

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

*Paulina Mierzejewska*

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Rola 5'-nukleotydyazy w eksperymentalnym modelu dysfunkcji  
zastawki aortalnej i ściany naczynia**

PhD THESIS

**The role of 5'-nucleotidase in the experimental model of aortic valve  
and vessel wall dysfunction**



GDAŃSK 2019

Wydano za zgodą  
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Issued with the consent of  
Dean of the Medical Faculty

Katedra i Zakład Biochemii  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Department of Biochemistry  
Medical University of Gdansk

Promotor/Supervisor  
dr hab. Ewa Maria Słomińska

*Serdeczne podziękowania składam*

*Przede wszystkim mojej Promotor,  
**Pani dr hab. Ewie Marii Słomińskiej**  
za opiekę merytoryczną, poświęcony czas, cierpliwość i wyrozumiałość  
oraz umożliwienie poszerzania horyzontów naukowych.*

***Panu Profesorowi Ryszardowi Tomaszowi Smoleńskiemu**  
za nieocenioną pomoc i wsparcie, cenne wskazówki oraz naukową inspirację.*

***Współautorom prac** oraz wszystkim osobom zaangażowanym w powstanie publikacji  
składających się na niniejszą rozprawę doktorską.*

***Mężowi** za wiarę, cierpliwość i wsparcie, bez których praca nad ukończeniem badań  
byłaby o wiele trudniejsza.*

***Rodzicom i Siostram** za zrozumienie, troskę oraz nieustanną motywację w dążeniu do celu.*

***Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biochemii** za cenne rady i wskazówki  
oraz wspaniałą atmosferę pracy.*

Gdańsk, 2019

Paulina Mierzejewska

Badania wykonano w ramach realizacji projektów Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (TEAM/2011-8/7), Narodowego Centrum Nauki (PRELUDIUM 2015/19/N/NZ1/03435) oraz zadania badawczego młodych naukowców finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (01-0342/08/256) w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanej przez prof. Juliana Świerczyńskiego (do 09/2016) oraz prof. Ryszarda T. Smoleńskiego (od 10/2016).

This research has been performed within the projects supported by the Foundation for Polish Science (TEAM/2011-8/7), National Science Centre of Poland (PRELUDIUM 2015/19/N/NZ1/03435) and the Polish Ministry of Science and Higher Education (01-0342/08/256) at the Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, headed by prof. Julian Swierczynski (untill 09/2016) and prof. Ryszard T. Smolenski (from 10/2016).

## SPIS TREŚCI

1. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/LIST OF PAPERS .....	7
2. WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS .....	8
3. STRESZCZENIE .....	10
4. ABSTRACT .....	11
5. WSTĘP .....	12
5.1. Izoformy 5'-nukleotydu .....	13
5.2. CD73 – zewnątrzkomórkowa izoforma 5'NT .....	15
5.2.1. CD73 – funkcja i struktura komórkowa .....	15
5.2.2. CD73 jako element sygnalizacji purynergicznej .....	16
5.2.2.1. Zewnątrzkomórkowa adenozyne jako ważna cząsteczka sygnałowa .....	17
5.2.3. Rola CD73 w utrzymaniu homeostazy śródbłona naczyniowego .....	18
5.2.4. Rola CD73 w patologjach naczyń i zastawki aortalnej .....	18
5.2.5. Aktywacja CD73 jako strategia terapeutyczna w chorobach układu krążenia ...	20
6. CELE .....	22
7. MODELE I TECHNIKI BADAWCZE .....	23
8. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ .....	24
8.1. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydu na zewnątrzkomórkowy metabolizm nukleotydów adeninowych na powierzchni aorty .....	24
8.2. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydu na funkcję oraz strukturę mysiej zastawki aortalnej .....	26
8.3. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydu na mineralizację mysiej zastawki aortalnej .....	28
8.4. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydu na rozwój, zależnej od wieku, dysfunkcji śródbłona naczyniowego .....	30
8.5. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydu na ogólnoustrojowe zmiany metabolizmu u myszy .....	35
9. WNIOSKI .....	38
10. INTRODUCTION .....	39
10.1. 5'-nucleotidase isoforms .....	40
10.2. CD73 - extracellular 5'NT isoform .....	42
10.2.1. CD73 - function and cell structure .....	42
10.2.2. CD73 as part of the purinergic signaling .....	43
10.2.2.1. Extracellular adenosine as an important signal molecule .....	44

10.2.3. The role of CD73 in vascular endothelial homeostasis.....	45
10.2.4. The role of CD73 in the vessel and aortic valve pathologies.....	45
10.2.5. Activation of CD73 as a therapeutic strategy in cardiovascular diseases.....	47
11. AIMS.....	49
12. RESEARCH MODELS AND TECHNIQUES.....	50
13. THE MOST IMPORTANT RESULTS .....	51
13.1. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on extracellular adenine nucleotide metabolism on the aortic surface.....	51
13.2. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the function and structure of the mouse aortic valve.....	53
13.3. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the mineralization of the mouse aortic valve.....	55
13.4. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the development of age-dependent endothelial dysfunction.....	57
13.5. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the systemic changes of the mice metabolism. ....	62
14. CONCLUSIONS.....	65
15. PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES.....	66
16. ZAŁĄCZNIKI/ APPENDIX:.....	<b>Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.</b>

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

- A. [Zukowska P, Kutryb- Zajac B, Toczek M, Smolenski R T, Slominska E M. „The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies.” \*Pharmacological Reports\* 2015 Aug; 67\(4\): 675-681](#)  
IF<sub>5</sub> letni/ 5 year = 2.251  
Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego /  
Ministry of Science and Higher Education Score = 25.000
- B. [Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Jaształ A, Toczek M, Zabielska MA, Borkowski T, Khalpey Z, Smolenski R T, Slominska E M. „Deletion of CD73 in mice leads to aortic valve dysfunction.” \*Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.\* 2017 Jun;1863\(6\):1464-1472](#)  
IF<sub>5</sub> letni/ 5 year = 5.964  
Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/  
Ministry of Science and Higher Education Score = 40.000
- C. [Mierzejewska P \(pop. Zukowska\), Zabielska MA, Kutryb-Zajac B, Tomczyk M, Koszalka P, Smolenski R T, Slominska E M. „Impaired L-arginine metabolism marks endothelial dysfunction in CD73-deficient mice.” \*Molecular and Cellular Biochemistry\* 2019 May; DOI: 10.1007/s11010-019-03537-4;](#)  
IF<sub>5</sub> letni/ 5 year = 2.561  
Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/  
Ministry of Science and Higher Education Score = 20.000

Łączna wartość współczynnika IF<sub>5</sub> letniego prezentowanych prac/Total IF<sub>5</sub> year of presented papers = 10.777

Łączna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego prezentowanych prac/ Total Ministry of Science and Higher Education Score = 85.000

## 2. WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS

<b>5'NT</b>	5'-nukleotydaza/ <i>5'-nucleotidase</i>
<b>ADA</b>	deaminaza adenozy/ <i>adenosine deaminase</i>
<b>ADMA</b>	asymetryczna dimetyloarginina/ <i>asymmetric dimethylarginine</i>
<b>ADP</b>	adenozynodifosforan/ <i>adenosine diphosphate</i>
<b>AK</b>	kinaza adenozy/ <i>adenosine kinase</i>
<b>ALP</b>	fosfataza alkaliczna/ <i>alkaline phosphatase</i>
<b>AMP</b>	adenozynomonofosforan/ <i>adenosine monophosphate</i>
<b>AOPCP</b>	$\alpha,\beta$ -metyleno-ADP/ <i><math>\alpha, \beta</math>-methylene-ADP</i>
<b>ATP</b>	adenozynotrifosforan/ <i>adenosine triphosphate</i>
<b>AVA</b>	pole powierzchni ujścia aortalnego/ <i>aortic valve area</i>
<b>CMP</b>	cytydynomonofosforan/ <i>cytidine monophosphate</i>
<b>e5'NT, CD73</b>	ekto-5'-nukleotydaza/ <i>ecto-5'-nucleotidase</i>
<b>eADA</b>	ekto-deaminaza adenozy/ <i>ecto-adenosine deaminase</i>
<b>eNOS</b>	śródbłonkowa syntaza tlenku azotu/ <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
<b>EC</b>	komórki śródbłonka/ <i>endothelial cells</i>
<b>EHNA</b>	erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) adenina/ <i>erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine</i>
<b>eNTPD, CD39</b>	ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa/ <i>ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase</i>
<b>FAD</b>	dinukleotyd flawinoadeninowy/ <i>flavin adenine dinucleotide</i>
<b>FMN</b>	mononukleotyd flawinowy/ <i>flavin mononucleotide</i>
<b>GMP</b>	guanozynomonofosforan/ <i>guanosine monophosphate</i>
<b>GTP</b>	guanozynotrifosforan/ <i>guanosine triphosphate</i>
<b>HPLC-RP</b>	wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych/ <i>reverse phase high performance liquid chromatography</i>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon gamma/ <i>interferon gamma</i>
<b>ICAM-1</b>	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1/ <i>intracellular adhesion molecule 1</i>
<b>IL-6</b>	interleukina 6/ <i>interleukine 6</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleukina 1 $\beta$ / <i>interleukine 1<math>\beta</math></i>
<b>IL-10</b>	interleukina 10/ <i>interleukine 10</i>
<b>IMP</b>	inozynomonofosforan/ <i>inosine monophosphate</i>



<b>LC/MS</b>	wysokosprawna chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas / <i>liquid chromatography – mass spectrometry</i>
<b>LDL</b>	lipoproteiny o niskiej gęstości/ <i>low density lipoproteins</i>
<b>LVEF</b>	frakcja wyrzutowa lewej komory/ <i>left ventricular ejection fraction</i>
<b>NAD</b>	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy/ <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NADP</b>	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego/ <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NFκB</b>	czynnik jądrowy κB/ <i>κB nuclear factor</i>
<b>NO</b>	tlenek azotu/ <i>nitric oxide</i>
<b>SAH</b>	S-adenozylohomocysteina/ <i>S-adenosyl-L-homocysteine</i>
<b>SAHH</b>	hydrolaza S-adenozylohomocysteiny/ <i>S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase</i>
<b>TAOS</b>	całkowity status antyoksydacyjny osocza/ <i>plasma total antioxidant status</i>
<b>TLR</b>	receptor Toll-podobny/ <i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF-α</b>	czynnik martwicy nowotworów/ <i>tumor necrosis factor</i>
<b>TNAP</b>	tkankowo niespecyficzna fosfataza alkaliczna/ <i>tissue nonspecific alkaline phosphatase</i>
<b>UMP</b>	urydynomonofosforan/ <i>uridine monophosphate</i>
<b>VASP</b>	fosfoproteina stymulująca wazodylatację/ <i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
<b>VCAM-1</b>	naczyniowa cząsteczka adhezyjna 1/ <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
<b>VIC</b>	komórki śródmiąższowe zastawki/ <i>valvular interstitial cells</i>
<b>WT</b>	myszki szczepu dzikiego/ <i>wild type mice</i>

### 3. STRESZCZENIE

Nukleotydy oraz nukleozydy odgrywają istotną rolę w przemianach energetycznych i wielu innych procesach biochemicznych zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i funkcjonujących na zewnątrz komórki. Jednym z ważniejszych enzymów katabolizmu nukleotydów jest 5'-nukleotydaza. Jedną z jej izoform - ekto-5'-nukleotydaza, znana także jako CD73 - zakotwiczona jest na zewnętrznej stronie błony komórkowej. Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy adenozy-5'-monofosforanu (AMP) do adenozy, która uznawana jest za cząsteczkę o istotnej roli sygnalizacyjnej - bierze udział w hamowaniu reakcji zapalnej oraz agregacji płytek krwi. Obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia adenozy może prowadzić do zaostrzenia stanu zapalnego, co powoduje rozwój wielu patologii układu krążenia. Uszkodzenie śródbłonna naczyniowego jest elementem patogenezы wszystkich chorób sercowo-naczyniowych - zarówno naczyniowych, jak i zastawkowych, z których jedną z najczęstszych jest zwężenie zastawki aortalnej.

Celem pracy była ocena roli 5'-nukleotydazy w patologii zastawki aortalnej oraz ściany naczynia. Do badań wykorzystany został model myszy z delecją CD73 (CD73 <sup>-/-</sup>). Do porównania użyto myszy szczepu dzikiego (WT) karmionych dietą wysokotłuszczową, co jest uznanym eksperymentalnym modelem patologii naczyniowych i zastawkowych. Zastosowane techniki badawcze obejmowały wysokosprawną chromatografię cieczową, spektrometrię mas, testy immunoenzymatyczne, barwienia histologiczne, badania echokardiograficzne oraz metody kolorymetryczne i standardowe procedury biochemiczne.

Badania wykazały, że CD73 ma kluczowe znaczenie w degradacji AMP do adenozy na powierzchni naczynia, a aktywności innych enzymów, takich jak fosfataza alkaliczna (ALP) odgrywają jedynie niewielką rolę. Delecja CD73 prowadziła do niemal całkowitego zahamowania hydrolizy AMP na powierzchni naczynia. Brak aktywności CD73 powodował zmiany aktywności innych enzymów zaangażowanych w zewnątrzkomórkowy katabolizm metabolitów nukleotydów - obniżenie aktywności ekto-deaminazy adenozy oraz wzrost aktywności ekto-difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej. Wykazano także, że delecja CD73 spowodowała wzrost stężenia markerów kalcyfikacji w zastawkach aortalnych (zwiększenie stężenia wapnia i fosforanów, wyższą aktywność ALP), pogrubienie płatków zastawki oraz upośledzenie jej funkcjonowania. Odnotowane zmiany były zbliżone do tych, rozwijających się pod wpływem diety wysokotłuszczowej u myszy WT. Zaobserwowano również, że brak aktywności CD73 prowadził do wzrostu poziomu molekuł adhezyjnych, związanych z aktywacją śródbłonna (ICAM-1, VCAM-1) oraz stężenia cytokin prozapalnych w surowicy. Dysfunkcja śródbłonna u myszy CD73<sup>-/-</sup> związana była z zaburzeniem metabolizmu L-argininy, na co wskazywało obniżone stężenie L-argininy, niższa aktywność syntazy tlenu azotu w komórkach śródbłonna oraz obniżony stosunek azotanów do azotynów w surowicy i aorcie tych zwierząt. Zmiany parametrów związanych z uszkodzeniem naczyń postępowały wraz z wiekiem zwierząt.

Powyższe badania wykazały, że 5'-nukleotydaza, a w szczególności jej zewnątrzkomórkowa izoforma CD73, odgrywa kluczową rolę w homeostazie zastawki aortalnej i naczyń. Zwiększenie aktywności CD73 może mieć znaczący potencjał terapeutyczny w patologiach naczyniowych i zastawkowych.

#### 4. ABSTRACT

Nucleotides and nucleosides play an important role in cell energy transformations and many other biochemical processes that operate both intracellularly and outside the cell. One of the most important enzymes of the nucleotides catabolism is 5'-nucleotidase. One of its isoforms - ecto-5'-nucleotidase, also known as CD73 - is anchored on the outside of the cellular membrane. It catalyzes the hydrolysis of adenosine-5'-monophosphate (AMP) to adenosine, which is considered a molecule with an important signaling role - it is involved in the inhibition of inflammation and platelet aggregation. The decrease in extracellular adenosine concentration may lead to an exacerbation of the inflammatory state, which causes the development of many cardiovascular pathologies. Endothelium damage is present in the pathogenesis of cardiovascular diseases – both, vascular and valvular pathologies, of which the most common is aortic valve stenosis.

The aim of the study was to evaluate the role of 5'-nucleotidase in the pathology of the aortic valve and vessel wall. The mouse model with the CD73 deletion (CD73<sup>-/-</sup>) was used for the study. As a reference model, mice fed a high-fat diet were used. High-fat diet treatment is one of the established experimental models of vascular and valvular pathologies. The applied techniques included high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, immuno-enzymatic tests, histological stainings, echocardiographic examinations as well as colorimetric methods and standard biochemical procedures.

The results showed that CD73 is crucial in the conversion of AMP to adenosine on the vessel surface, and the activities of other enzymes, such as alkaline phosphatase (ALP) play only a minor role. The deletion of CD73 led to almost complete inhibition of AMP hydrolysis on the vessel surface. The lack of CD73 activity caused changes in the activities of other enzymes involved in extracellular catabolism of nucleotide metabolites - a decrease in the ecto-adenosine deaminase and an increase in ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase. It was also shown that CD73 deletion caused an increase in the calcification markers level in aortic valves (increased calcium and phosphate concentrations, higher ALP activity), thickening of valve leaflets, and impairment of its functioning. The observed changes were similar to those developing under the influence of a high-fat diet. It was also noted that the lack of CD73 activity led to an increase in the concentration of adhesion molecules associated with endothelial activation (ICAM-1, VCAM-1) and pro-inflammatory cytokines. Endothelial dysfunction in CD73<sup>-/-</sup> mice was associated with L-arginine metabolism disorders, as indicated by decreased L-arginine concentration, lower nitric oxide synthase activity in endothelial cells, and a decreased nitrates/nitrites ratio in serum and aorta. Changes in parameters associated with vascular damage progressed with the age of the tested animals.

This research demonstrated that 5'-nucleotidase, and in particular its extracellular CD73 isoform, plays a key role in aortic valve and vascular homeostasis. Increase of the activity of CD73 may have significant therapeutic potential in vascular and valvular pathologies.

## 5. WSTĘP

Nukleotydy w organizmie występują jako składniki kwasów nukleinowych, a także w znacznych ilościach w komórkach i płynach ustrojowych w formie niezwiązanej (wolnej), gdzie ich rolą jest zapewnienie właściwego funkcjonowania wielu procesów biologicznych, między innymi przenoszą energię niezbędną w procesach metabolicznych (ATP, GTP), uczestniczą w reakcjach enzymatycznych jako koenzymy, kofaktory ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , FMN, FAD), substraty reakcji oraz działają jako efekторы allosteryczne, a ich cykliczne pochodne odpowiadają za przekazywanie sygnałów w komórce<sup>1-3</sup>. Nukleotydy i nukleozydy są obecne także w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie pełnią rolę ważnych cząsteczek sygnałowych, działających poprzez swoiste dla nich receptory na powierzchni komórek<sup>4, 5</sup>. Nukleotydy zewnątrzkomórkowe stymulują zapalenie (przez receptory P2), natomiast ich nukleozydy (np. adenozyne) odgrywają przeciwstawną rolę - biorą udział w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej (przez receptory P1). Na powierzchni komórek dochodzi do katabolizmu nukleotydów i nukleozydów przez ekto-enzymy.

Jednym z enzymów zaangażowanych w metabolizm nukleotydów jest 5'-nukleotydaza (5'NT - EC 3.1.3.5). Enzym ten występuje zarówno w organizmach bakteryjnych, roślinnych, jak również u zwierząt i ludzi. Hydrolizuje resztę fosforanową na końcu niecyklicznych 5'-monorybonukleotydów uwalniając nukleozyd i fosforan nieorganiczny. Enzym ten charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem pod względem hydrolizowanych substratów, do których należą przede wszystkim adenozyne-5'-monofosforan (AMP), inozyno-5'-monofosforan (IMP), ale także guanozyne-5'-monofosforan (GMP), cytydino-5'-monofosforan (CMP) oraz urydino-5'-monofosforan (UMP), jak również deoksynukleotydy, tj. deoksycytydino-5'-monofosforan (dCMP), deoksyurydino-5'-monofosforan (dUMP), czy też deoksytymidino-5'-monofosforan (dTMP)<sup>6</sup>.

Jednym z preferowanych przez 5'NT substratów jest AMP. Głównym źródłem tego nukleotydu w komórce jest fosforylacja adenozyne przez kinazę adenozyne (AK). Ponadto AMP może powstawać na drodze syntezy *de novo* z IMP poprzez działanie syntetazy adenylobursztynianowej a następnie liazy adenylobursztynianowej, na drodze reutilizacji adeniny w reakcji katalizowanej przez fosforybozylotransferazę adeninową (APRT), jak również poprzez przemiany wewnątrzkomórkowych trifosforanów i difosforanów<sup>7</sup>. AMP w komórce może ulegać fosforylacji do adenozyne-5'-difosforanu (ADP), deaminacji do IMP przy udziale deaminazy AMP, bądź też zostać przekształcony na drodze hydrolizy przez 5'NT do adenozyne.

Adenozyne jest ważnym produktem aktywności 5'NT. Hydroliza AMP stanowi główne źródło adenozyne w komórkach. Ponadto, w warunkach optymalnego zaopatrzenia komórek w tlen i substraty ok. 30 % puli adenozyne pochodzi z hydrolizy S-adenozylhomocysteiny (SAH) katalizowanej przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny (SAHH)<sup>8, 9</sup>. Niewielka część puli adenozyne może powstawać w wyniku aktywności niespecyficznych fosfodiesteraz i fosfataz, wykazujących powinowactwo do wszystkich związków fosforanowych<sup>10</sup>. W warunkach fizjologicznych stężenie wewnątrzkomórkowej adenozyne jest niskie (poniżej 1  $\mu\text{M}$ ) dzięki aktywności AK, enzymu który wykazuje wysoki stopień powinowactwa oraz niską wartość  $K_m$  dla adenozyne (25 nM - 1  $\mu\text{M}$ , w zależności od rodzaju tkanki)<sup>11</sup>. Drugim enzymem biorącym udział w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia adenozyne jest

deaminaza adenozy (ADA), katalizująca reakcję deaminacji adenozy do inozy <sup>12, 13</sup>. Charakteryzuje się ona jednak niższym powinowactwem do tej cząsteczki (Km ok. 25 - 150 μM) <sup>14</sup>. Wewnątrzkomórkowa adenoza, poprzez wysoką aktywność AK, odgrywa przede wszystkim rolę prekursora nukleotydów adeninowych. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej cząsteczka ta pełni natomiast istotną rolę sygnalizacyjną. Zewnątrzkomórkowa adenoza m.in. wykazuje działanie kardioprotekcyjne podczas niedokrwienia i niedotlenienia serca. Dodatkowo, bierze udział w regulacji procesów takich jak: neurotransmisja, napięcie komórek mięśni gładkich, agregacja płytek krwi, filtracja nerkowa oraz przebieg odpowiedzi zapalnej <sup>15-18</sup>. Transport adenozy, jak również innych nukleotydów, przez błonę komórkową może odbywać się zgodnie z gradientem stężeń - na drodze dyfuzji ułatwionej, poprzez system transporterów ENT (ang. *Equilibrative Nucleoside Transport system*) lub do wnętrza komórki w symporcie z jonem NA<sup>+</sup>, poprzez transportery CNT (ang. *Concentrative Nucleoside Transport system*) <sup>19</sup>.

### 5.1. Izoformy 5'-nukleotydu

5'NT występuje w postaci izoform, różniących się lokalizacją subkomórkową oraz właściwościami fizykochemicznymi. Obecnie znanych jest 7 odmian molekularnych 5'NT, z czego pięć zlokalizowanych jest w cytozolu (cN-IA, cN-IB, cN-II, cN-III oraz cdN), jedna w macierzy mitochondrialnej (mdN) oraz jedna zakotwiczona jest na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej (e5'NT, CD73) (Tab.1).

Izoformy 5'-nukleotydu	Nazwa zwyczajowa; symbol genu kodującego izoformę	Inne nazwy zwyczajowe
<b>cN-IA</b>	5'-nukleotydu cytozolowa IA; <i>NT5C1A</i>	cN-I; „high Km” AMP-specyficzna 5'-NT
<b>cN-IB</b>	5'-nukleotydu cytozolowa IB; <i>NT5C1B</i>	Homolog cN-IA
<b>cN-II</b>	5'-nukleotydu cytozolowa II; <i>NT5C2</i>	„high Km” IMP-specyficzna 5'-NT
<b>cN-III</b>	5'-nukleotydu cytozolowa III; <i>NT5C3</i>	PN-I; P5'N-1
<b>cdN</b>	Cytozolowa 5'(3')-deoksynukleotydu; <i>NT5C</i>	PN-II; dNT-1
<b>mdN</b>	Mitochondrialna 5'(3')-deoksynukleotydu; <i>NT5M</i>	dNT-2

e5'NT, CD73	Ekto-5'-nukleotydaza; <i>NT5E</i>	e5'nt, ekto-5'-NT, „low Km” AMP specyficzna 5'-NT
-------------	-----------------------------------	---

**Tabela 1. Izoformy 5'-nukleotydazy.** Na podstawie<sup>[20]</sup>, ze zmianami.

Cytozolowa 5'-nukleotydaza IA (cN-IA, ang. *cytosolic 5'-nucleotidase I*) jest tetramerem i nazywana jest także izoformą "preferującą" AMP lub "high Km" AMP specyficzną. Występuje głównie w mięśniach szkieletowych oraz sercu, gdzie odgrywa ważną rolę w produkcji adenozyiny podczas ischemii. Jej odmiana homologiczna - IB (cN-IB) - występuje w jądrze. Izoformy te wykazują wysokie powinowactwo do AMP, jak również do deoksyrymidynowych monofosforanów (dCMP, dUMP, dTMP). Dla optymalnej aktywności cN-I niezbędna jest obecność dwuwartościowych kationów ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  oraz  $Co^{2+}$ ). Wartość Km dla AMP wynosi 1,46 - 1,9 mM. ADP jest silnym aktywatorem tego enzymu - przy mikromolowym stężeniu ADP (10 - 89  $\mu M$ ) Km cN-I dla AMP ulega znacznemu obniżeniu. W mniejszym stopniu enzym ten aktywowany jest także przez GTP. Specyficznym inhibitorem cN-I jest 5'-etynylo-2'-deoksyurydina (5-Edu)<sup>20, 21</sup>.

Cytozolowa 5'-nukleotydaza II (cN-II, ang. *cytosolic 5'-nucleotidase II*) również występuje w postaci tetramery i jest obecna we wszystkich tkankach zwierzęcych. Charakteryzuje się wysokim powinowactwem do 6-hydroksypuryn, zwłaszcza do IMP oraz GMP. Jest odpowiedzialna za hydrolizę tych związków, ale także dzięki aktywności fosfotransferazy, przenosi grupę fosforanową z mono-5'-rybonukleotydów na odpowiednie 5'-rybonukleozydy, regulując w ten sposób wewnątrzkomórkowe stężenia IMP oraz GMP, jak również wpływając pośrednio na produkcję kwasu moczowego<sup>22</sup>. cN-II hydrolizuje IMP kilkanaście razy szybciej niż AMP. Wartości Km wynoszą odpowiednio 0,1 – 0,6 mM dla IMP oraz 1 - 15 mM dla AMP. Obecność milimolowych stężeń ATP oraz ADP modyfikuje właściwości kinetyczne enzymu, znacząco zwiększając szybkość maksymalną reakcji ( $V_{max}$ ) oraz jego powinowactwo do IMP oraz AMP. Natomiast fosforan nieorganiczny hamuje aktywność cN-II. Optimum aktywności cN-II wykazuje przy pH 6,5-9,5<sup>23</sup>.

Cytozolowa 5'-nukleotydaza III (cN-III, ang. *cytosolic 5'-nucleotidase III*) jest monomerem. Katalizuje hydrolizę rybonukleotydów pirymidynowych (CMP, UMP) do odpowiednich nukleozydów. Wykazuje znacznie mniejszą aktywność w stosunku do nukleotydów purynowych. Podobnie jak cN-II, cN-III także posiada właściwości fosfotransferazy. Występuje głównie w erytrocytach<sup>6</sup>. W dziedzicznej anemii hemolitycznej obserwuje się niedobór tego białka<sup>24</sup>.

Cytozolowa 5'(3') - deoksynukleotydaza (cdN) występuje w postaci dimeru, charakteryzuje się szeroką dystrybucją tkankową i uczestniczy w większości reakcji hydrolizy deoksyrybonukleotydów. Wykazuje wysoką aktywność zarówno w stosunku do dIMP, jak również do dGMP, natomiast słabszą w stosunku do dAMP. Enzym ten pozostaje nieaktywny w stosunku do dCMP. cdN hydrolizuje również 2' i 3'-monofosforany nukleozydów<sup>24</sup>.

Kolejną z poznanych izoform 5'-nukleotydazy jest mdN (ang. *mitochondrial 5'(3')-deoxynucleotidase*). Jest dimerem, zlokalizowanym w macierzy mitochondrialnej. Wykazuje duże podobieństwo do opisanej wyżej cdN, posiada jednak znacznie wyższą specyficzność substratową w stosunku do dUMP oraz dTMP. Tak jak cdN, mdN ma także zdolność reagowania z 2' oraz 3'-monofosforanami nukleozydów<sup>25</sup>.

Niezwykle interesującą izoformą jest ekto-5'-nukleotydaza (e5'NT, CD73, ang. *ecto-5'-nucleotidase*). Występuje ona w postaci dimeru i zlokalizowana jest na powierzchni komórki, gdzie połączona jest z błoną cytoplazmatyczną za pomocą glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Preferowanym substratem dla CD73 jest AMP<sup>26</sup>. Jej właściwości opisano poniżej.

## 5.2. CD73 – zewnątrzkomórkowa izoforma 5'NT

### 5.2.1. CD73 – funkcja i struktura komórkowa

Dojrzała ekto-5'-nukleotydaza (EC. 3.1.3.5) składa się z 548 aminokwasów o masie cząsteczkowej 70 kDa. Podczas dojrzewania, fragment około 25 reszt aminokwasowych, zawierający sekwencję sygnałową oraz hydrofobową część końca C-terminalnego, zostaje odcięty i zastąpiony przez glikozylofosfatydyloinozytol (GPI), za pomocą którego białko enzymatyczne zakotwiczone jest na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Domena C-końcowa białka odpowiedzialna jest za wiązanie AMP, podczas gdy domena N-końcowa za wiązanie jonów metali dwuwartościowych (**Rycina 1**)<sup>27, 28</sup>. CD73 nie wykazuje żadnej aktywności wobec 2'- i 3'- monofosforanów nukleozydów, katalizuje reakcje hydrolizy 5'-monofosforanów zarówno rybo-, jak i deoksyrybonukleozydów - AMP, CMP, UMP, IMP oraz GMP, przy czym to AMP jest preferowanym nukleotydem. Wartość Km dla AMP wynosi ok. 15 μM<sup>26</sup>. Optimum aktywności enzymu znajduje się w granicach pH 7,4 - 9,0. ATP oraz ADP są inhibitorami kompetycyjnymi CD73, zaś fosforan nieorganiczny niekompetycyjnym. Stałe inhibicji ATP i ADP zawierają się w zakresach stężeń mikromolowych. Związki te wiążą się z miejscem aktywnym enzymu, nie ulegając hydrolizie<sup>29</sup>. W homogenatach tkankowych, praktycznie połowa aktywności ekto-5'-nukleotydazy oddysocjuje od błony cytoplazmatycznej do środowiska inkubacyjnego, pozorując istnienie izoformy cytoplazmatycznej. Do niedawna jeszcze tę "cytoplazmatyczną", rozpuszczalną frakcję CD73 klasyfikowano jako niezależną izoformę enzymu błonowego<sup>30</sup>.

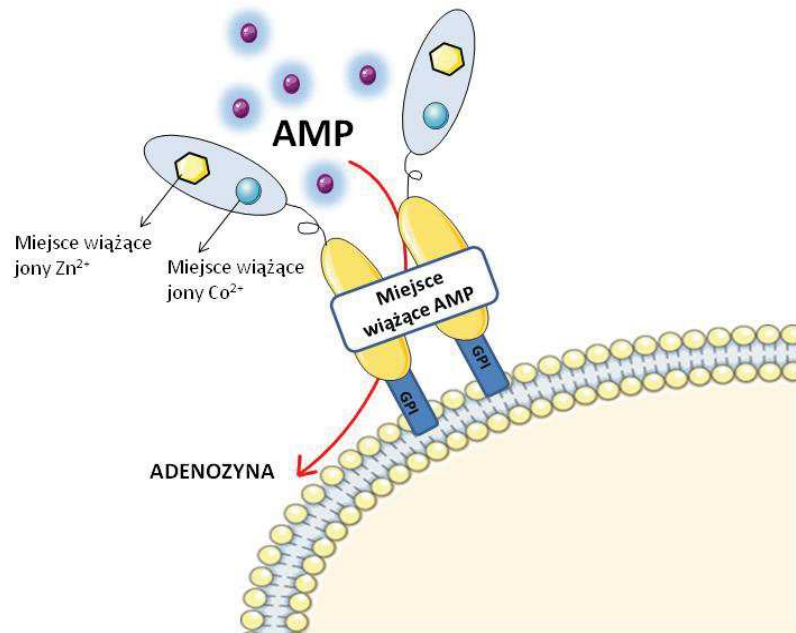
Poziom białka CD73 jest ściśle regulowany. Cytokiny prozapalne (IL-1β, TNF α) prowadzą do wzrostu ilości CD73 podczas rozwoju stanu zapalnego, natomiast fosfolipazy mogą odcinać to białko z powierzchni błony komórkowej w miejscu zakotwiczenia GPI. Ponadto, poziom CD73 zwiększa się w przebiegu dojrzewania komórek, w szczególności limfocytów T i B, a także ich wzrostu i migracji. Dodatkowo, czynnikami znacząco zwiększającymi poziom CD73 są hipoksja oraz ischemia<sup>23, 31</sup>.

CD73 charakteryzuje się szeroką dystrybucją tkankową. Wykazano obecność tego enzymu w różnych rodzajach tkanek, w tym w nerkach, wątrobie, płucach, mózgu i sercu. Potwierdzono jego występowanie na powierzchni leukocytów krwi obwodowej, a także w grasicy, śledzionie i węzłach chłonnych. Tak powszechne występowanie enzymu związane jest z jego obecnością na powierzchni komórek śródbłonna<sup>32</sup>. CD73 występuje również na powierzchni komórek nowotworowych<sup>33</sup>.

Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują na funkcjonalny udział ekto-5'-nukleotydazy w utrzymaniu bariery śródbłonna, w adaptacji do warunków niedotlenienia, utrzymaniu prawidłowej funkcji płuc, wątroby i nerek, a także układu sercowo-naczyniowego<sup>16</sup>. Wykazany został także znamienny wpływ aktywności CD73 na regulację odporności i stanu zapalnego. Ostatnie doniesienia wskazują, że oprócz produkcji zewnątrzkomórkowej adenozyiny, CD73 może katalizować reakcje hydrolizy mononukleotydu nikotynamidu do

rybozydu nikotynamidu i fosforanu nieorganicznego, jak również hydrolizy  $\text{NAD}^+$  <sup>34</sup>. CD73 może pełnić także funkcję nieenzymatyczną - jest cząsteczką adhezyjną wiążącą fibronektynę oraz lamininę w przestrzeni międzykomórkowej. Sugeruje się także, że może pełnić funkcję receptorową w szlakach sygnalizacji limfocytów T <sup>35</sup>.

AMP obecne w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest nie tylko substratem dla ekto-5'-nukleotydazy, ale może być również przekształcane przez inne enzymy defosforylujące nukleotydy, w tym przede wszystkim przez fosfatazę alkaliczną, która charakteryzuje się szeroką dystrybucją tkankową, ale wykazuje niższe powinowactwo do AMP <sup>36</sup>.



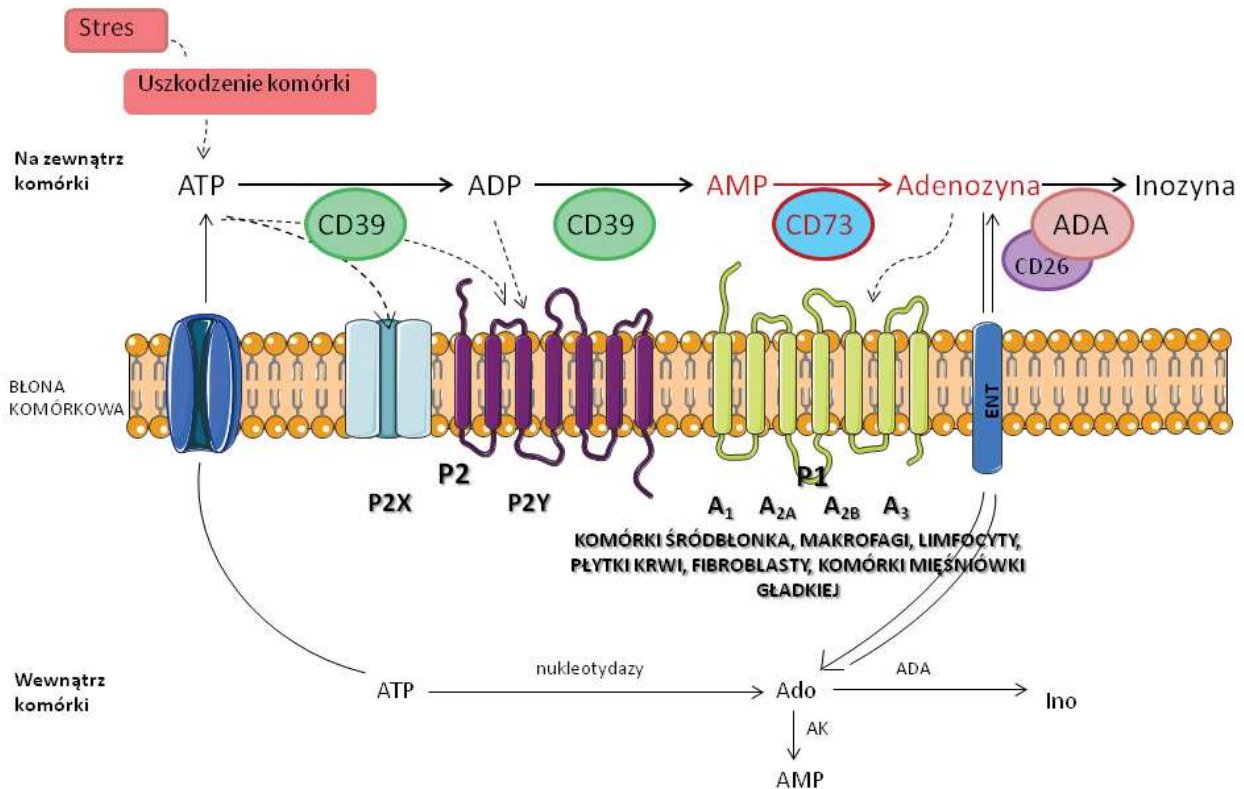
**Rycina 1.** Struktura ekto-5'-nukleotydazy (CD73) w błonie komórkowej. Na podstawie [27] ze zmianami.

### 5.2.2. CD73 jako element sygnalizacji purynergiczej

Podstawową funkcją CD73 jest defosforylacja AMP do adenozyiny. Enzym ten jest częścią szlaku zewnątrzkomórkowego katabolizmu nukleotydów adeninowych, przedstawionego na **Rycinie 2**, w którym uczestniczy również błonowy enzym CD39 (ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa 1, eNTPD 1), będący głównym źródłem AMP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a hydrolizujący ATP i ADP do AMP. Zewnątrzkomórkowa degradacja dinukleotydu nikotynoadeninowego ( $\text{NAD}^+$ ) jest także źródłem AMP <sup>27, 36</sup>. Zarówno CD39, jak i CD73 aktywowane są przez występujące w środowisku jony dwuwartościowe. Szybszą hydrolizę ATP stymuluje obecność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ , natomiast w reakcji katabolizmu AMP najsilniejsze działanie aktywujące wykazują jony  $\text{Mg}^{2+}$  <sup>37</sup>. Reakcję przemiany adenozyiny do inozyiny katalizuje ekto-deaminaza adenozyiny 1 (eADA 1). Bierze ona udział w kontrolowaniu stężenia adenozyiny, a jej aktywność ulega zmianom w wielu stanach patologicznych. Badania przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed wykazały znamienne wyższą aktywność naczyniowej eADA1 w przebiegu miażdżycy, pochodzącej z aktywowanych komórek śródbłonna i komórek



zapalnych infiltrujących ścianę naczynia. Zahamowanie tej aktywności poprzez zastosowanie 2'-deoksykoformycyny powodowało spowolnienie rozwoju choroby<sup>38-40</sup>.



**Rycina 2.** Zewnątrzkomórkowy katabolizm nukleotydów adeninowych oraz adenozyiny

### 5.2.2.1. Zewnątrzkomórkowa adenozyina jako ważna cząsteczka sygnałowa

Adenozyina obecna w przestrzeni zewnątrzkomórkowej pełni rolę cząsteczki o istotnej roli sygnalizacyjnej. Swoje działanie w przestrzeni międzykomórkowej wywiera łącząc się ze specyficznymi receptorami adenozyinowymi P1 sprzężonymi z białkiem G (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> i A<sub>3</sub>), znajdującymi się na powierzchni komórek, w tym również komórek układu sercowo-naczyniowego oraz układu immunologicznego<sup>18</sup>. Adenozyina jest fizjologicznie obecna w przestrzeni pozakomórkowej organizmu w bardzo niskim stężeniu (30 - 200 nM), stymulując receptory o niskim powinowactwie (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>3</sub>)<sup>41</sup>. Jej stężenie wzrasta w warunkach stresu metabolicznego (nawet do 100 μM), spowodowanego między innymi hipoksją, ischemią czy też rozwojem stanu zapalnego<sup>42</sup>. Aktywowany jest wówczas receptor A<sub>2b</sub>, charakteryzujący się znacznie wyższym powinowactwem do adenozyiny<sup>41</sup>. Do wzrostu stężenia zewnątrzkomórkowej adenozyiny dochodzi na skutek transportu adenozyiny z komórki, powstającej w wyniku wzmożonej degradacji wewnątrzkomórkowego ATP, ale przede wszystkim poprzez aktywnie działający szlak zewnątrzkomórkowego katabolizmu nukleotydów adeninowych uwalnianych z komórek w odpowiedzi na patologiczne bodźce<sup>43</sup>. Zewnątrzkomórkowa adenozyina bierze udział w hamowaniu reakcji zapalnej, agregacji płytek krwi, zmniejszeniu utleniania LDL oraz – poprzez regulację procesu różnicowania osteoklastów – w obniżeniu poziomu resorpcji kości. Zmniejsza też aktywność neutrofilii

między innymi poprzez hamowanie wytwarzania wolnych rodników. Reguluje też migrację limfocytów przez barierę śródbłonka. Ogranicza infiltrację neutrofilów do tkanek, zapobiegając ich uszkodzeniu. Ponadto, zewnątrzkomórkowa adenozylna pośredniczy w hamowaniu produkcji prozapalnych cytokin (TNF- $\alpha$ ), a wzmacnia syntezę cytokin przeciwzapalnych (IL-10)<sup>31</sup>.

### 5.2.3. Rola CD73 w utrzymaniu homeostazy śródbłonka naczyniowego

Funkcja śródbłonka polega na utrzymaniu naczyniowej homeostazy przez zbalansowane uwalnianie auto- i parakrynych substancji w odpowiedzi na bodźce fizyczne, biologiczne czy chemiczne. Śródbłonek odgrywa ważną rolę w regulacji napięcia ścian naczyń oraz regulacji nabytej lub wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego. Komórki śródbłonka, które tworzą najbardziej wewnętrzną powierzchnię ścian tętnic, w warunkach fizjologicznych są odporne na adhezję leukocytów. Proces zapalny inicjuje wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłonka, co umożliwia wiązanie leukocytów ze ścianą naczynia. Na migrację leukocytów wpływ mają przede wszystkim oddziaływania pomiędzy ligandami na ich powierzchni a śródbłonkowymi P- oraz E-selektynami, jak również oddziaływania między powierzchniowymi integrynami leukocytów a cząsteczkami adhezyjnymi ICAM-1 (ang. *Intracellular Adhesion Molecule*) i VCAM-1 (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule*)<sup>44</sup>.

Ekto-enzymy, takie jak CD73, mogą działać jako cząsteczki adhezyjne, ale przede wszystkim biorą udział w regulacji adhezji komórek układu odpornościowego poprzez metaboliczną kontrolę funkcji leukocytów<sup>45</sup>. CD73 występuje zarówno na powierzchni komórek śródbłonka, jak również limfocytów. Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują, że wiązanie leukocytów do komórek śródbłonka związane jest z zahamowaniem aktywności CD73. Mechanizm tej inaktywacji wymaga jednak dalszych badań<sup>46</sup>. Zewnątrzkomórkowa adenozylna poprzez działanie receptorowe może pośrednio zwiększać szczelność komórek śródbłonka poprzez - indukowaną wzrostem cAMP - aktywację kinazy białkowej A, prowadzącej do fosforylacji białek typowych dla połączeń ścisłych (barierowych), między innymi fosfoproteiny stymulującej wazodylatację (VASP, ang. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*)<sup>47</sup>. Uważa się, że zmniejszone, na skutek obniżonej aktywności CD73, stężenie adenozylny prowadzi do zwiększenia przepuszczalności komórek śródbłonka, co z kolei przyczynia się do zwiększonej migracji leukocytów. Wiadomo również, że adhezja limfocytów do śródbłonka „maskuje” śródbłonkową aktywność CD73. Proces ten powoduje zakłócenie zewnątrzkomórkowego katabolizmu nukleotydów adeninowych, co skutkuje wzrostem stężenia ATP<sup>48</sup>. Ponadto, CD73 odgrywa istotną rolę w regulacji krążenia wieńcowego poprzez wytwarzanie adenozylny, która z kolei pełni funkcję hiperpolaryzującego czynnika pochodzenia śródbłonkowego. Wówczas pośredniczy ona w rozkurczu tętnic wieńcowych prowadząc do indukcji hiperpolaryzacji i relaksacji komórek mięśniówki gładkiej naczyń poprzez stymulację receptorów adenozylnowych i regulację kanałów potasowych<sup>49</sup>.

### 5.2.4. Rola CD73 w patologii naczyń i zastawki aortalnej

Dysfunkcja śródbłónka naczyniowego jest obecna w patogenezie wszystkich chorób sercowo-naczyniowych. Definicja tego zaburzenia, oprócz upośledzonej zdolności rozkurczowej naczynia, obejmuje także współistniejący proces zapalny, który może prowadzić do rozwoju, między innymi miażdżycy poprzez zwiększenie przepuszczalności komórek śródbłónka, zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych, czy też intensywne wydzielanie cytokin i chemokin. Jednym z kluczowych mechanizmów dysfunkcji śródbłónka jest obniżenie syntezy tlenu azotu, najprawdopodobniej na skutek stresu oksydacyjnego<sup>50-52</sup>.

Doniesienia z piśmiennictwa dotyczące roli CD73 w miażdżycy są niejasne. Adhezja monocytów do aktywowanego śródbłónka, a następnie ich migracja przez śródbłónek jest kluczowym etapem w początkowej fazie rozwoju miażdżycy. Dane dostępne w piśmiennictwie wykazują, że proces adhezji monocytów w perfundowanych *ex vivo* tętnicach szyjnych myszy z delecją genu kodującego CD73 jest znacznie nasilony, a temu prozapalnemu działaniu towarzyszy znamienny wzrost stężenia VCAM-1, która uważana jest za marker zmian zachodzących w obrębie śródbłónka<sup>53</sup>. Delecja CD73 prowadzi także do wzrostu aktywacji Toll-podobnego receptora 2 (TLR2), który może bezpośrednio wpływać na indukcję procesu zapalnego<sup>54</sup>. Z drugiej strony, sugerowano, że aktywność CD73 przyczynia się do rozwoju miażdżycy, poprzez stymulację migracji i proliferacji komórek mięśniówki gładkiej naczyń, a także wzrostu stężenia lipidów w surowicy<sup>55</sup>.

Dane dostępne w piśmiennictwie podkreślają rolę białka CD73 w kontroli agregacji płytek krwi. Rolę CD73 w patofizjologii zakrzepicy badano na modelu tętnic szyjnych uszkodzonych przez wolne rodniki, poprzez zastosowanie FeCl<sub>3</sub> myszy z delecją CD73. Czas okluzji (czas od początku pomiaru do zamknięcia światła naczynia przez powstający w wyniku adhezji i agregacji płytek krwi czop płytkowy) był znacznie krótszy u myszy pozbawionych aktywności CD73 w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto, czas krwawienia (czas upływający od zranienia skóry do ustania krwawienia, po nacięciu końcówki ogona) również był o około 35 % krótszy u myszy charakteryzujących się brakiem aktywności CD73. Wyniki te sugerują, że prawidłowa aktywność tego enzymu hamuje agregację płytek krwi, a jej utrzymanie może stanowić nową strategię terapeutyczną w przeciwdziałaniu zakrzepicy<sup>56</sup>.

Zwapnienie naczyń, tworzące się w błonie wewnętrznej (*intima*) lub środkowej (*media*) naczynia, jest ważnym aspektem patologii układu sercowo-naczyniowego. Do niedawna jeszcze uważano, że jest to zmiana degeneracyjna. Jednak coraz więcej dowodów sugeruje, że jest to wynik aktywnego procesu, przypominającego przebudowę kości<sup>57</sup>. Uważa się, że zewnątrzkomórkowa kalcyfikacja wynika z aktywacji specyficznych szlaków biochemicznych, a ich stała inhibicja może zapobiec wystąpieniu tego procesu. U osób z mutacją w genie *NT5E* kodującym CD73 zaobserwowano zwiększoną kalcyfikację naczyń krwionośnych przy braku aktywności enzymatycznej tego białka w fibroblastach pochodzących od członków rodzin dotkniętych tą mutacją<sup>58</sup>. Proces kalcyfikacji zależy w dużej mierze od stężenia pirofosforanu, który jest silnym inhibitorem ektotopowego wapnienia, oraz od aktywności tkankowo niespecyficznej fosfatazy alkalicznej (TNAP, ang. *tissue nonspecific alkaline phosphatase*), rozkładającej pirofosforan do fosforanu nieorganicznego - aktywatora wapnienia. Wykazano także, że długotrwałe obniżenie stężenia zewnątrzkomórkowej adenozyiny zwiększa poziom aktywności TNAP. Natomiast dodanie adenozyiny do środowiska hodowli komórek pozbawionych białka CD73 odwracało efekt

stymulacji aktywności TNAP<sup>59</sup>. Ponadto, dane dostępne w piśmiennictwie wskazują, że inhibicja CD73 prowadzi do kalcyfikacji miocytów, a efekt ten może zostać zniesiony poprzez zahamowanie aktywności TNAP<sup>60</sup>. Doniesienia te dowodzą, że aktywność CD73, a co za tym idzie - produkt aktywności enzymatycznej tego białka, adenozyrna - mogą działać jako negatywny regulator kalcyfikacji tkankowej - prawdopodobnie poprzez inhibicję TNAP.

Jedną z najczęstszych wad zastawek serca jest zwężenie zastawki aortalnej. Obecnie, pomimo poważnych konsekwencji klinicznych wynikających z rozwoju choroby, jedynym skutecznym sposobem jej leczenia jest wymiana zastawki. Dane w piśmiennictwie sugerują jednak, że proces zapalny sprzyja rozwojowi zwężenia zastawki aortalnej (podobnie jak w przypadku kalcyfikacji naczyń), niezależnie od występowania nieprawidłowości anatomicznych. Wczesne zmiany wynikające z rozwoju zwężenia zastawki aortalnej związane są właśnie z aktywnym procesem zapalnym obejmującym naciekanie limfocytów T oraz makrofagów, a także odkładaniem złogów lipidowych, złogów wapnia oraz uszkodzeniem błony podstawnej<sup>61</sup>. W zmienionych patologicznie zastawkach obserwuje się obecność komórek tucznych oraz zwiększone stężenie cytokin prozapalnych: IL-1 $\beta$  oraz czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ). Zaburzenia zachodzące w płatkach półksiężycowatych zastawki aortalnej charakteryzują się nasiloną obecnością metaloproteinaz, rozkładających składniki macierzy zewnątrzkomórkowej<sup>62</sup>.

Mimo przytoczonych wcześniej badań, rola CD73 w utrzymaniu prawidłowej funkcji zastawki aortalnej nadal nie jest wyjaśniona. W piśmiennictwie znaleźć można wyniki wskazujące na wysoką ekspresję ekto-nukleotyduz w chorobie zastawkowej. Zauważono nadekspresję ekto-5'nukleotyduzy w zmineralizowanych zwężonych zastawkach aortalnych<sup>63</sup>. Eksperymenty *in vitro* dotyczące różnicowania osteoblastów sugerują, że adenozyrna może indukować proces mineralizacji<sup>63</sup>. Wyniki te budzą jednak wątpliwości, ponieważ w pracy tej porównywano jedynie przypadkowe obszary zwapniałych zastawek. Analiza histochemiczna wykonana przez zespół Katedry i Zakładu Biochemii GUMed wykazała, że w patologicznie zmienionych zastawkach ilość białka CD73 była znacznie zmniejszona, z wyjątkiem zwapnionych obszarów, które charakteryzowały się zwiększoną ilością CD73<sup>64</sup>. Może za tym stać mechanizm kompensacyjny, mający na celu przywrócenie prawidłowej aktywności tego białka. Ponadto, inne wyniki uzyskane w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed wykazały znacznie zmniejszoną aktywność CD73 w ludzkich skalcyfikowanych zastawkach aortalnych w porównaniu do nieskalcyfikowanych<sup>65</sup>.

Zaobserwowano również, że dodanie ATP bądź też syntetycznego agonisty receptora P2Y do środowiska pierwotnych komórek śródmiąższowych zastawki (VIC, ang. *valvular interstitial cells*) powodował podobny przebieg transformacji osteoblastycznej do tego, powodowanego przez medium osteogenne. Z kolei dodanie adenozyrny do VIC hodowanych w medium osteogennym prowadziło do znaczącego zmniejszenia zarówno aktywności, jak i ekspresji fosfatazy alkalicznej, która jest jednym z markerów kalcyfikacji<sup>66</sup>. Rolę zmian aktywności CD73 w patologiiach naczyniowych dokładniej opisano w pracy przeglądowej będącej częścią niniejszej rozprawy (Załącznik - Praca A).

### **5.2.5. Aktywacja CD73 jako strategia terapeutyczna w chorobach układu krążenia**

W ostatnich latach obserwuje się znaczny postęp w opracowywaniu nowych leków stosowanych w chorobach układu krążenia. Wciąż jednak zaburzenia układu sercowo-

naczyniowego są przyczyną około 50% przypadków przedwczesnej śmierci ludzi na świecie. Głównym wyzwaniem prowadzonych badań jest wprowadzenie nowych celów molekularnych do obecnie stosowanych terapii. Jak wynika z przytoczonych wcześniej danych, zależna od CD73 produkcja zewnątrzkomórkowej adenozyiny pełni istotną rolę w regulacji bariery naczyniowej. Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują na kardioprotekcyjną rolę zewnątrzkomórkowej adenozyiny oraz receptora A2B. Jako strategię terapeutyczną zaproponowano manipulację aktywnością enzymatyczną CD73 w celu zwiększenia zewnątrzkomórkowego stężenia adenozyiny, a także aktywację receptora A2B<sup>67</sup>. Farmakologiczne hamowanie aktywności lub delecja genu CD73 znosiły kardioprotekcyjne działanie hartowania niedokrwionego. Z kolei podanie rozpuszczalnej 5'-nukleotyduzy wywierało podobny efekt ochronny do hartowania niedokrwionego. Obserwowano znaczne zmniejszenie obszaru objętego zawałem mięśnia sercowego. Stwierdzono także, że podawanie rozpuszczalnej 5'-nukleotyduzy wspomaga prawidłową funkcję bariery naczyniowej i zmniejsza napływ neutrofilów. Ponadto, zaobserwowano, że w przeciwzapalnych efektach niskich dawek metotreksatu i sulfasalazyny pośredniczy zewnątrzkomórkowa adenozyina. Oba te związki prowadzą do zwiększenia jej stężenia w przestrzeni pozakomórkowej, a dzieje się to na skutek aktywacji CD73<sup>68</sup>. Tematyka ta została szerzej rozwinięta w pracy przeglądowej będącej częścią rozprawy doktorskiej (Załącznik - Praca A).

Jak wynika z powyższych rozważań, rola CD73 w rozwoju chorób sercowo – naczyniowych wciąż jest tematem budzącym wiele kontrowersji. Wyjaśnienie dokładnej roli tego białka w rozwoju patologii zastawki aortalnej oraz ściany naczynia, a także próba znalezienia mechanizmów tego działania są kluczowe i stanowiły główny cel niniejszej rozprawy doktorskiej. Hipoteza w niej przedstawiona zakłada, że zmniejszenie aktywności CD73 oraz zarówno lokalne, jak i ogólnoustrojowe zmiany powodowane przez to obniżenie mogą prowadzić do rozwoju dysfunkcji zastawki aortalnej i ściany naczynia.

## 6. CELE

Celem niniejszej pracy była ocena roli 5'-nukleotydazy w patologii zastawki aortalnej oraz ściany naczynia.

Szczegółowe cele obejmowały ocenę wpływu delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydazę na:

1. Zewnątrzkomórkowy metabolizm nukleotydów adeninowych na powierzchni mysiej aorty.
2. Funkcję oraz strukturę mysiej zastawki aortalnej.
3. Mineralizację mysiej zastawki aortalnej.
4. Rozwój dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w różnych grupach wiekowych myszy.
5. Ogólnoustrojowe zmiany metabolizmu u myszy.

## 7. MODELE I TECHNIKI BADAWCZE

Modelem badawczym były myszy C57BL/6 z delecją CD73 (CD73<sup>-/-</sup>), które utworzono poprzez usunięcie ze struktury genu dla CD73 egzonu II zawierającego „*Phosphoesterase Signature Motive*”, czyli motyw niezbędny dla prawidłowej funkcji miejsca aktywnego tego enzymu. Myszy CD73<sup>-/-</sup> nie różnią się pod względem anatomii oraz płodności od myszy typu dzikiego. Do badań użyto 9 - tygodniowe myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz myszy szczepu C57BL/6 typu dzikiego, oznaczane dalej jako WT (ang. *Wild Type*) lub myszy kontrolne. Zwierzęta losowo przydzielono do grup: CD73<sup>-/-</sup> oraz WT karmione dietą standardową i CD73<sup>-/-</sup> oraz WT karmione dietą wysokotłuszczową przez okres 15 tygodni. Dieta wysokotłuszczowa zawierała 60 % kcal tłuszczu, podczas gdy dieta standardowa 10 % kcal tłuszczu. Dieta o podwyższonej zawartości tłuszczu jest jednym z ustalonych eksperymentalnych modeli patologii naczyniowych, jak i zastawkowych i została zastosowana w celu porównania jej efektów ze zmianami obserwowanymi pod wpływem delecji CD73<sup>69, 70</sup>. Myszy CD73<sup>-/-</sup> na diecie wysokotłuszczowej posłużyły do zweryfikowania hipotezy, czy delecja CD73 prowadzi do zaostrzenia już istniejących nieprawidłowości.

Do oceny wpływu delecji CD73 na mineralizację zastawek aortalnych oraz rozwój dysfunkcji śródbłonna w zależności od wieku zwierząt, użyto 1 -, 3 -, 6 - oraz 12 - miesięczne myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT, karmione dietą standardową.

Aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów adeninowych oraz adenozyne oznaczono na powierzchni aorty, poprzez inkubację fragmentów aorty piersiowej z substratami odpowiednimi dla każdego z enzymów: adenozyne dla eADA, ATP dla CD39 oraz AMP dla CD73. Podczas badania hydrolizy ATP oraz AMP dodano inhibitor deaminazy adenozyne – EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonylo) adenina). Przy ocenie udziału fosfatazy alkalicznej (ALP) i CD73 w naczyniowej hydrolizie AMP, aorty inkubowano z dodatkiem AMP jako substratu, oraz odpowiednich inhibitorów: EHNA, lewamizolu (inhibitor ALP) oraz  $\alpha$ ,  $\beta$ -metyleno-ADP (AOPCP) - (inhibitor CD73). W środowisku inkubacyjnym mierzono stężenie ATP, ADP, AMP i adenozyne z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). Aktywności enzymatyczne znormalizowano do powierzchni aorty oszacowanej za pomocą programu ImageJ 1.48v i przedstawiono jako nmol/min/cm<sup>2</sup>.

W celu oceny wpływu braku aktywności CD73 na funkcję zastawki aortalnej, przeprowadzono pomiary echokardiograficzne u myszy za pomocą USG dopplerowskiego i oceniono: pole powierzchni ujścia aortalnego (AVA) oraz frakcję wyrzutową lewej komory (LVEF), a także zbadana została maksymalna prędkość przepływu krwi w czasie skurczu przez zastawkę aortalną (Vmax).

Do oceny histologicznej mysich zastawek aortalnych zastosowano barwienia na obecność złogów wapnia (czerwień alizarynowa) oraz zakrzepów (kombinacja barwień - orceina + MSB (ang. *Martius, Scarlet and Blue*). Wyniki pomiarów morfometrycznych przedstawiono jako stosunek średniej grubości płatków zastawki do powierzchni płątka.

W celu oceny efektów działania ATP oraz adenozyiny na aktywność ALP w badanych zastawkach wykorzystano model kalcyfikacji zastawki aortalnej *ex vivo*. Zastawki aortalne pozyskane od 6-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup>, inkubowano przez 72 h w medium osteogennym z dodatkiem ATP (100 μM) lub adenozyiny (50 μM), a następnie aktywność ALP mierzono kolorymetrycznie w homogenatach tkankowych.

Aktywność enzymatyczną NOS zmierzono fluorymetrycznie w komórkach śródbłonna wyizolowanych z płuc 2-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT.

Ponadto, w badaniach wykorzystano techniki: wysokosprawną chromatografię cieczową ze spektrometrią mas (do oceny stężenia adenozyiny oraz aminokwasów), testy immunoenzymatyczne (do oceny markerów stanu zapalnego i aktywacji śródbłonna oraz poziomu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS)), metody kolorymetryczne (do oceny aktywności enzymatycznej arginazy, stężenia metabolitów tlenu azotu, całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAOS)) oraz standardowe testy biochemiczne (do ocena stężenia glukozy i profilu lipidowego).

## 8. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ

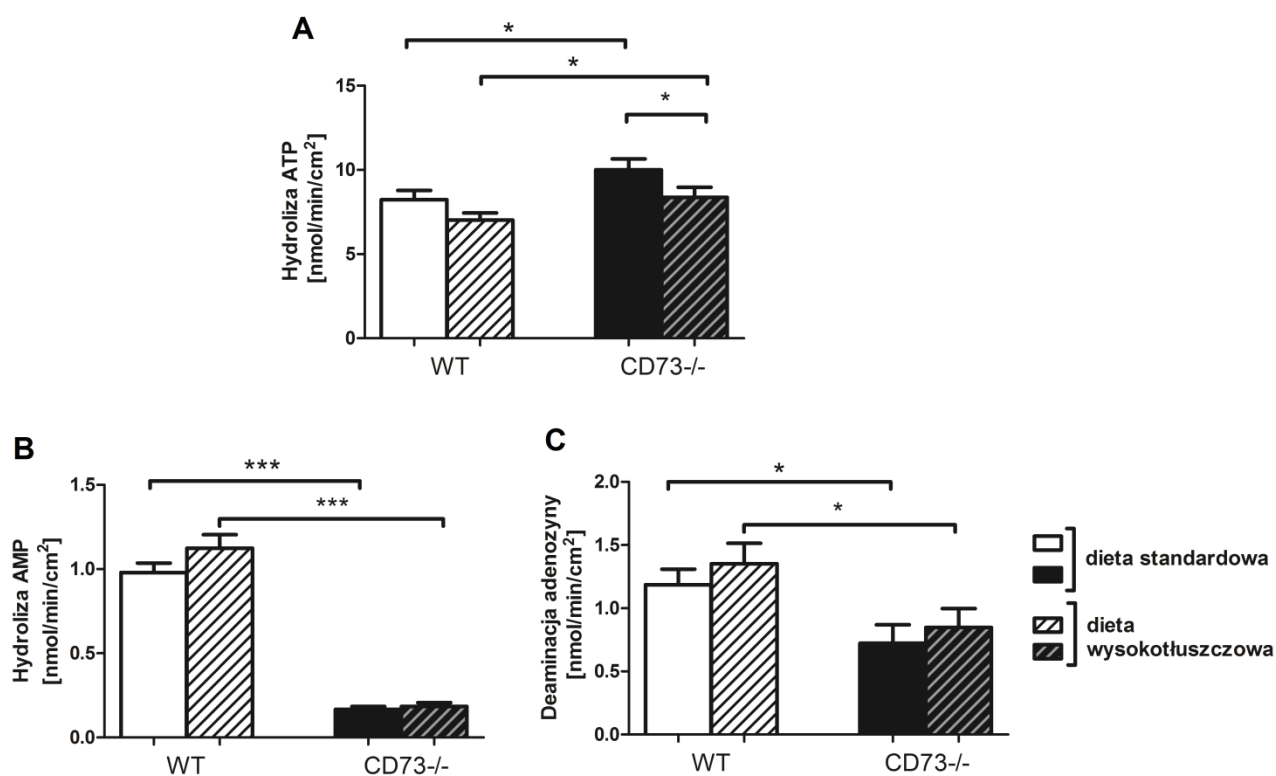
### 8.1. Wpływ delekcji genu kodującego ekto-5'-nukleotydazę na zewnątrzkomórkowy metabolizm nukleotydów adeninowych na powierzchni aorty

Aktywności ekto-enzymów katabolizmu nukleotydów adeninowych oraz adenozyiny: ekto-difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej 1 (CD39), ekto-5'-nukleotydazy (CD73) oraz ekto-deaminazy adenozyiny (eADA) zostały zbadane na powierzchni aorty myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT, karmionych dietą standardową bądź wysokotłuszczową.

Delekcja CD73 spowodowała prawie całkowite zahamowanie przemiany AMP do adenozyiny na powierzchni aorty (**Rycina 3B**, Praca B - rycina 1B). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w hydrolizie AMP pod wpływem diety wysokotłuszczowej. Brak aktywności CD73 miał także wpływ na aktywności innych enzymów zaangażowanych w zewnątrzkomórkowy katabolizm nukleotydów adeninowych. Aktywność CD39 była podwyższona na powierzchni aorty myszy CD73<sup>-/-</sup> w porównaniu z WT. Sama dieta wysokotłuszczowa powodowała obniżenie stopnia hydrolizy ATP w obu badanych grupach (**Rycina 3A**, Praca B - rycina 1A). Ponadto, zaobserwowano znamienne obniżoną deaminację adenozyiny na powierzchni aorty myszy CD73<sup>-/-</sup> w porównaniu do kontroli, niezależnie od diety (**Rycina 3C**, Praca B - rycina 1C).

Zmiany obserwowane w przebiegu hydrolizy ATP oraz deaminacji adenozyiny na powierzchni aorty spowodowane były znaczącym obniżeniem aktywności CD73. Na tym etapie badań rola wzrostu aktywności CD39 na powierzchni aorty myszy CD73<sup>-/-</sup> i związana z tym degradacja prozapalnego ATP oraz proagregacyjnego ADP, uwalnianych z komórek śródbłonna, jak również rola gromadzenia się AMP w środowisku zewnątrzkomórkowym nie są w pełni wyjaśnione. Z kolei, obniżona aktywność eADA wynika najprawdopodobniej z niskiego stężenia substratu - zewnątrzkomórkowej adenozyiny, na skutek braku jej produkcji przez CD73.

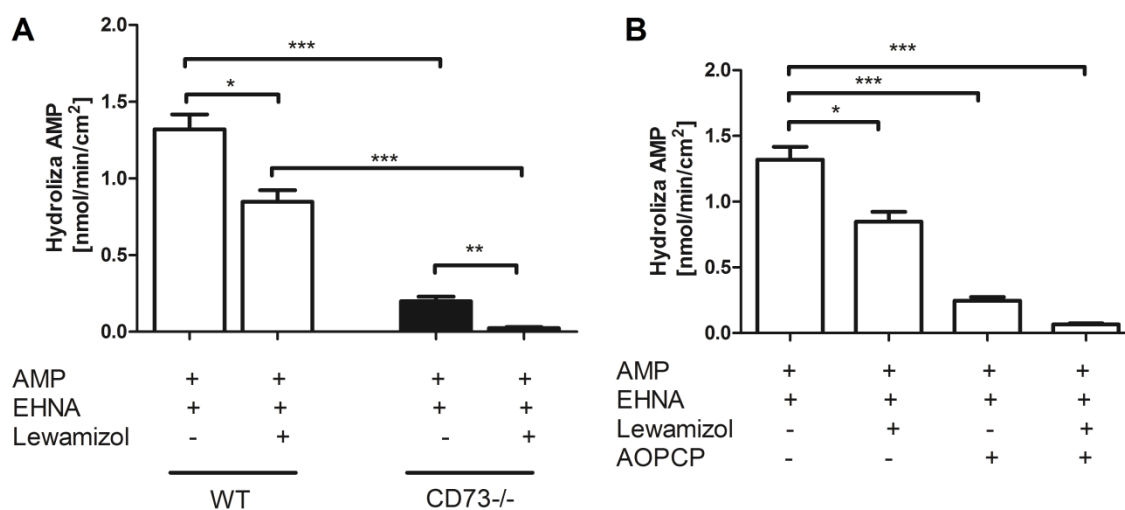




**Rycina 3.** Delecja CD73 zahamowała przemianę AMP do adenozyiny na powierzchni aorty. Wzrost aktywności CD39 oraz obniżenie aktywności eADA są wtórnymi zmianami spowodowanymi prawie całkowitym zahamowaniem aktywności CD73. Hydroliza ATP (A); hydroliza AMP (B); deaminacja adenozyiny (C) na powierzchni aorty myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT w zależności od zastosowanej diety: standardowej lub o podwyższonej zawartości tłuszczu. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnia ± SEM (n=21; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B

Oceniono również udział aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w hydrolizie AMP na powierzchni aorty myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Na podstawie przeprowadzonych badań z wykorzystaniem lewamizolu można stwierdzić, że ALP odpowiada jedynie za ok. 30% hydrolizy AMP. Za pozostałą przemianę AMP do adenozyiny odpowiada CD73 (**Rycina 4A**, Praca B - rycina 2A). Stopień hydrolizy AMP wynosił mniej niż 4 % kontroli, kiedy obie aktywności były zahamowane (**Rycina 4B**, Praca B - rycina 2B).

Wartość Km CD73 dla AMP znajduje się w zakresie mikromolowym i jest znacznie niższa (kilka rzędów wielkości) niż wartość Km ALP dla AMP, a zewnątrzkomórkowe stężenie AMP nie przekracza mikromolowych wartości, nawet przy silnym stresie<sup>27</sup>. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że udział ALP w hydrolizie AMP na powierzchni aorty jest niewielki i to CD73 jest głównym enzymem odpowiedzialnym za tę przemianę.



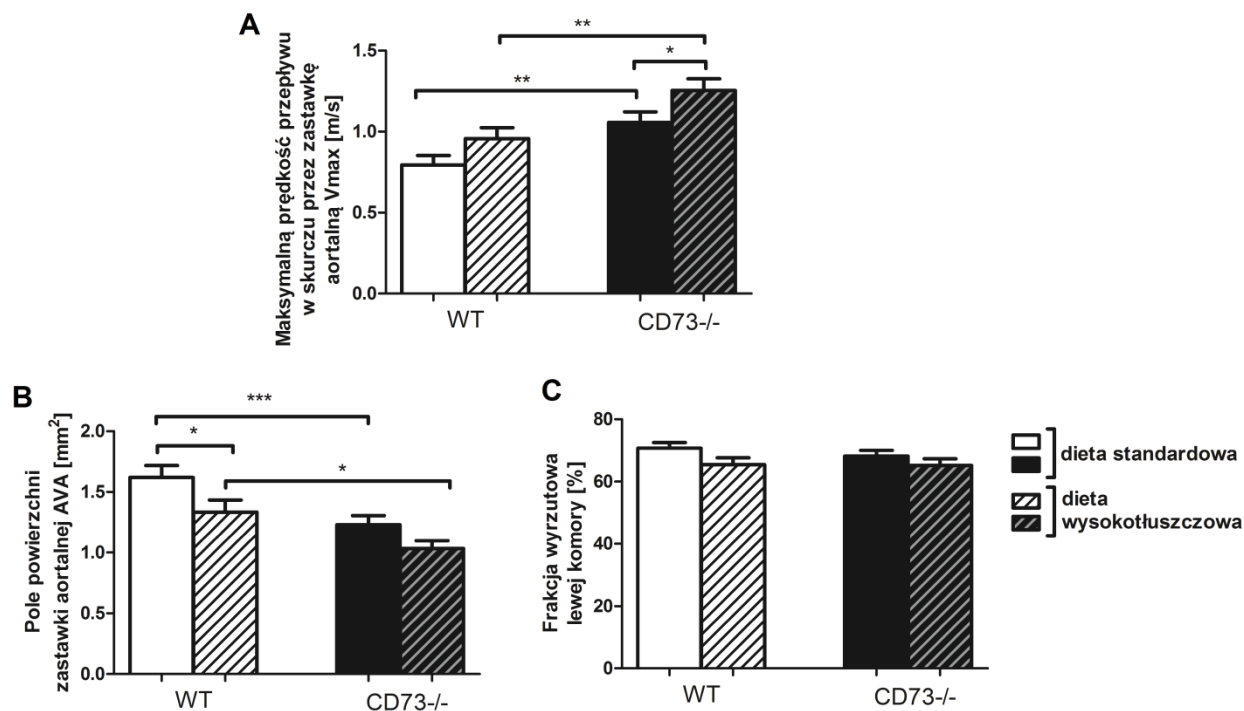
**Rycina 4. CD73, a nie fosfataza alkaliczna (ALP) jest głównym enzymem odpowiedzialnym za naczyniową przemianę AMP do adenozy. A) Hydroliza AMP na powierzchni aorty myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT w obecności i nieobecności lewamizolu; B) Udział CD73 i ALP w hydrolizie AMP na powierzchni aorty myszy WT w obecności i nieobecności lewamizolu oraz AOPCP. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnia ± SEM (n=10; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a (A) lub jednokierunkowej ANOVA z podtestem Sidak'a (B); \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B**

## 8.2. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydazę na funkcję oraz strukturę mysiej zastawki aortalnej

Stenoza aortalna jest patologią obejmującą m.in. zapalenie, zwłóknienie i zwapnienie płatków zastawki aortalnej. Na wszystkie te procesy mogą wpływać zaburzenia szlaku zewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów. W kolejnym etapie pracy doktorskiej oceniono rolę braku aktywności CD73 w rozwoju dysfunkcji zastawki aortalnej.

Badania z wykorzystaniem USG dopplerowskiego wykazały, że myszy CD73<sup>-/-</sup> charakteryzowały się znacznym wzrostem maksymalnej prędkości przepływu krwi przez zastawkę aortalną (**Rycina 5A, Praca B - rycina 3A**) oraz znamienne mniejszym polem powierzchni ujścia aortalnego (**Rycina 5B, Praca B - rycina 3B**). Zaobserwowano także, że LVEF jest prawidłowa u myszy z delecją CD73 i nie różni się od kontroli (**Rycina 5C, Praca B - rycina 3C**), co sugeruje, że odnotowane zaburzenia prędkości przepływu krwi przez zastawkę aortalną wynikają jedynie z dysfunkcji zastawki aortalnej. Obserwacje te są zgodne z danymi klinicznymi wskazującymi prawidłową wartość LVEF u większości pacjentów ze stenozą aortalną<sup>71</sup>. Zmiany wywołane delecją CD73 były zbliżone do tych, obserwowanych u myszy WT na diecie wysokotłuszczowej i wykazują podobieństwo do tych, stwierdzonych we wczesnych stadiach rozwoju zwężenia zastawki aortalnej u ludzi.

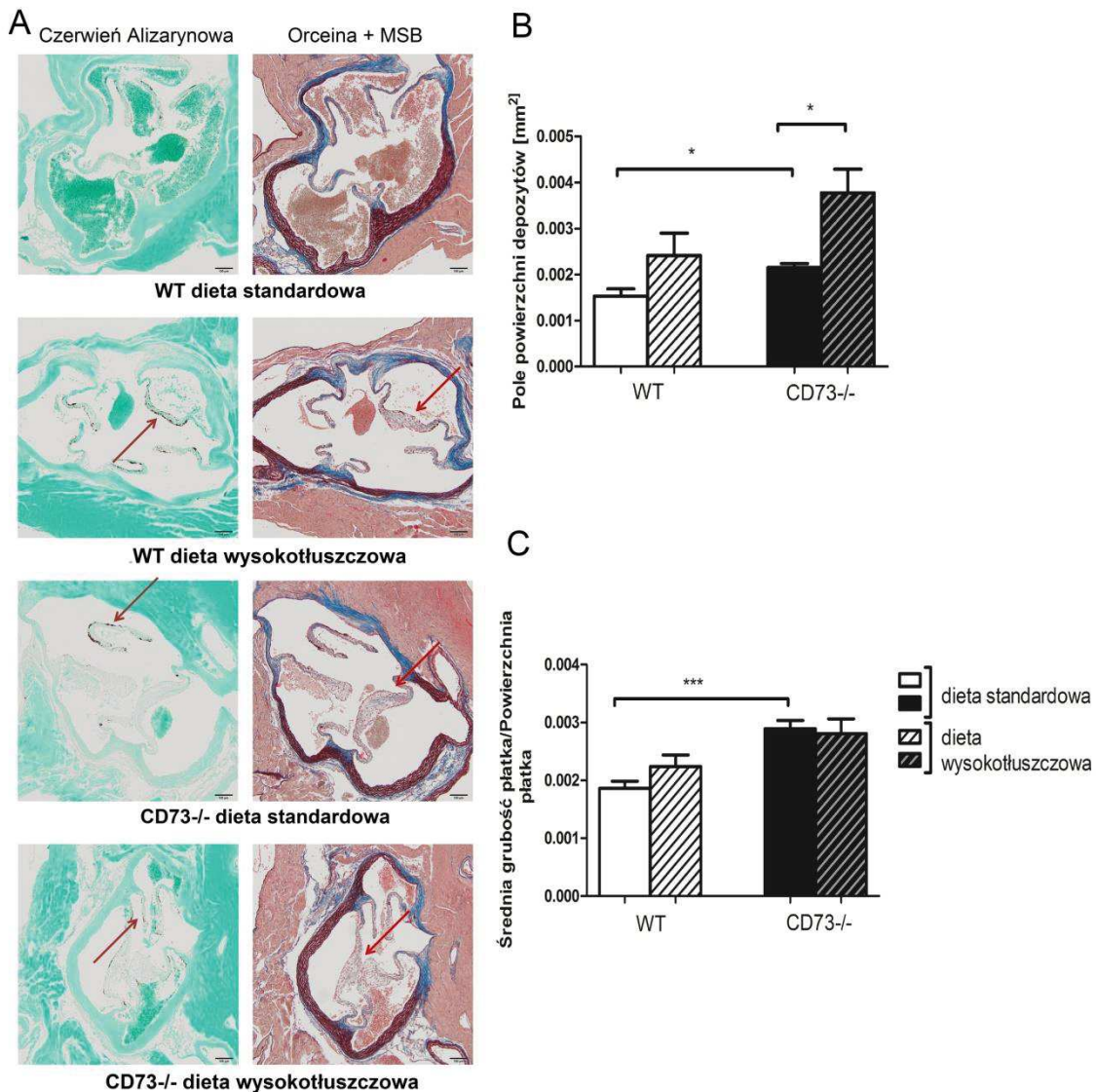
Uzyskane wyniki wskazują na znaczny udział obniżonej aktywności CD73 w rozwoju stenozy aortalnej.



**Rycina 5. Znacznie podwyższona maksymalna prędkość przepływu w skurczu przez zastawkę aortalną (Vmax) oraz zmniejszone pole powierzchni zastawki aortalnej (AVA), z zachowaną frakcją wyrzutową lewej komory (LVEF) u myszy CD73<sup>-/-</sup>. Parametry echokardiograficzne: A) Vmax; B) AVA; C) LVEF. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM (n=21; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B**

Ponadto, zmiany obserwowane w morfologii badanych zastawek aortalnych potwierdzają rozwój ich dysfunkcji. Analiza histologiczna wykazała pogrubienie płatków zastawki u myszy CD73<sup>-/-</sup> (**Rycina 6A**, Praca B - rycina 4A). Zaobserwowano także, że zastawki aortalne myszy CD73<sup>-/-</sup> charakteryzowały się obecnością złogów o ciemnym zabarwieniu, a w pobliżu miejsc wystąpienia depozytów, ściany zastawek były pogrubione. Prawie dwukrotnie zwiększoną akumulację złogów zaobserwowano w grupach zwierząt karmionych dietą o wysokiej zawartości tłuszczu, zarówno CD73<sup>-/-</sup>, jak i WT (**Rycina 6B**, Praca B - rycina 4C). Bardziej szczegółowa analiza złogów dowiodła, że jest to melanina. Dane z piśmiennictwa wskazują, że melanocyty biorą udział w rekonstrukcji i przebudowie zastawki aortalnej a ich akumulacja wpływa na jej sztywność<sup>72</sup>. Pomiary morfometryczne grubości płatków zastawki oraz powierzchni zajętej przez złogi melaniny podkreślają nieprawidłowości strukturalne, ale także funkcjonalne występujące u myszy z delecją CD73, szczególnie tych, karmionych dietą wysokotłuszczową (**Rycina 6C**, Praca B – rycina 4C). Metoda z użyciem czerwieni alizarynowej nie wykazała obecności złogów wapnia w badanych zastawkach. Brak obserwacji złogów wapnia w zastawkach może wynikać z różnic w ich anatomicznej strukturze w porównaniu do zastawek ludzkich, jak również z niższej czułości analizy histologicznej w porównaniu z metodami chemicznymi.

Uzyskane wyniki jednoznacznie dowiodły, że brak aktywności CD73 prowadzi do rozwoju dysfunkcji zastawki aortalnej u myszy, potwierdzonej przez zaburzenia jej struktury i prawidłowego funkcjonowania.

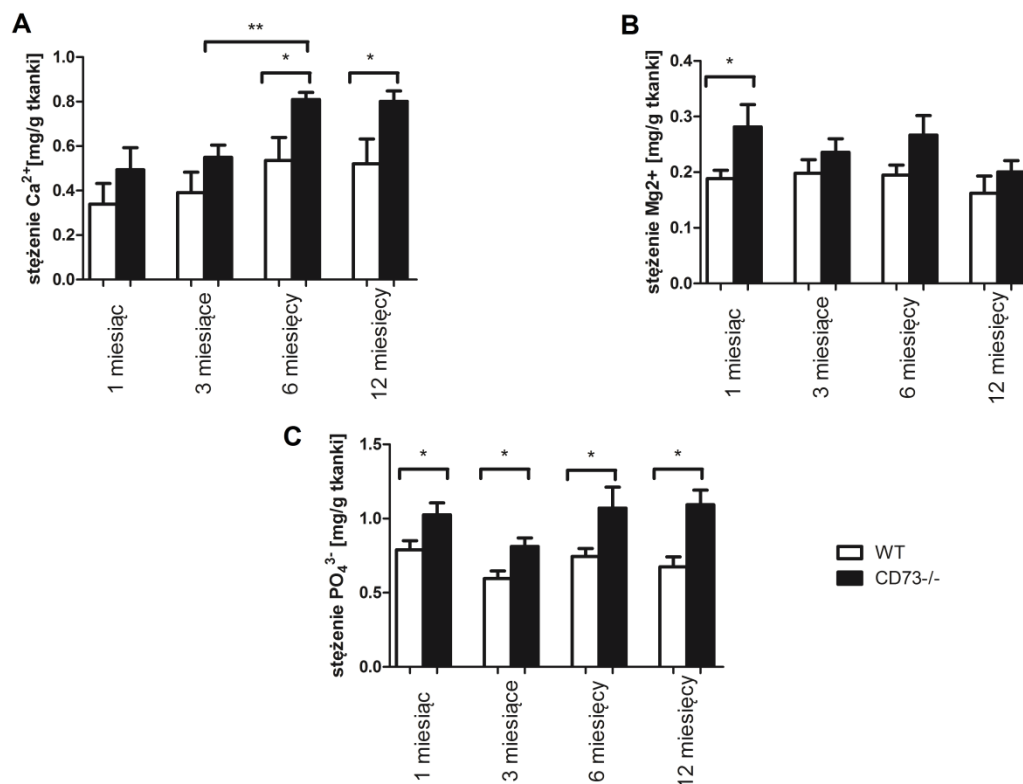


**Rycina 6. Delecja CD73 prowadzi do wystąpienia zmian morfologicznych i strukturalnych w zastawkach aortalnych.** A) Obrazy histologiczne zastawek aortalnych myszy WT oraz myszy CD73<sup>-/-</sup> na diecie standardowej i wysokotłuszczowej. Zastosowano: czerwień alizarynową oraz orceinę i barwienie Martius Scarlet Blue. Strzałki wskazują zmiany w zastawkach: pogrubienia oraz obszary gromadzenia się złogów melaniny; B) Pole powierzchni zajętej przez depozyty melaniny; C) Stosunek średniej grubości płatków zastawki do powierzchni płatków, jako wystandaryzowany pomiar grubości płatków zastawek. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 21; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B

### 8.3. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydazę na mineralizację mysiej zastawki aortalnej

Wpływ braku aktywności CD73 na mineralizację zastawek określono za pomocą metod spektrofotometrycznych. Zmierzono stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz  $\text{PO}_4^{3-}$  w zastawkach aortalnych 1-, 3-, 6- i 12-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Analiza chemiczna wykazała znacznie zwiększone stężenie wyżej wymienionych jonów w zastawkach myszy CD73<sup>-/-</sup>. Ponadto, zawartość wapnia oraz fosforanów wzrastała wraz z wiekiem zwierząt (**Rycina 7, Praca B - rycina 4B**).

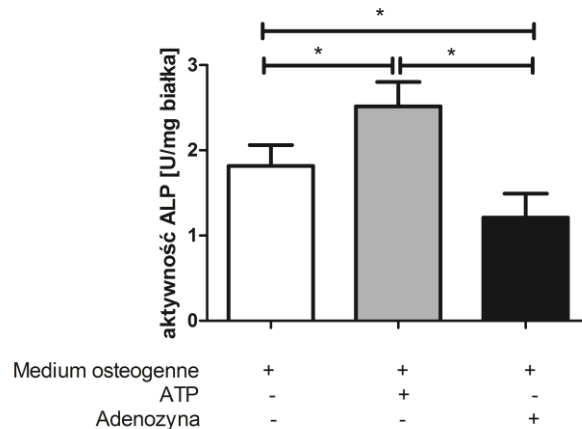
Mineralizacja tkanek jest konsekwencją nie tylko lokalnych, ale także ogólnoustrojowych czynników, w tym również zapalenia. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, utrata przeciwzapalnych właściwości adenozyiny, na skutek braku aktywności CD73, może prowadzić do aktywacji mineralizacji. Ponadto, ostatnie badania wykazały rozwój zwapnienia naczyń u transgenicznym myszy z obniżoną odpornością po iniekcji, pochodzących od pacjentów z niedoborem CD73, indukowanych pluripotencyjnych komórek macierzystych (iPSC)<sup>73,74</sup>. Wyniki te potwierdzają bezpośredni związek CD73 z ektopowym wapnieniem.



**Rycina 7. Wyższe stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz  $\text{PO}_4^{3-}$  w zastawkach aortalnych myszy CD73<sup>-/-</sup> potwierdzają ich prokalcyfikacyjny fenotyp.** Stężenie A)  $\text{Ca}^{2+}$ ; B)  $\text{Mg}^{2+}$  oraz C)  $\text{PO}_4^{3-}$  w zastawkach aortalnych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT w wieku 1, 3, 6 oraz 12 miesięcy. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM (n = 5; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Holm-Sidak.; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B

Zbadano także efekty działania zewnątrzkomórkowego ATP i adenozyiny na aktywność ALP w modelu kalcyfikacji zastawki aortalnej *ex vivo*. Wyniki wykazały, że inkubacja zastawek myszy CD73<sup>-/-</sup> w medium osteogennym z dodatkiem ATP spowodowała znaczny

wzrost aktywności ALP w tych zastawkach w porównaniu do inkubacji tylko w medium osteogennym. Z kolei, inkubacja zastawek myszy CD73<sup>-/-</sup> w medium osteogennym z dodatkiem adenozyzny prowadziła do znacznego zmniejszenia aktywności ALP (**Rycina 8**, Praca B - rycina 5).



**Rycina 8. Wyższa aktywność ALP w obecności ATP, a niższa w obecności adenozyzny w zastawkach aortanych myszy CD73<sup>-/-</sup> inkubowanych w medium osteogennym.** Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 4; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Holm-Sidak.; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B

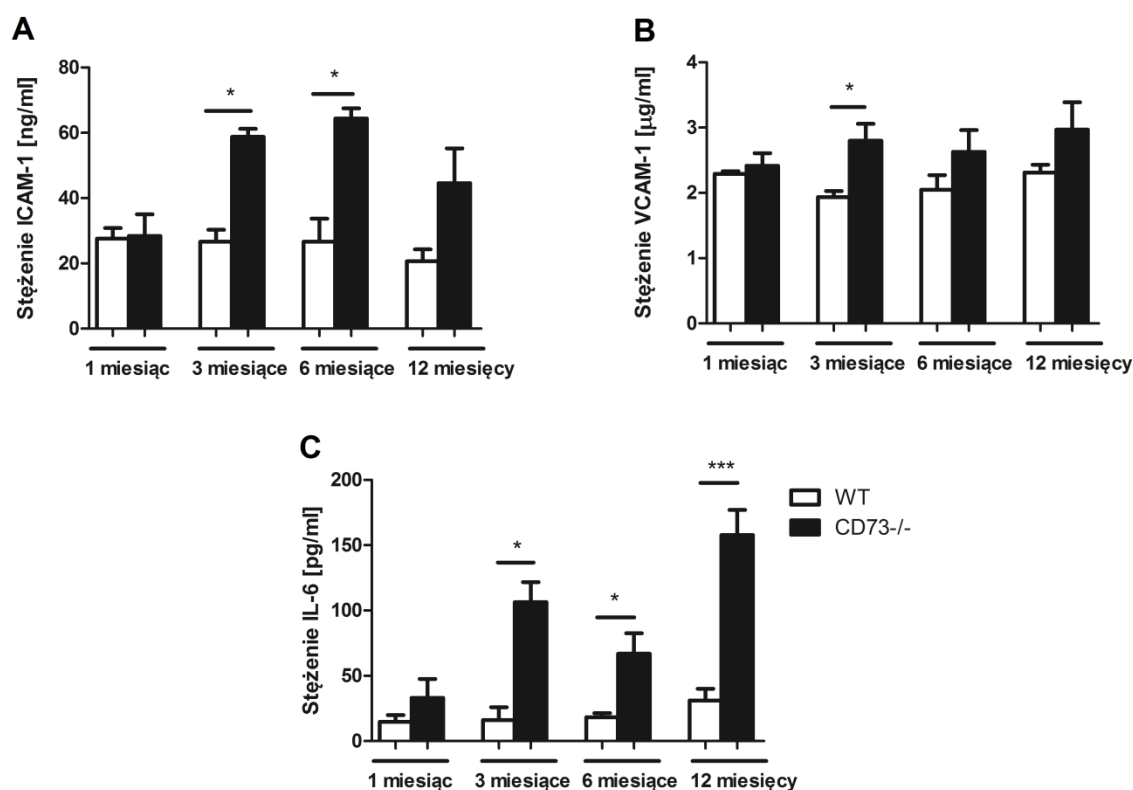
Wiele badań wykazało bezpośredni związek pomiędzy ALP a wapniem. Wiadomo, że zahamowanie aktywności ALP zapobiega wzrostowi ekspresji osteonektyny oraz depozytów wapnia w VIC inkubowanych w pożywce osteogennej<sup>75</sup>. Eksperymenty przeprowadzone w tej części badań sugerują, że zewnątrzkomórkowe ATP oraz adenozyzna odgrywają ważną rolę w kontroli kalcyfikacji, a CD73 jest bezpośrednio związane z procesem ektopowej kalcyfikacji.

#### **8.4. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukleotydazę na rozwój, zależnej od wieku, dysfunkcji śródbłonka naczyniowego**

Dysfunkcja śródbłonka leży u podstaw wszystkich chorób układu krążenia, a do jej rozwoju dochodzi najczęściej na skutek mechanizmów związanych z aktywnym procesem zapalnym, ale także zmniejszoną syntezą tlenku azotu. Tlenek azotu powstaje głównie w komórkach śródbłonka jako produkt przekształcenia L-argininy przez śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS)<sup>76</sup>. Przytoczone już wcześniej doniesienia dostępne w piśmiennictwie wykazały wpływ obniżonej aktywności CD73 na zaburzenie przepuszczalności komórek śródbłonka. W niniejszej rozprawie przedstawiono badania pogłębiające wiedzę o roli CD73 w rozwoju dysfunkcji komórek śródbłonka.

W celu oceny rozwoju stanu zapalnego oraz potwierdzenia prozapalnego fenotypu zwierząt z delecją CD73, przeprowadzono pomiary stężeń molekuł adhezyjnych związanych z aktywacją śródbłonka - ICAM-1 oraz VCAM-1, a także interleukiny 6 (IL-6) w surowicy 1-, 3-, 6- oraz 12-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Delecja genu CD73 spowodowała znaczny wzrost stężenia zarówno ICAM-1, jak i VCAM-1, a także znamienne podwyższenie

stężenia IL-6. Ten prozapalny fenotyp myszy CD73<sup>-/-</sup> nasilał się wraz z wiekiem zwierząt (Rycina 9, Praca C - rycina 1).



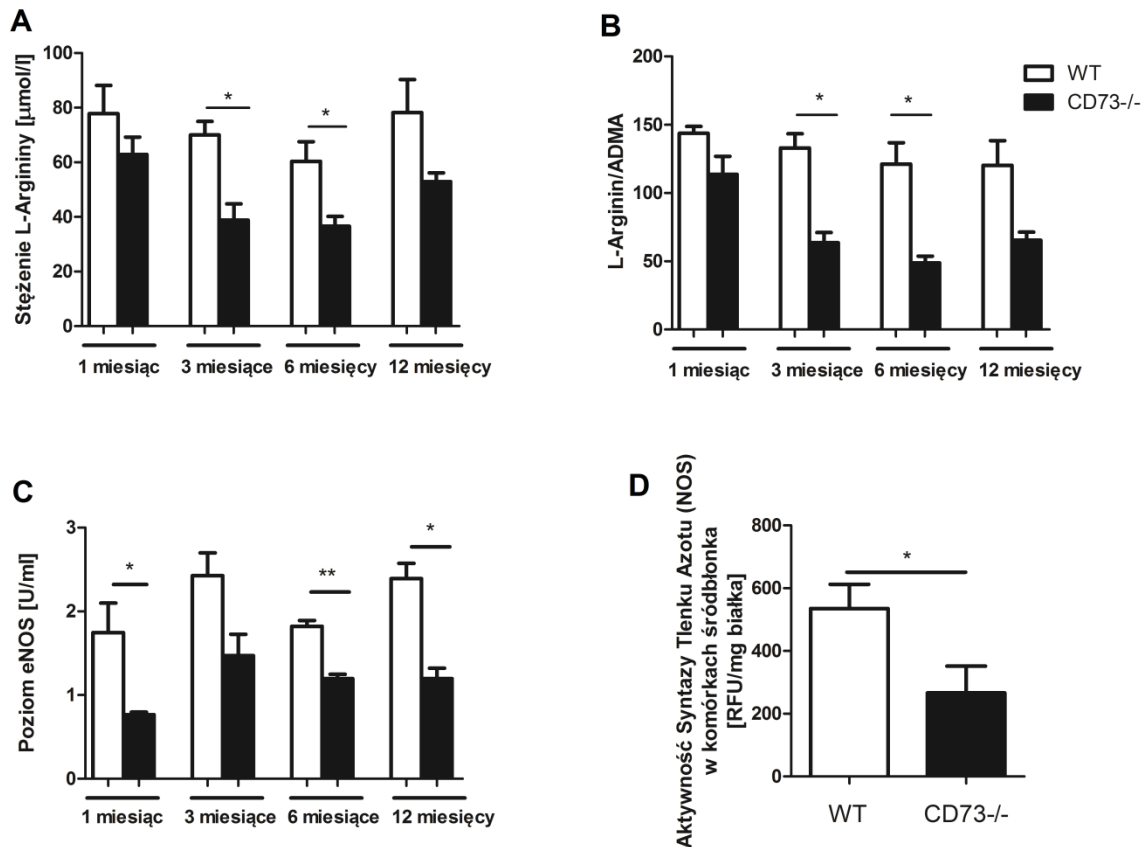
**Rycina 9. Wzrost stężenia prozapalnej IL-6 oraz molekuł adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 sugeruje aktywację śródbłonna, a także prozapalny fenotyp myszy CD73<sup>-/-</sup>.** Stężenia A) IL-6; B) ICAM-1 oraz C) VCAM-1 w surowicy myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT w wieku 1, 3, 6 oraz 12 miesięcy. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 5; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca C

Aktywny proces zapalny może stymulować ekspresję cząsteczek ICAM-1 oraz VCAM-1 w komórkach śródbłonna, co powoduje adhezję leukocytów do ściany naczynia oraz ich transmigrację do tkanek obwodowych. Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują na zwiększenie „przecieku naczyniowego” wywołanego niedotlenieniem w płucach, sercu czy też nerkach, w odpowiedzi na zahamowanie aktywności CD73<sup>31</sup>. Ponadto, eksperymenty *in vitro* hodowli komórek śródbłonna oraz limfocytów T w kokulturze wykazały, że genetyczna delecja CD73 nasila transendotelialną migrację limfocytów T i zwiększa ekspresję TNF- $\alpha$ , VCAM-1 oraz IFN- $\gamma$ <sup>77</sup>. Przytoczone doniesienia oraz wyniki przedstawione w tej części badań jednoznacznie sugerują, że CD73 odgrywa ważną rolę w utrzymaniu bariery śródbłonkowej.

Jednym z możliwych mechanizmów rozwoju dysfunkcji śródbłonna jest zaburzenie metabolizmu L-argininy, a tym samym produkcji tlenu azotu w naczyniach. W komórkach śródbłonna tlenek azotu wytwarzany jest z L-argininy przez eNOS. Cząsteczka ta jest kluczowym regulatorem wazodylatacji i homeostazy śródbłonna. Ponadto, odgrywa ważną rolę w regulacji cytotoksyczności makrofagów i agregacji płytek. Ponieważ L-arginina jest

jedynym substratem dla reakcji katalizowanej przez eNOS, jej dostępność jest krytyczna w kontroli syntezy tlenku azotu<sup>78, 79</sup>. Zbadano więc stężenie L-argininy, poziom białka eNOS w surowicy, a także aktywność NOS w komórkach śródbłonka izolowanych z płuc myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Ponadto, biorąc pod uwagę, że asymeryczna dimetyloarginina (ADMA) jest najbardziej istotnym endogennym inhibitorem eNOS, który konkuruje z L-argininą o wiązanie w miejscu aktywnym enzymu hamując syntezę tlenku azotu, zmierzono stosunek stężeń L-arginina/ADMA<sup>80</sup>. Dane z piśmiennictwa wskazują na wysokie stężenie ADMA obserwowane w surowicy pacjentów z patologiami naczyniowymi<sup>81</sup>.

Myszy z delecją CD73 charakteryzowały się znacząco niższym stężeniem L-argininy oraz ilością eNOS w surowicy, niezależnie od wieku. Ponadto, zaobserwowano, zależne od wieku myszy, obniżenie stosunku L-arginina/ADMA - parametru silnie związanego z dysfunkcją śródbłonka (**Rycina 10A i 10B**, Praca C - rycina 2A i 2B). Co więcej, wykazano znamienne niższą aktywność NOS w komórkach śródbłonka myszy CD73<sup>-/-</sup> w porównaniu do grupy kontrolnej (**Rycina 10C i 10D**, Praca C - rycina 2C i 2D).

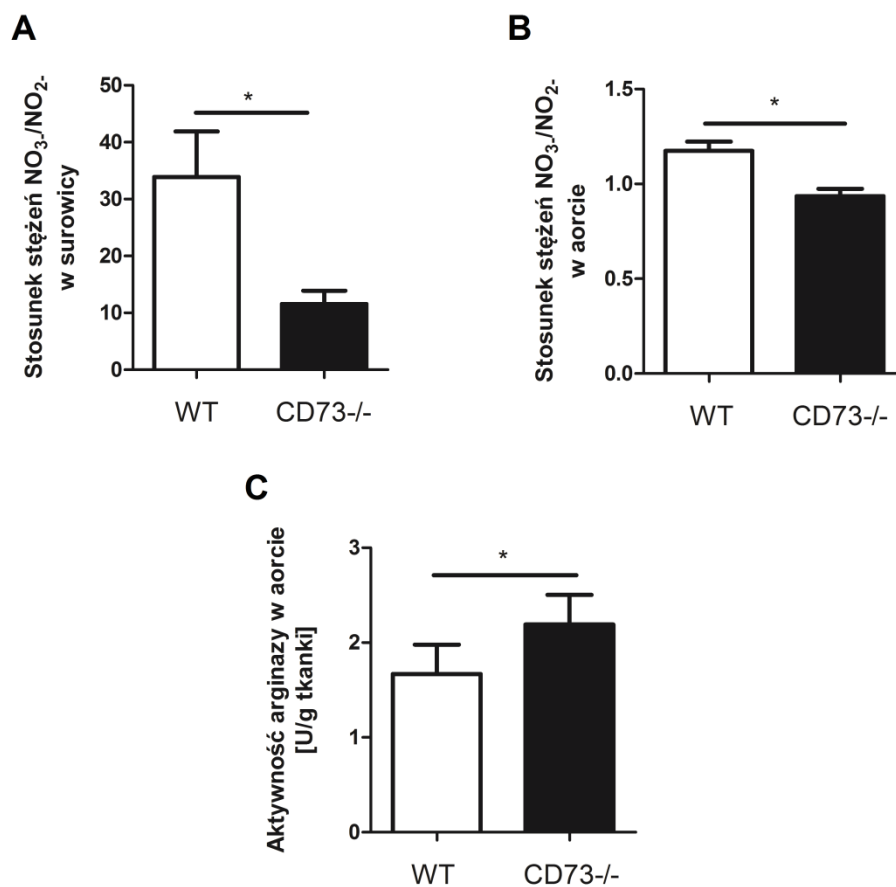


**Rycina 10. Obniżone stężenie L-argininy w surowicy oraz niższa aktywność NOS w komórkach śródbłonka wskazują na rozwój dysfunkcji śródbłonka u myszy z delecją CD73.** A) stężenie L-argininy; B) stosunek stężeń L-arginina/ADMA oraz C) ilość białka eNOS w surowicy myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT w wieku 1, 3, 6 oraz 12 miesięcy. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 5; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001). D) aktywność NOS w EC wyizolowanych z płuc 2-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n=3 - przy każdym pomiarze aktywności analizowano 5 powtórzeń technicznych dla każdej z badanych grup; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca C



Zaobserwowana obniżona aktywność NOS w komórkach śródbłonka wskazuje na zaburzenie produkcji tlenu azotu. W związku z brakiem możliwości wiarygodnego, bezpośredniego oznaczenia stężenia tlenu azotu, zmierzone zostały stężenia azotanów i azotynów w surowicy oraz aorcie 6-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Przeprowadzone badania wykazały, że stosunek stężeń azotanów do azotynów był znacząco obniżony zarówno w surowicy, jak i aorcie myszy CD73<sup>-/-</sup> w porównaniu do WT (**Rycina 11A i 11B**, Praca C - rycina 4A i 4B).

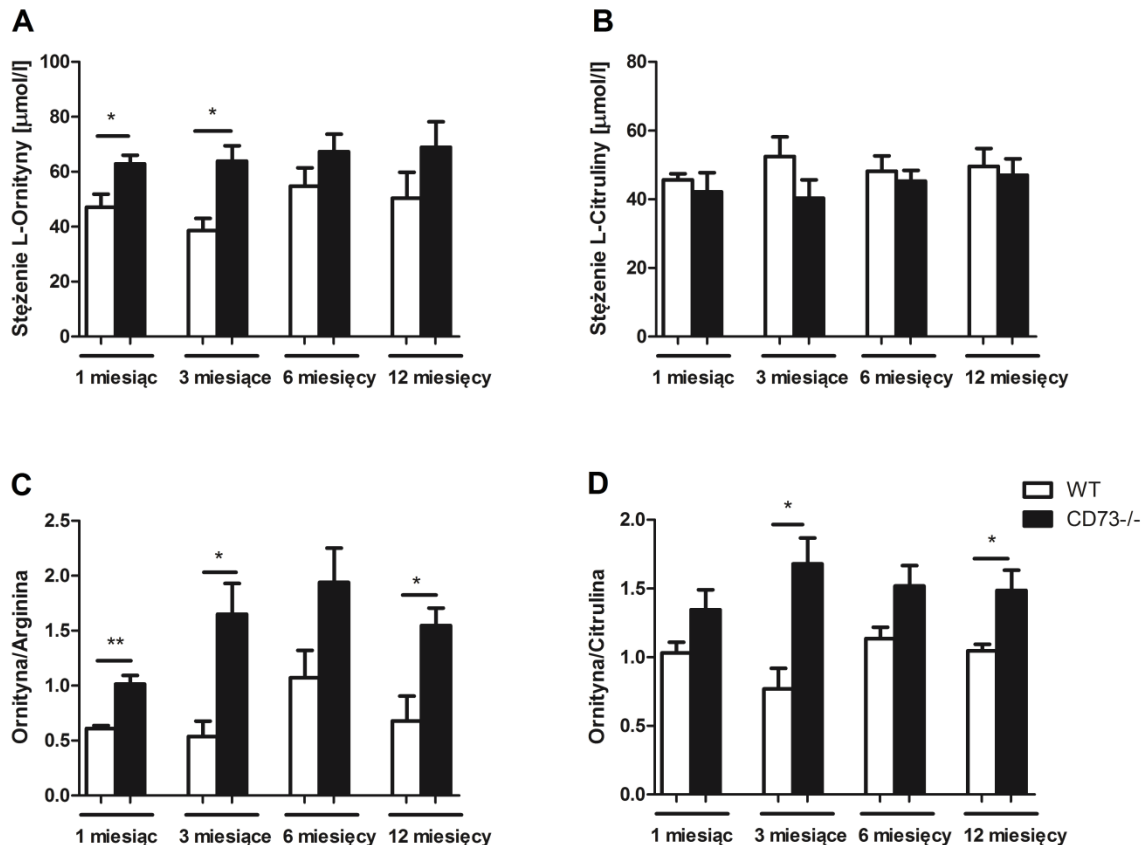
Ponadto, jedną z przyczyn obniżonego stężenia L-argininy, może być wzrost aktywności arginazy, odpowiedzialnej za przemianę L-argininy do L-ornityny i mocznika. Zmierzono więc jej aktywność w aortach badanych grup zwierząt. Zaobserwowano znacząco wyższą aktywność arginazy w aorcie myszy CD73<sup>-/-</sup> w porównaniu z grupą kontrolną (**Rycina 11 C**, Praca C - rycina 4C).



**Rycina 11. Zaburzona synteza tlenu azotu u myszy z delecją CD73, na co wskazuje obniżony stosunek stężeń azotanów do azotynów w surowicy oraz aorcie. Wyższa aktywność arginazy jako prawdopodobna przyczyna obniżonego stężenia L-argininy.** Stosunek azotanów do azotynów w A) surowicy; B) aorcie, a także C) aktywność arginazy w aorcie 6-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 5; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca C

Powyższe wyniki potwierdzają rozwój dysfunkcji śródbłonka u myszy z delecją CD73. Zaburzenie to nasila się wraz z wiekiem zwierząt.

Zbadano także, czy wzrost aktywności arginazy spowodował zmiany pozostałych metabolitów L-argininy, biorących wraz z L-argininą udział w cyklu mocznikowym. Wszystkie grupy wiekowe myszy CD73<sup>-/-</sup> charakteryzowały się podwyższonym stężeniem L-ornityny w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono istotnej różnicy w stężeniu L-cytruliny pomiędzy badanymi grupami. Odnotowano jednak znamienne podwyższone stosunki stężeń L-ornityna/L-arginina oraz L-ornityna/L-cytrulina w porównaniu z kontrolą (**Rycina 12**, Praca C - rycina 5). Podobne obserwacje odnotowano wcześniej u pacjentów ze zmianami w średnich i dużych naczyniach (m.in. miażdżycy tętnic kończyn dolnych), będącymi powikłaniami cukrzycy typu 2, jednej z chorób o podłożu zapalnym<sup>82</sup>.



**Rycina 12.** Wyższy stosunek stężeń L-ornityna/ L-arginina oraz L-ornityna/ L-cytrulina w surowicy myszy CD73<sup>-/-</sup>. Stężenia A) L-ornityny; B) L-cytruliny oraz stosunki stężeń C) L-ornityna/L-arginina; D) L-ornityna/L-cytrulina w surowicy myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT w wieku 1, 3, 6 i 12 miesięcy. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 5; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca C

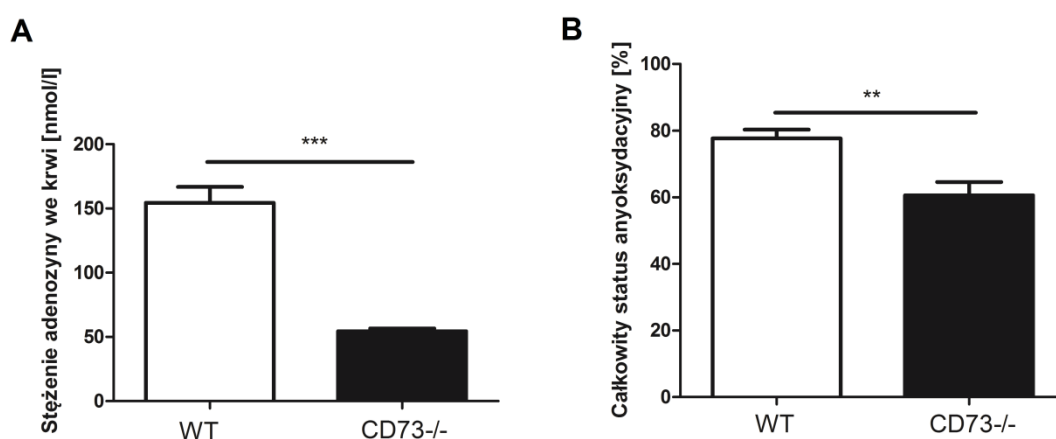
Biorąc pod uwagę powyższe dane, wyniki przedstawione w tej części badań jednoznacznie wskazują, że zależna od wieku dysfunkcja śródbłonna u myszy CD73<sup>-/-</sup> związana jest z zaburzeniami metabolizmu L-argininy oraz syntezy tlenu azotu. Wiadomo, że zaburzona produkcja tlenu azotu prowadzi do zwężenia naczyń, adhezji leukocytów i stresu oksydacyjnego. Sam stres oksydacyjny może również zakłócić produkcję i reaktywność tlenu azotu poprzez jego inaktywację przez wolne rodniki i zmniejszenie dostępności tetrahydrobiopteryny, która jest kofaktorem wymaganym do syntezy tlenu azotu<sup>83</sup>. Myszy CD73<sup>-/-</sup> charakteryzowały się zależnym od wieku wzrostem IL-6 w surowicy.

Dane w piśmiennictwie wykazały, że podwyższone stężenie IL-6 może wpływać na obniżenie aktywności eNOS, poprzez zwiększanie stopnia wiązania pomiędzy eNOS a kaweoliną-1, białkiem szkieletowym kaweoli, które jest inhibitorem eNOS<sup>84</sup>.

### 8.5. Wpływ delecji genu kodującego ekto-5'-nukletydazę na ogólnoustrojowe zmiany metabolizmu u myszy

Kolejnym aspektem pracy doktorskiej była analiza wpływu braku aktywności CD73 na ogólnoustrojowy metabolizm. Uzyskane wcześniej wyniki wskazują, że zmniejszenie dostępności adenozyiny przyczyniło się do rozwoju stanu zapalnego w zastawkach aortalnych i naczyniach myszy CD73<sup>-/-</sup>, a co za tym idzie - do ogólnoustrojowych zaburzeń. Procesy, które przyczyniają się do rozwoju większości patologii naczyniowych, takie jak stan zapalny czy też uszkodzenie śródbłonna, są ściśle związane ze stresem oksydacyjnym. Jednym z parametrów określających ogólny stan antyoksydacyjny jest całkowity status antyoksydacyjny w osoczu (TAOS).

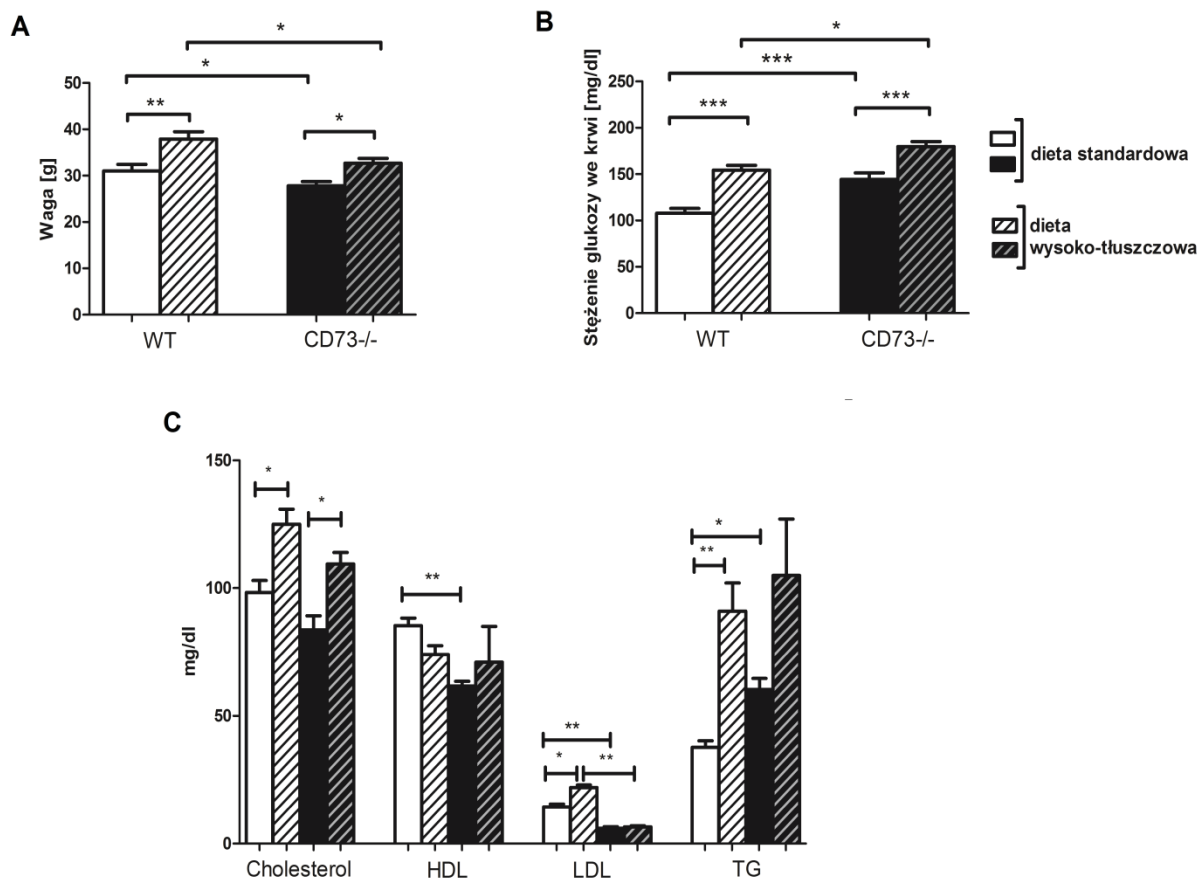
Zaobserwowano o około 25% niższy poziom TAOS u myszy CD73<sup>-/-</sup> w porównaniu do kontroli (**Rycina 13B**, Praca B - rycina 6B). Zbadano również stężenie adenozyiny we krwi myszy CD73<sup>-/-</sup>. Stężenie adenozyiny u myszy CD73<sup>-/-</sup> było znacząco niższe w porównaniu do WT (**Rycina 13A**, Praca B - rycina 6A).



**Rycina 13. Obniżony poziom całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAOS) w osoczu oraz stężenie adenozyiny we krwi myszy z delecją CD73.** A) Stężenie adenozyiny we krwi; B) Poziom TAOS w osoczu 6-miesięcznych myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 21; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B

Obniżony poziom TAOS sugeruje wzrost ilości wolnych rodników, a tym samym stresu oksydacyjnego. Zwiększenie ilości reaktywnych form tlenu może być spowodowany zarówno przez ich zwiększoną produkcję, ale także upośledzeniem ich degradacji. Mechanizm tego wzrostu wymaga dalszych badań. Natomiast dane dostępne w piśmiennictwie również potwierdzają przedstawione powyżej wyniki i łączą aktywność CD73 oraz produkcję adenozyiny z działaniem antyoksydacyjnym<sup>85</sup>.

Sygnalowanie purynergiczne odgrywa istotną rolę w procesach leżących u podstaw stenozy aortalnej, dysfunkcji śródbłonna, ale również w homeostazie tkanki tłuszczowej oraz metabolizmie węglowodanów. Zaburzenia metabolizmu lipidów i węglowodanów mogą prowadzić do inicjacji prozapalnej kaskady sygnałowej powodującej aktywację leukocytów, stymulując rozwój stanu zapalnego. Zmierzono wobec tego wagę, stężenie glukozy oraz profil lipidowy myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT na diecie standardowej oraz diecie o podwyższonej zawartości tłuszczu. Wykazano, że genetycznie modyfikowane myszy charakteryzują się niższą wagą niż myszy WT. Nawet pod wpływem diety wysokotłuszczowej przyrost masy ciała u myszy CD73<sup>-/-</sup> był o około 30% niższy niż w grupie kontrolnej. Dodatkowo, myszy CD73<sup>-/-</sup> miały podwyższone stężenie glukozy we krwi i zaburzony profil lipidowy w porównaniu z kontrolą (**Rycina 14**, Praca B - rycina S2).



**Rycina 14. Niższy przyrost masy ciała oraz wyższe stężenie glukozy we krwi myszy CD73<sup>-/-</sup>. Zmiany profilu lipidowego u myszy z delecją CD73.** A) Masę ciała B) stężenie glukozy we krwi oraz C) profil lipidowy myszy CD73<sup>-/-</sup> oraz WT. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 21; analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z podtestem Tukey'a; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001); Załącznik – Praca B

Adenozyna odgrywa istotną rolę w hamowaniu lipolizy. Obniżenie jej stężenia może prowadzić do wzrostu hydrolizy triacylogliceroli do glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych. Dane dostępne w piśmiennictwie również wskazują, że myszy z delecją CD73 charakteryzują się niższą zawartością tkanki tłuszczowej oraz zwiększonym stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy<sup>86</sup>. Wysoki poziom wolnych kwasów tłuszczowych może prowadzić do generowania reaktywnych form tlenu, jak również do

aktywacji TNF- $\alpha$  i IL-6 poprzez szlak sygnalizacji zapalnej IKK/NF- $\kappa$ B, a tym samym przyczyniać się do uszkodzenia komórek śródbłónka<sup>87</sup>.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania wykazały, że brak aktywności CD73 powoduje w mysim modelu eksperymentalnym: pogrubienie płatków zastawki aortalnej, aktywację mineralizacji zastawki oraz jej zaburzenie funkcjonalne, zbliżone do stenozы aortalnej. Dane te jednoznacznie sugerują, że aktywność CD73 jest istotna dla zachowania prawidłowej czynności zastawki aortalnej. Przeprowadzone badania wskazują, że myszy z delecją genu kodującego CD73 mogą być dobrym modelem dysfunkcji zastawki aortalnej i ściany naczynia. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie potwierdzają także koncepcję kluczowej roli aktywności CD73 w homeostazie śródbłónka. Po raz pierwszy łączą dysfunkcję komórek śródbłónka rozwijającą się u myszy CD73<sup>-/-</sup> z zaburzeniami metabolizmu L-argininy i produkcji tlenu azotu. Realizacja badań przyczyniła się do poszerzenia wiedzy z zakresu patologii naczyniowych i zastawkowych, a ich wyniki mogą stanowić w przyszłości podłoże nowej strategii terapeutycznej.

## 9. WNIOSKI

Najważniejsze wnioski, wynikające z badań wchodzących w skład publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej, są następujące:

1. Ekto-5'-nukleotydaza (CD73) ma kluczowe znaczenie w przekształceniu zewnątrzkomórkowego AMP do adenozyiny na powierzchni naczynia, a aktywności innych enzymów, takich jak fosfataza alkaliczna odgrywają jedynie niewielką rolę. Delecja CD73 prowadzi do zmian aktywności enzymów zaangażowanych w zewnątrzkomórkowy katabolizm nukleotydów na powierzchni aorty – zwiększenia aktywności CD39 oraz obniżenia aktywności ekto-deaminazy adenozyiny.
2. Delecja genu kodującego CD73 prowadzi do rozwoju dysfunkcji zastawki aortalnej u myszy. CD73 odgrywa zasadniczą rolę w utrzymaniu struktury i prawidłowej funkcji zastawki aortalnej.
3. Brak aktywności CD73 prowadzi do wzrostu poziomu markerów kalcyfikacji w zastawkach aortalnych (takich jak stężenie jonów wapnia, magnezu i fosforanów), jak również wzrostu aktywności fosfatazy alkalicznej.
4. Delecja genu kodującego CD73 prowadzi do rozwoju zależnej od wieku dysfunkcji śródbłonna u myszy, związanej z zaburzonym metabolizmem L-argininy.
5. Brak aktywności CD73 oraz niższe stężenie adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego oraz wzrostu stężenia cytokin prozapalnych, co wskazuje na rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego.

## 10. INTRODUCTION

In the organism, nucleotides are found as components of nucleic acids, as well as in significant quantities in cells and body fluids in the unbound (free) form where their role is to ensure the proper functioning of many biological processes. They can act as the carriers of the energy necessary in metabolic processes (ATP, GTP), participate in enzymatic reactions as coenzymes, cofactors (NAD, NADP, FMN, FAD) and substrates, act as allosteric effectors, and their cyclic derivatives are responsible for cell signaling<sup>1-3</sup>. Nucleotides and nucleosides are also present in the extracellular space, where they play the role of important signal molecules that act through specific receptors on the cell surface<sup>4, 5</sup>. The extracellular nucleotides stimulate inflammation (via P2 rec.), while their nucleosides (eg. adenosine) play an opposite role - they participate in the control of the immune response (via P1 rec.). On the surface of the cells, nucleotides and nucleosides may be degraded by the ecto-enzymes.

One of the enzymes involved in nucleotide metabolism is 5'-nucleotidase (5'NT - EC 3.1.3.5). This enzyme is found in bacteria, plants as well as in animal and human organisms. It hydrolyzes the phosphate residue at the end of the non-cyclic 5'-monoribonucleotides with the release of the nucleoside and inorganic phosphate. This enzyme is characterized by a wide variation in the hydrolyzed substrates, which primarily include adenosine-5'-monophosphate (AMP), inosine-5'-monophosphate (IMP), but also guanosine-5'-monophosphate (GMP), cytidine 5'-monophosphate (CMP) and uridine-5'-monophosphate (UMP) as well as deoxynucleotides, i.e. deoxycytidine-5'-monophosphate (dCMP), deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP), or deoxythymidine-5' -monophosphate (dTMP)<sup>6</sup>.

One of the substrates preferred by 5'NT is AMP. The main source of this nucleotide in the cell is the adenosine phosphorylation by adenosine kinase (AK). In addition, AMP may be formed by de novo synthesis from IMP by the action of adenylosuccinate synthetase and then adenylosuccinate lyase, by adenine reutilization in the reaction catalyzed by adenine phosphoribosyltransferase (APRT), as well as by degradation of intracellular triphosphates and diphosphates<sup>7</sup>. AMP in the cell may be phosphorylated to Adenosine-5'-diphosphate (ADP), deaminated to IMP with the participation of AMP deaminase, or be hydrolyzed by 5'NT to adenosine.

Adenosine is an important product of 5'NT activity. AMP hydrolysis is the main source of adenosine in cells. In addition, in conditions of optimal cellular supply of oxygen and substrates about 30% of the adenosine pool is derived from S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolysis catalyzed by S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH)<sup>8, 9</sup>. A small part of the adenosine pool may be the result of the activity of non-specific phosphodiesterases and phosphatases that have an affinity for all phosphorus compounds<sup>10</sup>. Under physiological conditions, the concentration of intracellular adenosine is maintained at the low level (below 1  $\mu$ M) primarily due to the AK activity, mentioned above. AK has a high affinity and a low Km value for adenosine (25 nM - 1  $\mu$ M, depending on the type of tissue)<sup>11</sup>. The second enzyme involved in the regulation of intracellular adenosine concentration is adenosine deaminase (ADA), which catalyzes the deamination of adenosine to inosine<sup>12, 13</sup>. However, it has a lower affinity for this molecule (Km about 25 - 150  $\mu$ M)<sup>14</sup>. Intracellular adenosine, through AK

activity, plays primarily the role of a nucleotide precursor. This molecule may also play an important signaling role in the extracellular space. An extracellular adenosine, among others shows cardioprotective activity during ischemia and hypoxia of the heart. In addition, it is involved in the regulation of processes such as: neurotransmission, smooth muscle cell tone, platelet aggregation, renal filtration and the course of inflammatory response<sup>15-18</sup>. The transport of adenosine, as well as other nucleosides, across the cellular membrane may take place with a concentration gradient - by facilitated diffusion, through the ENT transport system (Equilibrative Nucleoside Transport system) or inside the cell in the NA + ion symport, through CNT transporters (Concentrative Nucleoside Transport system)<sup>19</sup>

### 10.1. 5'-nucleotidase isoforms

5'NT occurs in the form of isoforms that differ in subcellular location and physicochemical properties. Currently, 7 molecular varieties of 5'NT are known, of which five are located in the cytosol (cN-IA, cN-IB, cN-II, cN-III and cdN), one in the mitochondrial matrix (mdN) and one is anchored on the external surface of the cytoplasmic membrane (e5'NT, CD73) (Tab.1).

5'-nucleotidase isoforms	Common name; symbol of the gene encoding the isoform	Other common names
<b>cN-IA</b>	cytosolic 5'-nucleotidase IA; <i>NT5C1A</i>	cN-I; „high Km” AMP-specific 5'-NT
<b>cN-IB</b>	cytosolic 5'-nucleotidase IB; <i>NT5C1B</i>	cN-IA homolog
<b>cN-II</b>	cytosolic 5'-nucleotidase II; <i>NT5C2</i>	„high Km” IMP-specific 5'-NT
<b>cN-III</b>	cytosolic 5'-nucleotidase III; <i>NT5C3</i>	PN-I; P5'N-1
<b>cdN</b>	cytosolic 5'(3') deoxynucleotidase; <i>NT5C</i>	PN-II; dNT-1
<b>mdN</b>	mitochondrial 5'(3')-deoxynucleotidase; <i>NT5M</i>	dNT-2
<b>e5'NT, CD73</b>	ecto-5'-nucleotidase; <i>NT5E</i>	e5'nt, ecto-5'-NT, „low Km” AMP-specific 5'-NT

**Table 1. 5'-nucleotidase isoforms.** Based on [20], with changes



Cytosolic 5'-nucleotidase IA (cN-IA) is a tetramer and is also called the AMP "preferential" isoform or "high Km" AMP-specific. It occurs mainly in skeletal muscles and the heart, where it plays an important role in the production of adenosine during ischemia. Its homolog - IB (cN-IB) - occurs in the testes. These isoforms have a high affinity for AMP as well as for deoxypyrimidine monophosphates (dCMP, dUMP, dTMP). For the optimal cN-I activity, the presence of divalent cations ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Co^{2+}$ ) is necessary. The Km value for AMP is 1.46 - 1.9 mM. ADP is a strong activator of the enzyme - at the micromolar concentration of ADP (10 - 89  $\mu M$ ) the cN-I Km for AMP is significantly reduced. To a lesser extent, this enzyme is also activated by GTP. A specific inhibitor of cN-I is 5'-ethynyl-2'-deoxyuridine (5-Edu) <sup>20, 21</sup>.

Cytosolic 5'-nucleotidase II (cN-II) is also present in the form of a tetramer and is present in all animal tissues. It is characterized by high affinity to 6-hydroxypurines, especially to IMP and GMP. It is responsible for the hydrolysis of these compounds, but also due to the phosphotransferase activity, it transfers the phosphate group from mono-5'-ribonucleotides to the appropriate 5'-ribonucleosides, thereby regulating the intracellular concentrations of IMP and GMP, as well as indirectly affecting the uric acid production <sup>22</sup>. cN-II hydrolyzes IMP several times faster than AMP. Km values are 0.1 - 0.6 mM for IMP and 1-15 mM for AMP, respectively. The presence of millimolar ATP and ADP concentrations modifies the kinetic properties of the enzyme, significantly increasing the maximum reaction rate (Vmax) and its affinity to IMP and AMP. In contrast, inorganic phosphate inhibits cN-II activity. The cN-II activity optimum is at pH 6.5-9.5 <sup>23</sup>.

Cytosolic 5'-nucleotidase III (cN-III) is a monomer. It catalyzes the hydrolysis of pyrimidine ribonucleotides (CMP, UMP) to the appropriate nucleosides. It shows much less activity in relation to purine nucleotides. Like cN-II, cN-III also has phosphotransferase properties. It occurs mainly in erythrocytes <sup>6</sup>. In hereditary hemolytic anemia, deficiency of this protein is observed <sup>24</sup>.

Cytosolic 5 '(3') - deoxynucleotidase (cdN) exists in the form of a dimer, is characterized by a wide tissue distribution and participates in the majority of deoxyribonucleotide hydrolysis reactions. It shows high activity in relation to both dIMP and dGMP, while weaker in relation to dAMP. This enzyme remains inactive in relation to dCMP. cdN also hydrolyzes nucleoside 2 'and 3'-monophosphates <sup>24</sup>.

Another of the known 5'-nucleotidase isoforms is mdN (mitochondrial 5 '(3') - deoxynucleotidase). It is a dimer, located in the mitochondrial matrix. It shows a large similarity to the above-described cdN, however it has a much higher substrate specificity in relation to dUMP and dTMP. Like cdN, mdN also has the ability to react with 2 'and 3'-monophosphates of nucleosides <sup>25</sup>.

A very interesting isoform is an ecto-5'-nucleotidase (e5'NT) or CD73. It occurs in the form of a dimer and is located on the surface of the cell, where it is connected to the cytoplasmic membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI). The preferred substrate for CD73 is AMP <sup>26</sup>. Its properties are described below.

## 10.2. CD73 - extracellular 5'NT isoform

### 10.2.1. CD73 - function and cell structure

Mature ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) consists of 548 amino acids with a molecular weight of 70 kDa. During maturation, a fragment of approximately 25 amino acid residues, comprising a signal sequence and a hydrophobic portion of the C-terminal end, is cleaved and replaced by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) through which the enzymatic protein is anchored on the outer surface of the cell membrane. The C-terminal domain of the protein is responsible for the binding of AMP, while the N-terminal domain for the binding of divalent metal ions (**Figure 1**)<sup>27,28</sup>.

CD73 has no activity on nucleoside 2'- and 3'-monophosphates, it catalyzes the hydrolysis reactions of both ribo- and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates - AMP, CMP, UMP, IMP and GMP, among which AMP is the preferred nucleotide. The Km value for AMP is approx. 15  $\mu$ M<sup>26</sup>. Optimal enzyme activity is within the pH range of 7.4 - 9.0. ATP and ADP are competitive inhibitors of CD73, while inorganic phosphate is non-competitive. The ATP and ADP inhibition constants are in the micromolar concentration ranges. These compounds bind to the active site of the enzyme, avoiding hydrolysis<sup>29</sup>. In tissue homogenates, practically half of the ecto-5'-nucleotidase activity dissociates from the cytoplasmic membrane into the incubation environment, simulating the existence of the cytoplasmic isoform. Until recently, this "cytoplasmic", soluble fraction of CD73 was classified as an independent isoform of the membrane enzyme<sup>30</sup>.

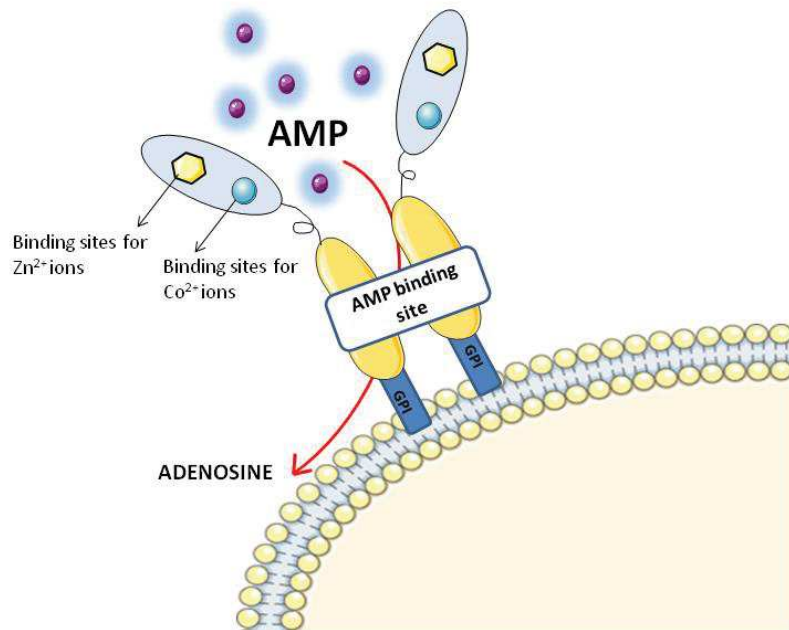
The CD73 protein level is tightly regulated. Pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ ) lead to an increase in the amount of CD73 during the development of inflammation, whereas phospholipases can cleave this protein from the cell membrane surface at the GPI anchor site. In addition, CD73 levels are usually increased in the course of cell maturation, in particular of T and B lymphocytes, as well as their growth and migration. In addition, hypoxia and ischemia are factors that significantly increase CD73 levels<sup>23,31</sup>.

CD73 is characterized by a wide tissue distribution. The presence of this enzyme has been demonstrated in various types of tissues, including kidneys, liver, lungs, brain, and heart. Its occurrence was confirmed on the surface of peripheral blood leukocytes, as well as in the thymus, spleen and lymph nodes. Such widespread presence of the enzyme is associated with its presence on the surface of endothelial cells<sup>32</sup>. CD73 also occurs on the surface of cancer cells<sup>33</sup>.

The data available in the literature indicate a functional contribution of ecto-5'-nucleotidase in endothelial barrier function, adaptation to hypoxia conditions, maintaining of the proper function of the lungs, liver, and kidneys, as well as the cardiovascular system<sup>16</sup>. A significant effect of CD73 activity on the regulation of immunity and inflammation was also demonstrated. Recent reports indicate that in addition to extracellular adenosine production, CD73 can catalyze nicotinamide mononucleotide hydrolysis to nicotinamide riboside and inorganic phosphate as well as NAD<sup>+</sup> hydrolysis<sup>34</sup>. CD73 can also perform a non-enzymatic function - it is an adhesive molecule that binds fibronectin and laminin in the

intercellular space. It is also suggested that it can act as a receptor in the T cell signaling pathways<sup>35</sup>.

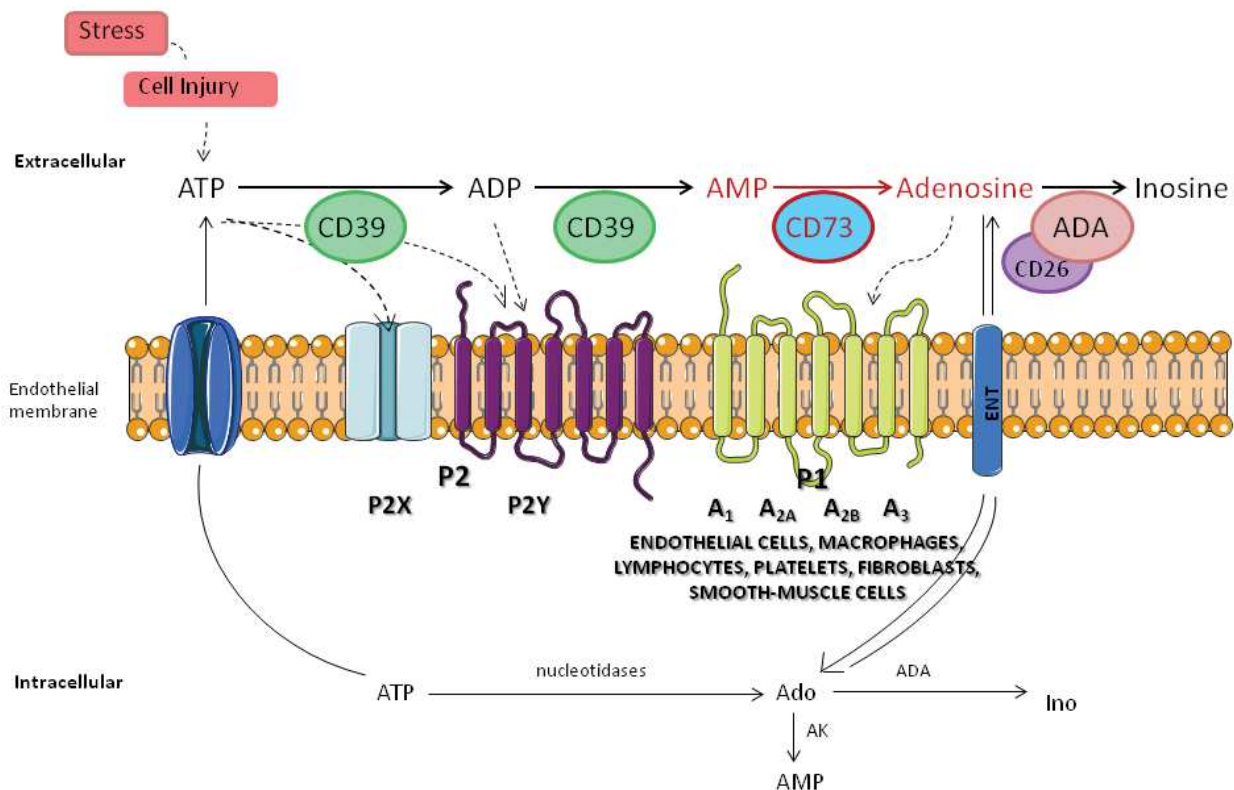
AMP present in the extracellular space is not only a substrate for ecto-5'-nucleotidase, but it can also be converted by other enzymes dephosphorylating nucleotides, primarily alkaline phosphatase, which is characterized by wide tissue distribution but shows a lower affinity for AMP<sup>36</sup>.



**Figure 1.** The structure of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in the cell membrane. Based on [27] with changes.

### 10.2.2. CD73 as part of the purinergic signaling

The primary function of CD73 is the dephosphorylation of AMP to adenosine. This enzyme is a part of an extracellular adenine nucleotide catabolism pathway, presented in **Figure 2**, in which also the membrane enzyme CD39 participates (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, eNTPD 1). CD39 hydrolyzed ATP and ADP to AMP and is the main source of AMP in the extracellular space. Extracellular degradation of nicotinamide dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) is also a source of AMP<sup>27, 36</sup>. Both CD39 and CD73 are activated by divalent ions present in the environment. The presence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions stimulates the faster hydrolysis of ATP, whereas in the AMP catabolism reaction the strongest activating effect is exhibited by Mg<sup>2+</sup> ions<sup>37</sup>. The conversion of adenosine to inosine is catalyzed by ecto-adenosine deaminase 1 (eADA 1). It takes part in the regulation of adenosine concentration, and its activity is disturbed in many pathological conditions. Research conducted at the Department of Biochemistry Medical University of Gdansk (MUG) showed the significantly higher activity of eADA1 in atherosclerosis, derived from activated endothelial cells and inflammatory cells infiltrating the vessel wall. Inhibition of this activity through the use of 2'-deoxycoformycin caused a slowdown in the development of the disease<sup>38-40</sup>.



**Figure 2. Extracellular catabolism of adenine nucleotides and adenosine**

### 10.2.2.1. Extracellular adenosine as an important signal molecule

Extracellular adenosine is considered a molecule with an important signaling role. In the extracellular space, its action is exerted by combining with specific adenosine receptors P1 coupled to the G protein (A1, A2a, A2b, and A3), located on the cell surface, including the cardiovascular system and the immune system cells<sup>18</sup>. Physiologically, in the extracellular environment adenosine is present at very low concentration (30 - 200 nM), stimulating low-affinity receptors (A1, A2a, A3)<sup>41</sup>. Its concentration increases under conditions of metabolic stress (even up to 100  $\mu$ M) caused, among others, by hypoxia, ischemia or the inflammation<sup>42</sup>. The A2b receptor, characterized by a much higher affinity for adenosine, is then activated<sup>41</sup>. The reason of the increase in extracellular adenosine concentration is the transport of adenosine from the cell, resulting from the increased degradation of intracellular ATP, but mainly from the activation of the extracellular catabolism of adenine nucleotides, which are released from the cells in response to pathological stimuli<sup>43</sup>. Extracellular adenosine is involved in the inhibition of inflammatory response, platelet aggregation, and LDL oxidation and - by regulating the process of osteoclast differentiation - in the reduction of bone resorption. It also reduces neutrophil pathological activity i.e. by inhibiting the production of free radicals. Adenosine also regulates lymphocyte migration across the endothelial barrier. It limits the infiltration of neutrophils into tissues, preventing their damage. In addition,

extracellular adenosine mediates the inhibition of the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ) and enhances the production of anti-inflammatory cytokines (IL-10) <sup>31</sup>.

### **10.2.3. The role of CD73 in vascular endothelial homeostasis**

Endothelial function is to maintain vascular homeostasis by balanced release of auto- and paracrine substance in response to physical chemical or biological stimuli. Endothelium plays an important role in regulating the vascular wall tension and regulating the acquired or innate immune response. Under the physiological conditions, endothelial cells - that form the innermost surface of the arterial wall - are resistant to the adhesion of leukocytes. The inflammatory process contributes to an increased expression of adhesion molecules by endothelial cells, what allows for binding of the leukocytes to the vessel wall. Leukocyte migration is primarily regulated by interactions between ligands on their surface and endothelial P- and E-selectins, as well as interactions between leukocytes surface integrins and adhesion molecules ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) and VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) <sup>44</sup>.

Ecto-enzymes, such as CD73, can act as adhesion molecules, but primarily they are involved in the regulation of immune cell adhesion by controlling leukocyte infiltration <sup>45</sup>. CD73 occurs on the surface of both, endothelial cells as well as lymphocytes. Data in the literature indicate that binding of leukocytes to endothelial cells is associated with inhibition of CD73 activity. However, the mechanism of this inactivation requires further studies <sup>46</sup>.

The extracellular adenosine, through affecting its receptors, may indirectly increase the endothelial cells barrier via - induced by the increase in cAMP - activation of protein kinase A, which may lead to the phosphorylation of proteins typical for the tight junction such as vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) <sup>47</sup>. It has been suggested that decreased adenosine concentration due to reduced CD73 activity leads to increased endothelial cell permeability, which in turn contributes to increased leukocyte migration. It is also known that lymphocyte adhesion to the endothelium "masks" endothelial CD73 activity. This process disrupts the extracellular catabolism of adenine nucleotides, which results in an increase in ATP concentration <sup>48</sup>. In addition, CD73 plays an important role in the regulation of coronary circulation by the production of adenosine, which in turn acts as a hyperpolarising factor of endothelial origin. Then, it mediates the relaxation of coronary arteries leading to the induction of vascular smooth muscle cells hyperpolarisation and relaxation via stimulation of adenosine receptors and potassium channels <sup>49</sup>.

### **10.2.4. The role of CD73 in the vessel and aortic valve pathologies**

Vascular endothelial dysfunction is present in the pathogenesis of all cardiovascular diseases. The definition of this disorder, in addition to the impaired vasodilatory capacity, also includes a co-existing inflammatory process, which may lead to the development of, among others, atherosclerosis by increasing endothelial cell permeability, increased expression of adhesion molecules, or intensive secretion of cytokines and chemokines. One of

the key mechanisms of endothelial dysfunction is a reduction in the bioavailability of nitric oxide, most likely due to oxidative stress<sup>50-52</sup>.

Literature reports concerning the role of CD73 in atherosclerosis are unclear. Monocytes adhesion to activated endothelium followed by endothelial migration is a key step in the early stages of atherosclerosis. Data available in the literature show that the monocyte adhesion in CD73<sup>-/-</sup> mice carotid arteries perfused *ex vivo* is significantly enhanced, and this pro-inflammatory effect is accompanied by a significant increase in VCAM-1 concentration, which is considered a marker of endothelial changes<sup>53</sup>. The deletion of CD73 also leads to an increase in the activation of Toll-like receptor 2 (TLR2), which can directly affect the induction of the inflammatory process<sup>54</sup>. On the other hand, it has been suggested that CD73 activity contributes to the development of atherosclerosis, stimulating the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells, as well as contributing to an increase in serum lipids<sup>55</sup>.

Literature data also indicate the importance of CD73 in the control of platelet aggregation. The role of CD73 in the pathophysiology of thrombosis has been studied on the carotid arteries of CD73 deletion mice that have been damaged by free radicals using FeCl<sub>3</sub>. Closure time (time taken by platelets to occlude the vessel lumen) was much shorter in CD73<sup>-/-</sup> mice compared to the control group. In addition, the bleeding time (time from skin wound to stopping of bleeding, after tail tip incision) was also about 35% shorter in CD73 deficient mice. These results suggest that the proper activity of ecto-5'-nucleotidase inhibits platelet aggregation and that its maintenance may constitute a new therapeutic strategy in the prevention of thrombosis<sup>56</sup>.

Vascular calcification, forming in the internal (intima) or middle (media) membrane of the vessel, is an important aspect of cardiovascular pathologies. Until recently, it was thought to be a degenerative change. However, the increasing number of evidence suggests that ectopic tissue calcification is the result of an active process reminiscent of bone remodeling<sup>57</sup>. It has been suggested that extracellular calcification is caused by the activation of specific biochemical pathways, and constant inhibition of these pathways can prevent this process. In patients with a mutation in the NT5E gene encoding CD73, researchers observed increased calcification of blood vessels. The enzymatic activity of this protein in fibroblasts of family members affected by this mutation was not observed<sup>58</sup>. Calcification depends largely on the concentration of pyrophosphate, which is a potent inhibitor of this process, and on the activity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), which breaks down pyrophosphate to inorganic phosphate – a calcification inductor. It has also been demonstrated that prolonged reduction of the extracellular adenosine concentration increases the TNAP activity. In contrast, the addition of adenosine to the culture environment of CD73 deficient cells reversed the effect of TNAP activity stimulation<sup>59</sup>. In addition, data available in the literature indicate that CD73 inhibition leads to the calcification of myocytes, and this effect can be suppressed by inhibiting TNAP activity<sup>60</sup>. These reports prove that the activity of CD73, and thus the product of its enzymatic activity, adenosine - can act as a negative regulator of tissue calcification - probably through the inhibition of TNAP.

One of the most common heart valve defects is aortic stenosis. Currently, despite the serious clinical consequences resulting from the development of this disease, the only effective way of treatment is valve replacement. The data in the literature suggest that the

inflammatory process promotes the development of aortic valve stenosis (as in the case of vascular calcification), regardless of the occurrence of anatomical abnormalities. Early changes that result in aortic stenosis are associated with an active inflammatory process involving the infiltration of T lymphocytes and macrophages, as well as lipid calcium deposition and basement membrane damage<sup>61</sup>. Damaged valves demonstrate the presence of mast cells and increased levels of pro-inflammatory cytokines: Il-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). The disturbances occurring in aortic valve leaflets are characterized by excessive expression of matrix metalloproteinases, which affect the extracellular matrix remodeling<sup>62</sup>.

Despite the studies cited earlier, the role of CD73 in aortic valve homeostasis is still unclear. There are results in the literature indicating the high level of ecto-nucleotidases in valvular disease. Ecto-5'nucleotidase was overexpressed in mineralized stenotic aortic valves<sup>63</sup>. In vitro experiments on osteoblast differentiation suggest that adenosine may induce mineralization<sup>63</sup>. The discrepancy with our conclusions could be a consequence of using only selected areas of the pathologically altered valves in this study. Histochemical analysis performed in the Biochemistry Department MUG showed demonstrated that in the pathologically altered valves the amount of CD73 protein was significantly reduced, with the exception of the calcified areas, which were characterized by an increased amount of CD73<sup>64</sup>. A compensatory mechanism for restoring the proper activity of this protein may be behind this. In addition, other results obtained at the Department of Biochemistry MUG showed a significantly reduced activity of CD73 in human calcified aortic valves compared to non-calcified<sup>65</sup>.

It was also observed that the addition of ATP or a synthetic P2Y receptor agonist to the environment of primary valvular interstitial cells (VIC) caused a similar course of osteoblast transformation to that caused by the osteogenic medium. In turn, the addition of adenosine to VIC cultured in an osteogenic medium led to a significant reduction in both activity and expression of alkaline phosphatase, which is one of the markers of calcification<sup>66</sup>. The role of changes in CD73 activity in vascular pathologies is described in more detail in the review which is part of the thesis ([Appendix - Paper A](#)).

#### **10.2.5. Activation of CD73 as a therapeutic strategy in cardiovascular diseases**

In recent years, significant progress in the development of new therapeutics used in cardiovascular diseases has been observed. However, cardiovascular disorders still cause about 50% of cases of premature death in the world. The main challenge is the introduction of new molecular targets for currently used therapies. As it results from the above-mentioned data, the CD73-dependent production of extracellular adenosine plays an important role in the regulation of the vascular barrier. Data available in the literature indicate the cardioprotective role of extracellular adenosine and the A2B receptor<sup>67</sup>. As a therapeutic strategy, the manipulation of CD73 enzymatic activity to increase the extracellular concentration of adenosine as well as activation of the A2B receptor was suggested. Pharmacological inhibition of CD73 activity or its genetic deletion reversed the cardioprotective effect of ischemic preconditioning. In turn, the administration of soluble 5'-nucleotidase had a similar protective effect for ischemic preconditioning. A significant reduction in the area affected by myocardial infarction was observed. It has also been found that the administration of soluble

5'-nucleotidase promotes normal vascular barrier function and reduces the neutrophil influx. In addition, it has been observed that the anti-inflammatory effects of low doses of methotrexate and sulfasalazine are mediated by extracellular adenosine. Both of these compounds lead to an increase in its concentration in the extracellular space, most likely through the activation of CD73<sup>68</sup>. This topic was further developed in the review paper which is part of the thesis (Appendix - Paper A).

As follows from the above considerations, the role of CD73 in cardiovascular diseases is still controversial. The explanation of the exact role of this protein in the development of aortic valve and vascular pathologies, as well as an attempt to clarify the mechanisms of its action are crucial and constitute the main goal of this thesis. The hypothesis assumes that the reduction of CD73 activity as well as local and systemic changes caused by this reduction may lead to the development of aortic valve and vessel wall pathologies. The explanation of the exact role of this protein in the development of aortic valve and vessel wall pathologies, as well as an attempt to find the mechanisms of this action are crucial and is the main goal of this doctoral dissertation.



## 11. AIMS

The aim of this work was to investigate the role of 5'-nucleotidase (CD73) in aortic valve and vessel wall pathology.

The specific aims included the evaluation of the effect of deletion of the CD73 encoding gene on:

1. Extracellular adenine nucleotide metabolism on the surface of the mouse aorta;
2. The function and structure of the mouse aortic valve;
3. Mineralization of the mouse aortic valve;
4. Development of vascular endothelial dysfunction in various age groups of mice;
5. Systemic changes of the mice metabolism.

## 12. RESEARCH MODELS AND TECHNIQUES

C57BL/6 mice with the CD73 deletion (CD73<sup>-/-</sup>) were used as an experimental model. Mice were created by removing from the CD73 gene structure "Phosphoesterase Signature Motive", i.e. a motif necessary for the normal function of the active site of this enzyme. CD73<sup>-/-</sup> mice do not differ in the anatomy and fertility from wild-type mice. 9-week-old CD73<sup>-/-</sup> and wild-type mice, hereinafter referred to as WT or control mice were used in the experiments. The animals were randomly assigned to the groups: CD73<sup>-/-</sup> and WT fed a standard diet and CD73<sup>-/-</sup> and WT fed a high-fat diet for 15 weeks. The high-fat diet contained 60% fat, while the standard diet was 10% fat. The high-fat diet is one of the established experimental models of vascular and valvular pathologies and has been used to compare its effects with those observed by the CD73 deletion<sup>69,70</sup>. CD73<sup>-/-</sup> mice on a high-fat diet were used to verify the hypothesis that CD73 deletion leads to exacerbation of already existing abnormalities.

To evaluate the effect of CD73 deletion on aortic valve mineralization and the development of age-dependent endothelial dysfunction, 1-, 3-, 6- and 12-month CD73<sup>-/-</sup> and WT mice fed with a standard diet were used.

The activities of ecto-enzymes of adenine nucleotide and adenosine catabolism were determined on the aortic surface, by incubation with substrates suitable for each of the enzymes: adenosine for eADA, ATP for CD39 and AMP for CD73. An adenosine deaminase inhibitor EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine) was added during the hydrolysis of ATP and AMP analysis. During the evaluation of the contribution of alkaline phosphatase (ALP) and CD73 in vascular hydrolysis of AMP, the aortic fragments were incubated with the addition of AMP as a substrate, and appropriate inhibitors: EHNA, levamisole (ALP inhibitor) and  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene-ADP (AOPCP) - (CD73 inhibitor). In the incubation environment, ATP, ADP, AMP and adenosine concentrations were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). Enzymatic activities were normalized to the aortic surface estimated using the ImageJ 1.48v program and are shown as nmol/min/cm<sup>2</sup>.

In order to determine the effect of the CD73 activity deficiency on the aortic valve function, echocardiographic measurements were made using the Doppler ultrasound. Aortic valve area (AVA) and left ventricular ejection fraction (LVEF), as well as the maximum velocity of blood flow through the aortic valve (V<sub>max</sub>), was analyzed.

For the histological evaluation of mouse aortic valves, stainings for the presence of calcium deposits (alizarin red) and fibrin clots (combination of stainings - orcein + MSB (Martius, Scarlet and Blue) were used. Results of the morphometric analysis were performed as the average leaflet thickness and leaflet area ratio.

In order to evaluate the effects of ATP and adenosine on ALP activity in the investigated valves, the *ex vivo* calcification model of the aortic valve was used. Aortic valves obtained from 6-month-old CD73<sup>-/-</sup> mice were incubated for 72 h in an osteogenic medium

supplemented with ATP (100  $\mu$ M) or adenosine (50  $\mu$ M), and then ALP activity was measured colorimetrically in tissue homogenates.

The NOS enzymatic activity was measured fluorimetrically in endothelial cells isolated from the lungs of 2-month-old CD73 - / - mice and WT.

In addition, research techniques included: high performance liquid chromatography with mass spectrometry (determination of adenosine and amino acids concentration), immuno-enzymatic tests (evaluation of markers related to inflammation and endothelium activation, as well as endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein level), colorimetric methods (arginase activity, nitric oxide metabolites, total antioxidant status (TAOS)) and standard biochemical tests (blood glucose concentration, lipid profile).

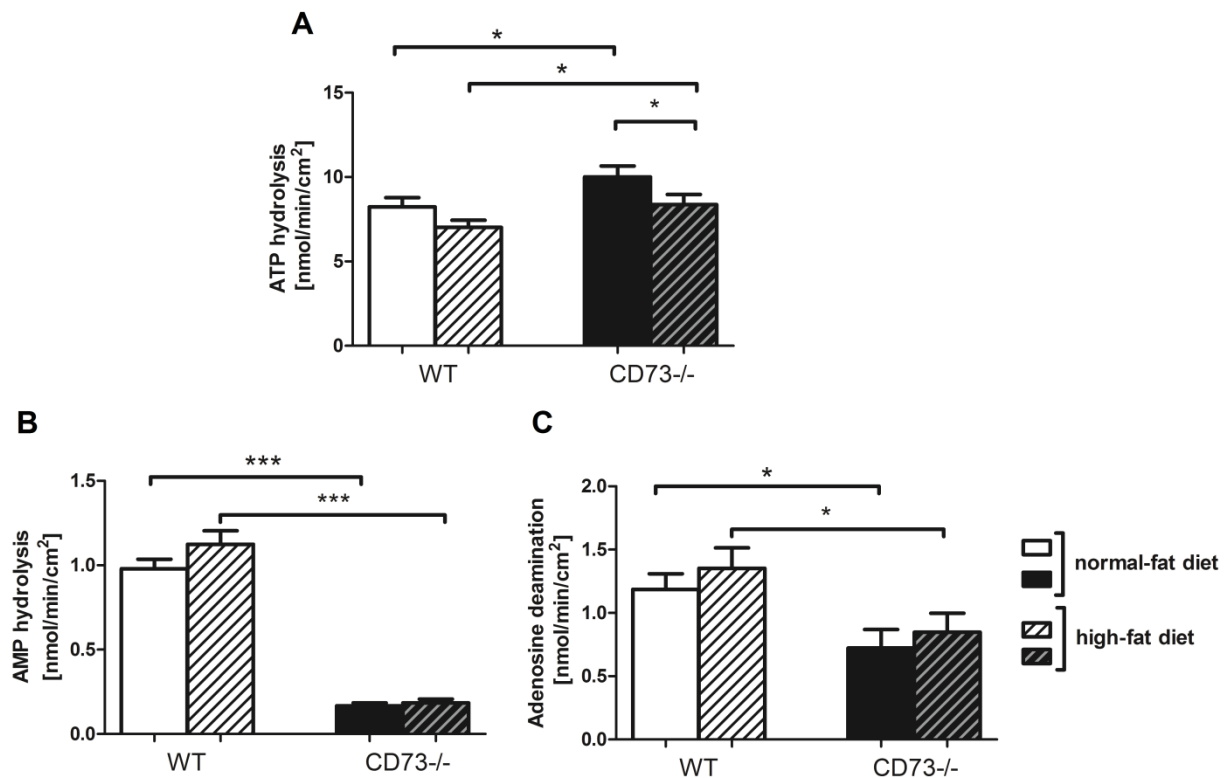
### 13. THE MOST IMPORTANT RESULTS

#### 13.1. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on extracellular adenine nucleotide metabolism on the aortic surface

Activities of adenine nucleotide and adenosine catabolism ecto-enzymes: ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73) and ecto-adenosine deaminase (eADA) were evaluated on the aortic surface of CD73-/- and WT mice fed standard or high-fat diet.

The deletion of CD73 caused almost complete inhibition of AMP conversion to adenosine on the aortic surface (**Figure 3B**, Paper B - Figure 1B). There were no statistically significant changes in the AMP hydrolysis under the influence of a high-fat diet. The lack of CD73 activity affected also the activities of other enzymes involved in the extracellular catabolism of adenine nucleotides. CD39 activity was increased on the surface of the CD73 -/- mice aorta as compared to WT. The high-fat diet reduced ATP hydrolysis in both study groups (**Figure 3A**, Paper B - Figure 1A). In addition, a significantly decreased adenosine deamination rate on the surface of the CD73 - / - mouse aorta was observed in comparison to controls, regardless of the diet (**Figure 3C**, Paper B - Figure 1C).

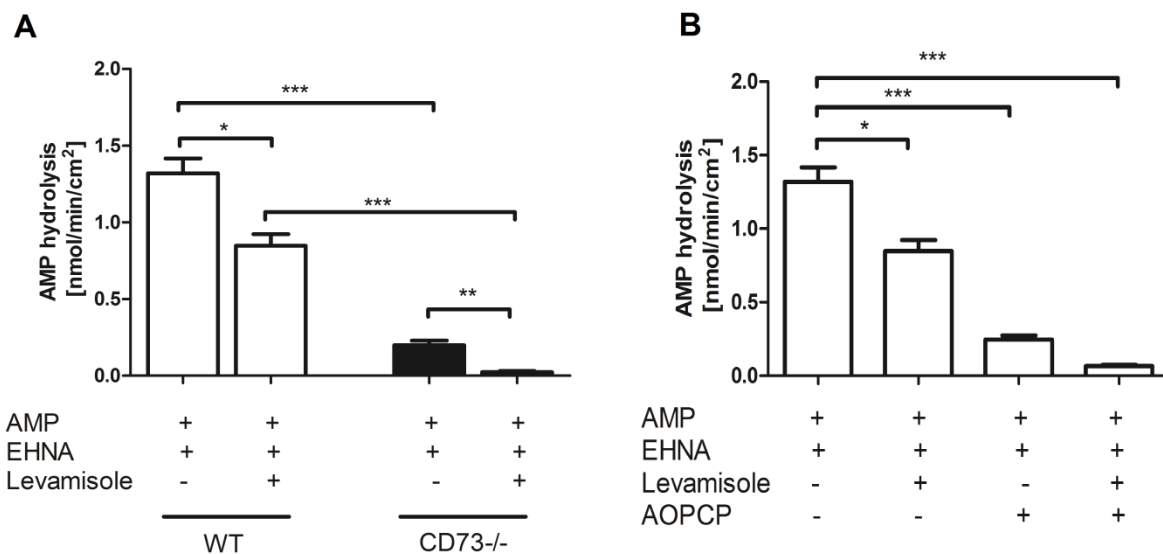
The changes observed in the ATP hydrolysis and adenosine deamination on the aortic surface were caused by a significant decrease in CD73 activity. At this stage of the studies, the role of increased CD39 activity on the aortic surface of the CD73 - / - mice and the associated degradation of pro-inflammatory ATP and pro-aggregative ADP, released from endothelial cells, as well as the role of AMP accumulation in the extracellular environment are not fully clarified . In turn, the decreased activity of eADA is most likely caused by the low concentration of its substrate - extracellular adenosine, due to the lack of its production by CD73.



**Figure 3. Deletion of CD73 inhibited the conversion of AMP to adenosine on the aortic surface. An increased CD39 activity and a decreased eADA activity are secondary changes due to the almost complete inhibition of CD73 activity.** ATP hydrolysis (A); AMP hydrolysis (B); adenosine deamination (C) on the surface of the CD73<sup>-/-</sup> and WT mice on standard or high-fat diet. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 21, statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test, \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001); [Appendix - Paper B](#)

The participation of alkaline phosphatase (ALP) in the AMP hydrolysis on the surface of the CD73<sup>-/-</sup> and WT mice aorta was also determined. Based on the conducted studies with the use of levamisole, it can be concluded that ALP is responsible for only about 30% of AMP hydrolysis. The remaining conversion of AMP to adenosine is due to CD73 activity (**Figure 4A**, [Paper B - Figure 2A](#)). The level of AMP hydrolysis was less than 4% of control when both activities were inhibited (**Figure 4B**, [Paper B - Figure 2B](#)).

The Km values of CD73 for AMP are in the low micromolar range and is significantly lower (several orders of magnitude) than the Km value of ALP for AMP, and the extracellular concentration of AMP does not exceed micromolar values, even under severe stress<sup>27</sup>. The obtained results clearly showed that the participation of ALP in AMP hydrolysis on the surface of the aorta is small and CD73 is the main enzyme responsible for this conversion.



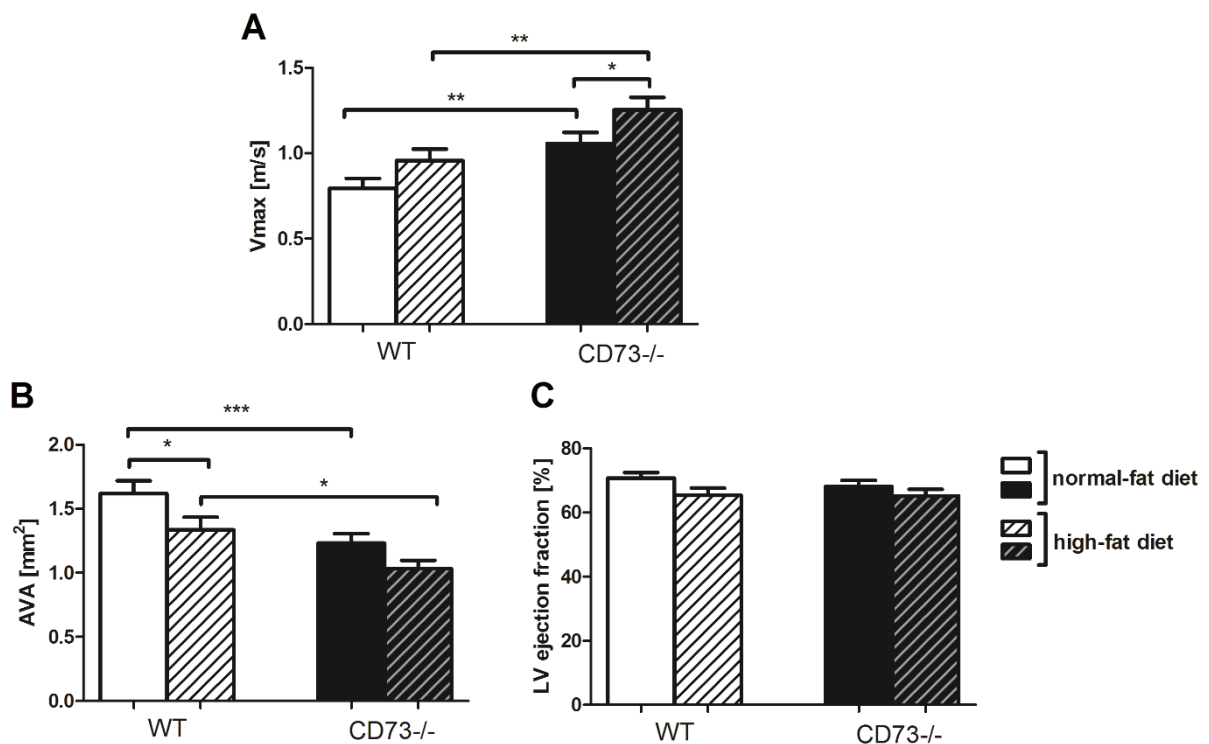
**Figure 4. CD73, not alkaline phosphatase (ALP) is the major enzyme responsible for the vascular conversion of AMP to adenosine.** A) Hydrolysis of AMP on the surface of the CD73 <sup>-/-</sup> and WT mice aorta in the presence and absence of levamisole; B) The participation of CD73 and ALP in the hydrolysis of AMP on the WT mice aortic surface in the presence and absence of levamisole and AOPCP. All values are expressed as mean ± SEM (n = 10; statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test (A) or one-way ANOVA with post-hoc Sidak test (B); \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001); Appendix - Paper B

### 13.2. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the function and structure of the mouse aortic valve

Aortic stenosis includes inflammation, fibrosis and calcification of the aortic valve leaflets. All of these processes may be affected by disturbances of the extracellular nucleotides metabolism pathway. In the next stage of the thesis, the role of CD73 in the development of aortic valve dysfunction was evaluated.

Doppler ultrasound examinations showed that CD73 <sup>-/-</sup> mice were characterized by a significant increase in the maximal aortic valve flow velocity (**Figure 5A**, Paper B - Figure 3A) and a significantly smaller aortic valve area (**Figure 5B**, Paper B - Figure 3B). It was also observed that LVEF is normal in CD73 deficient mice and does not differ from controls (**Figure 5C**, Paper B - Figure 3C), which suggests that the observed disturbances of the aortic valve blood flow velocity result from aortic valve dysfunction itself. These observations are consistent with clinical data indicating the normal value of LVEF in most patients with aortic stenosis <sup>71</sup>. The changes caused by the CD73 deletion were close to those observed in WT mice on a high-fat diet and are similar to those found in the early stages of aortic valve stenosis in humans.

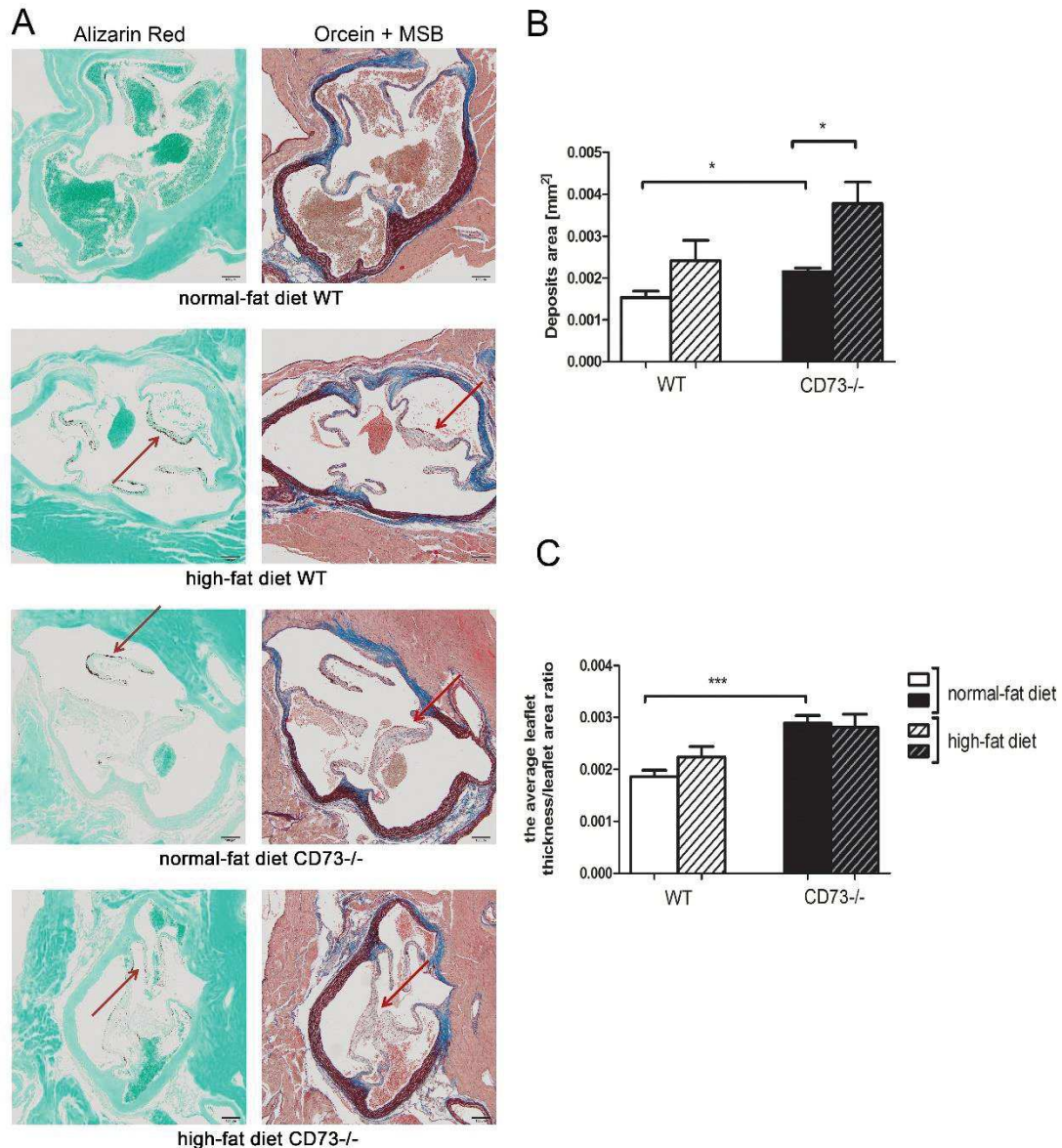
The obtained results indicate a significant contribution of the decreased CD73 activity in the development of aortic stenosis.



**Figure 5. Elevated peak aortic flow (Vmax) and decreased aortic valve area (AVA), with preserved left ventricular ejection fraction (LVEF) in CD73<sup>-/-</sup> mice.** Echocardiographic parameters: A) Vmax; B) AVA; C) LVEF. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 21, statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test, \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001); [Appendix - Paper B](#)

In addition, the changes observed in the morphology of the investigated aortic valves confirm the development of their dysfunction. Histological analysis showed thickening of the CD73<sup>-/-</sup> mice valve leaflets (**Figure 6A**, Paper B - Figure 4A). It was also observed that the aortic valves of the CD73 deficient mice were characterized by the presence of dark deposits, and within the vicinity of these deposits, the valve walls tended to be thickened. Almost twice increased the accumulation of deposits was observed in animal groups fed a high-fat diet, both CD73<sup>-/-</sup> and WT (**Figure 6B**, Paper B - Figure 4C). A more detailed analysis of the deposits proved that it is melanin. Data from the literature indicate that melanocytes are involved in the valve reconstruction and remodeling of the aortic valve and their accumulation affects its stiffness<sup>72</sup>. Morphometric measurements of the valve leaflets thickness and the area and amount of melanotic deposits emphasize structural as well as functional abnormalities in CD73 deficient mice, especially those fed a high fat-diet (**Figure 6C**, Paper B - Figure 4C). The alizarin red staining did not show the presence of calcium deposits in the tested valves. Lack of observation of calcium deposits in the valves may result from differences in their anatomical structure compared to human valves as well as from the lower sensitivity of histological analysis in comparison with chemical methods.

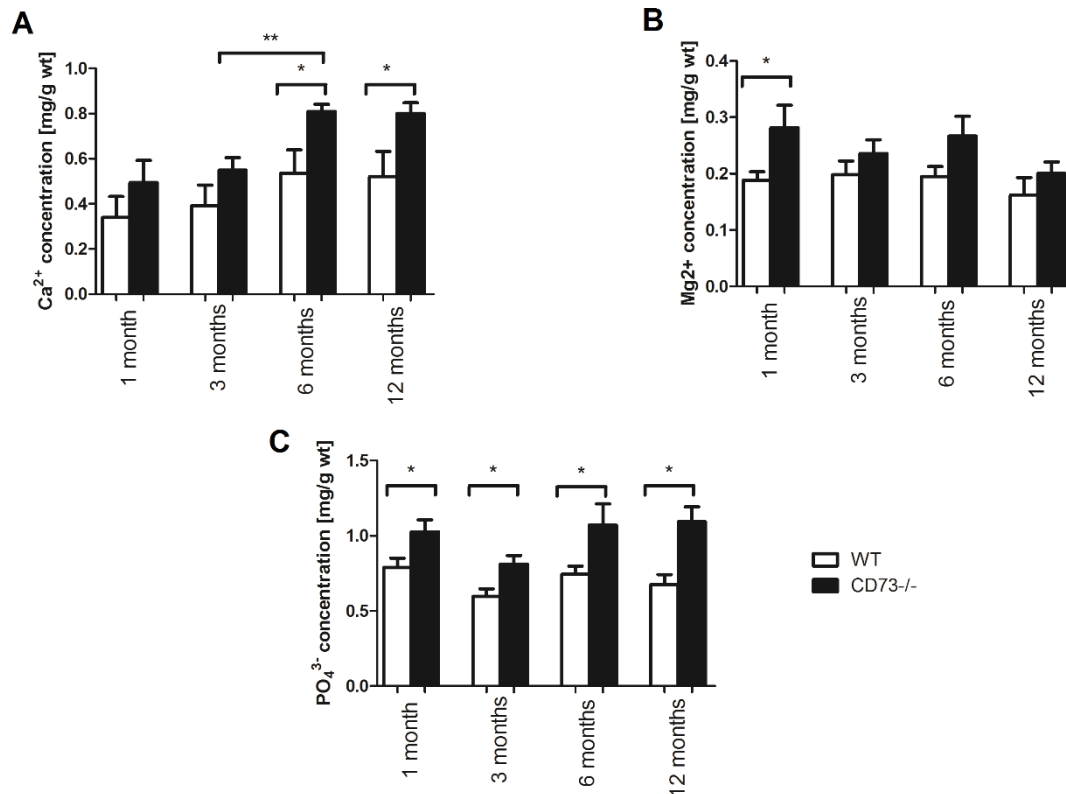
The obtained results clearly showed that the lack of CD73 activity leads to the development of aortic valve dysfunction in mice, confirmed by disturbances of its structure and proper function.



**Figure 6. The deletion of CD73 leads to morphological and structural changes in aortic valves.** A) Histological images of aortic valves of WT and CD73<sup>-/-</sup> mice on a standard and high-fat diet. The following stainings were used: alizarin red and orcein with Martius Scarlet Blue staining. The arrows indicate the changes in the valves: thickening and melanin accumulation areas; B) Melanin deposits area; C) the average aortic valve leaflet thickness/ leaflet area ratio as a standardized measurement of the valve leaflets thickness. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 21, statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test, \* p <0.05; \*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001); Appendix - Paper B

### 13.3. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the mineralization of the mouse aortic valve

The effect of the CD73 deficiency on valvular mineralization was determined using spectrophotometric methods. The concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  were measured in the aortic valves of 1-, 3-, 6- and 12-month-old CD73<sup>-/-</sup> and WT mice. Chemical analysis showed a significantly increased concentration of the above-mentioned ions in the CD73<sup>-/-</sup> mouse valves. In addition, the calcium and phosphate content increased with the age of animals (**Figure 7**, Paper B - Figure 4B).



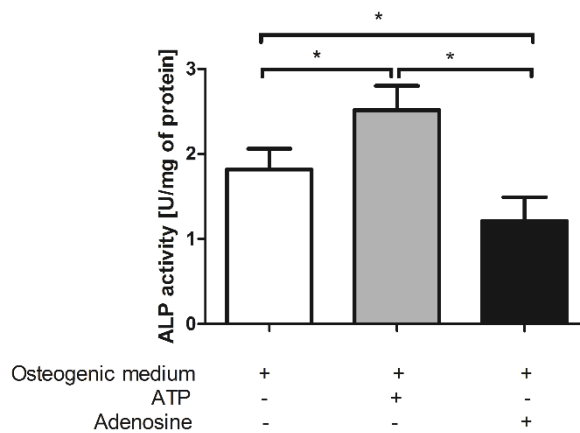
**Figure 7. Increased concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  in the aortic valves of CD73<sup>-/-</sup> mice confirm their pro-calcification phenotype.** Concentration A)  $\text{Ca}^{2+}$ ; B)  $\text{Mg}^{2+}$  and C)  $\text{PO}_4^{3-}$  in aortic valves of CD73<sup>-/-</sup> and WT mice at 1, 3, 6 and 12 months of age. All values are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 5; statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with post-hoc Holm-Sidak test; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001); Appendix - Paper B

The tissue mineralization is a consequence of not only local but also general factors including an inflammation. Considering the above results, the loss of anti-inflammatory properties of adenosine, due to the lack of CD73 activity, may lead to the activation of mineralization. In addition, recent studies have demonstrated the development of vascular calcification in immunocompromised transgenic mice following exposure on induced pluripotent stem cells (iPSCs) from the CD73 deficient patients<sup>73, 74</sup>. These results support the direct association of CD73 with ectopic calcification.

In addition, the effects of extracellular ATP and adenosine on ALP activity in the *ex vivo* calcification model of the aortic valve were investigated. The results showed that incubation of CD73<sup>-/-</sup> mice valves in an osteogenic medium with the addition of ATP caused a significant increase in ALP activity in these valves compared to incubation only in the osteogenic medium. On the other side, incubation of CD73<sup>-/-</sup> mouse valves in an osteogenic



medium with the addition of adenosine led to a significant reduction in ALP activity (**Figure 8, Paper B - Figure 5**).



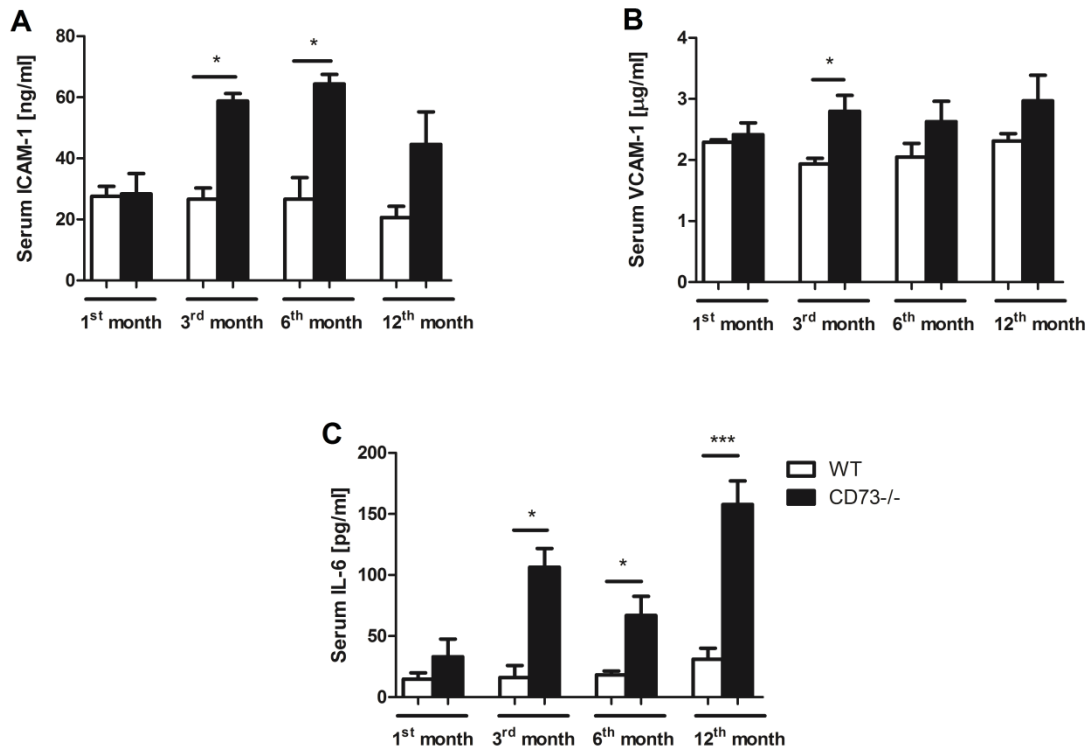
**Figure 8. Increased ALP activity in the presence of ATP, and decreased in the presence of adenosine in the aortic valves of CD73 <sup>-/-</sup> mice incubated in an osteogenic medium.** All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 4; statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with post-hoc Holm-Sidak test; \* p <0.05; \*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001); Appendix - Paper B

Many studies have demonstrated a direct relationship between ALP and calcification. It is known that inhibition of ALP activity prevents an increase in the osteonectin expression and calcium deposits in VIC incubated in osteogenic medium <sup>75</sup>. Experiments carried out in this part of the thesis suggest that extracellular ATP and adenosine play an important role in the control of calcification, and CD73 is directly related to the process of ectopic calcification.

#### 13.4. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the development of age-dependent endothelial dysfunction

Endothelial dysfunction underlies all cardiovascular diseases, and its development is most often due to mechanisms associated with active inflammation, but also reduced bioavailability of nitric oxide. Nitric oxide is produced predominantly in endothelial cells as a product of the conversion of L-arginine by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) <sup>76</sup>. The previously mentioned literature reports have demonstrated the effect of reduced CD73 activity on endothelial cell permeability impairment. This work presents investigations that deepen the knowledge about the role of CD73 in the development of endothelial cell dysfunction.

To assess the development of inflammation and confirm the pro-inflammatory phenotype of the CD73 deficient animals, the concentrations of adhesion molecules, associated with endothelium activation - ICAM-1, VCAM-1, and IL-6 were measured in the 1-, 3-, 6-, and 12-month-old CD73<sup>-/-</sup> and WT mice serum. The deletion of the CD73 gene caused a significant increase in both ICAM-1 and VCAM-1 concentrations, as well as a significant increase in the IL-6 cytokine concentration. This pro-inflammatory phenotype of CD73<sup>-/-</sup> mice intensified with the age of animals (**Figure 9, Paper C - Figure 1**).



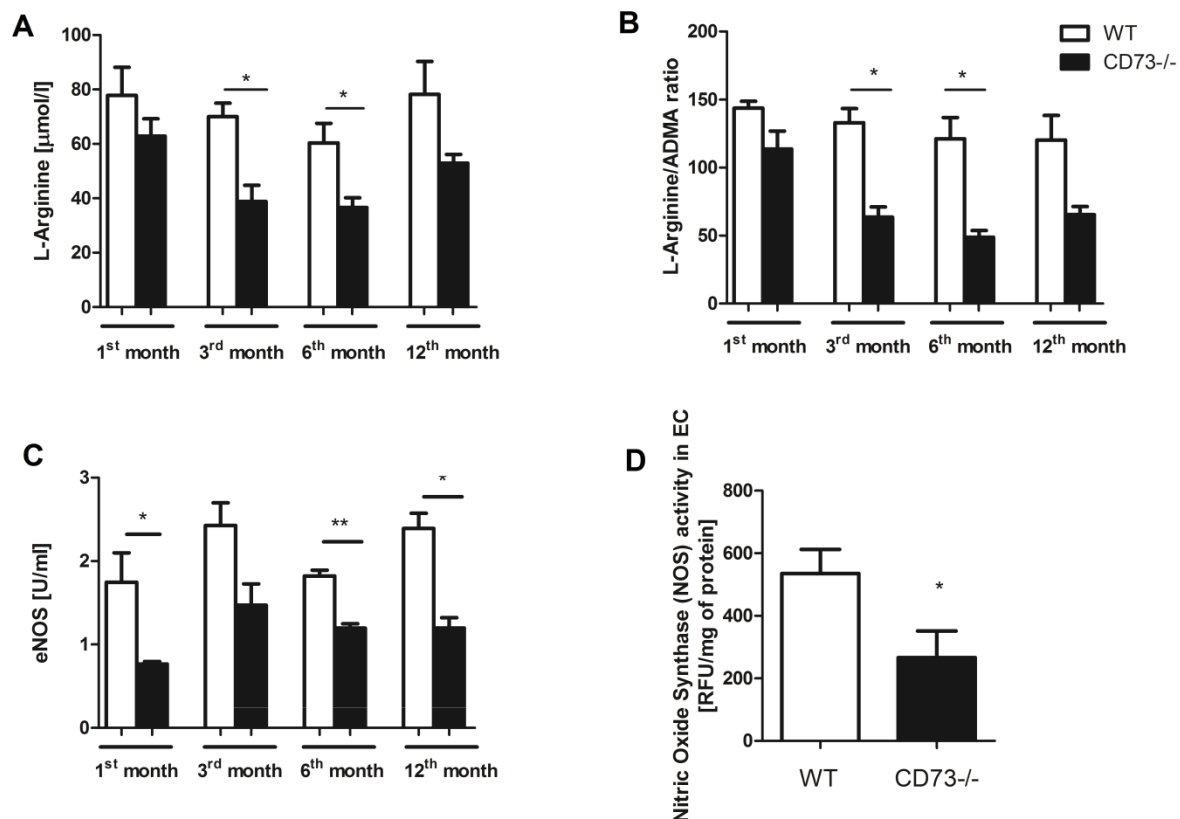
**Figure 9. The increase of pro-inflammatory IL-6 and adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 suggest endothelial activation, as well as the pro-inflammatory phenotype of CD73<sup>-/-</sup> mice.** Concentrations of A) IL-6; B) ICAM-1 and C) VCAM-1 in the serum of CD73<sup>-/-</sup> mice and WT at 1, 3, 6 and 12 months of age. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5, statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test, \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001); [Appendix - Paper C](#)

An active inflammatory process can stimulate the expression of ICAM-1 and VCAM-1 molecules in endothelial cells, what promotes the adhesion of leukocytes to the vessel wall and their transmigration to peripheral tissues. Data available in the literature indicate an increase in vascular leakage caused by hypoxia in the lungs, heart or kidneys. An active inflammatory process can stimulate the expression of ICAM-1 and VCAM-1 molecules in endothelial cells, which promotes the adhesion of leukocytes to the vessel wall and their transmigration to peripheral tissues. Data available in the literature indicate an increase in vascular leakage caused by hypoxia in the lungs, heart or kidneys, in response to the suppression of CD73 activity, in response to suppression of CD73 activity<sup>31</sup>. In addition, in vitro coculture experiments with endothelial cells and T lymphocytes showed that genetic deletion of CD73 enhances the transendothelial migration of T lymphocytes and increases the expression of TNF- $\alpha$ , VCAM-1, and IFN- $\gamma$ <sup>77</sup>. The reports quoted above and the results presented in this part of the thesis clearly suggest that CD73 plays an important role in maintaining the endothelial barrier.

One of the possible mechanisms of endothelial dysfunction development is the impairment of L-arginine metabolism, and thus the nitric oxide production. In endothelial cells, nitric oxide is produced from L-arginine by eNOS. This molecule is a key regulator of vasodilatation and endothelial homeostasis. In addition, it plays an important role in the regulation of macrophage cytotoxicity and platelet aggregation. Since L-arginine is the only substrate for the eNOS-catalyzed reaction, its availability is critical in controlling the production of nitric oxide<sup>78,79</sup>.

Therefore, the concentration of L-arginine, the level of eNOS protein in serum, as well as the activity of NOS in endothelial cells isolated from the lungs of CD73<sup>-/-</sup> mice and WT were analyzed. Furthermore, considering that asymmetric dimethylarginine (ADMA) is the most important endogenous eNOS inhibitor that competes with L-arginine for binding in the active site of the enzyme significantly reducing the production of nitric oxide, the L-arginine/ADMA concentration ratio was measured<sup>80</sup>. Data from the literature indicate a high concentration of ADMA observed in the serum of patients with vascular pathologies<sup>81</sup>.

CD73 deficient mice were characterized by a significantly lower concentration of L-arginine and the amount of eNOS in the serum, regardless of age. In addition, age-dependent decrease in L-Arginine/ADMA concentrations - a parameter strongly associated with endothelial dysfunction was observed (**Figure 10A and 10B**, Paper C - Figure 2A and 2B). Moreover, significantly reduced NOS activity was observed in endothelial cells of CD73<sup>-/-</sup> mice as compared to the control group (**Figure 10C and 10D**, Paper C - Figure 2C and 2D).

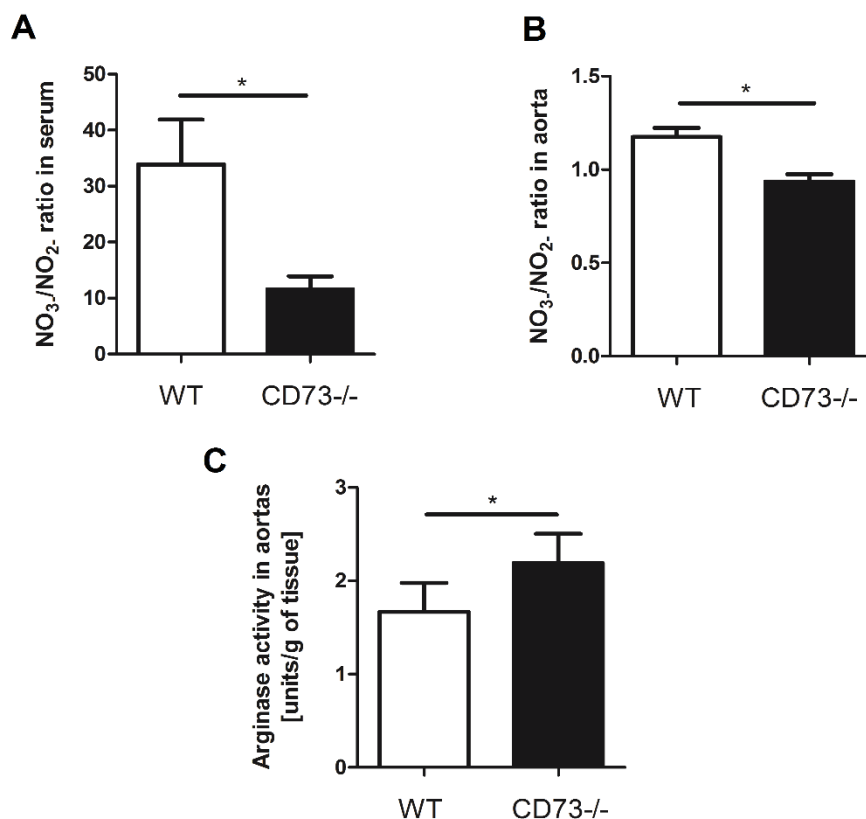


**Figure 10. Lower serum L-arginine concentration and NOS activity in endothelial cells indicate the development of endothelial dysfunction in CD73 deficient mice.** A) L-arginine concentration; B) L-arginine/ADMA concentration ratio and C) eNOS protein level in the serum of CD73<sup>-/-</sup> and WT mice at 1, 3, 6 and 12 months of age. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5; statistical analysis

was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). D) NOS activity in EC isolated from the lungs of 2-month-old CD73<sup>-/-</sup> mice and WT. Values are shown as mean  $\pm$  SEM (n=3 - for each activity measurement, 5 technical repetitions were analyzed for both of the studied groups, statistical analysis was performed using Student's t-test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ); [Appendix - Paper C](#)

The observed reduced activity of NOS in endothelial cells indicates a disorder of nitric oxide production. Due to the inability to reliably determine the concentration of nitric oxide itself, the concentrations of its metabolites - nitrates and nitrites in the serum as well as in the aorta of 6-month old CD73<sup>-/-</sup> mice and WT were measured. Results showed that the nitrate/nitrite concentrations ratio was significantly reduced in both, serum and aorta of CD73<sup>-/-</sup> mice as compared to WT (**Figure 11A and 11B**, [Paper C - Figure 4A and 4B](#)).

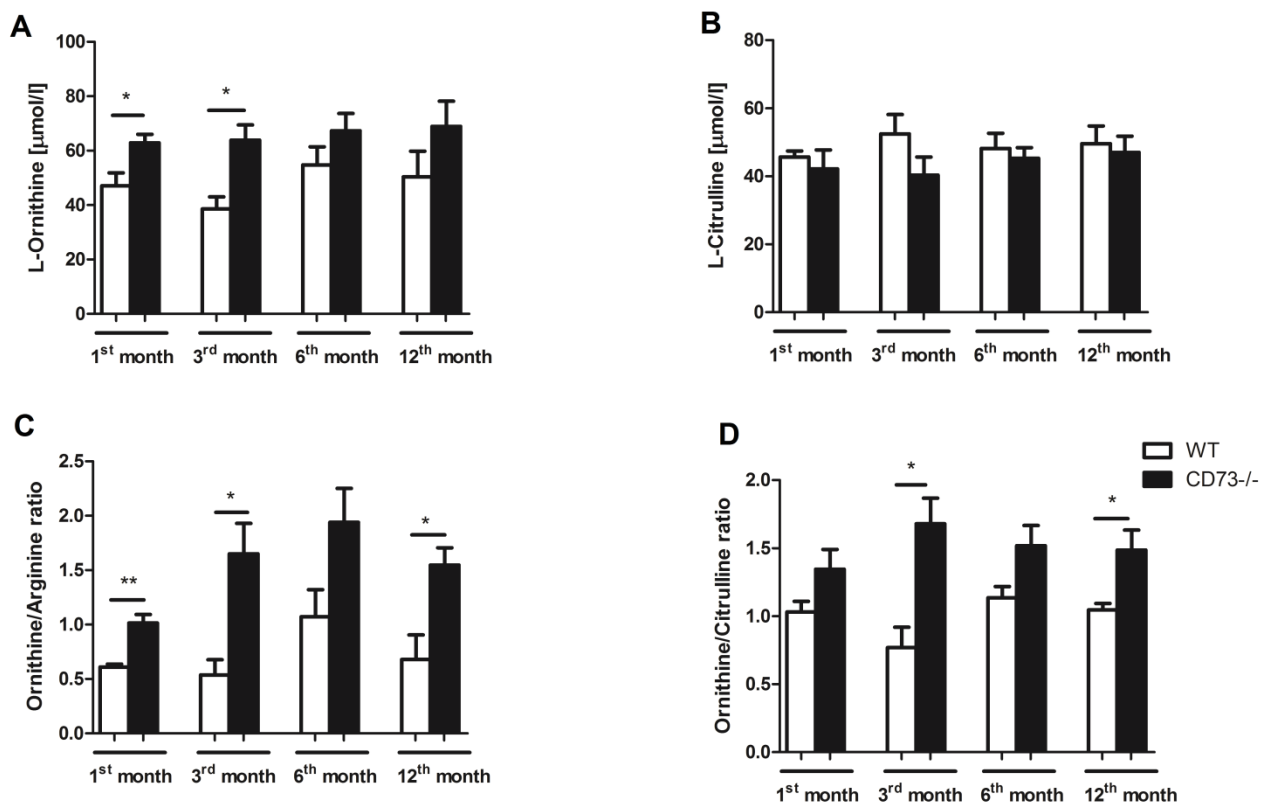
Moreover, one of the causes of the decreased concentration of L-arginine may be an increase in the arginase activity, responsible for the conversion of L-arginine to L-ornithine and urea. Thus, its activity in the aortas of the studied animals was measured. Significantly higher arginase activity in the CD73<sup>-/-</sup> mice aorta was also observed in comparison to the control group (**Figure 11 C**, [Paper C - Figure 4C](#)).



**Figure 11. Disrupted synthesis of nitric oxide in CD73 deficient mice, as indicated by a reduced nitrate/nitrite ratio in serum and aorta. Higher arginase activity as a probable cause of decreased L-arginine concentration.** The nitrate/nitrite ratio in A) serum; B) aorta, as well as C) arginase activity in the aorta of 6-month old CD73<sup>-/-</sup> and WT mice. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5, statistical analysis was performed using Student's t-test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ); [Appendix - Paper C](#)

The above results confirm the development of endothelial dysfunction in CD73 deletion mice. This disturbance intensifies with the age of animals.

In the next step, it was investigated whether the increase in arginase activity caused changes in other metabolites of L-arginine, taking part in the urea cycle. All age groups of CD73<sup>-/-</sup> mice were characterized by elevated serum L-ornithine concentration compared to the control group. There was no significant difference in the concentration of L-citrulline between the studied groups. However, significantly increased ratios of L-ornithine /L-arginine and L-ornithine / L-citrulline concentrations were observed as compared to the control (Figure 12, Paper C - Figure 5). Similar observations have been previously reported in patients with macrovascular complications (including atherosclerosis of the lower limbs), as a consequence of type 2 diabetes, which is one of the inflammatory diseases<sup>82</sup>.



**Figure 12. Increased L-ornithine/L-arginine and L-ornithine/L-citrulline ratio in the serum of CD73<sup>-/-</sup> mice.** Concentrations of A) L-ornithine; B) L-citrulline as well as C) L-ornithine/L-arginine and D) L-ornithine/L-citrulline ratio in the serum of CD73<sup>-/-</sup> and WT mice at 1, 3, 6 and 12 months of age. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5, statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test, \* p <0.05; \*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001); Appendix - Paper C

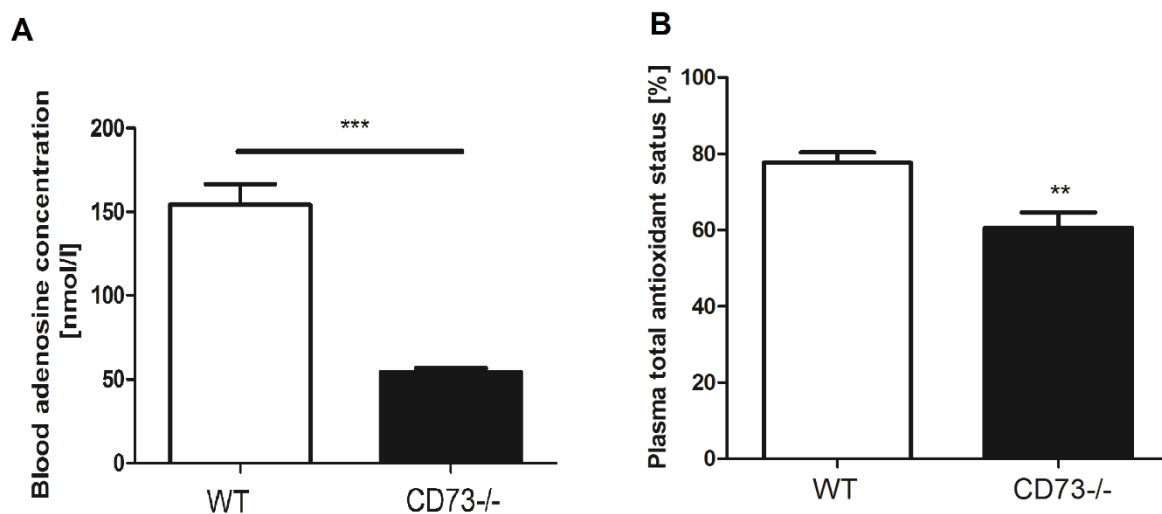
Considering the above data, the results presented in this part of the study clearly indicate that the age-dependent endothelial dysfunction in CD73<sup>-/-</sup> mice is associated with impaired L-arginine metabolism and nitric oxide synthesis. It is known, that impaired production of nitric oxide leads to vasoconstriction, leukocyte adhesion, and oxidative stress. Oxidative stress itself can also disrupt the production and activity of nitric oxide via its inactivation by free radicals and reduction of the tetrahydrobiopterin availability, which is cofactor required for nitric oxide synthesis<sup>83</sup>. CD73<sup>-/-</sup> mice were characterized by an age-

dependent increase in serum IL-6. Data in the literature showed that elevated levels of IL-6 may affect the reduction of eNOS activity by increasing the binding between eNOS and caveolin-1, a caveolae scaffold protein that inhibits eNOS<sup>84</sup>.

### 13.5. The effect of the ecto-5'-nucleotidase gene deletion on the systemic changes of the mice metabolism.

Another aspect of the thesis was the analysis of the impact of CD73 activity deficiency on systemic metabolism. The results obtained earlier indicate that the reduction of adenosine availability contributed to the development of inflammation in the aortic valves and vessels of CD73<sup>-/-</sup> mice, and thus - to systemic disorders. The processes that contribute to the development of most vascular pathologies, such as inflammation or endothelial damage, are closely related to oxidative stress. One of the parameters determining the overall antioxidant status is the total antioxidant status in plasma (TAOS).

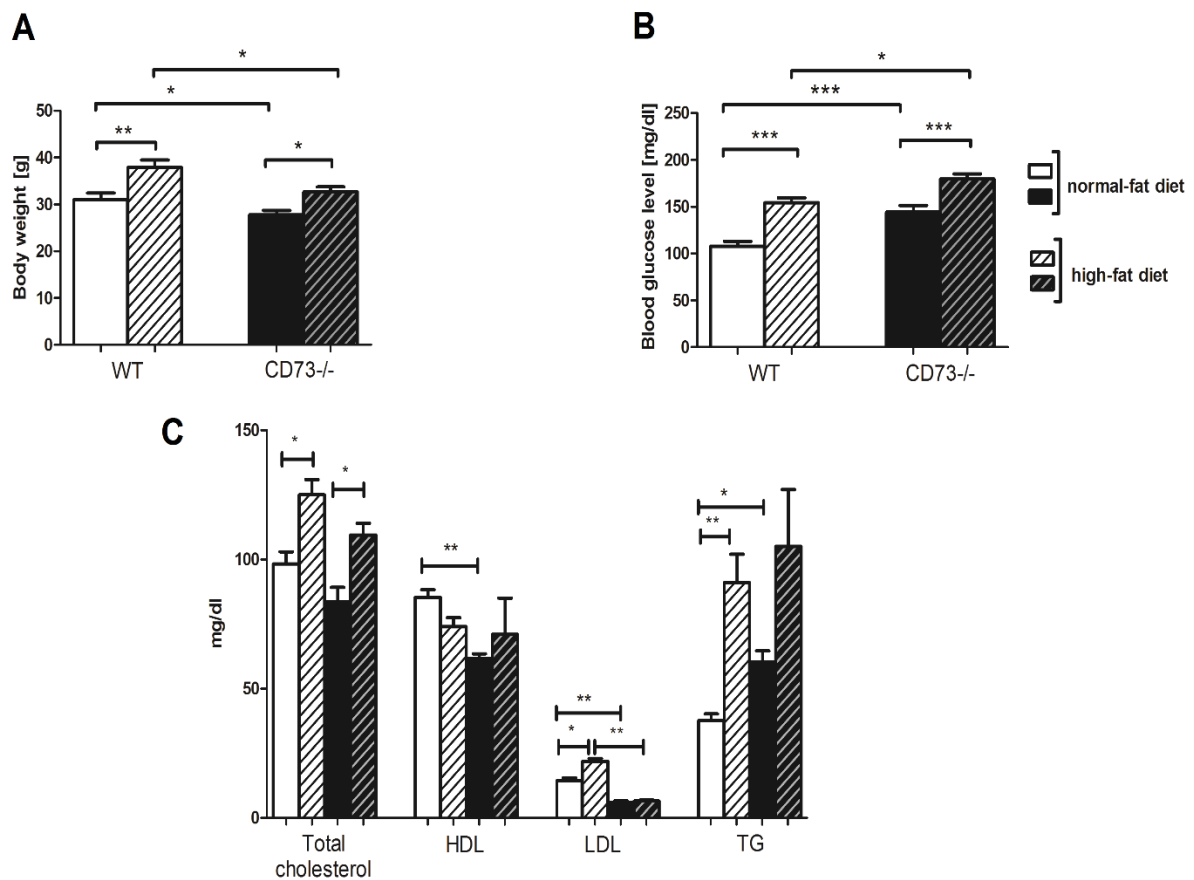
The total antioxidant status was approximately 25% lower in comparison to WT (Figure 13B, Paper B - Figure 6B). The concentration of adenosine in the whole blood of CD73<sup>-/-</sup> mice was also examined. The adenosine concentration in CD73<sup>-/-</sup> mice was significantly lower compared to WT (Figure 13A, Paper B - Figure 6A).



**Figure 13. Decreased level of total antioxidant status (TAOS) in plasma and adenosine concentration in the blood of CD73 deficient mice.** A) Concentration of adenosine in the whole blood; B) The level of TAOS in the plasma of 6-month old CD73<sup>-/-</sup> and WT mice. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 21, statistical analysis was performed using Student's t-test; \* p <0.05; \*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001); Appendix - Paper B

The reduced level of TAOS suggests an increase in the number of free radicals, and thus oxidative stress. A higher amount of reactive oxygen species may be caused by both, their increased production, but also by the impairment of their degradation. The mechanism of this increase requires further research. However, the data available in the literature also confirm the results presented above and link the activity of CD73 and the production of adenosine with antioxidant activity<sup>85</sup>.

Purinergic signaling plays an important role in the processes underlying aortic stenosis, endothelial dysfunction, but also in lipid and carbohydrate metabolism. Disturbances of lipid and carbohydrate metabolism may lead to the initiation of a pro-inflammatory signal cascade, which may contribute to the activation of leukocytes and the stimulation of the inflammation. The body weight, blood glucose concentration and lipid profile of CD73<sup>-/-</sup> and WT mice on a standard and high-fat diet were, therefore, measured. It has been shown that genetically modified mice are characterized by a lower weight than WT mice. Even under the influence of a high-fat diet, the weight gain of the CD73<sup>-/-</sup> mice was about 30% lower than in the control group. In addition, CD73<sup>-/-</sup> mice had an elevated blood glucose concentration and a disturbed lipid profile as compared to the control (**Figure 14**, Paper B - Figure S2).



**Figure 14. Lower weight gain and increased blood glucose concentration in CD73<sup>-/-</sup> mice. Changes in the lipid profile in CD73 deficient mice.** A) Body weight B) blood glucose concentration and C) lipid profile of CD73<sup>-/-</sup> and WT mice. All values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 21, statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with post-hoc Tukey test, \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001); Appendix - Paper B

Adenosine plays an important role as lipolysis inhibitor. The decrease in its concentration may lead to increased hydrolysis of triacylglycerols to glycerol and free fatty acids. Data available in the literature also indicate that CD73 deficient mice are characterized by a lower content of white adipose tissue and increased concentration of free fatty acids in serum<sup>86</sup>. The high level of free fatty acids may lead to reactive oxygen species generation, as

well as to the activation of TNF- $\alpha$  and IL-6 via the IKK/NF- $\kappa$ B inflammatory signaling and thus contribute to the endothelial cells damage<sup>87</sup>.

The research carried out as part of the doctoral thesis showed that the lack of CD73 activity causes thickening of the aortic valve leaflets, activation of valve mineralization and its functional disorder, similar to aortic stenosis. This data clearly suggest that CD73 activity is important for maintaining normal aortic valve function. The conducted studies indicate that mice with a deletion of the gene encoding CD73 may be a good model of aortic valve dysfunction and the vessel wall. The results obtained in this thesis also confirm the concept of the key role of CD73 activity in endothelial homeostasis. For the first time, they combine endothelial cell dysfunction that develops in CD73<sup>-/-</sup> mice with impaired L-arginine metabolism and nitric oxide production. The realization of this thesis has contributed to the broadening of knowledge in the field of vascular and valvular pathologies, and obtained results may form the basis of a new therapeutic strategy in the future.



## 14. CONCLUSIONS

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

1. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is crucial in the extracellular AMP to adenosine conversion on the aortic surface, and the activities of other enzymes, such as alkaline phosphatase, play only a minor role in it. The deletion of CD73 leads to changes in the activity of other enzymes involved in the extracellular catabolism of nucleotides on the aortic surface - an increase in CD39 activity and a decrease in the activity of ecto-adenosine deaminase.
2. The deletion of the CD73 encoding gene leads to the development of aortic valve dysfunction in mice. CD73 plays an essential role in maintaining the structure and proper function of the aortic valve.
3. The lack of CD73 activity leads to an increase in the calcification markers level in aortic valves such as calcium, magnesium, and phosphates as well as an increase in alkaline phosphatase activity.
4. Deletion of the CD73 encoding gene leads to the development of age-dependent endothelial dysfunction in mice associated with impaired L-arginine metabolism.
5. The lack of CD73 activity and the significantly lower concentration of adenosine in the extracellular space leads to oxidative stress and an increase in the concentration of proinflammatory cytokines, which indicates the development of systemic inflammation.

## 15. PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES

1. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Podstawy biologii komórki. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1999.
2. Illes P, Klotz KN, Lohse MJ. Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;**362**:295-298.
3. Pelley J, Goljan E. Rapid Review Biochemistry 3<sup>rd</sup> edition ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007:68-75.
4. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972;**24**:509-581.
5. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 1976;**62**:491-503.
6. Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Składanowski AC. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* 2006;**53**:269-278.
7. Ferrier DR. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemia. Wolters Kluwer, 2017.
8. Kailing LL, Bertinetti D, Herberg FW, Pavlidis IV. A coupled photometric assay for characterization of S-adenosyl-l-homocysteine hydrolases in the physiological hydrolytic direction. *N Biotechnol* 2017;**39**:11-17.
9. Palmer JL, Abeles RH. Mechanism for enzymatic thioether formation. Mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* 1976;**251**:5817-5819.
10. Komoszyński M, Wojtczak A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1310**:233-241.
11. Park J, Gupta RS. Adenosine kinase and ribokinase--the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci* 2008;**65**:2875-2896.
12. Singh LS, Sharma R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *Mol Cell Biochem* 2000;**204**:127-134.
13. Ford H, Dai F, Mu L, Siddiqui MA, Nicklaus MC, Anderson L, Marquez VE, Barchi JJ. Adenosine deaminase prefers a distinct sugar ring conformation for binding and catalysis: kinetic and structural studies. *Biochemistry* 2000;**39**:2581-2592.
14. Mills GC, Schmalstieg FC, Trimmer KB, Goldman AS, Goldblum RM. Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;**73**:2867-2871.
15. Kriz W. Adenosine and ATP: traffic regulators in the kidney. *J Clin Invest* 2004;**114**:611-613.
16. Eltzschig HK. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology* 2009;**111**:904-915.
17. Kumar V, Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* 2009;**616**:7-15.
18. Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 1997;**79**:2-10.
19. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 1999;**5**:216-224.
20. Sala-Newby GB, Newby AC. Cloning of a mouse cytosolic 5'-nucleotidase-I identifies a new gene related to human autoimmune infertility-related protein. *Biochim Biophys Acta* 2001;**1521**:12-18.
21. Świeca-Maćkowska A, Świątkowska-Freund M, Klimek J, Kaletha K. Catabolism of adenine nucleosides in human placenta. *Ann Acad Med Gedan* 2007;**37**:137-142.
22. Ipata PL, Tozzi MG. Recent advances in structure and function of cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase II (cN-II). *Purinergic Signal* 2006;**2**:669-675.
23. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 1992;**285** ( Pt 2):345-365.

24. Bianchi V, Spychala J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem* 2003;**278**:46195-46198.
25. Gallinaro L, Crovatto K, Rampazzo C, Pontarin G, Ferraro P, Milanese E, Reichard P, Bianchi V. Human mitochondrial 5'-deoxyribonucleotidase. Overproduction in cultured cells and functional aspects. *J Biol Chem* 2002;**277**:35080-35087.
26. Sträter N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal* 2006;**2**:343-350.
27. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 2012;**8**:437-502.
28. Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer* 2016;**2**:95-109.
29. James S, Richardson PJ. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J Neurochem* 1993;**60**:219-227.
30. Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millán JL, Usheva A, Bingham T, Belderbos M, Bergelson I, Burl S, Kampmann B, Gelinás L, Kollmann T, Bont L, Levy O. Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem* 2013;**288**:27315-27326.
31. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006;**2**:351-360.
32. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 2004;**200**:1395-1405.
33. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemelä J, Laurila JP, Elima K, Jalkanen S, Salmi M. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol* 2011;**41**:1231-1241.
34. Garavaglia S, Bruzzone S, Cassani C, Canella L, Allegrone G, Sturla L, Mannino E, Millo E, De Flora A, Rizzi M. The high-resolution crystal structure of periplasmic *Haemophilus influenzae* NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism. *Biochem J* 2012;**441**:131-141.
35. Resta R, Hooker SW, Laurent AB, Jamshedur Rahman SM, Franklin M, Knudsen TB, Nadon NL, Thompson LF. Insights into thymic purine metabolism and adenosine deaminase deficiency revealed by transgenic mice overexpressing ecto-5'-nucleotidase (CD73). *J Clin Invest* 1997;**99**:676-683.
36. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, D'Arena G, Coscia M, Tripodo C, Inghirami G, Robson SC, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood* 2011;**118**:6141-6152.
37. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1783**:673-694.
38. Kutryb-Zajac B, Zukowska P, Toczek M, Zabielska M, Lipinski M, Rybakowska I, Chlopicki S, Slominska EM, Smolenski RT. Extracellular nucleotide catabolism in aortoiliac bifurcation of atherosclerotic ApoE/LDLr double knock out mice. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2014;**33**:323-328.
39. Zabielska M, Kutryb-Zajac B, Żukowska P, Slominska E, Smoleński R. Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1 $\beta$ -D-ribose on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> mice. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2016;**35**:720-725.
40. Kutryb-Zajac B, Mateuszuk L, Zukowska P, Jaształ A, Zabielska MA, Toczek M, Jablonska P, Zakrzewska A, Sitek B, Rogowski J, Lango R, Slominska EM, Chlopicki

- S, Smolenski RT. Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovasc Res* 2016;**112**:590-605.
41. Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res* 2010;**316**:1284-1288.
  42. Cronstein BM. Adenosine receptors and wound healing, revised. *ScientificWorldJournal* 2006;**6**:984-991.
  43. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 2014;**66**:102-192.
  44. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *Biomed Res Int* 2014;**2014**:801896.
  45. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 2013;**19**:355-367.
  46. Henttinen T, Jalkanen S, Yegutkin GG. Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003;**278**:24888-24895.
  47. Jalkanen S, Salmi M. VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:18-26.
  48. Yegutkin GG, Henttinen T, Samburski SS, Szychala J, Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J* 2002;**367**:121-128.
  49. Ohta M, Toyama K, Gutterman DD, Campbell WB, Lemaître V, Teraoka R, Miura H. Ecto-5'-nucleotidase, CD73, is an endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;**33**:629-636.
  50. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006;**5**:4.
  51. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 2003;**108**:2054-2059.
  52. Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 2003;**5**:473-480.
  53. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 2003;**101**:2661-2666.
  54. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:508-519.
  55. Yang J, Jian R, Yu J, Zhi X, Liao X, Zhou P. CD73 regulates vascular smooth muscle cell functions and facilitates atherosclerotic plaque formation. *IUBMB Life* 2015.
  56. Koszalka P, Ozüyan B, Huo Y, Zerneck A, Flögel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sévigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Gödecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004;**95**:814-821.
  57. Cannata-Andia JB, Roman-Garcia P, Hruska K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrol Dial Transplant* 2011;**26**:3429-3436.
  58. St Hilaire C, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, Carlson-Donohoe H, Lederman RJ, Chen MY, Yang D, Siegenthaler MP, Arduino C, Mancini C, Freudenthal B, Stanescu HC, Zdebik AA, Chaganti RK, Nussbaum RL, Kleta R, Gahl WA, Boehm M. NT5E mutations and arterial calcifications. *N Engl J Med* 2011;**364**:432-442.
  59. Hesse L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millan JL. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane

- glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:9445-9449.
60. Gan XT, Taniai S, Zhao G, Huang CX, Velenosi TJ, Xue J, Urquhart BL, Karmazyn M. CD73-TNAP crosstalk regulates the hypertrophic response and cardiomyocyte calcification due to  $\alpha$ 1 adrenoceptor activation. *Mol Cell Biochem* 2014;**394**:237-246.
  61. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994;**90**:844-853.
  62. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003;**107**:2181-2184.
  63. Mahmut A, Boulanger MC, Bouchareb R, Hadji F, Mathieu P. Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. *Cardiovasc Res* 2015.
  64. Kaniewska E, Sielicka A, Sarathchandra P, Pelikant-Małecka I, Olkiewicz M, Słomińska EM, Chester AH, Yacoub MH, Smoleński RT. Immunohistochemical and functional analysis of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) in pig aortic valves. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2014;**33**:305-312.
  65. Kutryb-Zajac B, Jablonska P, Srocki M, Bulinska A, Mierzejewska P, Friebe D, Alter C, Jaształ A, Lango R, Rogowski J, Bartoszewski R, Slominska E, Chlopicki S, Schrader J, Yacoub M, Smolenski R. Special distribution of valvular nucleotide metabolism ecto-enzymes in calcific aortic valve disease and its clinical correlations. *Clinical Research in Cardiology* 2019;*in press*
  66. Osman L, Chester AH, Amrani M, Yacoub MH, Smolenski RT. A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification: a potential target for atorvastatin. *Circulation* 2006;**114**:I566-572.
  67. Eckle T, Krahn T, Grenz A, Köhler D, Mittelbronn M, Ledent C, Jacobson MA, Osswald H, Thompson LF, Unertl K, Eltzhig HK. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* 2007;**115**:1581-1590.
  68. Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, Balter L, Thompson LF, Resta R, Carlin G, Huie MA, Cronstein BN. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 1998;**101**:295-300.
  69. Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:850-855.
  70. Jung JJ, Razavian M, Kim HY, Ye Y, Golestani R, Toczek J, Zhang J, Sadeghi MM. Matrix metalloproteinase inhibitor, doxycycline and progression of calcific aortic valve disease in hyperlipidemic mice. *Sci Rep* 2016;**6**:32659.
  71. Hachicha Z, Dumesnil JG, Bogaty P, Pibarot P. Paradoxical low-flow, low-gradient severe aortic stenosis despite preserved ejection fraction is associated with higher afterload and reduced survival. *Circulation* 2007;**115**:2856-2864.
  72. Balani K, Brito FC, Kos L, Agarwal A. Melanocyte pigmentation stiffens murine cardiac tricuspid valve leaflet. *J R Soc Interface* 2009;**6**:1097-1102.
  73. Joolharzadeh P, St Hilaire C. CD73 (Cluster of Differentiation 73) and the Differences Between Mice and Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;**39**:339-348.
  74. St. Hilaire C, Hui J, Huang Y, Yu Z, Yang D, Negro A, Liu Y, Davaine J-M, Schwartzbeck R, Chen G, Boehm M. In Vivo Disease Modeling Using Patient-Derived iPSCs: CD73-Deficiency Promotes Osteogenic Differentiation and

- Calcification. In: 2016. PSCIIaIMTT-AB, ed. Purinergic Signaling, Purinergic Signaling. Cancer Immunotherapy: Immunity and Immunosuppression Meet Targeted Therapies - Abstract Book 2016. ed. Vancouver, British Columbia, Canada.: Purinergic Signaling. Cancer Immunotherapy: Immunity and Immunosuppression Meet Targeted Therapies - Abstract Book 2016., 2016:72.
75. Mathieu P, Voisine P, Pépin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis* 2005;**14**:353-357.
  76. Kamada Y, Nagaretani H, Tamura S, Ohama T, Maruyama T, Hiraoka H, Yamashita S, Yamada A, Kiso S, Inui Y, Ito N, Kayanoki Y, Kawata S, Matsuzawa Y. Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance. *J Clin Invest* 2001;**108**:717-724.
  77. Hasegawa T, Bouïs D, Liao H, Visovatti SH, Pinsky DJ. Ecto-5' nucleotidase (CD73)-mediated adenosine generation and signaling in murine cardiac allograft vasculopathy. *Circ Res* 2008;**103**:1410-1421.
  78. Jamwal S, Sharma S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders. *Inflamm Res* 2018;**67**:391-405.
  79. Rodrigues-Krause J, Krause M, Rocha IMGD, Umpierre D, Fayh APT. Association of L-Arginine Supplementation with Markers of Endothelial Function in Patients with Cardiovascular or Metabolic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2018;**11**.
  80. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev* 2010;**6**:82-90.
  81. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:2032-2037.
  82. Kövamees O, Shemyakin A, Pernow J. Amino acid metabolism reflecting arginase activity is increased in patients with type 2 diabetes and associated with endothelial dysfunction. *Diab Vasc Dis Res* 2016;**13**:354-360.
  83. d'Uscio LV, Milstien S, Richardson D, Smith L, Katusic ZS. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2003;**92**:88-95.
  84. Hung MJ, Cherng WJ, Hung MY, Wu HT, Pang JH. Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells. *J Hypertens* 2010;**28**:940-951.
  85. Le Hir M, Kaissling B. Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine. *Am J Physiol* 1993;**264**:F377-387.
  86. Burghoff S, Flögel U, Bongardt S, Burkart V, Sell H, Tucci S, Ikels K, Eberhard D, Kern M, Klötting N, Eckel J, Schrader J. Deletion of CD73 promotes dyslipidemia and intramyocellular lipid accumulation in muscle of mice. *Arch Physiol Biochem* 2013;**119**:39-51.
  87. Ghosh A, Gao L, Thakur A, Siu PM, Lai CWK. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci* 2017;**24**:50.