboru deaminazy AMP jest punktowa mutacja C34T w obu allelach genu *AMPD1*. Jednocześnie zwrócono uwagę na fakt, że objawy pacjentów z niedoborem AMPD są bardzo różne, od formy bezobjawowej po silne wysiłkowe bóle mięśniowe. Jako interpretację tak zróżnicowanego obrazu klinicznego zaproponowano kilka przyczyn: usunięcie eksonu 2 w genie *AMPD1* w wyniku alternatywnego składowania, zwiększenie ekspresji innej izoformy deaminazy AMP bądź konieczność istnienia dodatkowego deficytu metabolicznego niezbędnego do ujawnienia pełnoobjawowego obrazu choroby. Obecnie wiadomo, że mutacja C34T jest najczęściej występującym defektem genu *AMPD1* w populacji ludzkiej. Jest to mutacja punktowa, w której cytozyna w pozycji 34 zamieniona jest na tyminę w eksonie 2. Mutacja ta ma charakter nonsensowny i skutkuje przedwczesnym zatrzymaniem syntezy deaminazy AMP, powodując powstanie białka pozbawionego funkcji katalitycznej. Badania epidemiologiczne wykazały stosunkowo wysoką częstość występowania tej mutacji, aż 8-12% osób rasy kaukaskiej oraz 19% osób rasy afroamerykańskiej posiada mutację C34T w jednym allelu *AMPD1* a około 2-3% populacji w obu allelach (Norman i wsp., 1995; Rubio i wsp., 2005). Przeprowadzone badania określenia aktywności deaminazy AMP w mięśniach szkieletowych w zależności od polimorfizmu genu *AMPD1* wykazały zmniejszenie aktywności deaminazy AMP do około 50% u heterozygot i do śladowej aktywności u homozygot z mutacją C34T w obu allelach genu *AMPD1* (Norman i wsp., 1998). Interesującą obserwacją jest zredukowana do 50% aktywność sercowej deaminazy AMP u heterozygot z mutacją C34T w genie *AMPD1* (Kalsi i wsp., 2003).

## 1. 6. Metabolizm nukleotydów adeninowych

Podczas normoksji, kiedy to zachodzą zrównoważone procesy wytwarzania i zużywania energii, w miokardium znajduje się około 6-8 mM stężenie ATP, 40  $\mu\text{M}$  ADP, 0,2  $\mu\text{M}$  AMP i około 0,05  $\mu\text{M}$  adenozyiny (Decking, 2000). W warunkach deficytu tlenu dochodzi do szybkiego wyczerpania się zapasu energii zgromadzonego w postaci ATP i fosfokreatyny powodując przyrost ADP, AMP oraz katabolitów adenylobursztynianowych (Gneushev i wsp., 1977; Remme i wsp., 1977). W sytuacji kiedy w komórce wzrasta stężenie AMP, zaczyna ono być dalej metabolizowane przez AMPD oraz 5'-nukleotydazę AMP-specyficzną. Podczas gdy proces deaminacji jest nieodwracalny a resynteza AMP jest długotrwała i wymaga zaangażowania syntetazy adenylobursztynianowej oraz liazy adenylobursztynianowej, to proces refosforylacji adenozyiny do AMP jest bardzo szybki. Umożliwia on skuteczną fosforylację około 90% powstającej adenozyiny przy użyciu kinazy adenozyiny w tak zwanym cyklu adenozyinowym (Kroll i wsp., 1993). W trakcie nieprzerwanej ischemii dochodzi jednak do dalej idących procesów katabolicznych, wytwarzających znaczące ilości katabolitów tj.: adenozyiny i inozyiny. Nukleozydy te dyfundując przez błonę komórkową miocytów rozprzestrzeniają się w przestrzeni międzykomórkowej, gdzie dochodzi do oddziaływania ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek (Burnstock, 1980). Znajdujące się w błonie komórkowej endoteliocytów transportery nukleozydów wychwytyją około 65% adenozyiny z przestrzeni międzykomórkowej, transportery w kardiomiocytach i fibroblastach dalsze 5% a pozostałe 30% „wycieka” pomiędzy komórkami śródbłona do krwi i trafia do erytrocytów (Deussen i wsp., 1999). W ludzkich endoteliocytach i erytrocytach oprócz deaminazy adenozyiny znajdują się także fosforylaza nukleozydów purynowych oraz fosforylaza metylioadozyiny. Fosforylaza nukleozydów purynowych katalizuje proces odwracalnej fosforolizy inozyiny i guanozyiny odpowiednio do hipoksantyny i guaniny a fosforylaza metylioadozyiny katalizuje fosforolizę adenozyiny z uwolnieniem adeniny. Produktem w obu tych reakcjach jest również rybozo-1-fosforan (Gabrio i wsp., 1956). W cytoplazmie endoteliocytów a także na ich powierzchni znajduje się oksydaza ksantynowa, degradująca hipoksantynę do ksantyny i dalej do kwasu moczowego (Jarasch i wsp., 1986), który następnie jest eliminowany z organizmu przez filtrację w kłębuszkach nerkowych (Ryc. 1). Ten układ enzymatyczny sprawia, że stężenie adenozyiny w warunkach normoksji jest bardzo niskie i wynosi 0,1–1,0  $\mu\text{M}$  we

krwi oraz poniżej  $0,5 \mu\text{M}$  w przestrzeni międzykomórkowej miocytów (Moser i wsp., 1989). Podczas ischemii produkcja adenozyiny gwałtownie wzrasta powodując ponad 50-krotne podwyższenie stężenia w przestrzeni międzykomórkowej miocytów (Mullane i Bullough, 1995). Stan ten nie jest jednak długotrwały, ponieważ śródbłonek bardzo aktywnie metabolizuje powstałą adenozyinę.



Ryc. 1. Schemat metabolizmu adenylanów

## 1. 7. Adenozyna

Pierwsze fizjologiczne działanie adenozyny zaobserwowano już w 1929 roku. Zaobserwowano wówczas występowanie bradykardii, hipotonii oraz rozszerzenia tętnic wieńcowych po dożylnym podaniu świnie morskiej ekstraktów z serca i innych tkanek zawierających adenozynę (Drury i Szent-Gyorgyi, 1929). W 1963 roku Berne wysunął hipotezę, że istnieje związek pomiędzy zużyciem tlenu w mięśniu sercowym, międzykomórkowym stężeniem adenozyny a przepływem wieńcowym. Jednocześnie postulował ochronne działanie adenozyny, powodujące rozszerzanie tętnic wieńcowych niedokrwionego mięśnia sercowego (Berne, 1963). Od tamtego czasu zgromadzono wiele dowodów kardioprotekcyjnego działania adenozyny w układzie sercowo-naczyniowym. W doświadczeniach, w których badano znaczenie endogennie produkowanej adenozyny podczas ischemii stosowano blokery receptorów adenozynowych podawanych przed oraz w trakcie ischemii. Wykazano powiększenie strefy zawału oraz zwiększenie końcowo-rozkurczowego ciśnienia w lewej komorze w grupach traktowanych antagonistami receptorów adenozynowych (Bunch i wsp., 1992; Zhao i wsp., 1993). W doświadczeniach, w których oceniano wpływ egzogennej adenozyny podawanej drogą dożylną przed i w trakcie ischemii wykazywano zredukowanie strefy martwicy oraz ogłuszenia mięśnia sercowego (Janier i wsp., 1993; Sekili i wsp., 1995). Jedynie w okresie reperfuzji podawanie egzogennej adenozyny zmniejsza strefę zawału w nieznacznym stopniu lub pozostaje bez wpływu na jej wielkość (Vander Heide i Reimer, 1996). Ze względu na bardzo krótki czas półtrwania adenozyny we krwi wynoszący około 1,2 sekundy a także potrzebę uzyskania wysokiego stężenia adenozyny we krwi, trzeba było stosować duże dawki adenozyny ( $50-70 \mu\text{g}\cdot\text{kg m.c.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Wiązało się to jednak z wystąpieniem wielu niepożądanych efektów: bradyarytmii (blok przedsionkowo-komorowy II i III stopnia), hipotonii a także bólów głowy, bólu dławicowego czy duszności (Ogilby i wsp., 1993). W związku z tym dużo większe nadzieje pokładano w związkach zwiększających stężenie endogennej adenozyny w miejscu ischemii. Do takich związków należą: inhibitory enzymów (tj.: kinazy adenozyny, deaminazy adenozyny, deaminazy AMP) oraz inhibitory transporterów nukleozydów blokujących wychwyt adenozyny z przestrzeni międzykomórkowej do komórek śródbłonna. Zastosowanie nieselektywnego blokera transportera nukleozydów – dipirydamolu, jak również selektywnego blokera transportera nukleozydów – draflazyny, czy inhibitora deaminazy adenozyny - EHNA

przed i podczas ischemii powodowało zwiększenie stężenia międzykomórkowej adenozyiny i ograniczało strefę zawału (Dorheim i wsp., 1991; Zughuib i wsp., 1993; Sommerschild i wsp., 1997). Jeśli stężenie endogennej adenozyiny zwiększane było jedynie podczas reperfuzji efekt kardioprotekcyjny był mniejszy (Zhao et al., 1993).

Adenozyina wywiera kardioprotekcyjne efekty plejotropowo, głównie poprzez oddziaływanie z receptorami A1 i A3 zlokalizowanymi na kardiomiocytach oraz z receptorami A2a i A2b zlokalizowanymi na pozostałych komórkach układu sercowo-naczyniowego (Burnstock, 1980). Aktywacja receptora A1 wiąże się z uczuciem bólu dławicowego, powoduje ujemny efekt chronotropowy w węźle zatokowo-przedsionkowym i ujemny efekt dromotropowy w węźle przedsionkowo-komorowym (Ely i Berne, 1992). W kardiomiocytach w warunkach niedokrwienia poprzez aktywację receptora A1 dochodzi do obniżenia stężenia cyklicznego AMP, co przeciwdziała stymulacji adrenergicznej prowadząc do ujemnego efektu inotropowego, zmniejszenia relaksacji, zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia a także ograniczenia poboru wolnych kwasów tłuszczowych, lipolizy czy glikogenolizy (Belardinelli i wsp., 1995). W wyniku przejściowej ischemii bądź aktywacji receptorów A1 przy użyciu swoistych agonistów, występuje zjawisko hartowania serca poprzez niedokrwienie (*ang. ischaemic preconditioning*) (Murry i wsp., 1986). W zależności od gatunku i siły bodźca faza wczesna hartowania zaczyna się po upływie kilkunastu minut od ischemii i trwa do kilku godzin po stymulacji receptora A1 powodując zwiększenie tolerancji miokardium na kolejne niedokrwienie. Końcowymi efektorami wczesnej fazy hartowania są: kinaza białek C, kinaza tyrozyny, kinaza białek aktywowana mitogenem, mitochondrialne kanały  $K_{ATP}$ , mitochondrialne pory (*mitochondrial permeability transition pore - MPTP*) (Yellon i wsp., 1998; Halestrap i wsp., 2004). Późna faza hartowania obserwowana jest zazwyczaj pomiędzy 12 a 72 godz. od niedokrwienia, a jej kardioprotekcyjne znaczenie tłumaczone jest syntezą bądź posttranslacyjną modyfikacją białek tj.: dysmutazy ponadtlenkowej zależnej od Mn (MnSOD), indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) czy białek szoku termicznego (HSP) (Baxter i wsp., 1994; Bolli, 2000). Aktywacja receptorów A2 powoduje głównie wazodylatację w wyniku bezpośredniej relaksacji mięśni gładkich ściany naczyń oraz poprzez zwiększenie produkcji tlenku azotu (Smits i wsp., 1995). Dodatkowo aktywacja receptorów A2 odpowiada za obniżenie aktywności granulocytów obojętnochłonnych, wywiera efekt przeciwwzkrzepowy, przeciwwzapalny, zmniejsza produkcję wolnych rodników w fazie reperfuzji (Cronstein i wsp., 1990).

Z danych piśmiennictwa wynika również, że adenozyina hamuje produkcję TNF $\alpha$ , odgrywającego istotną rolę w patologii niewydolności serca i odrzutu przeszczepu (Wagner i wsp., 1998). Poza kardioprotekcyjnymi mechanizmami za pośrednictwem receptorów typu A, zwiększone stężenie międzykomórkowej adenozyiny podczas reperfuzji ma również inne korzystne działania. Adenozyina może być łatwo wchłonięta przez kardiomiocyty i szybko refosforylowana do AMP i dalej do ATP, dzięki czemu szybko może zostać uzupełniona pula nukleotydów adeninowych (Seifart i wsp., 1980; Kalsi i wsp., 1998).

Pomimo ogromnej ilości dowodów na korzystne działanie adenozyiny w układzie sercowo-naczyniowym, pochodzących z badań eksperymentalnych, obecnie w praktyce klinicznej adenozyina stosowana jest jedynie w celu przerwania częstoskurczu nadkomorowego. Przyczyną braku szerszych wskazań do stosowania adenozyiny jest występowanie efektów ubocznych podczas jej stosowania tj.: hipotonii, bradyarytmii, wywołania „efektu podkradania” w przypadku obecności istotnego zwężenia w tętnicy wieńcowej, a także występowania innych objawów nietolerancji w postaci bólu dławicowego, bólu głowy, duszności czy zaczerwienienia twarzy (Ogilby i wsp., 1993). Jak do tej pory jedynie kilka prac zostało poświęconych badaniu roli egzogennie podanej adenozyiny w warunkach ischemii i reperfuzji u ludzi. Garratt i Mahaffey (Garratt i wsp., 1998; Mahaffey i wsp., 1999) wykazali istotną redukcję strefy zawału u pacjentów z rozpoznaniem zawału serca leczonych angioplastyką wieńcową a następnie dożylnym wlewem adenozyiny w stężeniu 70  $\mu\text{g}/\text{kg m.c.}/\text{min}$ . Z kolei Marzilli i Assali (Marzilli i wsp., 2000; Assali i wsp., 2000) wykazali redukcję występowania zjawiska „no reflow” i poprawę rokowania po zawale serca w grupie pacjentów leczonych wlewem adenozyiny do tętnic wieńcowych oraz poddanych pierwotnej angioplastyce wieńcowej. Wpływ adenozyiny obecnej w płynie kardioplegicznym, stosowanym podczas operacji pomostowania aortalno-wieńcowego, na przebieg pooperacyjny badano w randomizowanym, podwójnie ślepy, kontrolowanym placebo badaniu z udziałem 253 pacjentów. W grupie traktowanej adenozyiną wykazano zmniejszenie częstości stosowania amin katecholowych oraz redukcję ryzyka wystąpienia zawału serca i śmierci (Mentzer, Jr. i wsp., 1999). Ostatnim, i jak do tej pory największym programem badającym znaczenie adenozyiny jako dodatkowego środka w leczeniu zawału mięśnia sercowego było randomizowane, podwójnie ślepe, kontrolowane placebo, wielośrodkowe badanie - AMISTAD II. Brało w nim udział 2118 pacjentów z rozpoznaniem zawału serca ściany przedniej z uniesieniem odcinka

ST (Ross i wsp., 2005). W badaniu tym testowano wpływ 3 godz. dożylnego wlewu adenozyiny w dawkach 50 lub 70  $\mu\text{g}/\text{kg m.c.}/\text{min}$  rozpoczętego 15 min przed terapią reperfuzyjną (fibrynolizą bądź angioplastyką wieńcową) na wielkość strefy zawałowej, niewydolność serca i śmiertelność do 6 miesięcy od rozpoznania zawału. Badanie to wykazało istotne, bo aż 57% zredukowanie strefy zawału w grupie traktowanej wysoką dawką adenozyiny w stosunku do grupy otrzymującej placebo. Pomimo tak wyraźnej redukcji strefy zawału, badacze odnotowali jedynie słaby trend w kierunku poprawy rokowania u pacjentów leczonych dożylnym wlewem adenozyiny (Ross i wsp., 2005).

## 1. 8. Kinaza białek zależna od AMP

Procesem mogącym indukować mechanizmy protekcyjne w komórkach serca w warunkach ischemii jest także aktywacja kinazy białkowej zależnej od AMP (AMPK). AMPK jest kluczowym enzymem odpowiedzialnym za utrzymanie energetycznej homeostazy w komórkach serca (Dyck i Lopaschuk, 2006). Do allosterycznej aktywacji AMPK dochodzi w warunkach ischemii w wyniku zwiększenia stosunku AMP/ATP (Frederich i Balschi, 2002). AMPK może być także aktywowana w wyniku fosforylacji przez inne AMPKK jak np.: STRAD (*STE-related adapter*), MO25 (*mouse protein 25*), LKB1 (ludzkie białko o właściwościach kinazy serynowo/treoninowej) czy przez kinazę kinazy białek zależnej od kalmoduliny (Hardie i Carling, 1997). Aktywacja AMPK ma na celu odbudowanie komórkowej puli ATP, głównie w wyniku włączenia procesów utleniania glukozy i kwasów tłuszczowych. Wzrost katabolizmu glukozy odbywa się poprzez zwiększenie wychwytu glukozy wskutek przemieszczenia transportera glukozy GLUT4 do sarkolemy (Russell, III i wsp., 2004), a także poprzez fosforylację i aktywację fosfofruktokinazy-2, wytwarzającej silny aktywator glikolizy – fruktozo-2,6-bisfosforan (Marsin i wsp., 2000). Wzrost utleniania kwasów tłuszczowych odbywa się w wyniku złożonych regulacji, głównie w wyniku fosforylacji i inhibicji karboksylazy acetylo-CoA, w wyniku której maleje stężenie sercowego malonylo-CoA, co w efekcie prowadzi do zwiększenia aktywności palmitoilotransferazy karnitynowej I i tym samym do wzrostu transportu acylo-CoA do mitochondrium (Kudo i wsp., 1995). W wyniku aktywacji AMPK dochodzi także do przemieszczenia CD36 do sarkolemy, co prowadzi do zwiększonego wychwytu wolnych kwasów tłuszczowych przez miocyty (Luiken i wsp., 2003) oraz do



fosforylacji i aktywacji dekarboksylazy malonylo-CoA, kolejnego czynnika prowadzącego do nasilenia katabolizmu wolnych kwasów tłuszczowych (Saha i wsp., 2000).

## **1. 9. Farmakologiczna inhibicja deaminazy AMP**

Zahamowanie deaminacji AMP z dużym prawdopodobieństwem będzie powodowało wzrost stężenia AMP w komórce, szczególnie w warunkach deficytu energetycznego, co prowadzi będzie do zwiększonej produkcji adenozy. Spowoduje to także wzrost stosunku AMP/ATP, będącego sygnałem aktywującym działanie kinazy białkowej AMP zależnej (AMPK). Zarówno zwiększona produkcja adenozy, jak i aktywacja AMPK są znanymi czynnikami odgrywającymi ochronną rolę w warunkach niedokrwienia i niewydolności serca. Farmakologiczną inhibicję AMPD jako potencjalny cel terapeutyczny dodatkowo uzasadniają ostatnie doniesienia o korzystnym wpływie polimorfizmu C34T genu *AMPD1* w ChNS i PNS. Dlatego głównym celem niniejszej pracy była ocena wpływu farmakologicznej inhibicji deaminazy AMP na metabolizm i funkcję serca w eksperymentalnych modelach choroby niedokrwiennej i niewydolności serca.

## 2. Cel pracy

Celem pracy było:

1. Porównanie działania potencjalnych inhibitorów deaminazy AMP na aktywność izolowanego enzymu i w homogenatach serc szczurów.
2. Zbadanie wpływu inhibitorów deaminazy AMP: TET01 i N-metylonikotynamidu na metabolizm nukleotydów oraz stan energetyczny izolowanych kardiomiocytów szczura.
3. Zbadanie wpływu TET01 na aktywność deaminazy AMP w sercu szczura perfundowanym w układzie Langendorffa.
4. Zbadanie farmakokinetyki TET01 u myszy po jego dożylnym podaniu. Ustalenie optymalnej dawki i sposobu podania TET01.
5. Zbadanie wpływu TET01 na zmiany w EKG oraz stężenie troponiny I w eksperymentalnym zawale serca u myszy C57BL ApoE/LDLR(-/-).
6. Zbadanie wpływu N-metylonikotynamidu na funkcję i metabolizm serc szczurów w eksperymentalnym modelu pozawałowej niewydolności serca.

### **3. Materiały i metody**

#### **3.1. Zwierzęta doświadczalne**

Wszystkie badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody 3 Lokalnej Komisji Etycznej w sprawie doświadczeń na zwierzętach w Gdańsku (uchwała nr 15/2006, 37/2007 i NKEBN 483/2006) oraz po uzyskaniu zezwolenia Dziekana Wydziału Lekarskiego GUMeD na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach (zezwolenie nr 8/06 i 11/08). Wszelkie procedury przeprowadzane na zwierzętach wykonywano w oparciu o wytyczne o traktowaniu zwierząt laboratoryjnych, podaży iniekcji i pobieraniu krwi (Diehl i wsp., 2001).

Do doświadczeń zostały użyte zwierzęta laboratoryjne: szczury rasy Sprague – Dawley zakupione w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, myszy rasy C57BL/6J zakupione w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej, oraz genetycznie modyfikowane myszy rasy C57BL (ApoE/LDLR-/-), otrzymane ze Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Do znieczulenia zwierząt laboratoryjnych używana była mieszanka ksylazyny z ketaminą podawana w iniekcjach drogą dootrzewnową w dawce kolejno: 2/35 mg/kg m.c. u szczura (Itter i wsp., 2004) i 5/80 mg/kg m.c. u myszy (Bryant i wsp., 1999). Do zabiegów terminalnych stosowano dootrzewnową iniekcję thiopentalu w dawce 50 mg/kg m.c.

#### **3.2. Modele eksperymentalne oraz protokoły doświadczeń**

##### **3.2.1. Izolowana deaminaza AMP i homogenat serca szczura**

###### ***Analiza wpływu TET01 i kofeiny aktywność izolowanej deaminazy AMP***

Fragmenty ludzkiego mięśnia czworogłowego uda uzyskano z Zakładu Medycyny Sądowej GUMeD. Po oddzieleniu tkanki łącznej, mięsień szkieletowy został podzielony na części po 5 g a następnie zhomogenizowany w 15 ml 89 mM buforu fosforanowego o pH 6,5, zawierającego: 180 mM KCl, 1 mM thioetanol, 1 mM fluorek fenylometylosulfonowy i 1 g/ml inhibitor trypsyny. Następnie homogenat został

dwukrotnie zwirowany, kolejno 30 min przy 600 rpm i 30 min przy 4000 rpm, uzyskany supernatant został wprowadzony na kolumnę wypełnioną fosfocelulozą (2,6 cm x 20 cm) zgodnie z opisaną procedurą (Smiley, Jr. i wsp., 1967). Następnie kolumnę płukano kolejno buforem ekstrakcyjnym 0,4 M KCl, i 0,75 M KCl w objętościach kolejno 0,5, 0,2 i 0,1 dm<sup>3</sup>. Deaminaza AMP została wypłukana liniowo narastającym gradientem 0,75–2,0 M KCl. Frakcje o największej aktywności enzymatycznej zostały zebrane i powtórnie nałożone na kolumnę z fosfocelulozą (2,6 cm x 20 cm), którą płukano kolejno: 0,1 dm<sup>3</sup> 0,4 M KCl i 0,1 dm<sup>3</sup> 0,75 M KCl a następnie 2,0 M KCl przy przepływie 7 ml/h.

Frakcję izolowanej deaminazy AMP rozcieńczono 100 krotnie buforem 50 mM Tris, pH 7,0 z dodatkiem inhibitora w różnych stężeniach. Oznaczenie aktywności prowadzono zgodnie z opisem podanym uprzednio (Kochan i wsp., 1994). Roztwór enzymu preinkubowano przez 15 min w temp 37°C z TET01 w zakresie stężeń 0,01 – 30 µM oraz z kofeiną w zakresie stężeń 0,01 – 3 mM. Następnie do każdej próbki dodawano 25 mM AMP i inkubowano przez kolejne 5 min w temp 37°C. Inkubację przerywano dodaniem 0,4 M HClO<sub>4</sub>. Następnie mieszaninę doprowadzono do pH 5–6 za pomocą 3 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Tak przygotowaną próbkę analizowano przy pomocy HPLC. Kontrolę stanowiły próbki bez inhibitora.

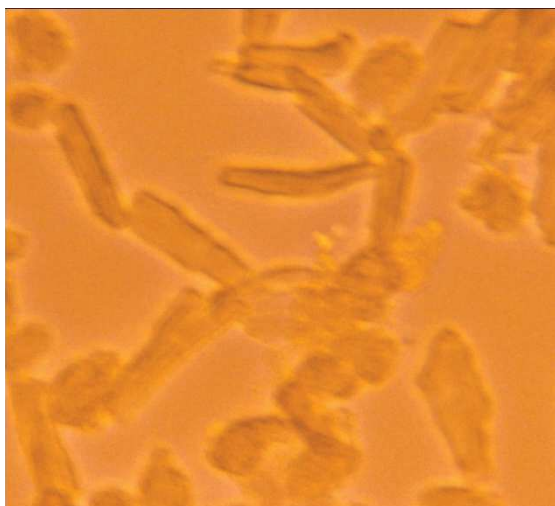
#### ***Analiza wpływu TET01 i kofeiny na aktywność deaminazy AMP w homogenacie serca szczura***

Po 5 min perfuzji, szczurze serce o masie 1,7 g zostało zhomogenizowane w 15 ml buforu zawierającego 150 mM KCl, 20 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (pH 7,0, 4°C). Następnie homogenat wirowano przez 30 min w 4°C przy 3700 rpm a uzyskany supernatant zebrano (Kochan i wsp., 1994). Supernatant rozcieńczono 10-krotnie buforem 50 mM Tris pH 7,0 a następnie inkubowano przez 15 min w 37°C z TET01 w zakresie stężeń 0,01–100 µM. Następnie do każdej próbki dodano 100 µM AMP i inkubowano przez kolejne 5 min w temp 37°C, po czym reakcję przerywano dodaniem 0,4 mM HClO<sub>4</sub>. Następnie mieszaninę doprowadzono do pH 5–6 za pomocą 3 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Tak przygotowaną próbkę analizowano przy pomocy HPLC. Kontrolę stanowiły próbki bez inhibitora.

### 3.2.2. Izolowane kardiomiocyty

#### *Procedura izolacji kardiomiocytów*

Wypreparowane serce, podłączone do układu Langendorffa, było wstępnie perfundowane w układzie otwartym przy użyciu pompy perystaltycznej z przepływem 10 ml/min buforem A (zawierającym: 60 mM NaCl, 16 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,25 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM HEPES, 80 mM mannitol, 11 mM glukozę, 5 mM pirogronian, 20 mM taurynę; pH 7,2, 37°C) gazowanym w sposób ciągły karbogenem (95%  $\text{O}_2$  / 5%  $\text{CO}_2$ ). Po 10 min perfuzji wstępnej, układ przełączany był na model recyrkulacji, 20 ml buforu A zawierającego dodatkowo 0,1% kolagenazę i 0,1% BSA. Po kolejnych 15 min perfuzji dodawano do buforu  $\text{CaCl}_2$  uzyskując stężenie 0,25 mM a po kolejnych 5 i 10 min, zwiększano je odpowiednio do 0,5 i 0,75 mM. Po 35–45 min perfuzji serce było rozdrabniane, a uzyskaną zawiesinę filtrowano przez nylonową siatkę. W kolejnym etapie zawiesinę miocytów wirowano przez 1 min przy 500 rpm a supernatant wylewano. Osadzone na dnie miocyty zawieszano w buforze A z 4% BSA (pH 7,2, 37°C) i ponownie wirowano a uzyskany supernatant wylewano. Procedurę tą powtarzano trzykrotnie i za każdym razem skracano czas wirowania o 5 s. Następnie miocyty zawieszano w buforze B (zawierającym: 120 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM HEPES, 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 11 mM glukozę, 2 mM pirogronian, pH 7,4, 37°C) z dodatkowo 2% BSA. Inkubowano je przez 15 min w 37°C, ostrożnie mieszając co kilka minut przeciwdziałając nadmiernej sedymentacji miocytów. Po inkubacji miocyty poddawano kolejnemu cyklowi trzech wirowań w buforze A z 4% BSA w sposób identyczny jak opisano powyżej. Przed ostatnim wirowaniem pobierano 1  $\mu\text{l}$  zawiesiny miocytów, wprowadzano do komory Thoma i po dodaniu 1% błękitu trypanu określano ilość i żywotność komórek (Ryc. 2). Po ostatnim wirowaniu supernatant zlewano, a miocyty zawieszano w buforze B z 2% BSA (pH 7,4, 37°C), w takiej objętości buforu by otrzymać liczbę około 75 tys. żywych kardiomiocytów w 1 ml buforu (Smolenski i wsp., 1991).



Ryc. 2. Wyizolowane kardiomiocyty szczura.

### ***Inkubacja wyizolowanych kardiomiocytów z TET01 bez stymulacji katabolizmu***

Do wyizolowanych kardiomiocytów, zawieszonych w 6 ml buforu B z 2% BSA, dodawano 5  $\mu\text{M}$  EHNA i 10  $\mu\text{M}$  ITU. Do 330  $\mu\text{l}$  zawiesiny dodawano odpowiednio: do próbek kontrolnych 0,9% NaCl a do pozostałych dodawano 0,03, 0,1, 0,3, 1 i 3 mM TET01. Próbkę inkubowano przez 75 min. Po upływie tego czasu pobierano 30  $\mu\text{l}$  środowiska w celu oznaczenia aktywności LDH a do pozostałej objętości zawiesiny dodawano 2,4 M kwas nadchlorowy, tak by jego końcowe stężenie wynosiło 0,4 M. Do 2 próbek kontrolnych z miocytami dodawano 0,1% Triton X i po dokładnym wymieszaniu zawartości pobierano 30  $\mu\text{l}$  w celu oznaczenia aktywności LDH. Po przygotowaniu materiału jak opisano w części 3.3.1 w próbkach oznaczano stężenia nukleotydów adeninowych i ich katabolitów przy pomocy HPLC. Metodą Bradforda mierzono ilość białka w próbce.

### ***Inkubacja wyizolowanych kardiomiocytów z inhibitorami AMPD w warunkach stymulacji katabolizmu***

Do wyizolowanych kardiomiocytów, zawieszonych w 6 ml buforu B z 2% BSA dodawano 5  $\mu\text{M}$  EHNA i 10  $\mu\text{M}$  ITU. Do próbek zawierających po 330  $\mu\text{l}$  zawiesiny dodawano odpowiednio: a) 0,9% NaCl w przypadku próbek kontrolnych, b) 0,03, 0,1, 0,3, 1 i 3 mM TET01 i następnie preinkubowano przez 30 min, 2,4 i 8 godz., c) 1 mM 4PYR, MNA, NA, met-4-PY, 2-P, 4-KPA, PA, met-2-PY i preinkubowano przez 30 min, d) 1 mM 4PYR, MNA i preinkubowano przez 6 godz, e) 0,2 mM purynorybozyd i preinkubowano odpowiednio przez 10, 30 i 60 min. Po zakończeniu fazy preinkubacji

prowadzonej w temperaturze 37°C do mieszaniny dodawano w celu stymulacji katabolizmu 5 µg/ml oligomycyny i 10 mM deoksyglukozy. Inkubację kontynuowano przez kolejne 45 min. Po tym czasie pobierano po 30 µl środowiska w celu oznaczenia aktywności LDH a następnie do pozostałej objętości zawiesiny dodawano 2,4 M kwas nadchlorowy, tak by jego końcowe stężenie wynosiło 0,4 M. Do 2 próbek kontrolnych z miocytami dodawano 0,1% Triton X i po dokładnym wymieszaniu zawartości pobierano 30 µl w celu pomiaru aktywności LDH. Po przygotowaniu materiału jak opisano w części 3.3.1. w próbkach przy pomocy HPLC oznaczano stężenia nukleotydów adeninowych i ich katabolitów. Metodą Bradforda określano ilość białka w próbce.

### ***Ocena transportu TET01 do wyizolowanych kardiomiocytów***

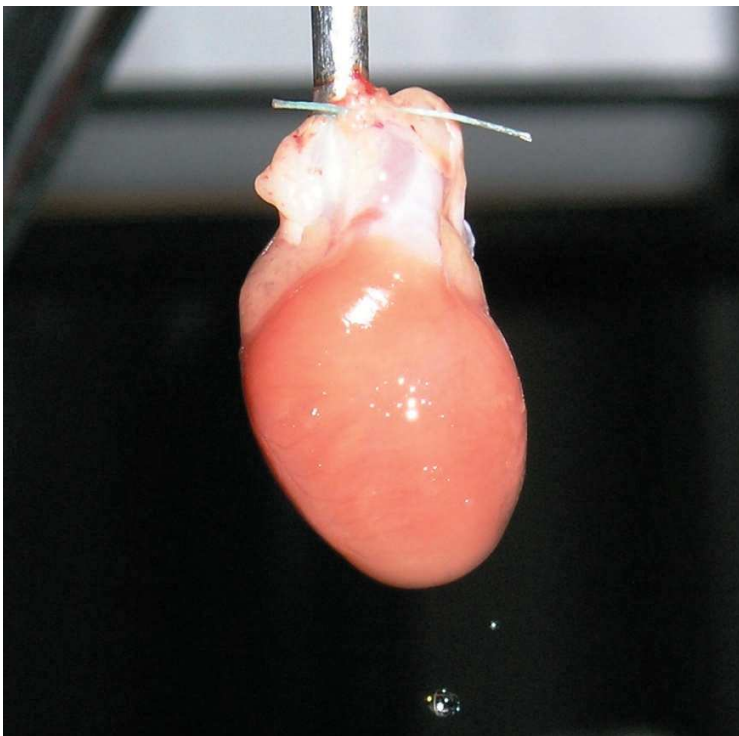
Wyizolowane kardiomiocyty inkubowano z 0,9% NaCl (kontrola) i z 0,3 mM TET01 przez 0,5, 2, 4 i 8 godz. Po inkubacji do każdej próbki dodawano 20 µl 0,5 M MNA służącego jako marker przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Następnie całą zawiesinę kardiomiocytów zbierano i wprowadzano na warstwę 400 µl bromododekanu, pod którą znajdowała się warstwa 100 µl 2 M HClO<sub>4</sub>. Następnie próbki wirowano przez 3 min w 4°C z prędkością 14000 rpm. Po wirowaniu najwyższą warstwę (środowisko) zbierano i dodawano taką objętość 2,4 M HClO<sub>4</sub>, by jego końcowe stężenie wynosiło 0,4 M. Następnie mieszaninę wirowano przez 10 min w 4°C przy 14000 rpm a uzyskany supernatant zobojętniano 2 M KOH. Jednocześnie po dokładnym zebraniu warstwy bromododekanu, zbierano dolną warstwę (komórki) i zobojętniano ją 2 M KOH. Następnie 100 µl zobojętnionych próbek z dolnej i górnej warstwy liofilizowano a następnie rozpuszczano je w 100 µl buforu zawierającego 16,9 mM kwas nonafluoropentanoinowy i dodawano 5 µl 1 mM chloroadenozyny (jako standard wewnętrzny). Tak przygotowany materiał analizowano przy pomocy LC/MS w celu oznaczenia stężenia TET01 i MNA. Osad miocytów rozpuszczano w 0,5 ml 2 M NaOH i metodą Bradforda oznaczano stężenie białka.

### **3.2.3. Perfuzja izolowanego serca**

Serca pobierano po uprzednim głębokim znieczuleniu zwierzęcia. Po rozcięciu powłoki jamy brzusznej wzdłuż łuków żebrowych, do żyły głównej tylnej podawano heparynę w dawce 200 IU. Następnie rozpoczynając od wyrostka mieczykowatego i

kierując się do wcięcia jarzmowego przecinano przyczepy lewych żeber do mostka. Po uwidocznieniu serce odcinano od naczyń z naddatkiem tkanki płucnej i niezwłocznie umieszczano w roztworze zawierającym: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,4 mM  $\text{CaCl}_2$ , i 11 mM glukozę (pH 7,4, 4°C).

Po pobraniu serca, umieszczeniu je w płynie kardioplegicznym a następnie po odcięciu naddatku tkanki płucnej wypreparowano aortę. Serce było podwieszane do układu Langendorffa poprzez nasunięcie aorty na kaniulę a następnie założeniu pętli przytwierdzającej aortę do kaniuli (Ryc. 3). Ciśnienie o wartości około 80 mmHg, niezbędne do perfuzji tętnic wieńcowych, było utrzymywane przez stale uzupełniający się do wysokości jednego metra słup buforu Krebsa – Henseleit'a (zawierającego: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,4 mM  $\text{CaCl}_2$ , i 11 mM glukozę), bądź przez pompę perystaltyczną z regulacją prędkości przepływu buforu. Ciśnienie w czasie perfuzji serca było stale monitorowane przez wbudowany do układu czujnik ciśnienia. Bufor perfundujący serce (37°C, pH 7,4) był przefiltrowany przez filtr o wielkości porów 0,45  $\mu\text{m}$ , i stale gazowany karbogenem (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) (Langendorff, 1895).



Ryc. 3. Serce szczura perfundowane w układzie Langendorffa.



Wyizolowane serce szczura było perfundowane w układzie Langendorffa w systemie otwartym buforem Krebsa – Henseleit’a przez 10 min (perfuzja wstępna) a następnie na 10 min układ przełączany był na model recyrkulacji, w którym krążyło 30 ml stale gazowanego karbogenem buforu Krebsa – Henseleit’a o temp 37°C zawierającego 300 µM TET01 lub tylko buforem w grupie serc stanowiących kontrolę. Podczas etapu recyrkulacji, serce umieszczano w dwuwarstwowym szklanym naczyniu stanowiącym płaszcz wodny a górę naczynia przykrywano szczelnie parafilmem, zapewniając utrzymanie stałej temp serca (37°C) podczas ischemii. Ischemię serca wywoływano przez zatrzymanie perfuzji serca na 5 min poprzez odcięcie przepływu buforu perfundującego. Następnie serce niezwłocznie zamrażano w ciekłym azocie. Po przygotowaniu materiału jak opisano w części 3.3.1. próbki analizowano pod kątem analizy stężeń nukleotydów adeninowych oraz ich katabolitów przy użyciu HPLC (Ogino i wsp., 1996).

#### **3.2.4. Farmakokinetyka TET01 *in vivo***

Samce myszy rasy C57BL o masie 25–30 g były znieczulone mieszanką ksylazyny z ketaminą w dawce podanej uprzednio. W celu stabilizacji warunków doświadczenia, mysz znajdowała się w inkubatorze klinicznym Medicor w temp 30°C. Po rozcięciu skóry w pachwinie lewego uda wypreparowywano żyłę udową i zakładano do niej wkłucie z igły 0,33 mm z nasuniętym na drugi koniec drenem polietylenowym, umożliwiającą iniekcję oraz wykonywanie wlewów przez pompę infuzyjną Ascor AP14. Przez rozciętą powłokę jamy brzusznej zakładano wkłucie do żyły głównej tylnej z igły 0,6 mm z nasuniętym na drugi koniec drenem do pobierania próbek krwi. Znieczulonym myszom podawano w iniekcji dożylniej 2 mg TET01 a następnie po 15 min, 1 i 3 godz. pobierano serca. Każde z nich przecinano na dwie równe części i inkubowano w probówkach przez 5 i 15 min w 37°C. Po jej zakończeniu serca zamrażano w ciekłym azocie. W czasie 5, 15 min, 1 oraz 3 godz. po podaniu TET01 z żyły głównej tylnej przez dren polietylenowy pobierano po 50 µl krwi i od razu zamrażano w ciekłym azocie. Próbki krwi i część serca przygotowywano do analizy stężenia TET01 na LC/MS metodą opisaną w części 3.3.2.

W innym eksperymencie znieczulonym myszom podawano 5 mg TET01 z dostępu przez żyłę udową w infuzji przez 0,5 i 1 godz. Po ukończeniu infuzji pobierano krew i serce. Serce przecinano na dwie części i inkubowano w probówkach przez 5 i 15

min w 37°C, a następnie zamrażano w ciekłym azocie. 50 µl z pobranej krwi zamrażano w ciekłym azocie bezpośrednio po pobraniu, a pozostałą część wirowano przez 3 min w 21°C przy 3000 rpm uzyskując rozdział na osocze i elementy morfotyczne, po czym obie frakcje zamrażano w ciekłym azocie.

### **3.2.5. Eksperymentalny zawał serca wywołany hipoksją**

Samce myszy rasy C57BL ApoE/LDLR(-/-) o masie 25–30 g były znieczulane mieszanką ksylazyny z ketaminą w dawce podanej uprzednio. Po uzyskaniu znieczulenia, szyję, klatkę piersiową oraz pachwinę lewego uda golono mechaniczną golarką. Środkowym, podłużnym cięciem, przecinano skórę szyi, wypreparowywano tkankę łączną i powierzchowną warstwę mięśniową w celu uwidocznienia tchawicy a następnie intubowano mysz rurką do intubacji o średnicy 1 mm. Następnie mysz podłączano do respiratora SAR-830/P i wentylowano mieszanką 21% O<sub>2</sub>/ 79% N<sub>2</sub> (objętość oddechowa 8 ml\*kg<sup>-1</sup>; częstość 200 oddechów\*min<sup>-1</sup>) (Schwarte i wsp., 2000). Procentowa zawartość tlenu w mieszaninie oddechowej była stale monitorowana przez aparat Capnomac Ultima, GE Healthcare. W celu stabilizacji warunków doświadczenia, mysz wentylowana przez respirator znajdowała się w inkubatorze klinicznym Medicor w temp 30°C. Następnie wszywano myszy trzy elektrody do pomiaru EKG, pierwszą w prawy mięsień piersiowy większy, drugą w lewy mięsień najszerszy grzbietu oraz trzecią w mięsień czworogłowy prawego uda. Elektrody podłączono kablem TSD 155C do rejestratora BIOPAC Systems MP 150 sprzężonego z platformą PC. Program AcqKnowledge 3.7.2 umożliwiał obserwowanie EKG w czasie rzeczywistym oraz archiwizację danych w formacie cyfrowym. Po rozcięciu skóry w pachwinie lewego uda wypreparowywano żyłę udową i zakładano do niej wkłucie z igły 0,33 mm z nasuniętym na drugi koniec drenem polietylenowym, umożliwiając wykonywanie wlewów przez pompę infuzyjną Ascor AP14. Obrazowo pokazano to na Ryc. 4.



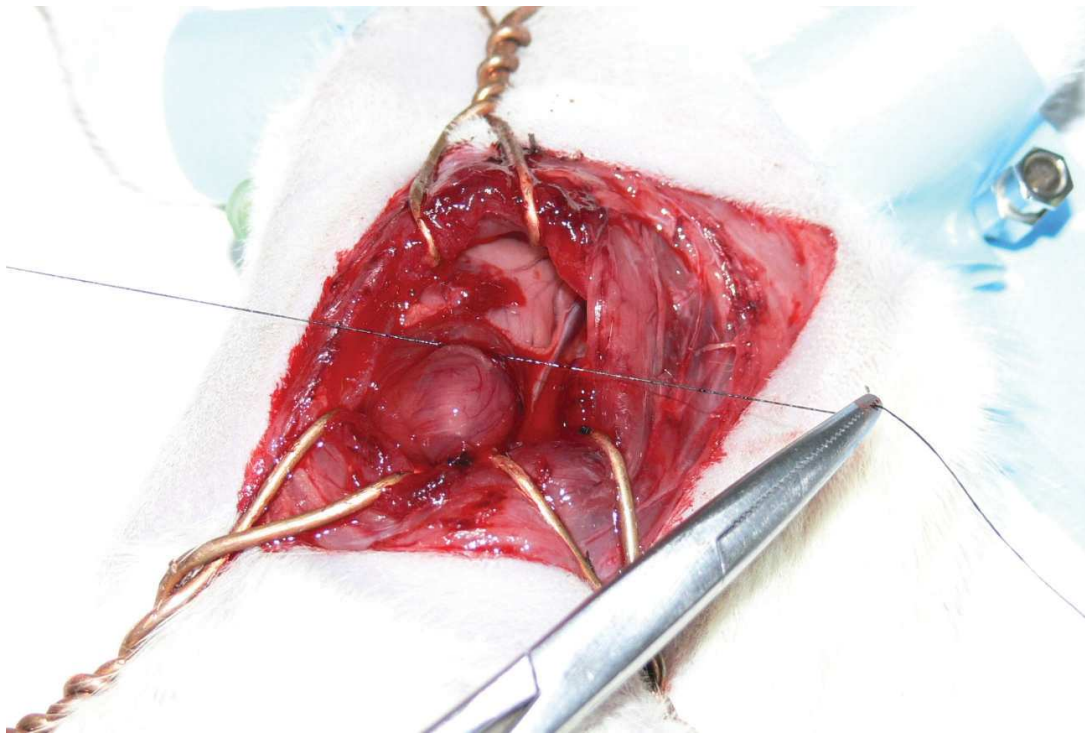
Ryc. 4. Model zawału serca indukowanego hipoksją.

TET01 w ilości 5 mg podawano myszom w 30 min dożylnym wlewie przy użyciu pompy infuzyjnej w stężeniu 10 mg/ml, zaś kontrolnym myszom jednakową objętość 0,9% NaCl. Po ukończeniu infuzji zmniejszono zawartość tlenu w mieszaninie oddechowej do 5% przez 5 min a następnie powracano do standardowej mieszaniny oddechowej tj.: 21% O<sub>2</sub>/ 79% N<sub>2</sub> i kontynuowano ją przez dalsze 15 min (Caligiuri i wsp., 1999). Po przeprowadzeniu procedury hipoksji i reoksygenacji mysz ekstubowano, odłączano od elektrod, zszywano skórę a następnie przenoszono do klatki. Po upływie 24 godz od hipoksji ponownie znieczulano mysz i po podłączeniu do respiratora, z dostępu przez żyłę główną tylną pobierano krew a bijące serce natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Pobraną krew wirowano przez 3 min w temperaturze pokojowej przy 3000 rpm, a w uzyskanym osoczu oznaczano stężenie troponiny I.

### 3.2.6. Eksperymentalna niewydolność serca

#### *Model niewydolności serca szczura wywołany podwiązaniem tętnicy wieńcowej*

Samce szczurów rasy Sprague-Dawley o masie 250–300 g zostały znieczulone mieszkanką ksylazyny z ketaminą. Procedurę powięzania tętnicy wieńcowej prowadzono zgodnie z opisem podanym uprzednio (Suzuki i wsp., 2001). Po uzyskaniu znieczulenia klatkę piersiową golono przy pomocy mechanicznej golarki. Następnie przy pomocy laryngoskopu wykonywano intubację wenflonem 17G (Jou i wsp., 2000) a następnie zwierzęta podłączano do respiratora i wentylowano 100% tlenem (objętość oddechowa  $9 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; częstość  $90 \text{ oddechów} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (Walder i wsp., 2005). Torakotomię wykonywano na wysokości lewej, czwartej przestrzeni międzyżebrowej. Po uwidocznieniu serca, przy użyciu nici 6-0 Ethicon Mersilk (Johnson&Johnson) podwiązywano gałąź przednią zstępującą lewej tętnicy wieńcowej w jej części początkowej, co przedstawiono na Ryc. 5. Po zabiegu przy użyciu nici 3-0 Amifilm (Sinpo Poznań), wszystkie warstwy zszywano. Zabieg prowadzono w aseptycznych warunkach. Śmiertelność procedury wynosiła około 25%. Po 2 tygodniach od wytworzenia zawału i po echokardiograficznej ocenie funkcji serca, szczury rozdzielano na dwie grupy: grupę, której podawano rozpuszczony w wodzie pitnej MNA w dawce  $100 \text{ mg/kg mc/dobę}$  oraz grupę kontrolną.



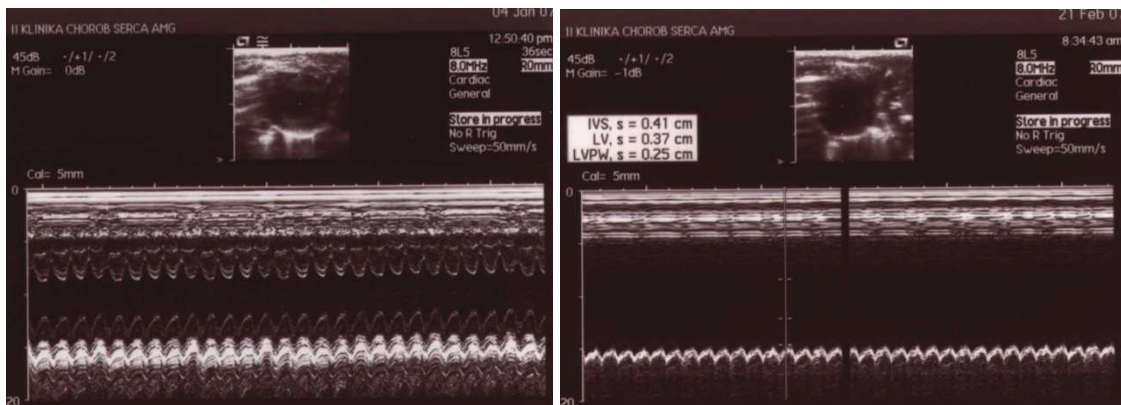
Ryc. 5. Podwiązanie tętnicy wieńcowej u szczura. Model niewydolności serca indukowanej zawałem.

### ***Echokardiograficzna ocena mechanicznej funkcji serca szczura in vivo***

Szczurom, które miały wywołaną podwiązaniem tętnicy niewydolność serca wykonywano badania echokardiograficzne w II Klinice Kardiologii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w przy użyciu aparatu Acuson Sequoia 512 z głowicą 8L5 (8 MHz). Z projekcji przymostkowej w osi krótkiej wykonywano pomiary w trybie M-mode a następnie z tej samej projekcji w trybie 2D przy użyciu planimetrycznej metody Simpson'a wyliczano wielkość frakcji wyrzutowej (Yang i wsp., 1999). Każde zwierzę miało wykonane badanie echokardiograficzne w 2, 4 i 8 tyg. od czasu podwiązania tętnicy wieńcowej (Ryc. 6 A i B).

**A**

**B**

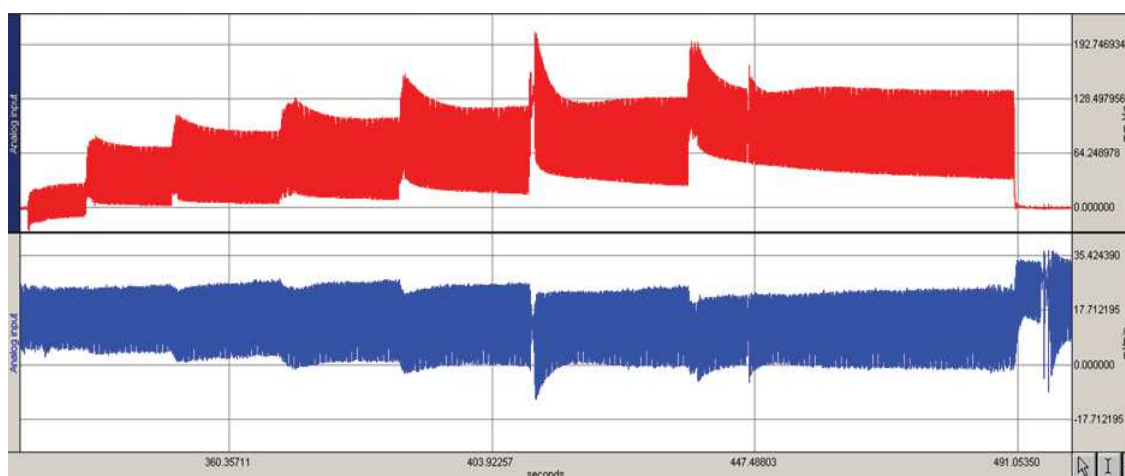


Ryc. 6. Pomiar kurczliwości lewej komory serca szczura w projekcji przymostkowej, w osi krótkiej przy zastosowaniu opcji M-mode. Ryc. 6A (po lewej) przedstawia serce kontrolne, natomiast Ryc. 6B (po prawej) przedstawia rozstrzeń lewej komory powstałej po 8 tyg. od podwiązania gałęzi przedniej zstępującej.

### ***Inwazyjna ocena mechanicznej funkcji serca szczura in vitro***

Po znieczuleniu szczura i dożylniej iniekcji 200 IU heparyny, pobrane serce, niezwłocznie podwieszono do układu Langendorffa i perfundowano w systemie otwartym buforem Krebsa – Henseleit'a przy ciśnieniu wytwarzanym hydrostatycznie przez jednometrowej wysokości słup buforu. W czasie pierwszych 15 min perfuzji wprowadzano do lewej komory serca przez nacięcie w ścianie lewego przedsionka foliowy balon szczelnie zamocowany do polietylowego drenu o średnicy 2 mm. Drugi koniec drenu podłączano do przetwornika ciśnienia krwi TSD 104A i rejestratora BIOPAC Systems MP 150 sprzężonego z platformą PC. Program AcqKnowledge 3.7.2 umożliwiał obserwację ciśnienia w czasie rzeczywistym oraz archiwizację danych w formacie cyfrowym. Do serca podłączono stymulator EV4542, a elektrody umieszczono w ścianie prawego przedsionka i w okolicy koniuszka serca. Stymulację

serca prowadzono z częstością 350 pobudzeń na min. Następnie do balonu wprowadzono wodę w celu jego wypełnienia w jamie lewej komory. Procedurę wykonywano tak, by ciśnienie końcowo-rozkurczowe w lewej komorze nie przekraczało wartości 40 mmHg. W czasie trwania eksperymentu dbano by w drenie i w balonie nie znajdowały się pęcherzyki powietrza oraz by objętość balonu była odpowiednia do badanego serca. Po takim przygotowaniu, otwierano zawór układu w celu wypłynięcia nadmiaru wody i wyzerowania ciśnienia w balonie. Następnie zamykano zawór układu i w 60 sekundowych odstępach czasowych wprowadzano strzykawką do balonu kolejne objętości wody po 100  $\mu$ l aż do uzyskania ciśnienia końcowo-rozkurczowego o wartości 40 mmHg. Następnie otwierano zawór układu w celu ponownego wypłynięcia nadmiaru wody i wyzerowania ciśnienia, po czym zawór układu ponownie zamykano a procedurę pomiaru funkcji serca rozpoczynano od początku podając w 60 sekundowych interwałach do balonu po 50  $\mu$ l wody aż do uzyskania ciśnienia końcowo-rozkurczowego o wartości 40 mmHg. Przepływ wieńcowy stale rejestrowano przy pomocy czujnika elektromagnetycznego podłączonego do rejestratora BIOPAC (Ryc. 7). U wszystkich szczurów po upływie 8 tyg. od wykonania podwiązania tętnicy wieńcowej oznaczono funkcję mechaniczną serca. Z analizy wykluczono pomiary funkcji serc, w których nie stwierdzono wytworzenia blizny zawałowej (Smolenski i wsp., 2001). Po ukończeniu pomiaru, serca natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i po przygotowaniu materiału jak opisano w części 3.3.1. próbkę analizowano przy użyciu HPLC w celu oznaczenia stężenia nukleotydów adeninowych i ich metabolitów.



Ryc. 7. Inwazyjny pomiar funkcji serca z oceną zmiany ciśnienia w lewej komorze serca (górny wykres) oraz pomiar przepływu wieńcowego mierzonego czujnikiem elektromagnetycznym (dolny wykres).

### 3.3. Metody analityczne

#### 3.3.1. Analiza przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detekcją w ultrafiolecie

Zamrożoną w  $-80^{\circ}\text{C}$  płytkę z miocytami rozmrażano w lodzie. Następnie całą zawartość ze studzienek przenoszono do probówek Eppendorff i wirowano przez 10 min w  $4^{\circ}\text{C}$  przy 14000 rpm. Po wirowaniu zbierano supernatant, który doprowadzano do pH 6,5–7,0 2 M KOH, po czym próbkę wirowano przez 10 min w  $4^{\circ}\text{C}$  przy 14000 rpm a zebrany supernatant analizowano przy użyciu HPLC.

Zamrożone w  $-80^{\circ}\text{C}$  fragmenty mięśnia sercowego liofilizowano przez 48 godz., następnie podzielono je na części o masie około 30 mg. Jedną część homogenizowano z 0,4 M  $\text{HClO}_4$  w stosunku wagowym 1:25. Po homogenizacji zawiesinę wirowano a uzyskany supernatant doprowadzono do pH 6,5–7,0 2 M KOH. Próbkę ponownie wirowano przez 10 min w  $4^{\circ}\text{C}$  przy 14000 rpm a zebrany supernatant analizowano przy użyciu HPLC.

Stężenia nukleotydów adeninowych i ich metabolitów analizowano przy pomocy wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) z detekcją w ultrafiolecie. System (Merck-Hitachi/Hewlett-Packard) złożony był z kolejno podłączonych ze sobą podzespołów:

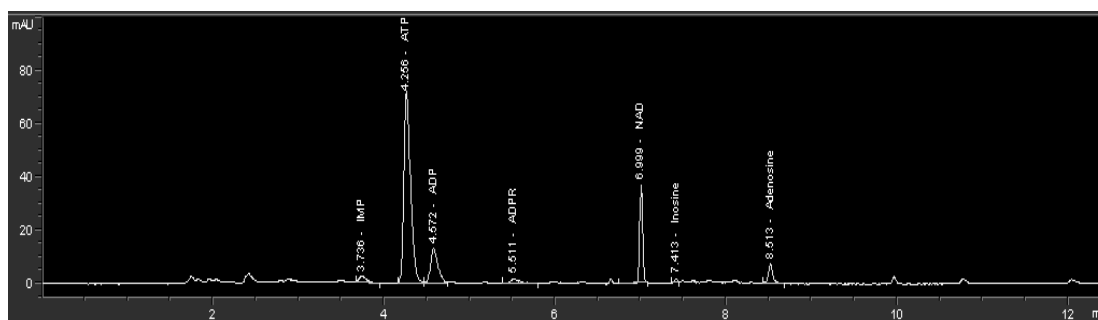
- modułu do buforów A, B i C
- wysokociśnieniowej pompy ze sterownikiem gradientu (L-6200)
- autosamplera (AS-2000) chłodzonego do  $4^{\circ}\text{C}$
- prekolumny firmy Phenomenex typu SecurityGuard
- kolumny analitycznej o wymiarach 150mm/4.9mm z wypełnieniem typu odwróconej fazy (Hypersil C18-BDS) firmy Phenomenex o wielkości ziarna 3  $\mu\text{m}$  umieszczonej w termostacie ( $18^{\circ}\text{C}$ )
- detektora (UV-VIS) z szeregiem diodowym typu DAD serii 1050 (Merck-Hitachi/Hewlett Packard)

Dane były rejestrowane oraz analizowane jakościowo i ilościowo przy pomocy programu HPChemStation pracującego na platformie typu PC.

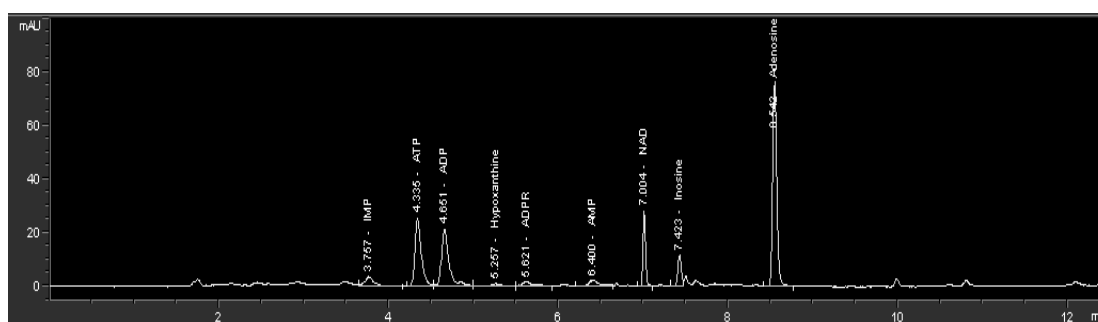
Rozdział próbki zachodził przy zmieniającym się składzie eluentu. Bufor A złożony był z 122 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM KCl, 28 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , bufor B składał się z 1,5% roztworu acetonitrylu w buforze A, bufor C składał się z 15% roztworu

acetonitrylu w buforze A. Do analizy stosowano następujący gradient: do 3 min elucji 50% A i 50% B, do 5,5 min 25% A, 25% B i 50% C, od 9,4 min 100% C. Czas trwania analizy próbki wynosił 13,5 min, nastryk próbki 20  $\mu$ l a wielkość przepływu eluentu w układzie 0,9 ml/min. Ciśnienie podczas rozdzielania wynosiło 180-210 atmosfer. Analizę próbek rozpoczynano i kończono rozdzielaniem standardów (17 związków). Czasy retencji poszczególnych związków były stałe a kolejność rozdzielania standardów następująca: fosfokreatyna, kreatyna, kwas moczowy, GMP, IMP, ATP, ADP, hipoksantyna, ADPR, ksantyna, AMP, NADP, NAD, adenina, inozyna, guanozyna i adenozyzna (Ryc. 8 A i B). Analizy jakościowej poszczególnych związków dokonywano na podstawie czasu retencji oraz spektrum absorbancji dla każdego związku przy długości fali od 210 nm do 340 nm. Analizę ilościową oznaczanych związków przeliczano proporcjonalnie z pola powierzchni pod krzywą danego piksu do pola powierzchni standardu. Stężenie oznaczanych związków odnoszono do stężenia białka w danej próbce (Smolenski i wsp., 1990).

**A**



**B**



Ryc. 8. Rozdział chromatograficzny nukleotydów purynowych i ich katabolitów wyekstrahowanych z zawiesiny kardiomiocytów inkubowanych w warunkach normoksji (A) oraz w warunkach stymulacji katabolizmu (B).



### **3.3.2. Analiza przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową**

#### ***Przygotowanie próbek do analizy stężenia TET01 metodą LC/MS***

Zamrożone w  $-80^{\circ}\text{C}$  próbki krwi pełnej, erytrocytów, osocza rozmrażano i dodawano acetonitryl o końcowym stężeniu 70%, a następnie dokładnie mieszano. Następnie próbki wirowano 5 min w  $4^{\circ}\text{C}$  przy 14000 rpm, a uzyskany supernatant zamrażano w ciekłym azocie i liofilizowano przez 24 godz. Po zliofilizowaniu, zawartość próbki rozpuszczano w 100  $\mu\text{l}$  buforu zawierającego 16,9 mM kwas nonafluoropentanoinowy i dodawano 5  $\mu\text{l}$  1 mM 2-chloroadenozyny (będącej standardem wewnętrznym). Tak przygotowany materiał analizowano przy pomocy LC/MS. Wyekstrahowane kwasem nadchlorowym fragmenty mięśnia sercowego zostały zamrożone i następnie zliofilizowane. Zawartość próbek rozpuszczano w 100  $\mu\text{l}$  buforu zawierającego 16,9 mM kwas nonafluoropentanoinowy i dodawano po 5  $\mu\text{l}$  1 mM 2-chloroadenozyny jako standardu wewnętrznego. Tak przygotowany materiał analizowano z wykorzystaniem LC/MS.

#### ***Przygotowanie próbek do oznaczenia stężenia hydroksyproliny i pirydynoliny z wykorzystaniem LC/MS***

Zliofilizowane próbki mięśnia sercowego poddawano 18 godz hydrolizie w 6 M HCl w zamkniętej szklanej fiole w temp  $110^{\circ}\text{C}$ . Próbki ponownie liofilizowano po czym rozpuszczano w 5 mM kwasie nonafluoropentanoinowym. Stężenie hydroksyproliny i pirydynoliny analizowano przy użyciu LC/MS.

#### ***System spektrometrii masowej LC/MS***

Stężenie TET01, MNA, hydroksyproliny i pirydynoliny w badanych próbkach oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS). System (Thermo-Finnigan, LCQ Advantage, Surveyor, Waltham, MA, USA) złożony był z kolejno podłączonych ze sobą podzespołów:

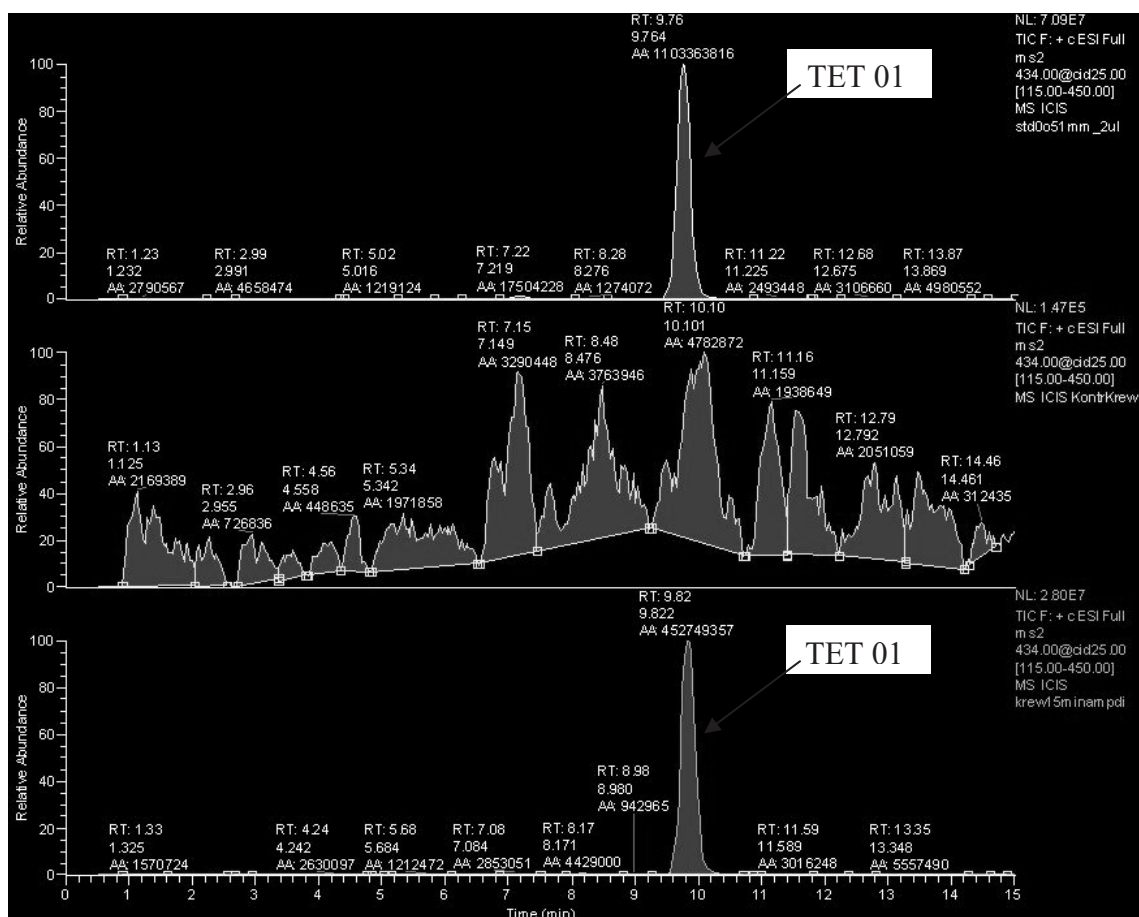
- modułu do buforów A i B
- wysokociśnieniowej pompy ze sterownikiem gradientu (Surveyor MS Pump)
- autosamplera (Surveyor AS) chłodzonego do temp  $4^{\circ}\text{C}$
- prekolumny 2x2 mm C18 Security Guard

- kolumny analitycznej Phenomenex umieszczonej w termostacie
- jonizatora cząsteczek metodą elektrorozpylania (ESI)
- analizatora mas typu pułapki jonowej (LCQ Advantage)

Dane były rejestrowane oraz analizowane jakościowo i ilościowo przy pomocy programu Xcalibur Quan i Qual Browser pracującego na platformie typu PC.

### ***Oznaczenie stężenia TET01 i MNA przy użyciu LC/MS***

Rozdziały próbek prowadzone były na kolumnie analitycznej firmy Phenomenex o wymiarach 150mm/2,0mm z wypełnieniem Hypersil C18-BDS i wielkości ziarna 3  $\mu\text{m}$ . Bufor A zawierał 10 mM kwas nonafluoropentanoiowy (NFPA) a bufor B 100% acetonitryl. W ciągu 12 min skład buforu zmieniał się liniowo z początkowego 100% buforu A do 60% buforu B na końcu przy przepływie 0,2 ml/min. Kolumna była termostatowana w 25°C, a objętość nastrzyku wynosiła 20  $\mu\text{l}$ . Detektor masowy pracował w trybie MS/MS z pozytywną jonizacją z zastosowaniem głowicy ESI. Przepływ gazu wynosił 35 arbitralnych jednostek aparatu, napięcie 4,5 kV, temperatura kapilary 275°C. Bezpośrednia infuzja standardów związków TET01 i MNA umożliwiła określenie fragmentacji oraz zoptymalizowanie energii kolizji dla analizy w trybie MS/MS. W tych warunkach TET01 tworzył jon macierzysty o  $m/z=434$ , który poddany fragmentacji 25% energią kolizji tworzył jony pochodne  $m/z=415$  i 417, które wykorzystano do analizy (Ryc. 9). W identycznych warunkach MNA tworzył jon o  $m/z=137$ . Odzysk TET01 i MNA wynosił 85–95%, a współczynnik zmienności około 10%. Analizę ilościową oznaczanych związków określono w oparciu o krzywą kalibracyjną (Słominska i wsp., 2006).



Ryc. 9. Przedstawiono trzy chromatogramy z detektora masowego. W panelu górnym widoczny jest chromatogram standardu TET01. Panel środkowy przedstawia kontrolny rozdział ekstraktu pełnej krwi przed podaniem TET01, natomiast panel dolny przedstawia rozdział ekstraktu krwi po upływie 15 min od dożylnego podania TET01 (widoczny duży pik inhibitora).

### Oznaczenie stężenia hydroksyproliny i pirydynoliny przy użyciu LC/MS

Oznaczenie stężenia hydroksyproliny i pirydynoliny przeprowadzono na kolumnie analitycznej firmy Phenomenex o wymiarach 150mm/2,0mm Synergi Hydro RP C18/ODS i wielkości ziarna 4  $\mu$ m. Bufor A zawierał 5 mM kwas nonafluoropentanoinowy (NFPA) a bufor B 100% acetonitryl. W ciągu 5 min skład buforu zmieniał się liniowo z początkowego 100% buforu A do 85% buforu B na końcu, przepływ 0,15 ml/min. Całkowity czas analizy próbki wynosił 18 min. Kolumna utrzymywana była w 25°C przy pomocy termostatu. Objętość nstrzykiwanych standardów kalibracyjnych i próbek wynosiła 2  $\mu$ l. Detektor masowy pracował w trybie MS/MS z pozytywną jonizacją z zastosowaniem elektrospreju. Przepływ gazu wynosił 35 arbitralnych jednostek aparatu, napięcie elektrospreju 20 kV, temperatura kapilary 300°C. W metodzie zastosowano dodatkowy przepływ 0,15ml/min mieszaniny acetonitrylu z 0,05% kwasem mrówkowym w celu ustabilizowania parametrów

elektrycznych elektrospreju. Mieszanina była podawana bezpośrednio przed komorą jonizacyjną za pomocą dodatkowej pompy typu Waters. Hydroksyprolinę oznaczano w trybie MS/MS uzyskując z jonu macierzystego  $m/z=132$  jon pochodny  $m/z=86$  przy zastosowaniu 26% energii kolizji. Pirydynolinę oznaczano również w trybie MS/MS uzyskując z jonu macierzystego  $m/z=429$  jon pochodny  $m/z=412$  przy użyciu 30% energii kolizji. Odzysk hydroksyproliny i pirydynoliny wynosił powyżej 90%, a współczynnik zmienności był niższy niż 15%. Analizę ilościową oznaczanych związków przeprowadzono w oparciu o krzywą kalibracyjną (Kindt i wsp., 2000).

### **3.3.3. Pozostałe procedury analityczne**

#### ***Oznaczenie dehydrogenazy mleczanowej metodą spektrofotometryczną***

Pomiar stężenia dehydrogenazy mleczanowej wykonano przy użyciu metody spektrofotometrycznej. Do 50 mM buforu Tris-HCl o pH 7,4 dodawano kolejno: badaną próbkę, 20  $\mu\text{M}$  pirogronian oraz 6  $\mu\text{M}$  NADH. Następnie zawartość kuwety mieszano i w spektrofotometrze oznaczano absorbancję przy długości fali 340 nm (Hakala i wsp., 1956). Uzyskany w jednostkach (U) wynik odnoszono do pomiaru próbki kontrolnej traktowanej 0,1% Tritonem-X i przedstawiano w procentach.

#### ***Oznaczenie wiązania TET01 z albuminą***

Do próbek z membraną o średnicy porów 0,45  $\mu\text{m}$  wprowadzano osocze szczura a także roztwory 0,5 i 2% białka z 0,01–0,3 mM TET01 i inkubowano 15 min w temp pokojowej. Następnie pobierano 40  $\mu\text{l}$  roztworu a pozostałą część wirowano przez 15 min w 4°C przy 14000 obr/min po czym pobierano 40  $\mu\text{l}$  filtratu. Do próbek pobranych na początku jak i do filtratów dodawano po 60  $\mu\text{l}$  100% acetonitrylu a następnie wirowano przez 15 min w 4°C przy 14000 obr/min. Następnie 50  $\mu\text{l}$  supernatantu przenoszono do eppendorfa, zamrażano i liofilizowano, po czym zawartość próbki rozpuszczano w 100  $\mu\text{l}$  buforu zawierającego 16,9 mM kwas nonafluoropentanoinowy i dodawano 5  $\mu\text{l}$  1 mM 2-chloroadenozyny. Tak przygotowane próbki analizowano przy pomocy LC/MS.

### ***Oznaczenie białka metodą Bradford'a***

Standardy albuminy w zakresie stężenia od 0,05 do 0,5 mg/ml oraz próbki w których oznaczano stężenia białka rozpuszczono w 0,5 M NaOH. Następnie przenoszono po 10 µl roztworu na 96-dołkową płytkę i dodano 200 µl roztworu Bradford'a. Po wymieszaniu zawartości i 30 min inkubacji w temp pokojowej mierzono na spektrofotometrze absorbancję przy długości fali 595 nm (Bradford, 1976).

### ***Oznaczanie stężenia troponiny I***

Stężenie troponiny I w osoczu myszy oznaczane było przy użyciu immunochemicznego testu Architect Stat troponina I na platformie Architect ci8200 w Centralnym Laboratorium Klinicznym, Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (James i wsp., 2006).

## **3.4. Odczynniki**

**TET01** (3-[2-(3-karboksy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaftyl)etyl]-3,6,7,8-tetrahydroimidazo-[4,5]-[1,3]diazepin-8-ol) – selektywny inhibitor deaminazy AMP, został zsyntetyzowany w Katedrze Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego GUMed w oparciu o publikację Kasibhatla (Kasibhatla i wsp., 2001) przez Panią Dr Czesławę Orlewską.

**MNA** (1-metylonikotynamid) – został uzyskany z firmy Pharmena, dzięki uprzejmości Pana Profesora Jerzego Gębickiego (Gebicki i wsp., 2003).

**4PYR** (fosforan 4-pirydo-3-karboksamid-1-beta-D-rybonukleozyd), **met-2-PY** (N-metylo-2-pirydo-5-karboksamid), **met-4-PY** (N-metylo-4-pirydo-3-karboksamid), **2-P** (kwas 2-pikoliniowy), **PA** (pikolinamid), **4-KPA** (kwas 4-ketopikolinowy) zostały zsyntetyzowane w Katedrze Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego GUMed (Słominska i wsp., 2006).

**Purynorybozyd** (puryno-1-D-rybofuranozyd) i **Kofeina** (1,3,7-trimetyloksantyna) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich.

**Pozostałe odczynniki:** EHNA (erytro-9-hydroksy-3-nonyloadenozyna), ITU (5-jodotubercydyna), kolagenaza C8051, albumina A6003, albumina A9418, NADH, pirogronian, NA, tauryna, Tris-HCl, HEPES zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. Związki chemiczne użyte do chromatografii:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , acetonitryl, kwas nonafluoropentanoinowy zostały zakupione w firmie Merck. NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , mannitol, glukoza,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{NaHCO}_3$  zakupiono w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne. Do wszystkich doświadczeń używano wody oczyszczonej z zastosowaniem techniki molekularnego wymiennicza jonowego i odwróconej osmozy (zestaw Elga Maxima).

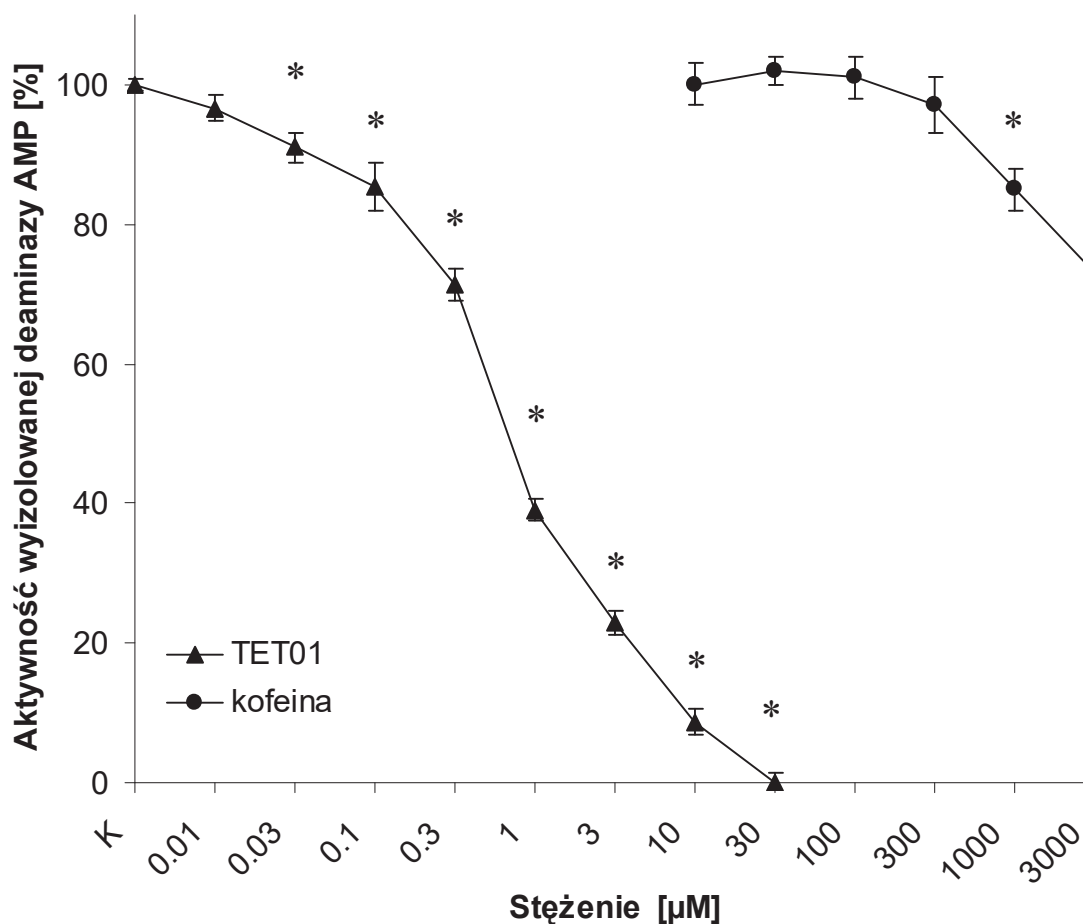
### **3.5. Analiza statystyczna**

Zmienne przedstawione są jako wartości średnie  $\pm$  błąd standardowy. Różnica pomiędzy dwiema grupami, w której zmienna rozkładała się w sposób normalny, analizowana była testem t-Studenta, natomiast w przypadku braku normalnego rozkładu zmiennej, wykorzystywano test U-Manna Whitney'a. Różnica między wieloma grupami analizowana była przy użyciu analizy jednoczynnikowej ANOVA z testem post hoc Bonferroniego. Wartość  $p < 0,05$  uważana była za istotną statystycznie.

## 4. Wyniki

### 4.1. Wpływ TET01 i kofeiny na aktywność wyizolowanej deaminazy AMP

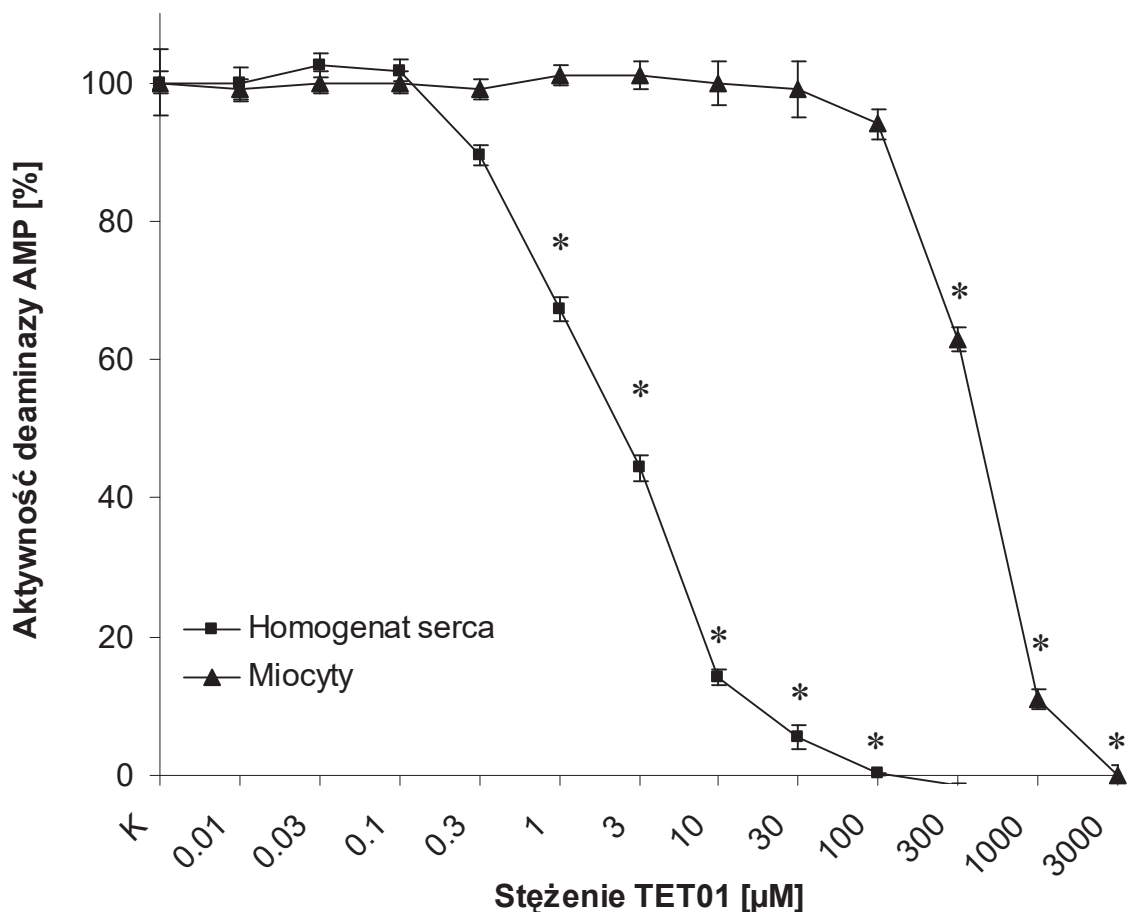
Na Ryc. 10 przedstawiono aktywność deaminazy AMP wyizolowanej z mięśnia szkieletowego człowieka inkubowanej w obecności różnych stężeń TET01 i kofeiny. Po zastosowaniu TET01 w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  deaminaza AMP hamowana była w 50%. Podczas gdy stosowano 10  $\mu\text{M}$  TET01 zahamowanie aktywności enzymu było niemal całkowite. Zastosowanie kofeiny w stężeniu 3 mM hamowało aktywność enzymu jedynie w 25%.



Ryc. 10. Aktywność deaminazy AMP wyizolowanej z mięśnia szkieletowego człowieka w obecności TET01 w zakresie stężeń 0,01-30  $\mu\text{M}$  oraz kofeiny w zakresie stężeń 0,01-3 mM. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $P<0,05$  vs kontrola. Za 100% aktywność deaminazy AMP przyjęto próbki bez inhibitora (produkujące największą ilość IMP).

## 4.2. Porównanie hamowania aktywności AMPD przez TET01 w homogenatach serc i izolowanych kardiomiocytach szczura

Na Ryc. 11 przedstawiono aktywność deaminazy AMP obecnej w homogenatach serc oraz w wyizolowanych kardiomiocytach szczura w obecności różnych stężeń TET01. W homogenacie uzyskano 50% hamowanie aktywności AMPD po zastosowaniu stężenia 2  $\mu\text{M}$  podczas gdy 30  $\mu\text{M}$  niemal całkowicie ją hamowało. W wyizolowanych kardiomiocytach 50% zahamowanie aktywności AMPD uzyskano po zastosowaniu 0,5 mM TET01, natomiast stężenie 1 mM powodowało hamowanie w około 90%.



Ryc. 11. Aktywność deaminazy AMP w homogenatach serc oraz w wyizolowanych kardiomiocytach szczura w obecności 0,01-3000  $\mu\text{M}$  TET01. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $P < 0,05$  vs kontrola. Za 100% aktywności deaminazy AMP przyjęto próbki inkubowane bez TET01 (produkujące największą ilość IMP).



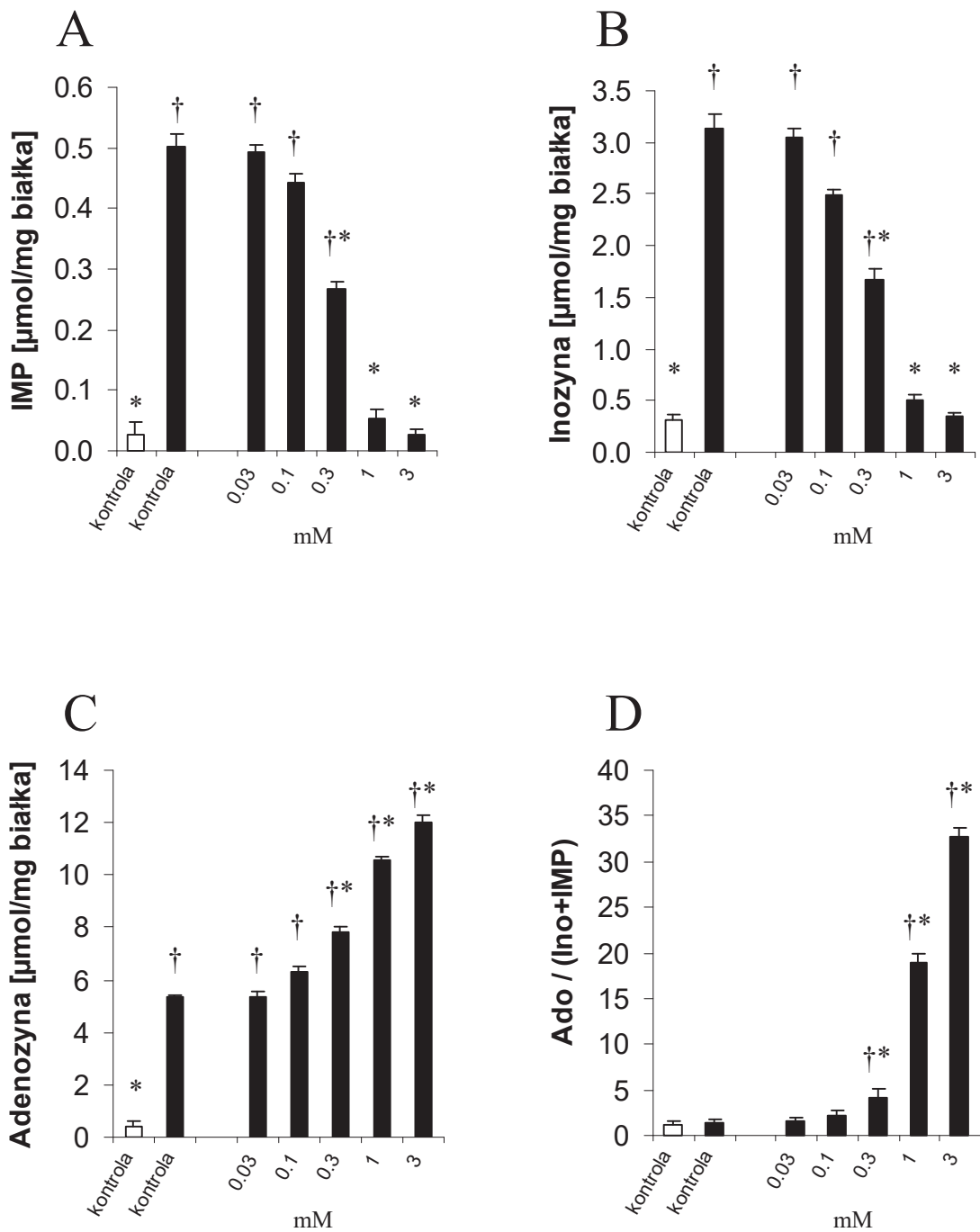
### 4.3. Wpływ TET01 na metabolizm adenylanów, ocena jego toksyczności w wyizolowanych kardiomiocytach

Ryc. 12 przedstawia wpływ różnych stężeń TET01 (0,03–3 mM) na metabolizm adenylanów w modelu wyizolowanych kardiomiocytów poddanych stymulacji katabolizmu, u których zahamowano aktywność deaminazy adenozyiny i kinazy adenozyiny poprzez inkubację ich z 5  $\mu$ M EHNA i 10  $\mu$ M ITU.

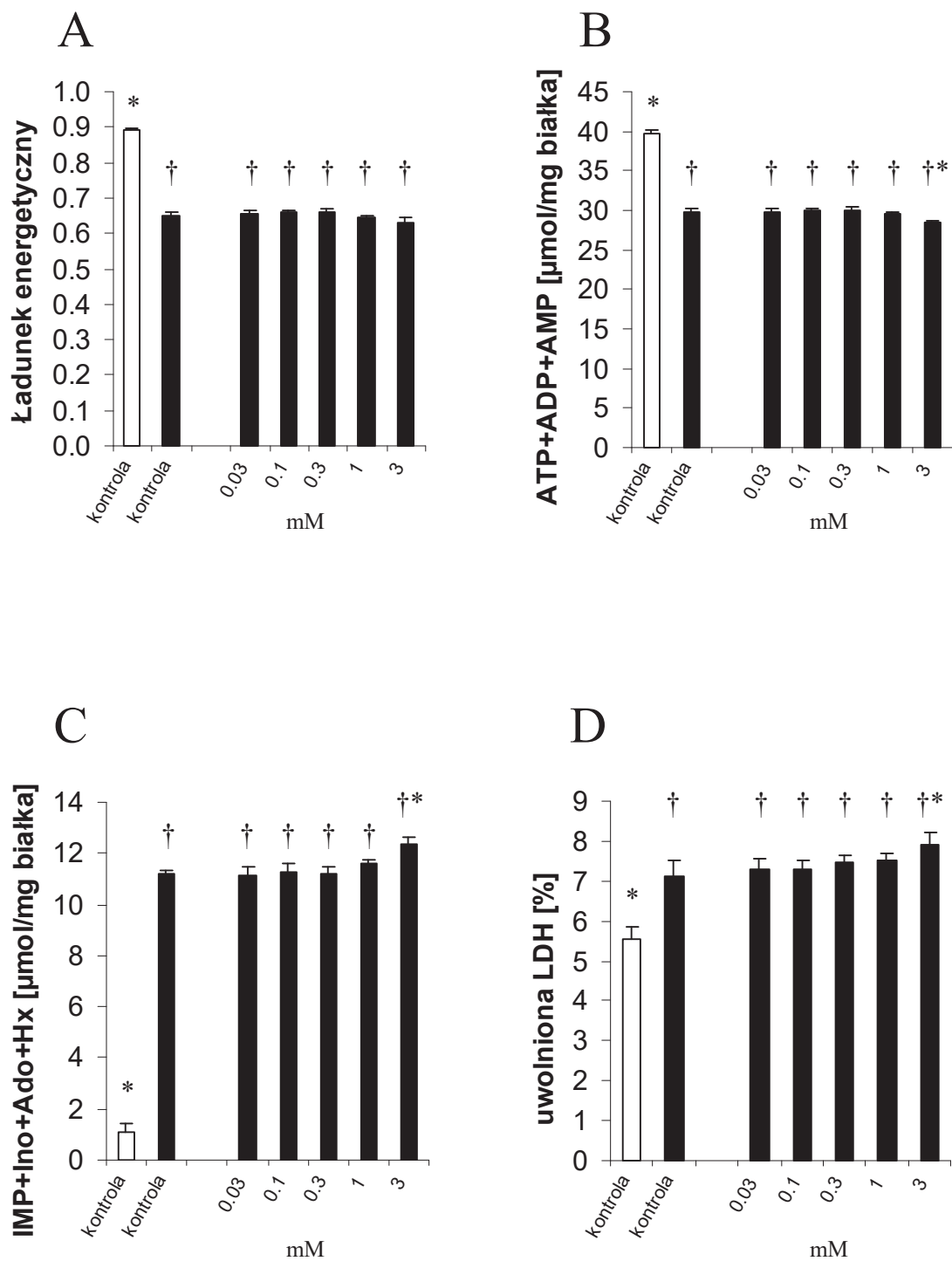
W panelu A i B przedstawiono kolejno stężenia: IMP i inozyny. Stężenia obu tych związków były zmniejszone o około 40% po zastosowaniu 0,3 mM TET01 i o 90% po zastosowaniu 1 mM w porównaniu do kontroli ze stymulacją katabolizmu (SK). Po inkubacji kardiomiocytów z TET01 w stężeniach 0,3, 1 i 3 mM zaobserwowano podwyższenie produkcji adenozyiny odpowiednio o 47, 98 i 125% w porównaniu do kontroli z SK (Ryc. 12 C).

Panel D przedstawia stosunek stężenia adenozyiny do sumy stężenia inozyny i IMP –  $\text{Ado}/(\text{Ino}+\text{IMP})$ , będący wskaźnikiem aktywności deaminazy AMP. Po zastosowaniu 0,3 mM TET01 uzyskano 2,75-krotny wzrost stosunku  $\text{Ado}/(\text{Ino}+\text{IMP})$ , natomiast zastosowanie 1 mM powodowało ponad 12-krotny wzrost stosunku  $\text{Ado}/(\text{Ino}+\text{IMP})$  w porównaniu do kontroli z SK, co świadczy o niemal całkowitym zahamowaniu AMPD.

Zastosowanie TET01 w zakresie stężeń 0,03–3 mM w modelu izolowanych kardiomiocytów poddanych stymulacji katabolizmu (z całkowicie zahamowaną aktywnością deaminazy adenozyiny i kinazy adenozyiny) nie wpłynęło na ładunek energetyczny adenylanów (Ryc. 13 A). W grupie kardiomiocytów inkubowanych z 3 mM TET01 obserwowano obniżenie sumy stężeń nukleotydów adeninowych w porównaniu do kontroli z SK (Ryc. 13 B). Również suma stężeń katabolitów AMP a także procent LDH uwolnionej do środowiska inkubacyjnego były podwyższone w przypadku kardiomiocytów inkubowanych z 3 mM TET01 w porównaniu do kontroli z SK (Ryc. 13 C i D).



Ryc. 12. Stężenie IMP (A), inozyny (B), adenozyny (C) oraz stosunek Ado/(Ino+IMP) (D) w kardiomiocytach inkubowanych przez 0,5 godz z 0,03 - 3 mM TET01 w obecności 5  $\mu\text{M}$  EHNA i 10  $\mu\text{M}$  ITU a następnie poddanych stymulacji katabolizmu (SK). Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM, n=5. \* $P < 0,05$  vs kontrola z SK. † $P < 0,05$  vs kontrola bez SK. Czarne słupki (SK), białe słupki (bez SK)



Ryc. 13. Ładunek energetyczny adenylanów (A), suma stężeń nukleotydów adeninowych (ATP+ADP+AMP) (B), suma stężeń katabolitów AMP (IMP+Ino+Ado+Hx) (C) oraz procent uwolnionej do środowiska LDH (D) w kardiomiocytach inkubowanych 0,5 godz z 0,03 - 3 mM TET01 w obecności 5  $\mu$ M EHNA i 10  $\mu$ M ITU a następnie poddanych stymulacji katabolizmu (SK). W panelu D wartość 100% uzyskana była w preparacie kardiomiocytów poddanych działaniu 0,1% Triton X. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM, n=5. \* $P < 0,05$  vs kontrola z SK. † $P < 0,05$  vs kontrola bez SK. Czarne słupki (SK), białe słupki (bez SK).

#### 4.4. Wpływ czasu inkubacji izolowanych kardiomiocytów z TET01 na efekt inhibicji AMPD i parametry toksyczności

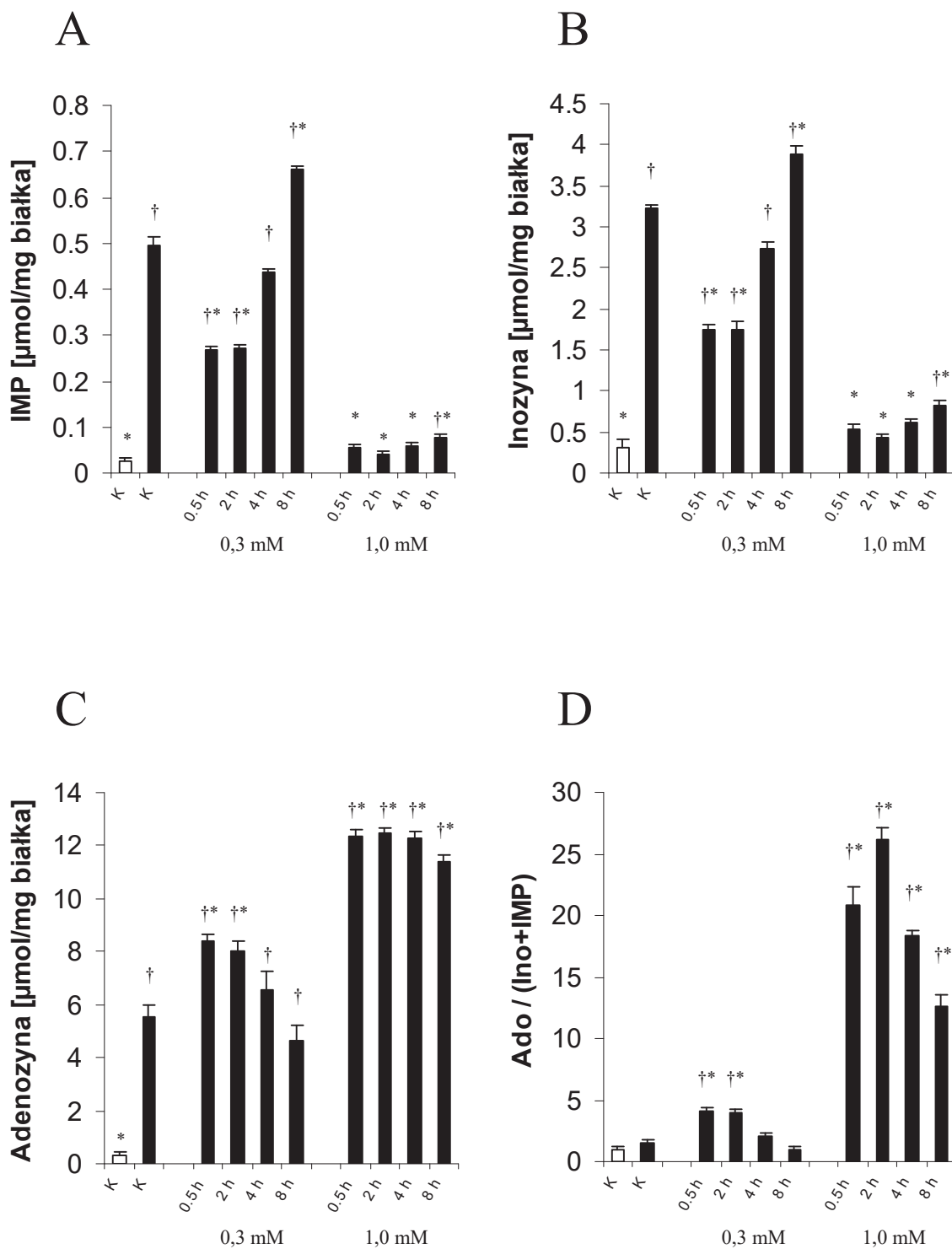
Ryc. 14 przedstawia wpływ 0,3 i 1,0 mM TET01 na metabolizm nukleotydów adeninowych w zależności od czasu inkubacji izolowanych kardiomiocytów poddanych stymulacji katabolizmu, z całkowicie zahamowaną aktywnością deaminazy adenozynej i kinazy adenozynej.

0,3 mM TET01 spowodował zmniejszenie produkcji IMP i inozyny o około 40% po 0,5 i 2 godz. inkubacji w porównaniu do kontroli z SK. Natomiast po 8 godz. inkubacji zaobserwowano 30% wzrost produkcji IMP i 20% wzrost produkcji inozyny w porównaniu do kontroli z SK (Ryc. 14 A i B). Inkubacja 0,5 i 2 godz. z 0,3 mM TET01 powodowała kolejno 50% i 44% wzrost produkcji adenozynej, jednak wydłużenie inkubacji do 8 godz. skutkowało zmniejszeniem produkcji adenozynej o około 15% w stosunku do kontroli z SK (Ryc. 14 C). Stosunek Ado/(Ino+IMP) po inkubacji 0,5 i 2 godz. z 0,3 mM TET01 wzrósł około 2,7-krotnie, natomiast inkubacja trwająca 8 godz. powodowała zmniejszenie współczynnika o około 30% w stosunku do kontroli z SK (Ryc. 14 D).

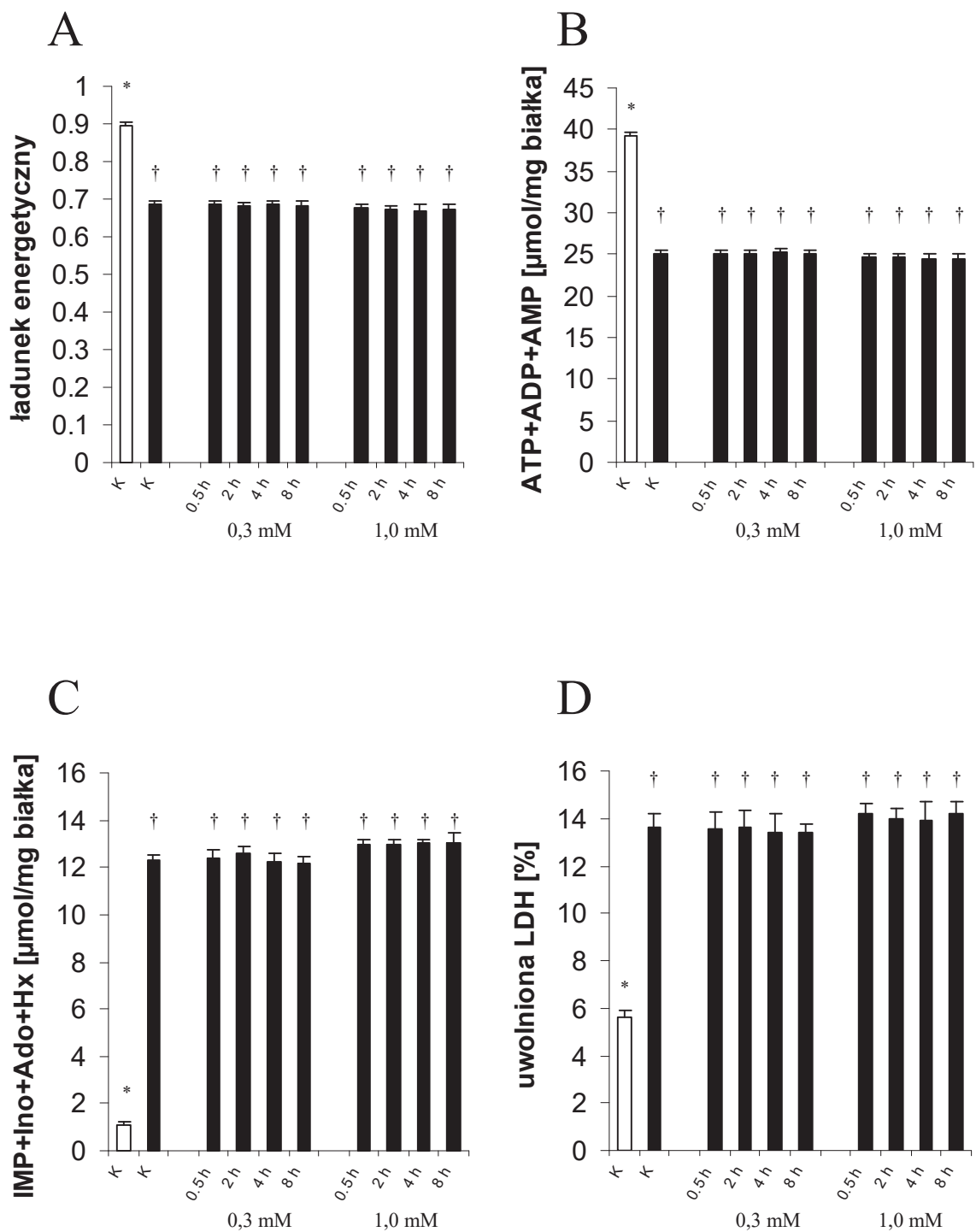
1 mM TET01 powodował niemal całkowite zahamowanie produkcji IMP i inozyny w badanym przedziale czasowym (0,5-8 godz) w porównaniu do kontroli z SK (Ryc. 14 A i B). Po zastosowaniu 1 mM TET01 zaobserwowano także zwiększoną o około 100% produkcję adenozynej w czasie całego doświadczenia w porównaniu do kontroli z SK (Ryc. 14 C). Współczynnik Ado/(Ino+IMP) po zastosowaniu 1 mM TET01 w czasie całego doświadczenia był istotnie podwyższony w stosunku do kontroli z SK, ale od 2-giej godziny inkubacji stopniowo obniżał się (Ryc. 14 D).

Inkubacja przez 8 godz. z 0,3 i 1 mM TET01 a następnie stymulacja katabolizmu nie powodowała efektów cytotoksycznych w kardiomiocytach. Wartości ładunku energetycznego adenylanów, suma stężeń nukleotydów adeninowych, suma stężeń katabolitów AMP oraz procent LDH uwolnionej od środowiska inkubacyjnego nie zmieniały się (Ryc. 15).

W kardiomiocytach inkubowanych przez 75 min w warunkach bez stymulacji katabolizmu użycie TET01 w zakresie 0,03-3 mM nie wpływało na parametry cytotoxyczności tj.: ładunek energetyczny adenylanów, sumę stężeń nukleotydów adeninowych, sumę stężeń katabolitów AMP, procent uwolnionej do środowiska LDH (Tab. 1).



Ryc. 14. Stężenie IMP (A), inozyny (B), adenozyny (C) oraz stosunek Ado/(Ino+IMP) (D) w kardiomiocytach inkubowanych przez 0,5-8 godz z 0,3 i 1 mM TET01 w obecności 5  $\mu\text{M}$  EHNA i 10  $\mu\text{M}$  ITU a następnie poddanych stymulacji katabolizmu (SK). Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM, n=4. \* $P < 0,05$  vs kontrola z SK. † $P < 0,05$  vs kontrola bez SK. Czarne słupki (SK), białe słupki (bez SK).



Ryc. 15. Ładunek energetyczny adenylanów (A), suma stężeń nukleotydów adeninowych (ATP+ADP+AMP) (B), suma stężeń katabolitów AMP (IMP+Ino+Ado+Hx) (C) oraz procent uwolnionej do środowiska LDH (D) w kardiomiocytach inkubowanych przez 0,5-8 godz z 0,3 i 1 mM TET01 w obecności 5 μM EHNA i 10 μM ITU a następnie poddanych stymulacji katabolizmu (SK). Wyniki stanowią średnią ± SEM, n=4. \*P<0,05 vs kontrola z SK. †P<0,05 vs kontrola bez SK. Czarne słupki (SK), białe słupki (bez SK).

Tab. 1. Ładunek energetyczny adenylanów, suma stężeń nukleotydów adeninowych (ATP+ADP+AMP), suma stężeń katabolitów AMP (IMP+Ino+Ado+Hx) oraz procent uwolnionej do środowiska LDH w preparacie kardiomiocytów inkubowanych przez 75 min z 0,03-3 mM TET01 w obecności 5  $\mu$ M EHNA i 10  $\mu$ M ITU. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD, n=4. W obrębie poszczególnych parametrów nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami.

	kontrola	0,03 mM	0,1 mM	0,3 mM	1 mM	3 mM
<b>ładunek energetyczny</b>	0,9 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,02	0,9 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,05
<b>ATP+ADP+AMP</b>	40,1 $\pm$ 0,2	40,5 $\pm$ 0,1	40,3 $\pm$ 0,1	40,1 $\pm$ 0,1	40,6 $\pm$ 0,1	39,9 $\pm$ 0,2
<b>IMP+Ino+Ado+Hx</b>	1,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1
<b>% uwolnionego LDH</b>	5,1 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,4

#### 4.5. Wpływ purynorybozydu oraz pochodnych nikotynamidu na aktywność deaminazy AMP w izolowanych kardiomiocytach

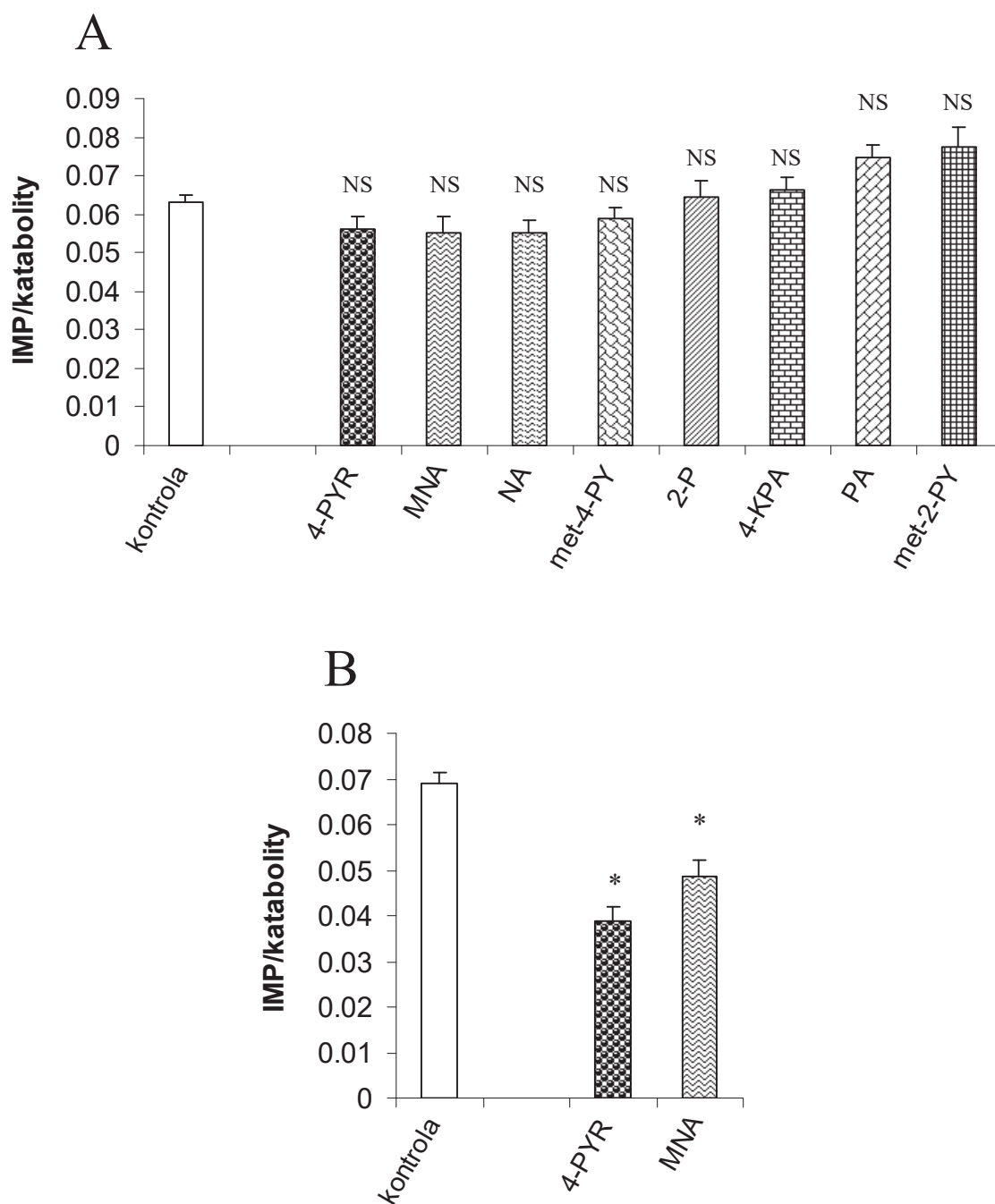
Krótką, 10 min inkubacją kardiomiocytów z 0,2 mM purynorybozydem (Purr), poddawanych stymulacji katabolizmu z zahamowaną aktywnością deaminazy adenozyiny i kinazy adenozyiny, powodowała około 10% wzrost aktywności AMPD. Natomiast 1-godzinna inkubacja powodowała około 15% redukcję aktywności AMPD (Tab. 2). Aktywność deaminazy AMP została wyrażona stosunkiem stężenia IMP do sumy katabolitów AMP w celu uzyskania wspólnego parametru umożliwiającego porównanie wyników pomiędzy różnymi doświadczeniami.

Tab. 2. Stosunek IMP/katabolity jako wskaźnik aktywności deaminazy AMP po 10, 30 i 60 min inkubacji kardiomiocytów z 0,2 mM Purr w obecności 5  $\mu$ M EHNA i 10  $\mu$ M ITU, które następnie poddane zostały stymulacji katabolizmu. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD, n=7. \* $P$ <0,05 vs 10 min.

	Kontrola	10 min	30 min	60 min
<b>IMP/katabolity</b>	0,064 $\pm$ 0,014	0,071 $\pm$ 0,010	0,064 $\pm$ 0,008	0,055 $\pm$ 0,006*

Na Ryc. 16 przedstawiono wyniki inkubacji NA i jego pochodnych tj.: 4PYR, MNA, met-4-PY, 2-P, 4KPA, PA, met-2-PY w stężeniu 1 mM z kardiomiocytami, które następnie zostały poddane stymulacji katabolizmu, jednocześnie z zablokowaną aktywnością deaminazy adenozyiny i kinazy adenozyiny. Po 0,5 godz. inkubacji nie

zaobserwowano istotnych zmian w stosunku stężenia IMP do sumy stężeń katabolitów AMP w porównaniu do kontroli (Ryc. 16 A). Wydłużenie inkubacji do 6 godz. z 1 mM 4PYR i MNA powodowało zmniejszenie stosunku stężeń IMP/katabolity o kolejno 43 i 30% w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 16 B).

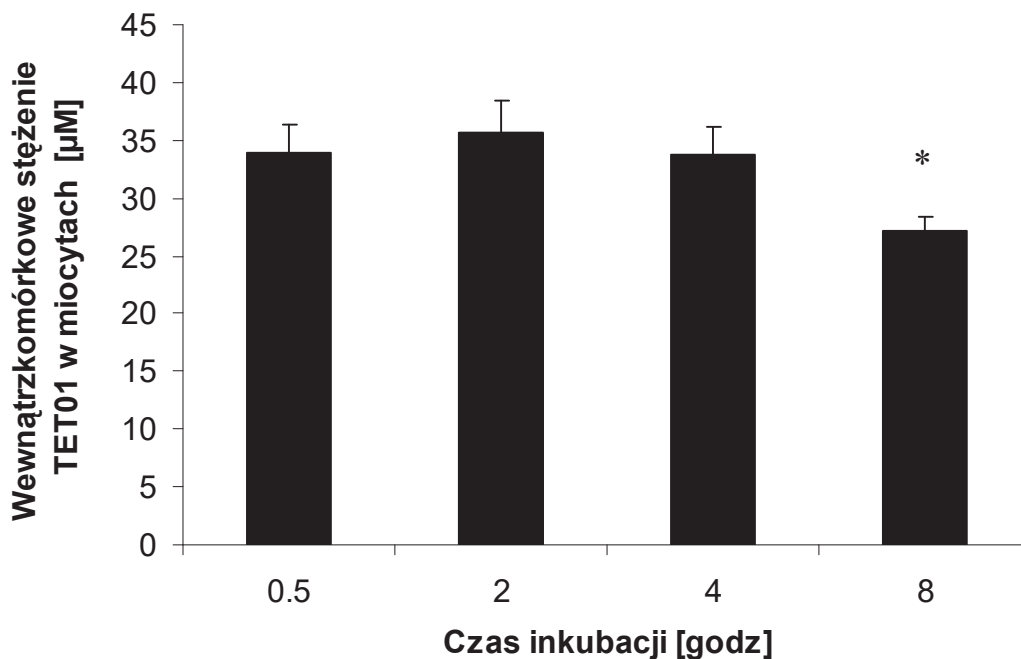


Ryc. 16. Stosunek stężenia IMP do sumy katabolitów AMP (IMP/katabolity) jako wskaźnik aktywności deaminazy AMP po 0,5 godz (A) i po 6 godz (B) inkubacji kardiomiocytów z 1 mM 4PYR, MNA, NA, met-4-PY, 2-P, 4KPA, PA, met-2-PY w obecności 5  $\mu$ M EHNA i 10  $\mu$ M ITU, następnie poddanych stymulacji katabolizmu. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD, n=5. \*P<0,05 vs kontrola.



#### 4.6. Ocena wewnątrzkomórkowego stężenia TET01 w kardiomiocytach

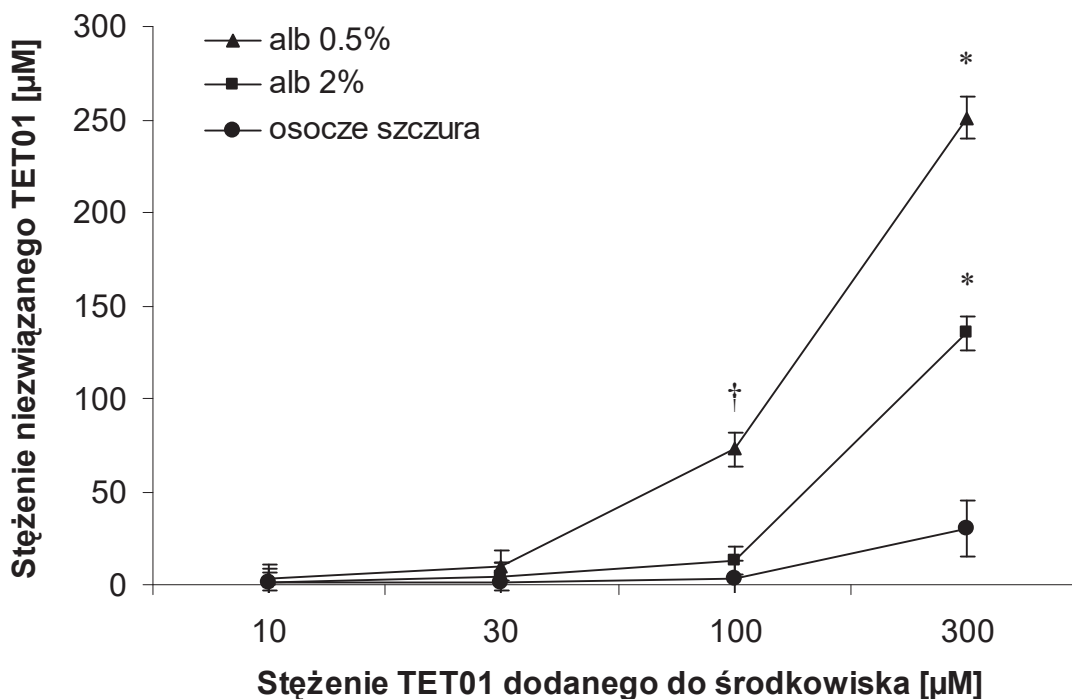
Ryc. 17 przedstawia wewnątrzkomórkowe stężenie TET01, po inkubacji kardiomiocytów z TET01 w stężeniu 0,3 mM przez 0,5-8 godz. Po 0,5, 2 i 4 godz. inkubacji wewnątrzkomórkowe stężenie TET01 wynosiło około 35  $\mu\text{M}$ , natomiast po 8 godz inkubacji było istotnie mniejsze i wynosiło 27  $\mu\text{M}$ . Z przeprowadzonej analizy wynika, że tylko około 10% inhibitora „wchodzi” do kardiomiocytów.



Ryc. 17. Stężenie TET01 w kardiomiocytach inkubowanych przez 0,5-8 godz z 0,3 mM TET01 w środowisku. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $P<0,05$  vs 0,5 godz.

#### 4.7. Ocena stopnia wiązania się TET01 z albuminą

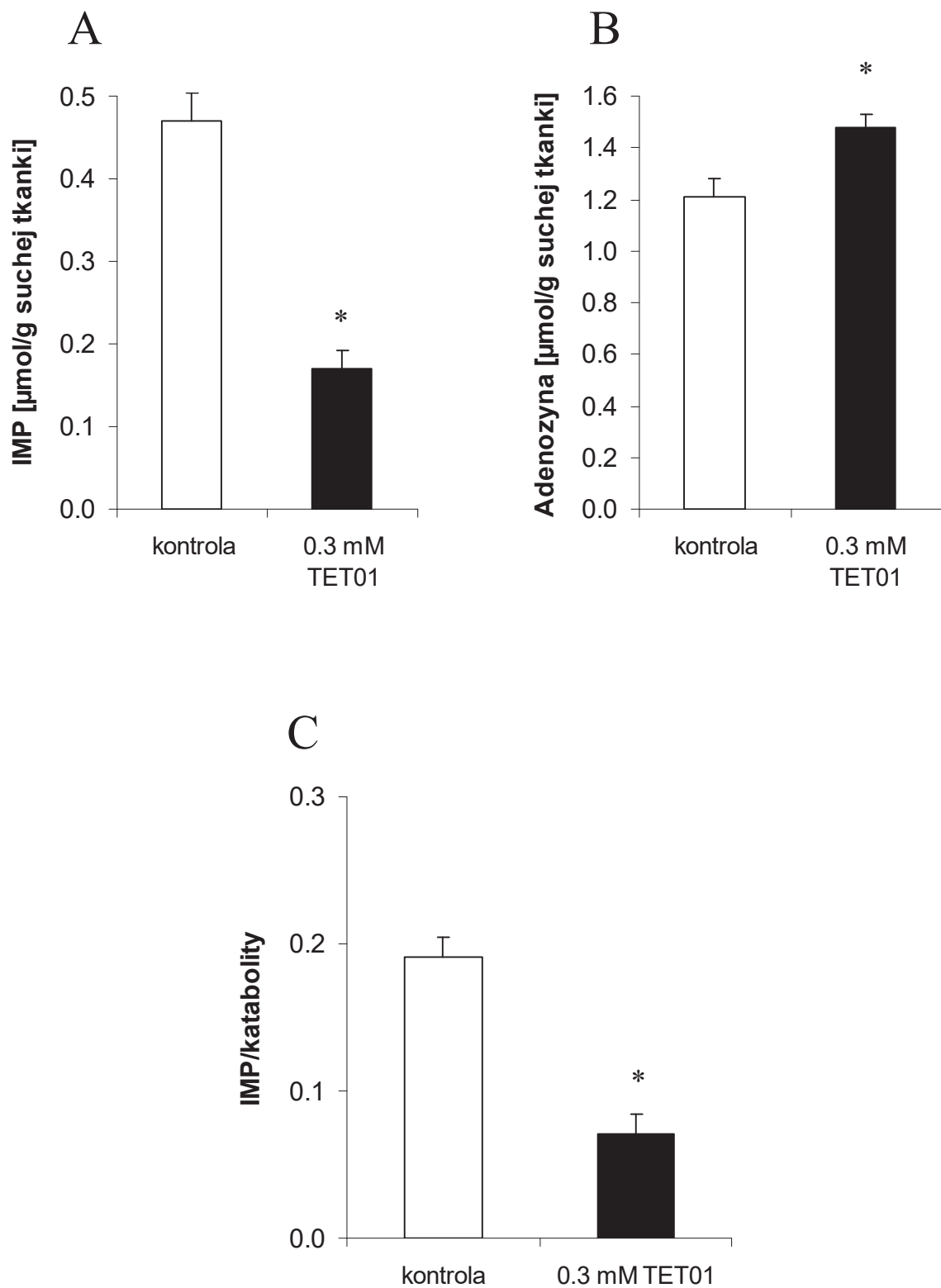
Doświadczenie mające na celu ocenę stopnia wiązania TET01 przez albuminę obecną w środowisku wykazało, że przy stężeniu 0,1 mM TET01 w obecności 0,5% albuminy stężenie formy niezwiązanej wynosi 70  $\mu\text{M}$ , natomiast w nierozcieńczonym osoczu szczura i roztworze 2% albuminy wolny TET01 był niewykrywalny. Po inkubacji 0,3 mM TET01 z osoczem szczura, 2% i 0,5% albuminą, TET01 występował w formie niezwiązanej w stężeniu kolejno 30, 135 i 250  $\mu\text{M}$  (Ryc. 18).



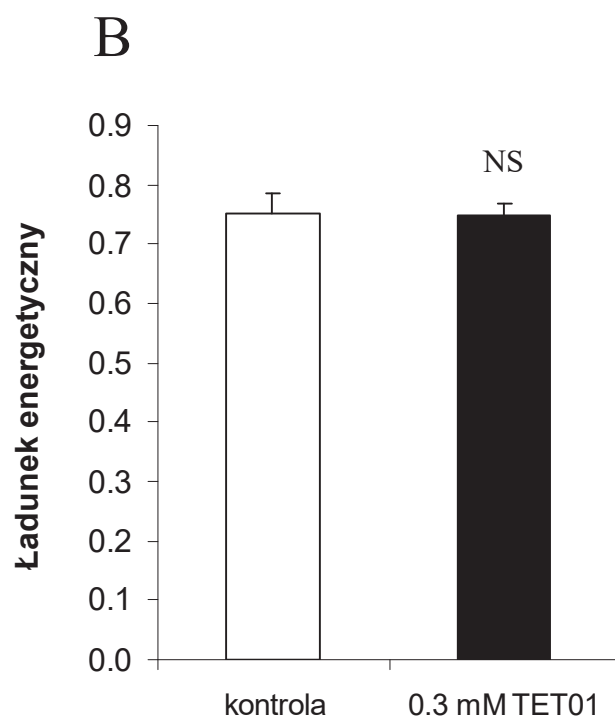
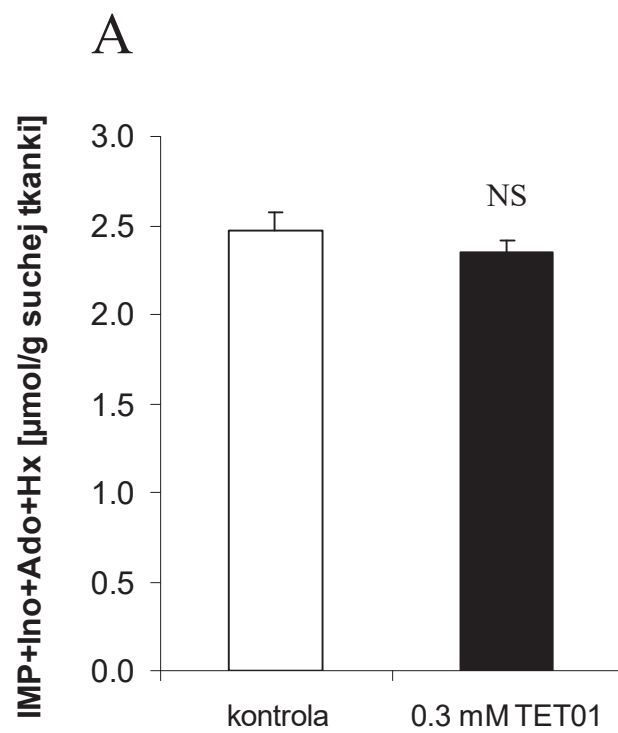
Ryc. 18. Stężenie wolnego TET01 w środowisku inkubacyjnym w zależności od stężenia albuminy oraz końcowego stężenia TET01. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $P<0,05$  vs 300  $\mu M$  w grupie z osoczem. † $P<0,05$  vs 100  $\mu M$  w grupie z osoczem.

#### 4.8. Wpływ TET01 na aktywność deaminazy AMP w izolowanym sercu

Perfuzja serca szczura z 0,3 mM TET01 w układzie Langendorffa przez 10 min i następnie poddanie go 5 min ischemii spowodowało 65% obniżenie produkcji IMP i stosunku stężeń IMP/katabolity w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 19 A i C). Jednocześnie zaobserwowano ponad 22% podwyższenie produkcji adenozyiny w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 19 B). Analiza parametrów toksyczności tj.: katabolitów AMP i ładunku energetycznego adenylanów w grupie traktowanej TET01 i grupie kontrolnej nie wykazała różnic, co pokazano na Ryc. 20.



Ryc. 19. Wpływ 10 min perfuzji serca szczura z 0,3 mM TET01 na stężenie IMP (A), produkcję adenozyny (B) oraz na stosunek IMP/katabolity (C) po 5 min ischemii. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $P<0,05$  vs kontrola.



Ryc. 20. Wpływ 10 min perfuzji serca szczura z 0,3 mM TET01 na sumaryczne stężenie katabolitów AMP (IMP+Hx+Ado+Ino) (A) oraz ładunek energetyczny adenylanów (B) oznaczony po 5 min całkowitej ischemii. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=3$ .

#### **4.9. Ocena farmakokinetyki TET01 *in vivo* na podstawie stężenia inhibitora i jego efektu metabolicznego**

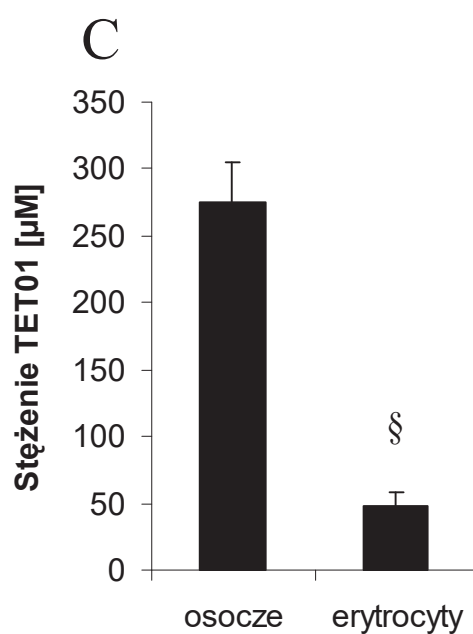
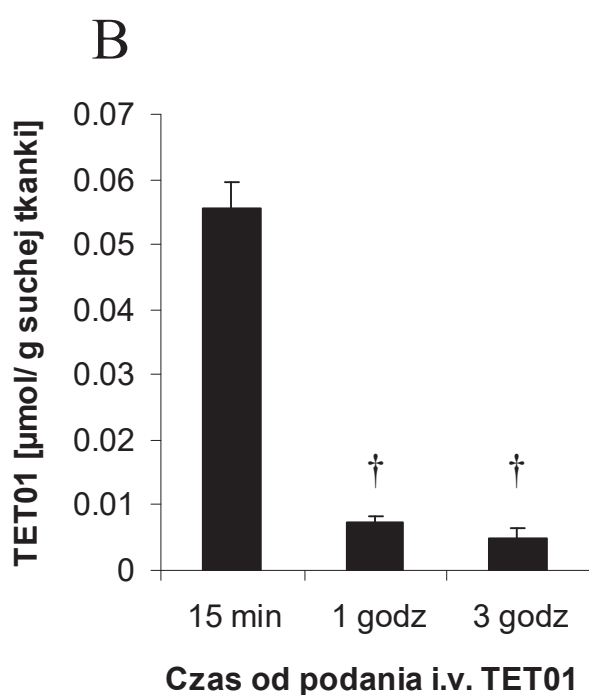
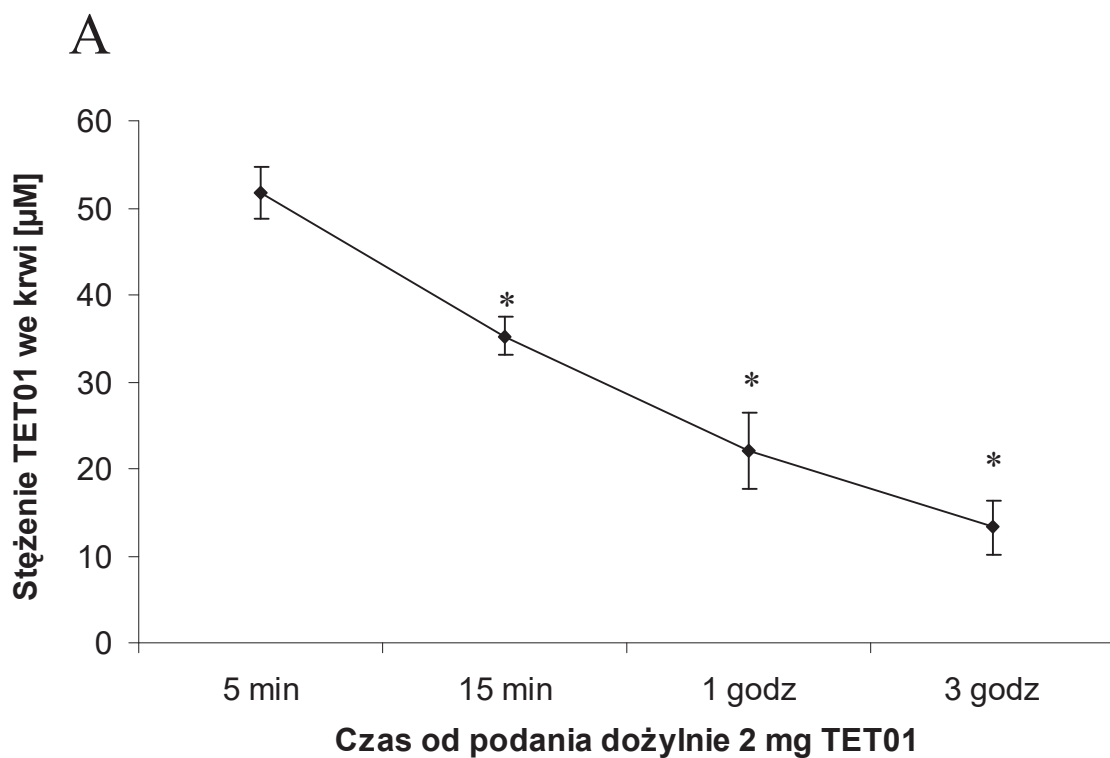
Po dożylnym podaniu myszy 2 mg TET01 obserwowano szybki spadek stężenia tego związku we krwi z wartości początkowej 51,8  $\mu\text{M}$  do stężenia 35,3, 22,2 i 13,2  $\mu\text{M}$  odpowiednio po 15 min, 1 i 3 godz od podania inhibitora. Pozwoliło to na określenie czasu półtrwania tego związku we krwi na około 30 min (Ryc. 21 A).

Stężenie TET01 było najwyższe w miokardium po 15 min od podania i wynosiło 0,055  $\mu\text{mol/g}$  suchej tkanki. Po 1 i 3 godz. stężenie inhibitora w miokardium wyraźnie obniżyło się i wynosiło odpowiednio 0,007 i 0,005  $\mu\text{mol/g}$  suchej tkanki (Ryc. 21 B).

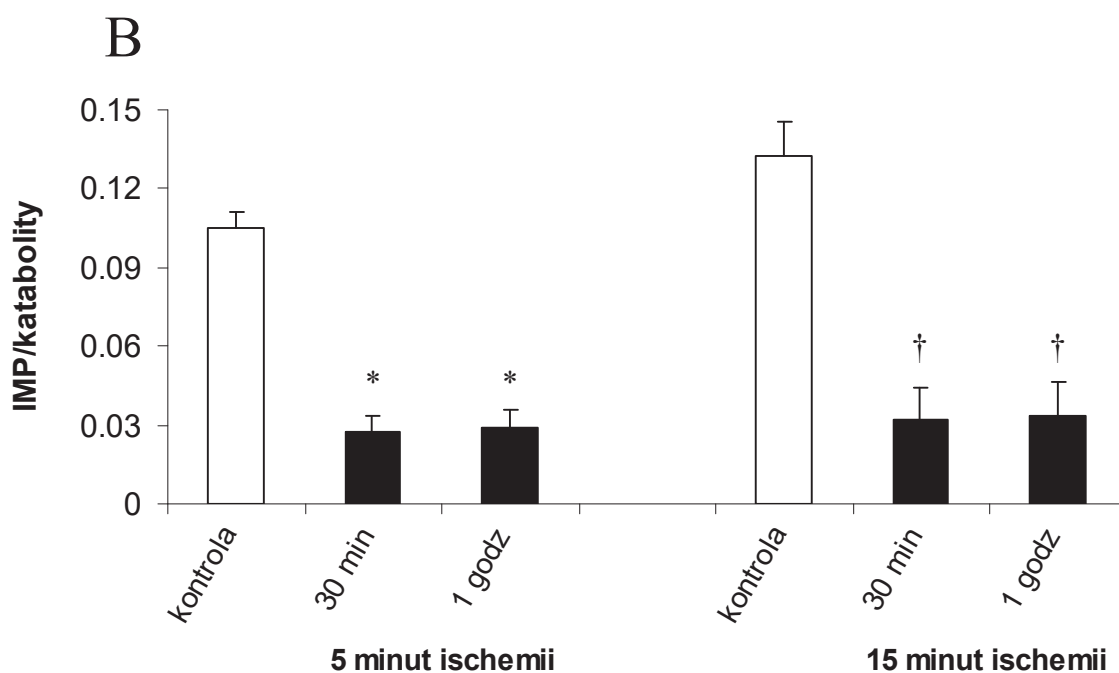
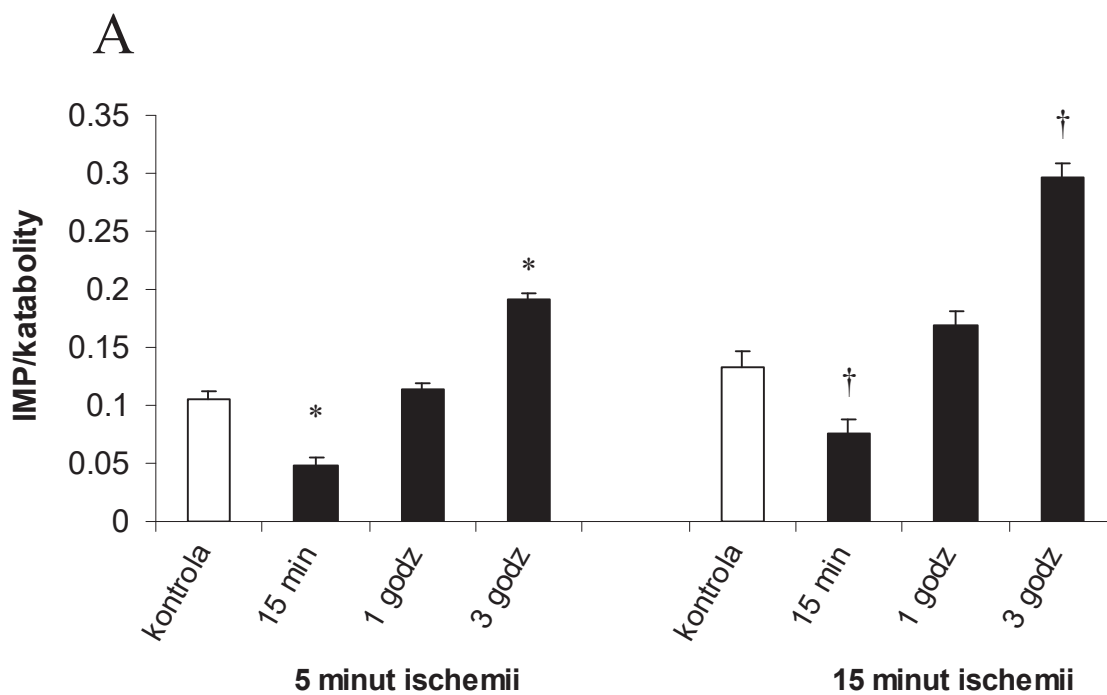
Podanie myszy 5 mg TET01 w dożylnym 30 min wlewie z użyciem pompy infuzyjnej pozwoliło uzyskać 276  $\mu\text{M}$  stężenie tego związku w osoczu i około 5-krotnie mniejsze (48  $\mu\text{M}$ ) w erytrocytach (Ryc. 21 C).

Jednorazowe, dożylne podanie myszy 2 mg TET01 powodowało 50% obniżenie stosunku stężeń IMP/katabolity w miokardium po 15 min od podania inhibitora, normalizację parametru po 1 godz. i 2-krotny wzrost po 3 godz. w porównaniu do kontroli. Wyniki uzyskane z miokardium poddanego 5 i 15 min ischemii były zbliżone, (Ryc. 22 A).

W celu zwiększenia efektu metabolicznego zastosowano dożylną infuzję 5 mg TET01 przez 0,5 i 1 godz., uzyskując w obu przypadkach około 75% redukcję stosunku stężeń IMP/katabolity w miokardium poddanym 5 i 15 min ischemii, (Ryc. 22 B).



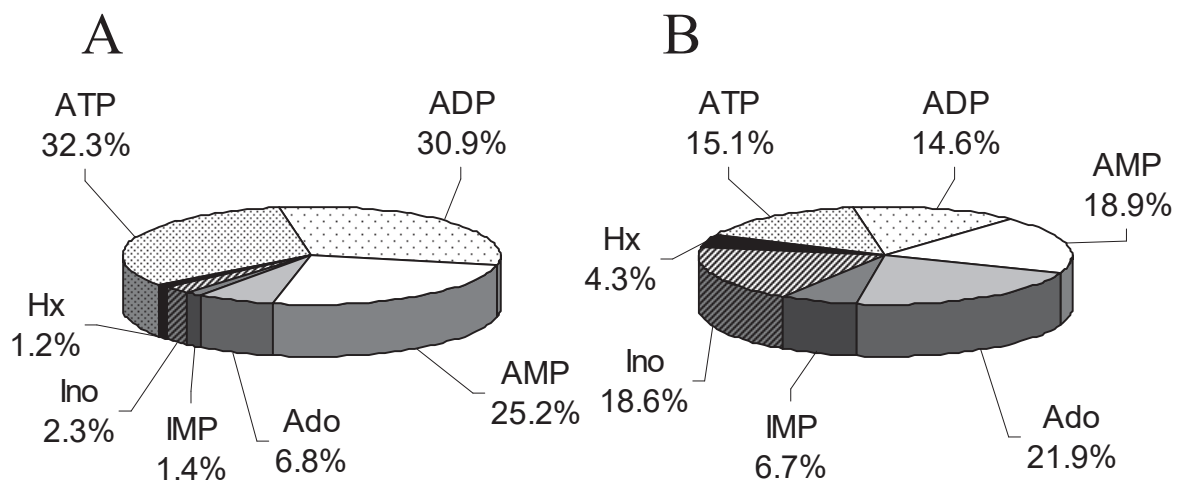
Ryc. 21. Stężenie TET01 w mysiej krwi po 5 min, 15 min, 1 godz i 3 godz (A) oraz w mysim sercu po 15 min, 1 godz i 3 godz (B) od podania dożylnie 2 mg TET01 a także stężenie TET01 w mysim osoczu i w erytrocytach po 30 min dożylniej infuzji 5 mg TET01 (C). \* $P < 0,05$  vs 5 min. † $P < 0,05$  vs 15 min. § $P < 0,05$  vs osocze.



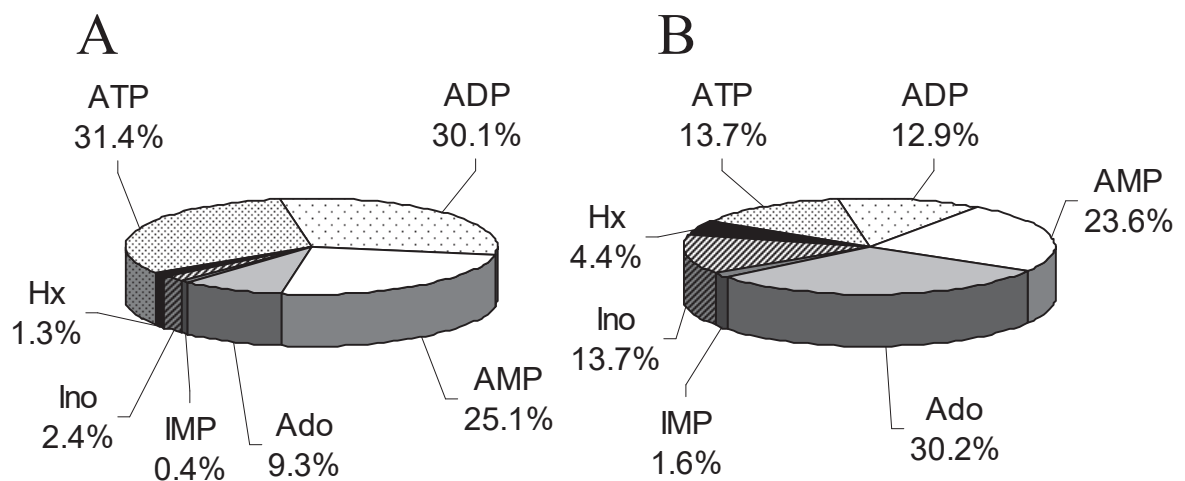
Ryc. 22. Stosunek IMP/katabolity jako wskaźnik aktywności deaminazy AMP w mysim sercu poddanym 5 i 15 min ischemii po 15, 60 i 180 min od dożylniej iniekcji 2 mg TET01 (A) oraz po 0,5 i 1 godz dożylniej infuzji 5 mg TET01 (B). Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $P<0,05$  vs kontrola 5 min ischemii. † $P<0,05$  vs kontrola 15 min ischemii.

#### 4.10. Wpływ TET01 na metabolizm adenylanów w czasie ischemii *in vivo*

Ryc. 23 przedstawia procentową zawartość nukleotydów adeninowych i ich katabolitów w miokardium myszy po 5 min (panel A) i 15 min (panel B) ischemii prowadzonej w temp 37°C. Dożylne podanie myszy 5 mg TET01 a następnie wykonanie identycznego modelu ischemii powoduje zwiększenie produkcji adenozyyny (Ryc. 24).



Ryc. 23. Procentowa zawartość nukleotydów adeninowych i ich katabolitów (Ado, Ino, Hx) w mysim sercu po 5 (A) i 15 min całkowitej ischemii (B).

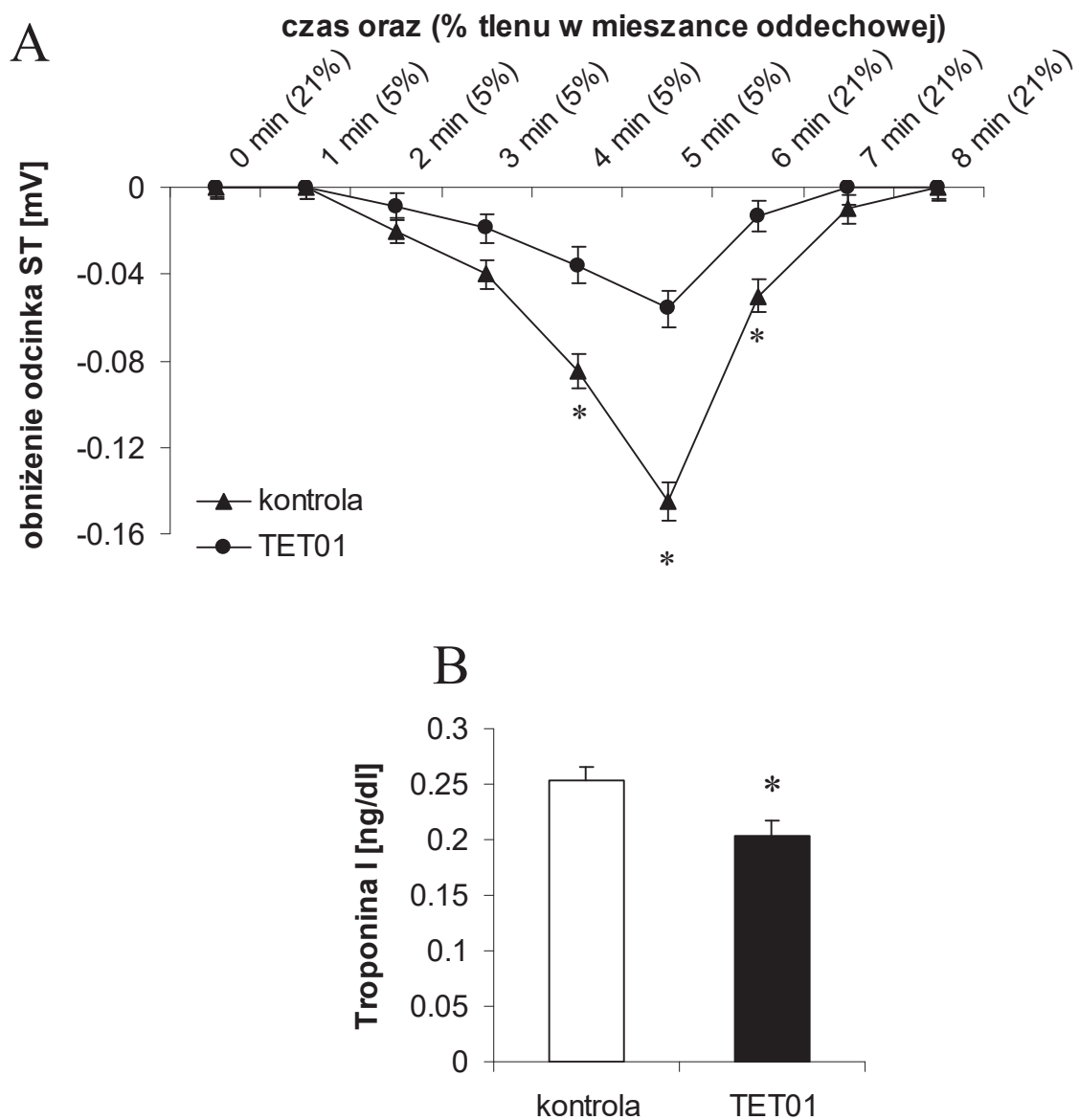


Ryc. 24. Procentowa zawartość nukleotydów adeninowych i ich katabolitów (Ado, Ino, Hx) w sercu myszy po 30 min dożylnej infuzji 5 mg TET01 oraz 5 min (A) i 15 min całkowitej ischemii (B).



#### 4.11. Wpływ TET01 na parametry niedokrwienia i martwicy mysiego miokardium w modelu zawału serca indukowanego hipoksją

Dożylnie podanie 5 mg TET01 w 30 min infuzji myszom knock-out rasy C57BL ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, a następnie poddanie ich 5 min hipoksji z zastosowaniem 5% O<sub>2</sub> spowodowało istotną redukcję obniżenia odcinka ST w 4-tej i 5-tej min hipoksji z 0,09 i 0,14 mV w grupie kontrolnej do 0,04 i 0,06 mV w grupie traktowanej TET01 (Ryc. 25 A). Podanie inhibitora spowodowało zmniejszenie stężenia troponiny I w osoczu po 24 godz od hipoksji w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 25 B).



Ryc. 25. Zachowanie odcinka ST podczas hipoksji (A) oraz stężenie Troponiny I w osoczu myszy C57BL Apo<sup>-/-</sup> LDLR<sup>-/-</sup> po 24 godz od początku hipoksji (B) poprzedzone 30 min dożylnym wlewem 5 mg TET01. Wyniki stanowią średnią ± SEM, n=5. \*P<0,05 vs kontrola.

#### 4.12. Wpływ MNA na funkcję i metabolizm serca oraz na strukturę kolagenu w modelu pozawałowej niewydolności serca

Ze względu na brak możliwości uzyskania długotrwałego efektu zahamowania aktywności deaminazy AMP przy użyciu TET01 z powodu jego krótkiego okresu półtrwania *in vivo*, do oceny wpływu przewlekłego wyhamowania deaminazy AMP na rozwój niewydolności serca został użyty MNA, nieselektywny inhibitor deaminazy AMP.

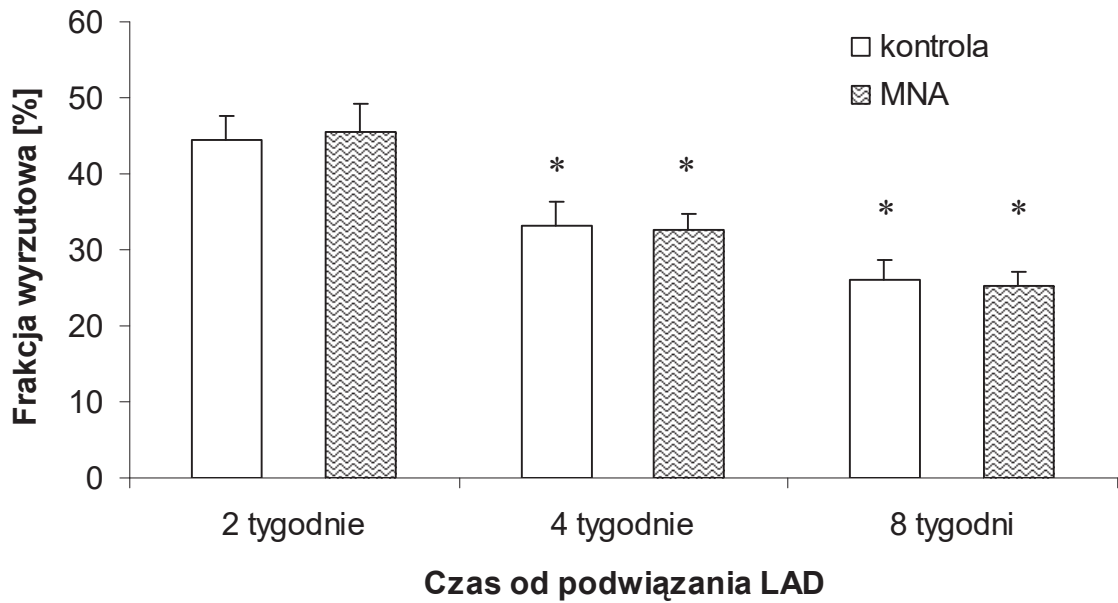
MNA nie wpływał na frakcję wyrzutową lewej komory mierzoną badaniem echokardiograficznym. Po 4 tyg. od podwiązania gałęzi przedniej zstępującej wykazano obniżenie frakcji wyrzutowej zarówno w grupie kontrolnej jak i przyjmującej MNA do 33% a po 8 tyg. do 25% (Ryc. 26).

Przedstawienie wyników inwazyjnej oceny parametrów funkcji skurczowej niewydolnych serc znajduje się na Ryc. 27. Na podstawie oceny szczytowego ciśnienia skurczowego lewej komory w zależności od objętości balonu wypełniającego lewą komorę (Ryc. 27 A), maksymalnego rozwijanego ciśnienia lewej komory (Ryc. 27 B) oraz maksimum + dp/dt (Ryc. 27 C) nie stwierdzono różnic w funkcji skurczowej pomiędzy grupą przyjmującą MNA a grupą kontrolną.

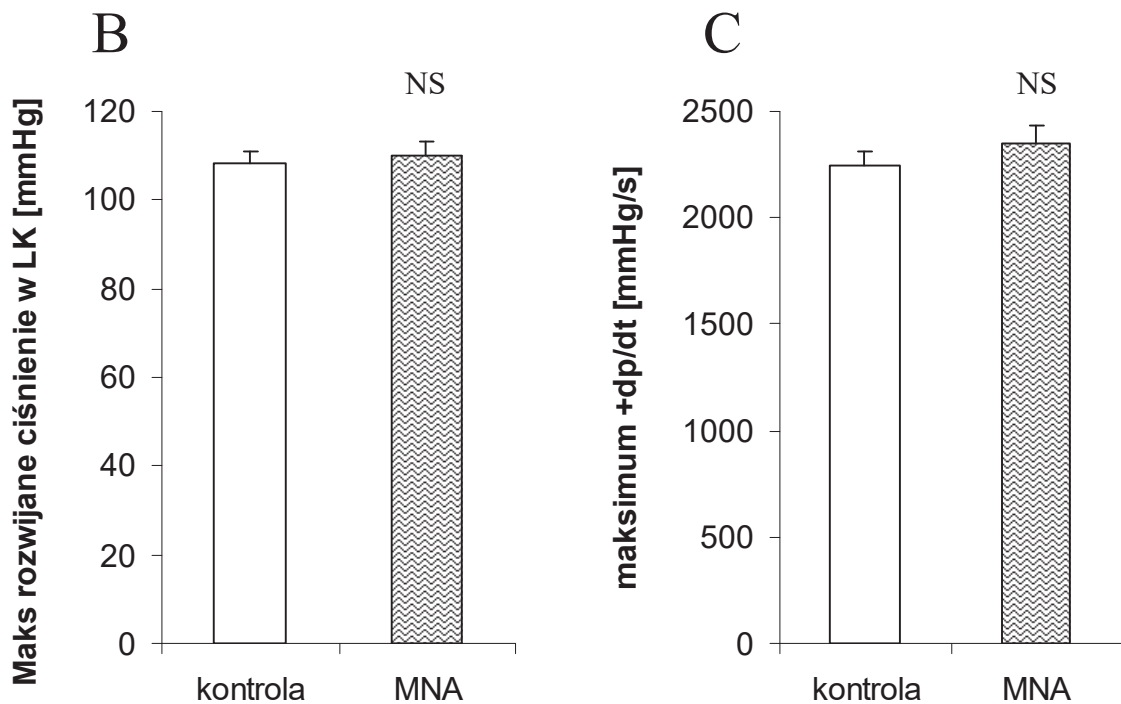
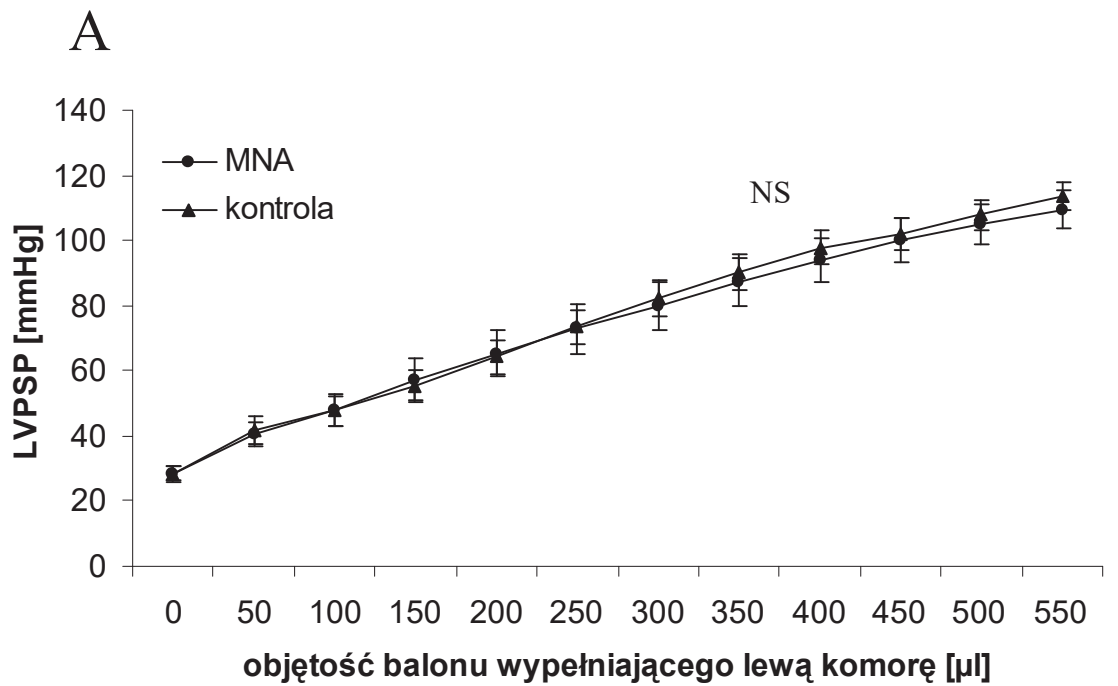
Ryc. 28 przedstawia parametry funkcji rozkurczowej niewydolnych serc oceniane metodą inwazyjną. Analiza krzywej zależności końcowo-rozkurczowego ciśnienia w lewej komorze od objętości balonu wypełniającego lewą komorę wykazała uzyskanie istotnie mniejszego ciśnienia końcowo-rozkurczowego w grupie traktowanej MNA w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 28 A). MNA spowodował także ponad 7% zwiększenie wartości maksimum - dp/dt (Ryc. 28 B).

Podanie MNA nie wpłynęło ani na ładunek energetyczny adenylanów ani na sumę stężeń nukleotydów adeninowych w sercach obu badanych grup (Ryc. 29 A i B). W grupie traktowanej MNA uzyskano 35% redukcję produkcji IMP w stosunku do grupy kontrolnej (Ryc. 29 C).

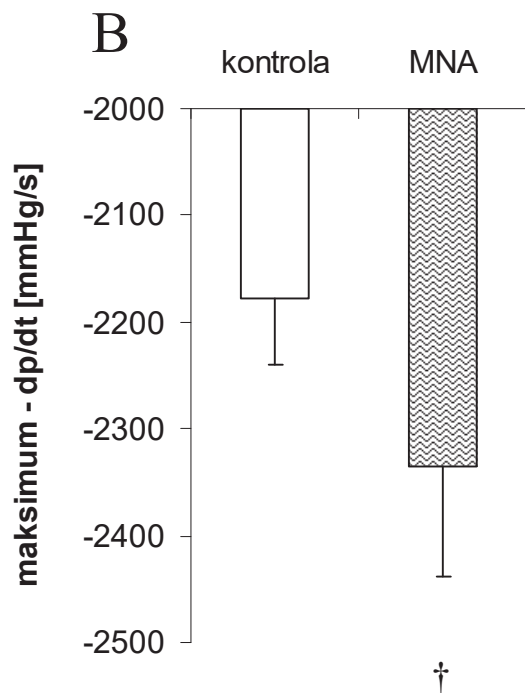
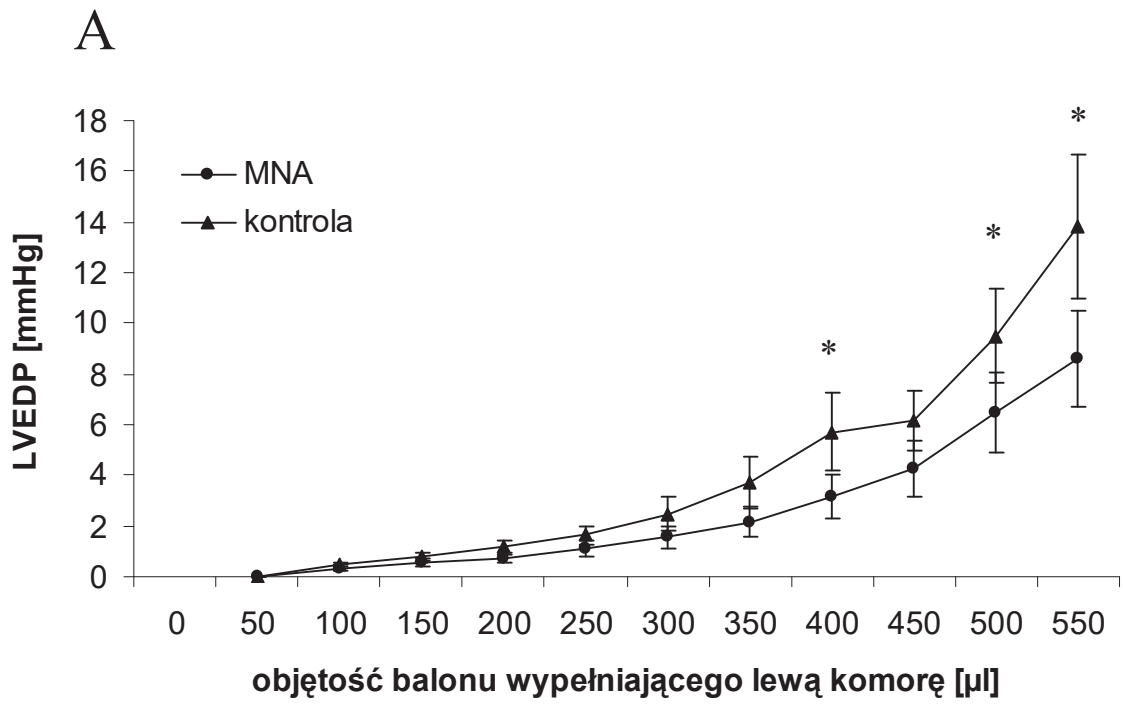
MNA nie wpłynął na ilość kolagenu w pozawałowo przebudowanym sercu (Ryc. 30 A), spowodował on jednak istotne 10% zmniejszenie mostków pirydynolinowych wyrażonych stosunkiem stężeń pirydynoliny/hydroksyproliny (Ryc. 30 B).



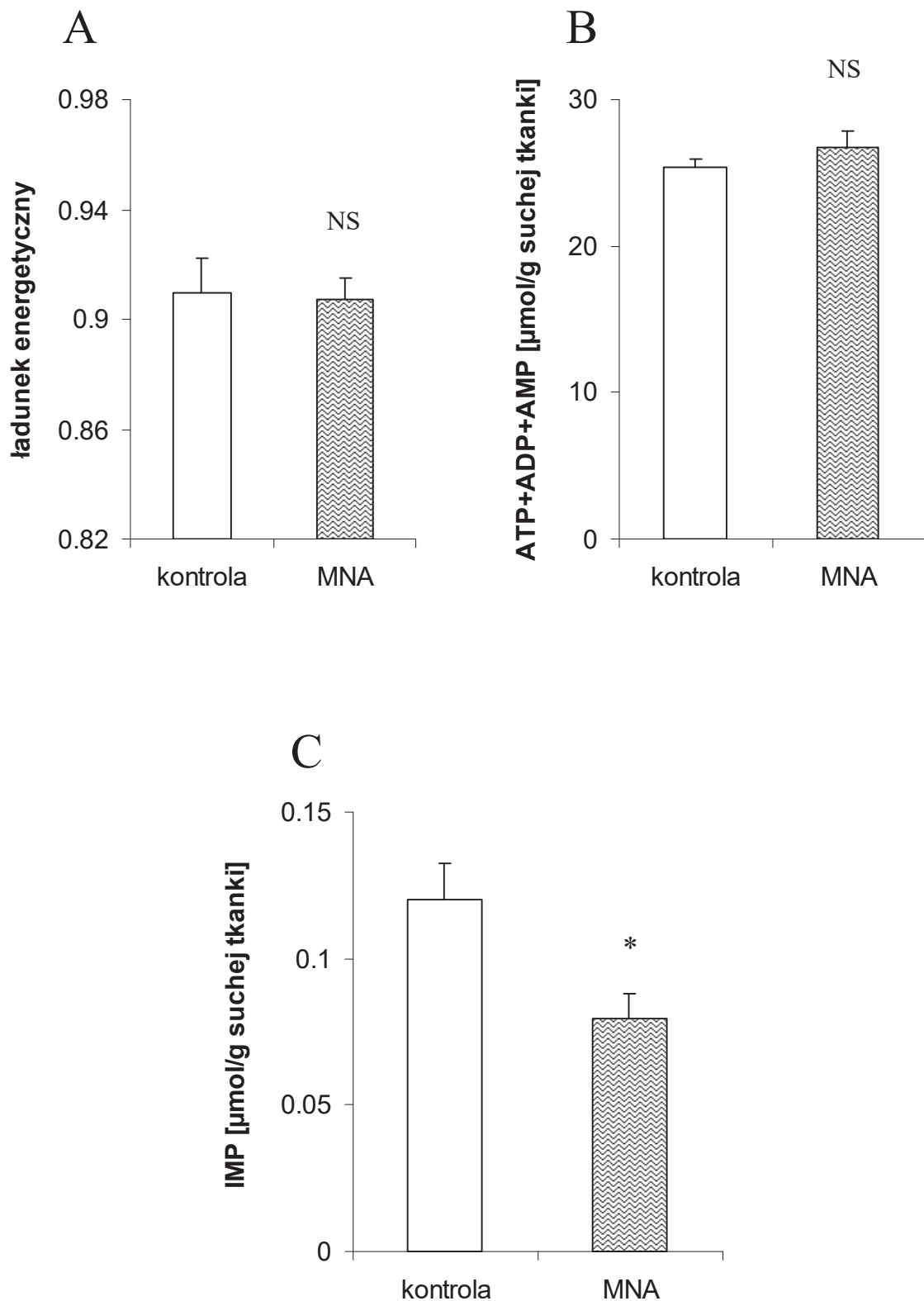
Ryc. 26. Frakcja wyrzutowa lewej komory serca określona metodą Simpsona w badaniu echokardiograficznym po 2, 4 i 8 tygodniach od podwiązania proksymalnego odcinka gałęzi przedniej zstępującej, lewej tętnicy wieńcowej (LAD) w grupie przyjmującej MNA i w grupie kontrolnej. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD,  $n=20$ . \* $P<0,05$  vs kontrola 2 tygodnie.



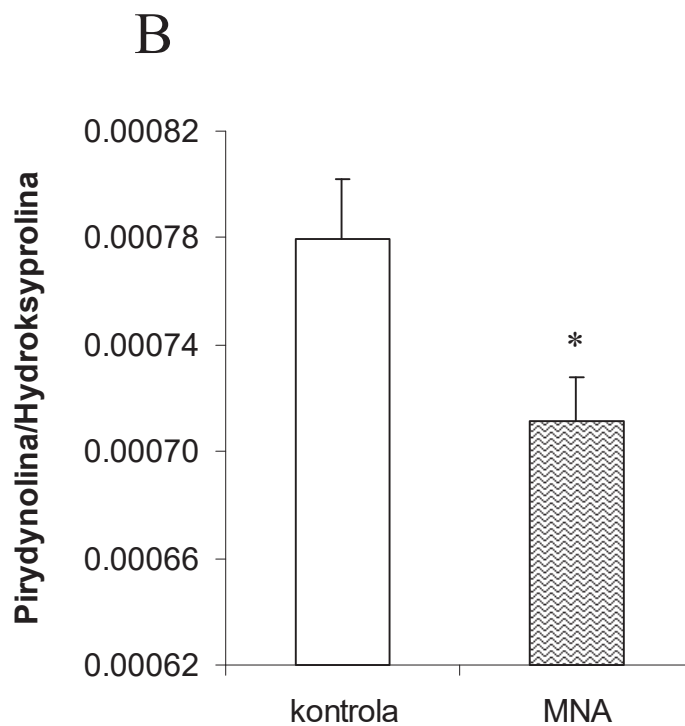
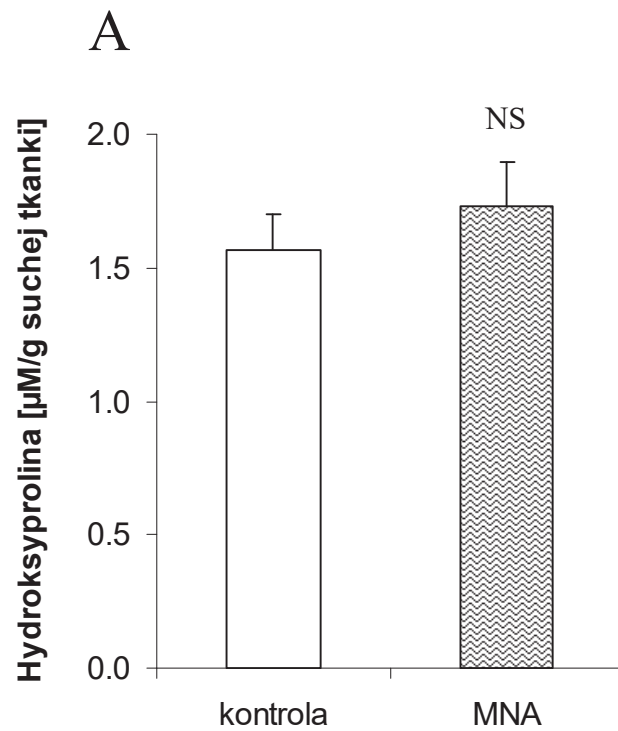
Ryc. 27. Szczytowe ciśnienie skurczowe (LVPSP) (A), maksymalne rozwijane ciśnienie (B), maksymalne +dp/dt (C) lewej komory w perfundowanym sercu szczurów traktowanych przez 6 tygodni doustną dawką 100 mg/kg metylonikotynamidu (MNA) lub placebo. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM, n=20.



Ryc. 28. Końcowo-rozkurczowe ciśnienie (LVEDP) (A), maksymalne - dp/dt (B) lewej komory, perfundowanego w układzie Langendorffa serca szczura traktowanego przez 6 tygodni 100 mg/kg m.c. per os MNA vs kontrola. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM, n=20. \* $P < 0,05$  vs odpowiednia kontrola. Trend † $P = 0,13$  vs kontrola.



Ryc. 29. Ładunek energetyczny adenylanów (A), suma stężeń nukleotydów adeninowych (ATP+ADP+AMP) (B) oraz stężenie IMP (C) po oznaczeniu funkcji mechanicznej w pozawalowo przebudowanym mięśniu sercowym szczura traktowanego przez 6 tygodni 100 mg/kg m.c. MNA oraz w grupie kontrolnej. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM, n=20. \* $P < 0,05$  vs kontrola.



Ryc. 30. Zawartość kolagenu wyrażona stężeniem hydroksyproliny (A) oraz wskaźnik ilości mostków kolagenowych wyrażony stosunkiem pirydynolina/hydroksyprolina (B) w pozawalowo przebudowanym mięśniu sercowym szczura traktowanego przez 6 tygodni 100 mg/kg m.c. MNA oraz w grupie kontrolnej. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SEM,  $n=20$ . \* $P<0,05$  vs kontrola.

## 5. Dyskusja

W niniejszej pracy wykazano, że 3-[2-(3-karboksy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaftyl)etyl]-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5]-[1,3]diazepin-8-ol (TET01) jest skutecznym inhibitorem AMPD działającym zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Działanie hamujące aktywność AMPD wykazano również dla 4PYR oraz MNA. W doświadczeniach z użyciem izolowanej AMPD, wyizolowanych kardiomiocytów, perfundowanych serc szczura oraz w doświadczeniach *in vivo* u myszy TET01 powodował niemal całkowite zahamowanie AMPD. Badania przedstawione w niniejszym opracowaniu wykazały konieczność stosowania wysokich stężeń TET01 w modelach komórkowych i *in vivo* ze względu na wiązanie z białkami oraz utrudnioną dyfuzję inhibitora przez błonę komórkową. Nie zaobserwowano jednak efektów toksycznych przy stosowaniu tak dużych dawek. Stosunkowo krótki czas półtrwania TET01 w mysim modelu *in vivo* spowodował konieczność zastosowania ciągłego dożylnego wlewu inhibitora, co pozwoliło uzyskać skuteczną inhibicję AMPD. Zahamowanie aktywności AMPD przez TET01 w mysim modelu zawału serca indukowanym hipoksją zredukowano parametry niedokrwienia i martwicy serca. W przedstawianych badaniach stwierdzono również poprawę czynności rozkurczowej niewydolnego serca po długotrwałym podawaniu MNA. Efekt ten może jednak nie być związany tylko z hamowaniem AMPD.

Przedstawiona w niniejszej pracy analiza wpływu TET01 na izolowaną deaminazę AMP wykazała 50% zahamowanie jej aktywności przy stężeniu ok. 0,5  $\mu\text{M}$ . Jest to stężenie wielokrotnie wyższe niż wartości  $K_i$  podane uprzednio dla tego związku wynoszące 2 nM (Kasibhatla i wsp., 2001). Różnica ta może wynikać z przyczyn metodologicznych – stosowano różne metody oznaczania aktywności, a przede wszystkim różne stężenia AMP w czasie oznaczania. Metoda stosowana w niniejszej pracy używała bardzo wysokiego, 25 mM stężenia AMP. Ponadto AMPD użyta do sprawdzenia tego efektu była z innego źródła – w niniejszej pracy stosowano AMPD z mięśni szkieletowych człowieka, natomiast w cytowanej użyto rekombinowanej AMPD typu erytrocytarne.

W kolejnym etapie projektu prowadzono badania z zastosowaniem modelu izolowanych kardiomiocytów, gdzie badano hamujące działanie związków mających wpływ na izolowaną deaminazę AMP. Wykazano, że TET01 jest najsilniejszym



inhibitorem AMPD spośród badanych związków i po 30 min inkubacji selektywnie hamuje jej aktywność w 50 i 90% w stężeniach kolejno 0,5 i 1 mM. Z pozostałych badanych związków jedynie wysokie stężenia (1 mM) 4PYR i MNA wykazywały właściwości hamujące aktywność AMPD (kolejno 43 i 30%), przy czym efekt ten był wyraźniejszy po zastosowaniu długich inkubacji (6 godz). Purynorybozyd oraz kofeina wykazywały również słaby efekt hamujący AMPD (Borkowski i wsp., 2008). Stężenie TET01 hamujące w 50% aktywność wyizolowanej AMPD czy AMPD w homogenacie serca wynosiło 0,5-2,0  $\mu$ M, natomiast w modelu izolowanych kardiomiocytów wynosiło około 500  $\mu$ M. Jak wykazały przedstawione w niniejszym opracowaniu badania, znacząco wyższe stężenie TET01 potrzebne do zahamowania AMPD w kardiomiocytach wynikało z wiązania inhibitora do albuminy obecnej w środowisku inkubacyjnym oraz z utrudnionej dyfuzji TET01 przez błonę komórkową. To powodowało, że wewnątrzkomórkowe stężenie TET01 wynosiło jedynie 10% stężenia obecnego w środowisku zewnątrzkomórkowym. Analiza zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia TET01 oraz stopnia zahamowania AMPD wykazywała podobny trend tj.: uzyskanie najwyższego stężenia inhibitora i największego efektu inhibicji AMPD w 0,5 – 2 godz inkubacji, a następnie stopniowy spadek stężenia TET01 z równoległą normalizacją aktywności AMPD. Intrygującym wynikiem było uzyskanie aktywacji AMPD w przypadku 8 godz inkubacji kardiomiocytów z 0,3 mM TET01. Najprawdopodobniej wskazuje to na wewnątrzkomórkowy metabolizm TET01 z wytworzeniem pochodnej, posiadającej przeciwny, czyli aktywujący wpływ na AMPD. Zastosowanie TET01 w stężeniu 1 mM w układzie izolowanych kardiomiocytów nie wykazało właściwości toksycznych mierzonych uwalnianiem enzymów wewnątrzkomórkowych. Opracowanie warunków pozwalających na niemal całkowite zahamowanie aktywności AMPD przez TET01 w modelu izolowanych kardiomiocytów z jednoczesnym brakiem cech toksycznego działania, umożliwiło dalsze badanie wpływu hamowania AMPD na metabolizm i funkcje w modelu perfundowanego serca oraz *in vivo*.

Dotychczasowy brak danych eksperymentalnych analizujących wpływ zahamowania aktywności AMPD w sercu na jego funkcję spowodowany był brakiem dostępnych selektywnych inhibitorów AMPD. Z uwagi na liczne przesłanki płynące z obserwacji klinicznych wskazujących na potencjalnie korzystne efekty zahamowania aktywności AMPD w warunkach niedokrwienia i niewydolności serca (Loh i wsp., 1999; Anderson i wsp., 2000; Yazaki i wsp., 2004; Kolek i wsp., 2005), w ostatnim

czasie znacznie wzrosło zainteresowanie farmakologiczną inhibicją AMPD. W latach 1997 – 2001 grupa Erion opracowała szereg związków chemicznych zsyntezowanych na podstawie modyfikacji koformycyny (Kasibhatla i wsp., 2001). Właściwości nowo zsyntezowanych inhibitorów AMPD badano w modelu izolowanych hepatocytów, gdzie wykazano ich silny efekt inhibicyjny AMPD, wysoką specyficzną a także brak efektów toksycznych (Erion i wsp., 1999). Badania tej grupy ograniczyły się jednak tylko do określenia właściwości chemicznych uzyskanych związków z bardzo ograniczoną analizą właściwości biologicznych, co wynikało najprawdopodobniej z braku odpowiedniego warsztatu badawczego. Badania selektywnych inhibitorów AMPD w prostych modelach chorób i metabolizmu serca były przedmiotem pracy doktorskiej Se-Chan Kim prowadzonej w Centrum Fizjologii, Instytutu Serca i Fizjologii Krążenia, Uniwersytetu w Dusseldorfie (Kim, 2003). W badaniach tych wykazano niemal całkowite zahamowanie wyizolowanej AMPD po zastosowaniu 1  $\mu$ M selektywnego inhibitora AMPD. Zaobserwowano również utrudnioną dyfuzję inhibitora przez błonę komórkową, wykazując 20-sto krotnie mniejsze stężenie związku w cytoplazmie kardiomiocytów w porównaniu ze stężeniem w środowisku inkubacyjnym. Wyniki te są zgodne z danymi przedstawianymi w niniejszym opracowaniu. Nie uzyskano jednak efektu hamującego AMPD w modelu perfuzji izolowanego serca świnki morskiej po zastosowaniu badanych inhibitorów w stężeniach 1 i 10  $\mu$ M, co wynikało ze zbyt niskiego stężenia inhibitora AMPD. Badania przedstawiane w niniejszym opracowaniu z zastosowaniem modelu perfuzji izolowanego serca, w których stosowano TET01 w stężeniu 300  $\mu$ M wykazały 65% efekt inhibicji AMPD z jednoczesnym 22% wzrostem produkcji adenozyiny i brakiem cech toksyczności. Uzyskane wyniki potwierdzają utrudniony transport inhibitora przez błonę komórkową kardiomiocytów i wskazują na konieczność stosowania jego wysokich stężeń w celu uzyskania odpowiedniego efektu metabolicznego. Jedną z dróg poprawy biodostępności inhibitorów AMPD może być wytworzenie fosfonianowych pochodnych, znacznie poprawiających biodostępność szerokiej grupy związków chemicznych (Dang i wsp., 2007).

Analiza stężenia TET01 *in vivo* we krwi u myszy po jego dożylnym podaniu, wykazała szybki spadek stężenia inhibitora we krwi z czasem półtrwania wynoszącym około 30 min. Jeszcze wyraźniejszy spadek stężenia inhibitora w określonym czasie od podania obserwowano w miokardium. Równoległe do spadku stężenia TET01 we krwi, wykazano zmianę aktywności AMPD w miokardium z początkowego 50%

zahamowania aktywności AMPD po 15 minutach od podania inhibitora, normalizacją aktywności po 1 godz i podwojeniu aktywności AMPD po 3 godz. Wyniki te potwierdziły dane o TET01 uzyskane na podstawie doświadczeń z użyciem kardiomiocytów o silnym efekcie inhibicyjnym oraz przemianach TET01 do pochodnych, mających przeciwstawne działanie. Zaobserwowano także, że stężenie TET01 w erytrocytach wynosi około 20% stężenia w osoczu, potwierdzając wcześniejsze obserwacje o jego utrudnionej dyfuzji przez błonę komórkową oraz silnym wiązaniu z białkami osocza. W celu uzyskania silniejszego i trwalszego efektu metabolicznego wywołanego przez TET01 w modelu *in vivo* u myszy, zastosowano dożylną infuzję 5 mg inhibitora przez 30 min i 60 min. Zarówno 30 min infuzji jak i podwojenie tego czasu spowodowały taki sam – 75% efekt hamujący katabolizm przez AMPD. Jest to najprawdopodobniej najsilniejszy efekt, który można uzyskać *in vivo* podając TET01.

Z uwagi na dostępność jedynie ograniczonej ilości TET01 oraz konieczność stosowania wysokich stężeń inhibitora w doświadczeniach *in vivo*, eksperymenty prowadzono na myszach. W celu zbadania roli inhibicji AMPD w eksperymentalnym modelu zawału serca, wykorzystano myszy knock-out rasy C57BL ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, które spontanicznie rozwijają miażdżycę. W modelu tym pod wpływem hipoksji dochodzi do odruchowego skurczu tętnic wieńcowych na blaszce miażdżycowej, co powoduje niedokrwienie miokardium widoczne pod postacią obniżenia odcinka ST w EKG oraz martwicę miokardium związaną z uwalnianiem troponiny I (Caligiuri i wsp., 1999). Podanie TET01 myszom w dawce hamującej deaminazę AMP powodowało ograniczenie obniżenia odcinka ST w EKG oraz ograniczenie martwicy mięśnia sercowego (redukcję uwolnionej troponiny I).

Bardzo niewiele jest danych w piśmiennictwie dotyczących wpływu inhibitorów AMPD w eksperymentalnych modelach chorób serca. Jedyne dostępne dane to analiza wpływu aktywności AMPD na funkcję serca w warunkach patologicznych (Paolucci i wsp., 2006). Badano tam wpływ nieselektywnego inhibitora macierzowych metaloproteinaz (MMPI) na metabolizm nukleotydów purynowych, aktywność AMPD oraz zawartość mostków kolagenowych w modelu podostrej niewydolności serca wywołanej przez ekspozycję na angiotensynę II oraz tachykardię uzyskaną przez elektryczną stymulację serca. W doświadczeniu tym zastosowanie MMPI spowodowało zwiększenie podatności niewydolnego serca. Autorzy pracy postulują, że jest to wynik poprawy energetyki mięśnia sercowego związany z 20% inhibicją AMPD. W niniejszej

pracy doktorskiej nie było możliwości zastosowania selektywnego inhibitora TET01 w modelu niewydolności serca z uwagi na jego ograniczone ilości oraz krótki czas półtrwania.

Innym dostępnym w naszych warunkach związkiem wykazującym pewne działanie hamujące aktywność AMPD był MNA. Związek ten podawano doustnie szczurom po zawale serca przez 6 tyg w dawkach stosowanych we wcześniejszych badaniach (Bartus i wsp., 2008). W wyniku przewlekłego podawania MNA, podobnie jak w pracy Paolocci, uzyskano zwiększenie podatności mięśnia sercowego i zaobserwowano poprawę relaksacji niewydolnego serca. Poprawę obu parametrów funkcji rozkurczowej można wiązać ze zmniejszeniem o około 35% aktywności AMPD a także ze zmniejszeniem o 10% ilości mostków kolagenowych.

Jednym z kluczowych zagadnień związanych z efektami działania inhibitorów AMPD jest poznanie ich dokładnego mechanizmu. Zwiększona produkcja adenozyiny lub/i aktywacja kinazy proteinowej zależnej od AMP (AMPK) stanowią dwie najważniejsze możliwości. W ciągu ostatnich dekad, w oparciu o liczne badania eksperymentalne, zgromadzono wiele dowodów kardioprotekcyjnego znaczenia adenozyiny (Sommerschild i Kirkeboen, 2000; Peart i Headrick, 2007) jak i aktywacji kinazy białkowej AMP w warunkach niedokrwienia i niewydolności serca (Lopaschuk, 2008). Jednakże duże badania kliniczne jak np.: AMISTAD I i II badające rolę dożylnego wlewu adenozyiny u pacjentów z ostrym zawałem serca poddanych terapii reperfuzyjnej, nie wykazały istotnego wpływu egzogennej adenozyiny na rokowanie pacjentów, pomimo wyraźnego ograniczenia strefy martwicy serca. Obecnie wydaje się, że badania kliniczne jednoznacznie przekreśliły szansę adenozyiny na stanie się nowym, dodatkowym lekiem stosowanym w leczeniu ostrych zespołów wieńcowych ze względu na wątpliwy efekt odległy oraz na działania niepożądane takie jak wystąpienie bradyarytmii, hipotonii, bólów głowy, bólu dławicowego czy duszności (Ogilby i wsp., 1993). W innych pracach eksperymentalnych wykazano poprawę funkcji serca po ischemii i reperfuzji w grupach, w których obserwowano zwiększone stężenie międzykomórkowej endogennej adenozyiny jak np.: w modelu genetycznie modyfikowanych myszy z wyłączoną aktywnością deaminazy adenozyiny (Willems i wsp., 2006), po zastosowaniu inhibitorów deaminazy adenozyiny (Zhu i wsp., 1990), łącznego zastosowania inhibitorów deaminazy adenozyiny oraz kinazy adenozyiny (Smolenski i wsp., 2001), bądź po zastosowaniu inhibitora transportera nukleozydów (Sommerschild i wsp., 1997). Kolejnym mechanizmem w wyniku którego może

dochodzić do zwiększonej produkcji adenozyiny w warunkach niedokrwienia jest inhibicja AMPD. Kardioprotekcyjny efekt tego mechanizmu może być zwiększony poprzez aktywację kinazy białkowej AMP zależnej w wyniku wzrostu stosunku AMP/ATP. Ostatnie obserwacje kliniczne pacjentów z mutacją C34T w genie *AMPDI* powodującą 50% zahamowanie aktywności AMPD wykazały poprawę rokowania w ChNS i PNS (Kalsi i wsp., 2003; Gastmann i wsp., 2004; Kolek i wsp., 2005). W przeciwieństwie prace (de Groote i wsp., 2006; Collins i wsp., 2006) nie wykazały korzyści polimorfizmu C34T w ChNS i PNS. Badania przedstawione w niniejszym opracowaniu są pierwszymi doświadczeniami badającymi rolę selektywnej inhibicji AMPD w modelu zawału serca, które wykazały jej kardioprotekcyjne znaczenie. Zastosowanie MNA spowodowało częściowe zahamowania aktywności AMPD i poprawiło parametry funkcji rozkurczowej niewydolnego serca.

Głównym ograniczeniem przedstawianej pracy jest szybki metabolizm najsilniejszego inhibitora AMPD badanego w tej pracy – TET01 oraz jego utrudniona dyfuzja przez błonę komórkową. Krótki czas półtrwania uniemożliwił długoterminową aplikację TET01 w modelu niewydolności serca. Wskazane są dalsze poszukiwania bardziej stabilnych i biodostępnych inhibitorów AMPD (Kirkman i wsp., 2008). Pomimo konieczności prowadzenia dalszych badań, wyniki przedstawione w niniejszej pracy dostarczają ważnych dowodów wskazujących, że hamowanie deaminazy AMP może być skutecznym celem terapeutycznym w chorobach serca.

## 6. Wnioski

1. Najsilniejszym inhibitorem deaminazy AMP wśród badanych związków jest TET01 podczas gdy MNA, 4PYR, purynorybozyd i kofeina są słabszymi inhibitorami tego enzymu.
2. Stała inhibitorowa TET01 w preparacie wyizolowanej deaminazy AMP oraz homogenacie serca szczura wynosi około 1  $\mu\text{M}$ , natomiast w izolowanych kardiomiocytach wynosi około 500  $\mu\text{M}$ .
3. Wysokie stężenie potrzebne do zahamowania deaminazy AMP w kardiomiocytach wynika ze słabego transportu TET01 do komórki, wiązania się z białkami w środowisku inkubacyjnym oraz wewnątrzkomórkowym metabolizowaniu inhibitora.
4. TET01 w stężeniu 1 mM nie wykazuje właściwości cytotoksycznych, przez co możliwe jest zastosowanie tego związku w tak wysokich stężeniach w badaniach *in vivo*.
5. TET01 podany w stężeniu 0,3 mM hamuje deaminazę AMP w ok. 65% w izolowanym sercu perfundowanym w układzie Langendorffa.
6. Czas półtrwania TET01 we krwi jest krótki; po dożylnym podaniu u myszy wynosi około 30 min.
7. Dożylna infuzja TET01 w dawce 5 mg przez 30 min powoduje ok. 75% zmniejszenie aktywności deaminazy AMP w mysim sercu; jednorazowa iniekcja dożylna powoduje mniejszy efekt hamowania aktywności AMPD.
8. Podanie TET01 myszom C57BL ApoE/LDLR (-/-) w dawce hamującej AMPD ogranicza obniżenie odcinka ST w EKG oraz redukuje uwalnianie troponiny I podczas eksperymentalnego zawału serca.
9. Podanie metylonikotynamidu (MNA) szczurom z niewydolnością serca wywołaną podwiązaniem tętnicy wieńcowej powoduje zmniejszenie aktywności deaminazy AMP, poprawę parametrów funkcji rozkurczowej niewydolnego serca oraz zmianę struktury sercowego kolagenu.

## 7. Piśmiennictwo

- Anderson, JL, Habashi, J, Carlquist, JF, Muhlestein, JB, Horne, BD, Bair, TL, Pearson, RR, Hart, N. "A common variant of the AMPD1 gene predicts improved cardiovascular survival in patients with coronary artery disease." *J.Am.Coll.Cardiol.* 36.4 (2000): 1248-52.
- Ashby, B i Frieden, C. "Interaction of AMP-aminohydrolase with myosin and its subfragments." *J.Biol.Chem.* 252.6 (1977): 1869-72.
- Assali, AR, Sdringola, S, Ghani, M, Denkats, AE, Yepes, A, Hanna, GP, Schroth, G, Fujise, K, Anderson, HV, Smalling, RW, Rosales, OR. "Intracoronary adenosine administered during percutaneous intervention in acute myocardial infarction and reduction in the incidence of "no reflow" phenomenon." *Catheter.Cardiovasc.Interv.* 51.1 (2000): 27-31.
- Bartus, M, Lomnicka, M, Kostogrys, RB, Kazmierczak, P, Watala, C, Slominska, EM, Smolenski, RT, Pisulewski, PM, Adamus, J, Gebicki, J, Chlopicki, S. "1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats." *Pharmacol.Rep.* 60.1 (2008): 127-38.
- Baxter, GF, Marber, MS, Patel, VC, Yellon, DM. "Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning." *Circulation* 90.6 (1994): 2993-3000.
- Belardinelli, L, Shryock, JC, Song, Y, Wang, D, Srinivas, M. "Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes." *FASEB J.* 9.5 (1995): 359-65.
- Berne, RM. "Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow." *Am.J.Physiol* 204 (1963): 317-22.
- Bolli, R. "The late phase of preconditioning." *Circ.Res.* 87.11 (2000): 972-83.
- Borkowski, T, Lipinski, M, Kaminski, R, Krzyminska-Stasiuk, E, Langowska, M, Raczak, G, Slominska, EM, Smolenski, RT. "Modulation of AMP deaminase in rat hearts subjected to ischemia and reperfusion by purine riboside." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27.6 (2008): 876-80.
- Bradford, MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal.Biochem.* 72 (1976): 248-54.
- Bryant, SR, Bjercke, RJ, Erichsen, DA, Rege, A, Lindner, V. "Vascular remodeling in response to altered blood flow is mediated by fibroblast growth factor-2." *Circ.Res.* 84.3 (1999): 323-28.
- Bunch, FT, Thornton, J, Cohen, MV, Downey, JM. "Adenosine is an endogenous protectant against stunning during repetitive ischemic episodes in the heart." *Am.Heart J.* 124.6 (1992): 1440-46.
- Burnstock, G. "Purinergic receptors in the heart." *Circ.Res.* 46.6 Pt 2 (1980): I175-I182.
- Byrnes, EW i Suelter, CH. "Preparation of rabbit muscle myosin or actomyosin free of 5'-adenylic acid deaminase." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 20.4 (1965): 422-26.
- Caligiuri, G, Levy, B, Pernow, J, Thoren, P, Hansson, GK. "Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96.12 (1999): 6920-24.
- Chapman, AG i Atkinson, DE. "Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction." *J.Biol.Chem.* 248.23 (1973): 8309-12.

- Collins, RP, Palmer, BR, Pilbrow, AP, Frampton, CM, Troughton, RW, Yandle, TG, Skelton, L, Richards, AM, Cameron, VA. "Evaluation of AMPD1 C34T genotype as a predictor of mortality in heart failure and post-myocardial infarction patients." *Am.Heart J.* 152.2 (2006): 312-20.
- Cronstein, BN, Daguma, L, Nichols, D, Hutchison, AJ, Williams, M. "The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively." *J.Clin.Invest* 85.4 (1990): 1150-57.
- Dang, Q, Liu, Y, Rydzewski, RM, Brown, BS, Robinson, E, van Poelje, PD, Colby, TJ, Erion, MD. "Bis[(para-methoxy)benzyl] phosphonate prodrugs with improved stability and enhanced cell penetration." *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 17.12 (2007): 3412-16.
- de Groote, P, Lamblin, N, Helbecque, N, Mouquet, F, Hermant, X, Amouyel, P, Dallongeville, J, Bauters, C. "The impact of the AMPD1 gene polymorphism on exercise capacity, other prognostic parameters, and survival in patients with stable congestive heart failure: a study in 686 consecutive patients." *Am.Heart J.* 152.4 (2006): 736-41.
- Decking, UK. "In vivo NMR spektroskopische Untersuchungen des kardialen Stoffwechsels." *Shaker* (2000).
- Deussen, A, Stappert, M, Schafer, S, Kelm, M. "Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient." *Circulation* 99.15 (1999): 2041-47.
- Diehl, KH, Hull, R, Morton, D, Pfister, R, Rabemampianina, Y, Smith, D, Vidal, JM, van, d, V. "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes." *J.Appl.Toxicol.* 21.1 (2001): 15-23.
- Dorheim, TA, Hoffman, A, Van Wylen, DG, Mentzer, RM, Jr. "Enhanced interstitial fluid adenosine attenuates myocardial stunning." *Surgery* 110.2 (1991): 136-45.
- Drury, AN i Szent-Gyorgyi, A. "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." *J.Physiol* 68.3 (1929): 213-37.
- Dyck, JR i Lopaschuk, GD. "AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally?" *J.Physiol* 574.Pt 1 (2006): 95-112.
- Ely, SW i Berne, R. "Protective effects of adenosine in myocardial ischemia." *Circulation* 85.3 (1992): 893-904.
- Erion, MD, Kasibhatla, SR, Bookser, BC, van Poelje, PD, Reddy, MR, Gruber, HE, Appleman, JR. "Discovery of AMP Mimetics that Exhibit High Inhibitory Potency and Specificity for AMP Deaminase." *J.Am.Chem.Soc.* 121.2 (1999): 308-19.
- Fischer, H, Esbjornsson, M, Sabina, RL, Stromberg, A, Peyrard-Janvid, M, Norman, B. "AMP deaminase deficiency is associated with lower sprint cycling performance in healthy subjects." *J.Appl.Physiol* 103.1 (2007): 315-22.
- Fishbein, WN, Armbrustmacher, VW, Griffin, JL. "Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle." *Science* 200.4341 (1978): 545-48.
- Frederich, M i Balschi, JA. "The relationship between AMP-activated protein kinase activity and AMP concentration in the isolated perfused rat heart." *J.Biol.Chem.* 277.3 (2002): 1928-32.
- Gabrio, B, Huennekens, F, Nurk, EA. "Erythrocyte metabolism. I. Purine nucleoside phosphorylase." *J.Biol.Chem.* 221.2 (1956): 971-81.



- Garratt, KN, Holmes, DR, Jr., Molina-Viamonte, V, Reeder, GS, Hodge, DO, Bailey, KR, Lobl, JK, Laudon, DA, Gibbons, RJ. "Intravenous adenosine and lidocaine in patients with acute myocardial infarction." *Am.Heart J.* 136.2 (1998): 196-204.
- Gastmann, A, Sigusch, HH, Henke, A, Reinhardt, D, Surber, R, Gastmann, O, Figulla, HR. "Role of adenosine monophosphate deaminase-1 gene polymorphism in patients with congestive heart failure (influence on tumor necrosis factor-alpha level and outcome)." *Am.J.Cardiol.* 93.10 (2004): 1260-64.
- Gebicki, J, Sysa-Jedrzejowska, A, Adamus, J, Wozniacka, A, Rybak, M, Zielonka, J. "1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin." *Pol.J.Pharmacol.* 55.1 (2003): 109-12.
- Gneushev, ET, Naumova, VV, Bogoslovskii, VA. "Content of hypoxanthine in the peripheral venous blood in infarction and ischemia of the myocardium." *Ter.Arkh.* 49.4 (1977): 20-24.
- Hakala, M, Glaid, A, Schwert, G. "Lactic dehydrogenase. II. Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature." *J.Biol.Chem.* 221.1 (1956): 191-209.
- Halestrap, AP, Clarke, SJ, Javadov, SA. "Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection." *Cardiovasc.Res.* 61.3 (2004): 372-85.
- Hardie, DG i Carling, D. "The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?" *Eur.J.Biochem.* 246.2 (1997): 259-73.
- Itter, G, Jung, W, Juretschke, P, Schoelkens, BA, Linz, W. "A model of chronic heart failure in spontaneous hypertensive rats (SHR)." *Lab Anim* 38.2 (2004): 138-48.
- James, S, Flodin, M, Johnston, N, Lindahl, B, Venge, P. "The antibody configurations of cardiac troponin I assays may determine their clinical performance." *Clin.Chem.* 52.5 (2006): 832-37.
- Janier, MF, Vanoverschelde, JL, Bergmann, SR. "Adenosine protects ischemic and reperfused myocardium by receptor-mediated mechanisms." *Am.J.Physiol* 264.1 Pt 2 (1993): H163-H170.
- Jarasch, ED, Bruder, G, Heid, HW. "Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells." *Acta Physiol Scand.Suppl* 548 (1986): 39-46.
- Jou, IM, Tsai, YT, Tsai, CL, Wu, MH, Chang, HY, Wang, NS. "Simplified rat intubation using a new oropharyngeal intubation wedge." *J.Appl.Physiol* 89.5 (2000): 1766-70.
- Kaletha, K, Stankiewicz, A, Makarewicz, W, Żydowo, M. "The influence of phosphate, fluoride and potassium ions on the activity of amp-deaminase from human skeletal muscle." *Int.J.Biochem.* 7.1-2 (1976): 67-71.
- Kaletha, K i Żydowo, M. "Differencs in therma susceptibility of the kinetics of amp-aminohydrolase from foetal and postnatal chick muscl." *Int.J.Biochem.* 2.7 (1971): 20-26.
- Kalsi, KK, Smolenski, RT, Yacoub, MH. "Effects of nucleoside transport inhibitors and adenine/ribose supply on ATP concentration and adenosine production in cardiac myocytes." *Mol.Cell Biochem.* 180.1-2 (1998): 193-99.
- Kalsi, KK, Yuen, AH, Rybakowska, IM, Johnson, PH, Slominska, E, Birks, EJ, Kaletha, K, Yacoub, MH, Smolenski, RT. "Decreased cardiac activity of AMP deaminase in subjects with the AMPD1 mutation--a potential mechanism of protection in heart failure." *Cardiovasc.Res.* 59.3 (2003): 678-84.

- Kasibhatla, SR, Bookser, BC, Xiao, W, Erion, MD. "AMP deaminase inhibitors. 5. Design, synthesis, and SAR of a highly potent inhibitor series." *J.Med.Chem.* 44.4 (2001): 613-18.
- Kim, SC. "Die Umsatzrate der AMP-Desaminase im Meerschweinchenherzen." *Doktorarbeit* (2003): 1-89.
- Kindt, E, Rossi, DT, Gueneva-Boucheva, K, Hallak, H. "Quantitative method for biomarkers of collagen degradation using liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Anal.Biochem.* 283.1 (2000): 71-76.
- Kirkman, JK, Lindell, SD, Maechling, S, Slawin, AM, Moody, CJ. "Synthesis of 3-(carboxyarylalkyl)imidazo[2,1-f][1,2,4]triazines as potential inhibitors of AMP deaminase." *Org.Biomol.Chem.* 6.23 (2008): 4452-59.
- Kochan, Z, Smolenski, RT, Yacoub, MH, Seymour, AL. "Nucleotide and adenosine metabolism in different cell types of human and rat heart." *J.Mol.Cell Cardiol.* 26.11 (1994): 1497-503.
- Kolek, MJ, Carlquist, JF, Thaneemit-Chen, S, Lazzeroni, LC, Whiting, BM, Horne, BD, Muhlestein, JB, Lavori, P, Anderson, JL. "The role of a common adenosine monophosphate deaminase (AMPD)-1 polymorphism in outcomes of ischemic and nonischemic heart failure." *J.Card Fail.* 11.9 (2005): 677-83.
- Kroll, K, Decking, UK, Dreikorn, K, Schrader, J. "Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart." *Circ.Res.* 73.5 (1993): 846-56.
- Kudo, N, Barr, AJ, Barr, RL, Desai, S, Lopaschuk, GD. "High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase." *J.Biol.Chem.* 270.29 (1995): 17513-20.
- Langendorff, H. "Untersuchungen am uberlebenden Saugethierherzen." *Pflugers Arch.Gesamte Physiol Menschen.Tiere.* 61 (1895): 291-332.
- 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* 99.11 (1999): 1422-25.
- Lopaschuk, GD. "AMP-activated protein kinase control of energy metabolism in the ischemic heart." *Int.J.Obes.(Lond)* 32 Suppl 4 (2008): S29-S35.
- Lowenstein, JM. "Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle." *Physiol Rev.* 52.2 (1972): 382-414.
- Luiken, JJ, Coort, SL, Willems, J, Coumans, WA, Bonen, A, van, d, V, Glatz, JF. "Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling." *Diabetes* 52.7 (2003): 1627-34.
- Mahaffey, KW, Puma, JA, Barbagelata, NA, DiCarli, MF, Leeser, MA, Browne, KF, Eisenberg, PR, Bolli, R, Casas, AC, Molina-Viamonte, V, Orlandi, C, Blevins, R, Gibbons, RJ, Califf, RM, Granger, CB. "Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial." *J.Am.Coll.Cardiol.* 34.6 (1999): 1711-20.
- Mahnke, DK i Sabina, RL. "Calcium activates erythrocyte AMP deaminase [isoform E (AMPD3)] through a protein-protein interaction between calmodulin and the N-terminal domain of the AMPD3 polypeptide." *Biochemistry* 44.14 (2005): 5551-59.
- Mahnke-Zizelman, DK, Eddy, R, Shows, TB, Sabina, RL. "Characterization of the human AMPD3 gene reveals that 5' exon usage is subject to transcriptional

- control by three tandem promoters and alternative splicing." *Biochim.Biophys.Acta* 1306.1 (1996): 75-92.
- Mahnke-Zizelman, DK i Sabina, RL. "Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. Evidence for a third AMPD gene exhibiting alternatively spliced 5'-exons." *J.Biol.Chem.* 267.29 (1992): 20866-77.
- Mahnke-Zizelman, DK i Sabina, RL. "Localization of N-terminal sequences in human AMP deaminase isoforms that influence contractile protein binding." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 285.2 (2001): 489-95.
- Mahnke-Zizelman, DK i Sabina, RL. "N-terminal sequence and distal histidine residues are responsible for pH-regulated cytoplasmic membrane binding of human AMP deaminase isoform E." *J.Biol.Chem.* 277.45 (2002): 42654-62.
- Marquetant, R, Desai, NM, Sabina, RL, Holmes, EW. "Evidence for sequential expression of multiple AMP deaminase isoforms during skeletal muscle development." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84.8 (1987): 2345-49.
- Marsin, AS, Bertrand, L, Rider, MH, Deprez, J, Beauloye, C, Vincent, MF, Van den, BG, Carling, D, Hue, L. "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." *Curr.Biol.* 10.20 (2000): 1247-55.
- Marzilli, M, Orsini, E, Marraccini, P, Testa, R. "Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction." *Circulation* 101.18 (2000): 2154-59.
- Mentzer, RM, Jr., Birjiniuk, V, Khuri, S, Lowe, JE, Rahko, PS, Weisel, RD, Wellons, HA, Barker, ML, Lasley, RD. "Adenosine myocardial protection: preliminary results of a phase II clinical trial." *Ann.Surg.* 229.5 (1999): 643-49.
- Mineo, I, Clarke, PR, Sabina, RL, Holmes, EW. "A novel pathway for alternative splicing: identification of an RNA intermediate that generates an alternative 5' splice donor site not present in the primary transcript of AMPD1." *Mol.Cell Biol.* 10.10 (1990): 5271-78.
- Mineo, I i Holmes, EW. "Exon recognition and nucleocytoplasmic partitioning determine AMPD1 alternative transcript production." *Mol.Cell Biol.* 11.10 (1991): 5356-63.
- Morisaki, T, Gross, M, Morisaki, H, Pongratz, D, Zollner, N, Holmes, EW. "Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89.14 (1992): 6457-61.
- Morisaki, T i Holmes, EW. "Functionally distinct elements are required for expression of the AMPD1 gene in myocytes." *Mol.Cell Biol.* 13.9 (1993): 5854-60.
- Morisaki, T, Sabina, RL, Holmes, EW. "Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats." *J.Biol.Chem.* 265.20 (1990): 11482-86.
- Moser, GH, Schrader, J, Deussen, A. "Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood." *Am.J.Physiol* 256.4 Pt 1 (1989): C799-C806.
- Mosterd, A i Hoes, AW. "Clinical epidemiology of heart failure." *Heart* 93.9 (2007): 1137-46.
- Mullane, K i Bullough, D. "Harnessing an endogenous cardioprotective mechanism: cellular sources and sites of action of adenosine." *J.Mol.Cell Cardiol.* 27.4 (1995): 1041-54.
- Murry, CE, Jennings, RB, Reimer, KA. "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* 74.5 (1986): 1124-36.
- Norman, B, Glenmark, B, Jansson, E. "Muscle AMP deaminase deficiency in 2% of a healthy population." *Muscle Nerve* 18.2 (1995): 239-41.

- Norman, B, Mahnke-Zizelman, DK, Vallis, A, Sabina, RL. "Genetic and other determinants of AMP deaminase activity in healthy adult skeletal muscle." *J.Appl.Physiol* 85.4 (1998): 1273-78.
- Norman, B, Sabina, RL, Jansson, E. "Regulation of skeletal muscle ATP catabolism by AMPD1 genotype during sprint exercise in asymptomatic subjects." *J.Appl.Physiol* 91.1 (2001): 258-64.
- Ogasawara, N, Goto, H, Watanabe, T. "Isozymes of rat brain AMP deaminase: developmental changes and characterizations of five forms." *FEBS Lett.* 58.1 (1975): 245-48.
- Ogasawara, N, Goto, H, Yamada, Y, Watanabe, T. "Distribution of AMP-deaminase isozymes in rat tissues." *Eur.J.Biochem.* 87.2 (1978): 297-304.
- Ogasawara, N, Goto, H, Yamada, Y, Watanabe, T, Asano, T. "AMP deaminase isozymes in human tissues." *Biochim.Biophys.Acta* 714.2 (1982): 298-306.
- Ogilby, JD, Heo, J, Iskandrian, AS. "Effect of adenosine on coronary blood flow and its use as a diagnostic test for coronary artery disease." *Cardiovasc.Res.* 27.1 (1993): 48-53.
- Ogino, H, Smolenski, RT, Zych, M, Seymour, AM, Yacoub, MH. "Influence of preconditioning on rat heart subjected to prolonged cardioplegic arrest." *Ann.Thorac.Surg.* 62.2 (1996): 469-74.
- Paolocci, N, Tavazzi, B, Biondi, R, Gluzband, YA, Amorini, AM, Tocchetti, CG, Hejazi, M, Caturegli, PM, Kajstura, J, Lazzarino, G, Kass, DA. "Metalloproteinase inhibitor counters high-energy phosphate depletion and AMP deaminase activity enhancing ventricular diastolic compliance in subacute heart failure." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 317.2 (2006): 506-13.
- Parnas, JK, Mozołowski, W, Lewiński, W. "Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. IX. Der Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskelarbeit." *Biochem.Z.* 188 (1927): 15-23.
- Peart, JN i Headrick, JP. "Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways." *Pharmacol.Ther.* 114.2 (2007): 208-21.
- Remme, WJ, de Jong, JW, Verduow, PD. "Effects of pacing-induced myocardial ischemia on hypoxanthine efflux from the human heart." *Am.J.Cardiol.* 40.1 (1977): 55-62.
- Rico-Sanz, J, Rankinen, T, Joanisse, DR, Leon, AS, Skinner, JS, Wilmore, JH, Rao, DC, Bouchard, C. "Associations between cardiorespiratory responses to exercise and the C34T AMPD1 gene polymorphism in the HERITAGE Family Study." *Physiol Genomics* 14.2 (2003): 161-66.
- Ronca-Testoni, S, Raggi, A, Ronca, G. "Muscle AMP aminohydrolase. 3. A comparative study on the regulatory properties of skeletal muscle enzyme from various species." *Biochim.Biophys.Acta* 198.1 (1970): 101-12.
- Ross, AM, Gibbons, RJ, Stone, GW, Kloner, RA, Alexander, RW. "A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II)." *J.Am.Coll.Cardiol.* 45.11 (2005): 1775-80.
- Rubio, JC, Martin, MA, Rabadan, M, Gomez-Gallego, F, San Juan, AF, Alonso, JM, Chicharro, JL, Perez, M, Arenas, J, Lucia, A. "Frequency of the C34T mutation of the AMPD1 gene in world-class endurance athletes: does this mutation impair performance?" *J.Appl.Physiol* 98.6 (2005): 2108-12.
- Rundell, KW, Tullson, PC, Terjung, RL. "AMP deaminase binding in contracting rat skeletal muscle." *Am.J.Physiol* 263.2 Pt 1 (1992): C287-C293.

- Russell, RR, III, Li, J, Coven, DL, Pypaert, M, Zechner, C, Palmeri, M, Giordano, FJ, Mu, J, Birnbaum, MJ, Young, LH. "AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury." *J.Clin.Invest* 114.4 (2004): 495-503.
- Sabina, RL i Mahnke-Zizelman, DK. "Towards an understanding of the functional significance of N-terminal domain divergence in human AMP deaminase isoforms." *Pharmacol.Ther.* 87.2-3 (2000): 279-83.
- Sabina, RL, Morisaki, T, Clarke, P, Eddy, R, Shows, TB, Morton, CC, Holmes, EW. "Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes." *J.Biol.Chem.* 265.16 (1990): 9423-33.
- Saha, AK, Schwarsin, AJ, Roduit, R, Masse, F, Kaushik, V, Tornheim, K, Prentki, M, Ruderman, NB. "Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta -D-ribofuranoside." *J.Biol.Chem.* 275.32 (2000): 24279-83.
- Schmidt, G. "Über Fermentative Desaminierung in Muskel." *Hoppe-Seyler's Z.Physiol Chem.* 179 (1928): 243-82.
- Schwarte, LA, Zuurbier, CJ, Ince, C. "Mechanical ventilation of mice." *Basic Res.Cardiol.* 95.6 (2000): 510-20.
- Scislawski, PW, Aleksandrowicz, Z, Swierczynski, J. "Purine nucleotide cycle as a possible anaplerotic process in rat skeletal muscle." *Experientia* 38.9 (1982): 1035-37.
- Seifart, HI, Delabar, U, Siess, M. "The influence of various precursors on the concentration of energy-rich phosphates and pyridine nucleotides in cardiac tissue and its possible meaning for anoxic survival." *Basic Res.Cardiol.* 75.1 (1980): 57-61.
- Sekili, S, Jeroudi, MO, Tang, XL, Zughaib, M, Sun, JZ, Bolli, R. "Effect of adenosine on myocardial 'stunning' in the dog." *Circ.Res.* 76.1 (1995): 82-94.
- Setlow, B i Lowenstein, JM. "Adenylate deaminase. II. Purification and some regulatory properties of the enzyme from calf brain." *J.Biol.Chem.* 242.4 (1967): 607-15.
- Setlow, B i Lowenstein, JM. "Adenylate deaminase. IV. Nucleotide specificity of the enzyme from calf brain with special reference to guanosine triphosphate." *J.Biol.Chem.* 243.12 (1968): 3409-15.
- Sims, B, Mahnke-Zizelman, DK, Profit, AA, Prestwich, GD, Sabina, RL, Theibert, AB. "Regulation of AMP deaminase by phosphoinositides." *J.Biol.Chem.* 274.36 (1999): 25701-07.
- 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* 25.9-11 (2006): 1245-49.
- Slominska, EM, Carrey, EA, Foks, H, Orlewska, C, Wiczerzak, E, Sowinski, P, Yacoub, MH, Marinaki, AM, Simmonds, HA, Smolenski, RT. "A novel nucleotide found in human erythrocytes, 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate." *J.Biol.Chem.* 281.43 (2006): 32057-64.
- Smiley, KL, Jr., Berry, AJ, Suelter, CH. "An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase." *J.Biol.Chem.* 242.10 (1967): 2502-06.
- Smiley, KL i Suelter, CH. "Univalent cations as allosteric activators of muscle adenosine 5'-phosphate deaminase." *J.Biol.Chem.* 242.8 (1967): 1980-81.

- Smits, P, Williams, SB, Lipson, DE, Banitt, P, Rongen, GA, Creager, MA. "Endothelial release of nitric oxide contributes to the vasodilator effect of adenosine in humans." *Circulation* 92.8 (1995): 2135-41.
- Smolenski, RT, Lachno, DR, Ledingham, SJ, Yacoub, MH. "Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation." *J.Chromatogr.* 527.2 (1990): 414-20.
- Smolenski, RT, Raisky, O, Slominska, EM, Abunasra, H, Kalsi, KK, Jayakumar, J, Suzuki, K, Yacoub, MH. "Protection from reperfusion injury after cardiac transplantation by inhibition of adenosine metabolism and nucleotide precursor supply." *Circulation* 104.12 Suppl 1 (2001): I246-I252.
- Smolenski, RT, Schrader, J, de, GH, Deussen, A. "Oxygen partial pressure and free intracellular adenosine of isolated cardiomyocytes." *Am.J.Physiol* 260.4 Pt 1 (1991): C708-C714.
- Solano, C i Coffee, CJ. "Differential response of AMP deaminase isozymes to changes in the adenylate energy charge." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 85.2 (1978): 564-71.
- Sommerschild, HT, Grund, F, Offstad, J, Jynge, P, Ilebekk, A, Kirkeboen, KA. "Importance of endogenous adenosine during ischemia and reperfusion in neonatal porcine hearts." *Circulation* 96.9 (1997): 3094-103.
- Sommerschild, HT i Kirkeboen, KA. "Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion--an overview." *Acta Anaesthesiol.Scand.* 44.9 (2000): 1038-55.
- Suzuki, K, Murtuza, B, Smolenski, RT, Sammut, IA, Suzuki, N, Kaneda, Y, Yacoub, MH. "Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis." *Circulation* 104.12 Suppl 1 (2001): I308-I313.
- Tarnopolsky, MA, Parise, G, Gibala, MJ, Graham, TE, Rush, JW. "Myoadenylate deaminase deficiency does not affect muscle anaplerosis during exhaustive exercise in humans." *J.Physiol* 533.Pt 3 (2001): 881-89.
- Tavenier, M, Skladanowski, AC, De Abreu, RA, de Jong, JW. "Kinetics of adenylate metabolism in human and rat myocardium." *Biochim.Biophys.Acta* 1244.2-3 (1995): 351-56.
- Thakkar, JK, Janero, DR, Yarwood, C, Sharif, HM. "Modulation of mammalian cardiac AMP deaminase by protein kinase C-mediated phosphorylation." *Biochem.J.* 291 ( Pt 2) (1993): 523-27.
- Tornheim, K i Lowenstein, JM. "The purine nucleotide cycle. The production of ammonia from aspartate by extracts of rat skeletal muscle." *J.Biol.Chem.* 247.1 (1972): 162-69.
- Van den Bergh, F i Sabina, RL. "Characterization of human AMP deaminase 2 (AMPD2) gene expression reveals alternative transcripts encoding variable N-terminal extensions of isoform L." *Biochem.J.* 312 ( Pt 2) (1995): 401-10.
- Vander Heide, RS i Reimer, KA. "Effect of adenosine therapy at reperfusion on myocardial infarct size in dogs." *Cardiovasc.Res.* 31.5 (1996): 711-18.
- Vincent, MF, Van den, BG, Hers, HG. "The pathway of adenine nucleotide catabolism and its control in isolated rat hepatocytes subjected to anoxia." *Biochem.J.* 202.1 (1982): 117-23.
- Wagner, DR, McTiernan, C, Sanders, VJ, Feldman, AM. "Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor-alpha in the failing human heart." *Circulation* 97.6 (1998): 521-24.

- Walder, B, Fontao, E, Totsch, M, Morel, DR. "Time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats." *Eur.J.Anaesthesiol.* 22.10 (2005): 785-94.
- WHO. "The global burden of disease: 2004 update." WHO (2004): 1-146.
- Willems, L, Reichelt, ME, Molina, JG, Sun, CX, Chunn, JL, Ashton, KJ, Schnermann, J, Blackburn, MR, Headrick, JP. "Effects of adenosine deaminase and A1 receptor deficiency in normoxic and ischaemic mouse hearts." *Cardiovasc.Res.* 71.1 (2006): 79-87.
- Yang, XP, Liu, YH, Rhaleb, NE, Kurihara, N, Kim, HE, Carretero, OA. "Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice." *Am.J.Physiol* 277.5 Pt 2 (1999): H1967-H1974.
- Yazaki, Y, Muhlestein, JB, Carlquist, JF, Bair, TL, Horne, BD, Renlund, DG, Anderson, JL. "A common variant of the AMPD1 gene predicts improved survival in patients with ischemic left ventricular dysfunction." *J.Card Fail.* 10.4 (2004): 316-20.
- Yellon, DM, Baxter, GF, Garcia-Dorado, D, Heusch, G, Sumeray, MS. "Ischaemic preconditioning: present position and future directions." *Cardiovasc.Res.* 37.1 (1998): 21-33.
- Yoshino, M i Murakami, K. "Role of AMP deaminase reaction in the response of phosphofructokinase to the adenylate energy charge." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 112.1 (1983): 96-101.
- Zhao, ZQ, McGee, S, Nakanishi, K, Toombs, CF, Johnston, WE, Ashar, MS, Vinten-Johansen, J. "Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit." *Circulation* 88.2 (1993): 709-19.
- Zhu, QY, Chen, SG, Zou, CM. "Protective effects of an adenosine deaminase inhibitor on ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat heart." *Am.J.Physiol* 259.3 Pt 2 (1990): H835-H838.
- Zielke, CL i Suelter, CH. "Rabbit muscle adenosine 5'-monophosphate aminohydrolase. Characterization as a zinc metalloenzyme." *J.Biol.Chem.* 246.7 (1971): 2179-86.
- Zielke, CL i Suelter, CH. "Substrate specificity and aspects of deamination catalyzed by rabbit muscle 5'-adenylic acid aminohydrolase." *J.Biol.Chem.* 246.5 (1971): 1313-17.
- Zughaib, ME, bd-Elfattah, AS, Jeroudi, MO, Sun, JZ, Sekili, S, Tang, XL, Bolli, R. "Augmentation of endogenous adenosine attenuates myocardial 'stunning' independently of coronary flow or hemodynamic effects." *Circulation* 88.5 Pt 1 (1993): 2359-69.
- Zydowo, M. "Adenylic acid and adenosine deaminases in rat kidneys." *Acta Biochim.Pol.* 7 (1960): 215-26.
- Zydowo, M, Makarewicz, W, Umiastowski, J, Purzycka, J. "Temperature dependence of AMP deamination catalysed by muscle extracts from homeothermic and poikilothermic animals." *Acta Biochim.Pol.* 12.4 (1965): 319-25.