

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ LEKARSKI

mgr inż. Anna Maria Gdula

OCENA WPŁYWU
AGONISTÓW RECEPTORÓW ADENOZYNOWYCH I
ANTAGONISTÓW RECEPTORÓW P2Y
NA FUNKCJONOWANIE KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

The effect of adenosine receptor agonists and P2Y receptor antagonists on
the functioning of endothelial cells

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor: prof. dr hab. Maria Świątkowska
Promotor pomocniczy: dr Marta Stasiak

Praca wykonana w Zakładzie Cytobiologii i Proteomiki oraz
Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
Katedry Nauk Biochemicznych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Łódź 2021

STRESZCZENIE

Komórki śródbłonka odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu fundamentalnych procesów zachodzących w układzie sercowo-naczyniowym. Badania naukowe przeprowadzone w ciągu ostatnich dwóch dekad wykazały, że wiele z tych zdarzeń jest regulowanych przez receptory nukleotydowe, odpowiednio P1, aktywowane adenozyzną oraz P2, wzbudzone przez nukleotydy purynowe i pirymidynowe.

Zarówno ADP, ATP jak i adenozyzna odgrywają istotną rolę w kontroli przepuszczalności warstwy komórek śródbłonka, hemostazie naczyniowej, stanie zapalnym, a także aktywacji i agregacji płytek krwi. Endogenne nukleotydy mogą być uwalniane do środowiska zewnątrzkomórkowego w wyniku lizy komórek, egzocytozy, transportu przez kanały błonowe oraz w efekcie autokrynnej ścieżki sygnalizacyjnej. Z kolei, zakotwiczone w błonie komórek śródbłonka enzymy CD39 i CD73, przeprowadzają metabolizm ATP, hydrolizując go do ADP, AMP i adenozyzny. A zatem, stężenie pozakomórkowych nukleotydów jest zależne od działania śródbłonka naczyniowego, który w ten sposób reguluje funkcjonowanie płytek krwi. Powszechnie wiadomo, że ich nadreaktywność determinuje występowanie zdarzeń zakrzepowozatorowych, które wciąż stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Pomimo istnienia licznych rozwiązań terapeutycznych, znaczny odsetek pacjentów wykazuje oporność wobec standardowego leczenia. W szczególności, są to osoby, u których występują choroby współistniejące, jak na przykład cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze. Problem wydaje się jeszcze trudniejszy w obliczu trwającej pandemii COVID-19 wywołanej drugim koronawirusem zespołu ostrej niewydolności oddechowej SARS-CoV-2. Zaobserwowano bowiem, że jednym z powikłań, będącym główną przyczyną śmierci jest ciężka dysfunkcja śródbłonka prowadząca do zakrzepicy żyłnej.

W obliczu niezadawalającej skuteczności terapeutycznej zasadne jest poszukiwanie nowych rozwiązań, wpływających nie tylko na aktywność płytek krwi, ale również modulujących funkcjonowanie śródbłonka naczyniowego. Zważając na doniesienia naukowe sugerujące udział receptorów adenozynowych, w szczególności podtypów A_{2A} i A_{2B} , w efekcie przeciwalkrepcyjnym, obiecująca wydaje się koncepcja dwutorowa, która polega na jednoczesnym blokowaniu receptora $P2Y_{12}$ i stymulacji wybranych receptorów P1. Takie działanie miałyby na celu wzmocnić przeciwpłytkowy

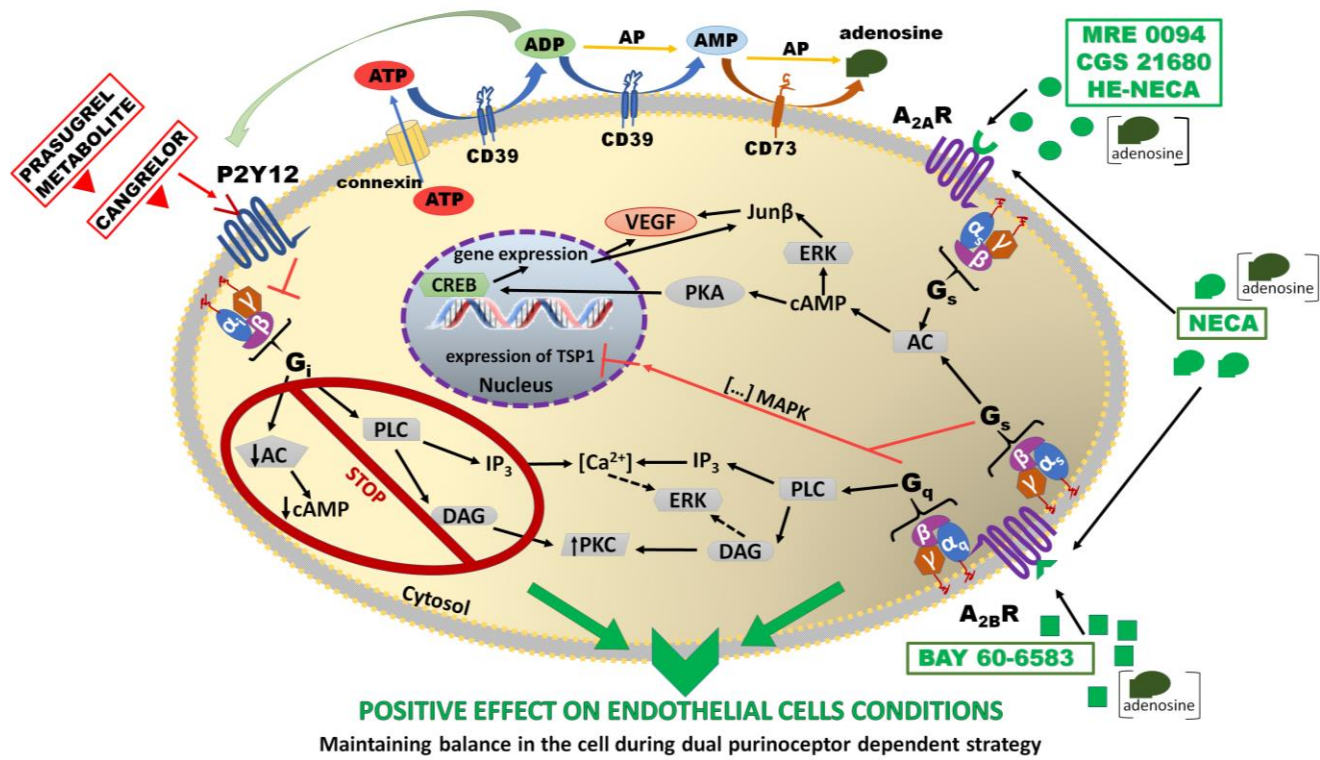
efekt wywołany antagonizacją receptora P2Y₁₂, poprzez dodatkową aktywację receptorów adenozytowych.

Receptory A_{2A}, A_{2B} jak i P2Y₁₂ ulegają ekspresji w komórkach śródbłonna naczyniowego. Biorąc to pod uwagę, poza zbadaniem efektu płytkowego wywołanego przez nowe podejście terapeutyczne, równie istotne wydaje się zweryfikowanie jego wpływu na funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego (Rycina 1). Zważając na liczne ścieżki sygnalizacyjne związane z aktywacją purynoceptorów, jak również występujące pomiędzy nimi współzależności, podczas oceny proponowanej koncepcji dualnej należy posłużyć się kompleksowymi badaniami dotyczącymi modulacji hemostazy naczyniowej, angiogenezy oraz stanu zapalnego.

W rozprawie doktorskiej zaprezentowałam wyniki badań prowadzonych w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek śródbłonna naczyń włosowatych skóry (HMEC-1). Ich dysfunkcja wiąże się z rozwojem licznych nieprawidłowości w układzie krążenia. Z tego powodu, podczas realizacji niniejszej pracy badawczej koncentrowałam się przede wszystkim na efektach działania agonistów receptorów adenozytowych P1 i antagonistów receptorów nukleotydowych P2Y₁₂, w kontekście najważniejszych procesów zachodzących z udziałem śródbłonna naczyniowego. Za cel pracy obrałam ocenę zmian kluczowych czynników, które determinują przebieg angiogenezy, hemostazy naczyniowej oraz stanu zapalnego, w odpowiedzi na testowane związki stosowane pojedynczo lub zgodnie z założeniami koncepcji dualnej (tj. jednoczesna aplikacja agonisty P1R i antagonisty P2Y₁₂R). Przeprowadziłam analizę: czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), trombospondyny-1 (TSP-1), syntazy tlenu azotu (eNOS), endoteliny-1 (ET-1), VCAM-1 i ICAM-1 na poziomach ekspresji genu (PCR), białka (Western Blot) i sekrecji (ELISA) jak również określiłam poziom fosforylowanych białek: receptora 2 dla VEGF (VEGFR-2) oraz kinazy stanowiące kluczowe przetworniki sygnału: ogniskowo-adhezyjną (p-FAK) i p-src. Ponadto dokonałam weryfikacji zmian funkcji barierowej monowarstwy komórek śródbłonna naczyniowego (analiza ECIS[®]), a także dwa badania funkcjonalne: test zarastania rasy (ang. *Wound healing*) i analizę tworzenia struktur sferycznych, które pozwoliły ocenić aktywność angiogenną HMEC-1.

Uzyskane rezultaty wykazały, że poszczególni agoniści P1R wywołują różne efekty, uwarunkowane specyficzną strukturą cząsteczek oraz siłą oddziaływania z

określonym podtypem receptora. Związkiem, który najsilniej modulował funkcjonowanie komórek śródbłonna naczyniowego był MRE0094, zaś nieco słabszy efekt przypadał w udziale NECA i UK-432,097. Pozostali agoniści receptora adenozynowego nie wpływali znacząco na zmianę badanych czynników. W doświadczeniach prowadzonych zgodnie z założeniami koncepcji dualnej zaobserwowałam nadzwyczajne zjawisko. Mianowicie wykazałam, że podwyższona ekspresja oraz uwalnianie VEGF, a także proangiogenne efekty będące wynikiem działania wybranych agonistów P1R, uległa istotnemu zmniejszeniu w odpowiedzi na blokowanie receptora P2Y₁₂, podczas gdy efekty odnotowane dla samych antagonistów P2Y₁₂R nie różniły się znacząco wobec tych uzyskanych w grupie komórek nietraktowanych. Ponadto we wspomnianych układach dualnych odnotowałam znaczący spadek tempa migracji komórek HMEC-1 oraz obniżoną zdolność do formowania kapilar. Opisanym procesom towarzyszyła również zmiana poziomów ekspresji TSP-1. Analizy dotyczące fosforylowanych kinaz src i FAK, pozwoliły stwierdzić, że przedstawione rezultaty były głównie wynikiem modulacji szlaku zależnego od src, zaś istotne różnice pomiędzy dualnymi układami z ARC69931MX i R-138727 świadczyły o większej aktywności prasugrelu niż kangreloru. Ponadto wzmocnienie funkcji barierowej komórek śródbłonna oraz znaczący spadek endoteliny-1, w odpowiedzi na podejście dualne, sugerują pozytywny wpływ wobec hemostazy naczyniowej. Natomiast obniżenie poziomów sVCAM-1 i sICAM-1 (uprzednio stymulowanych czynnikiem martwicy nowotworów) potwierdziło przeciwzapalne właściwości testowanego układu. Podsumowując, rezultaty z kompleksowych analiz, które wykonałam w toku niniejszej rozprawy doktorskiej, świadczą nie tylko o wzmocnieniu przeciwplatekowego efektu śródbłonna naczyniowego, ale również o ochronie jego komórek przed nadmierną aktywacją i ich dysfunkcją podczas procedur terapeutycznych. A zatem, obecna rozprawa doktorska stanowi kolejny dowód potwierdzający zasadność koncepcji dualnej zależnej od purynoceptorów.



Rycina 1. Graficzne przedstawienie założeń niniejszej rozprawy doktorskiej (Schemat Autorki)

SUMMARY

Endothelial cells play a key role in the proper course of major processes in the cardiovascular system. Over the past two decades, scientific research has shown that many of these events are regulated by P1 nucleotide receptors activated by adenosine and P2, respectively, and induced by purine and pyrimidine nucleotides.

ADP, ATP and adenosine fulfil an important function in controlling the permeability of the endothelial cell layer, vascular hemostasis, inflammation, and the activation and aggregation of platelets. Endogenous nucleotides can be released into the extracellular environment through cell lysis, exocytosis, transport through membrane channels, and through an autocrine signaling pathway. In turn, the CD39 and CD73 enzymes anchored in the endothelial cell membrane metabolize ATP, hydrolyzing it to ADP, AMP and adenosine. Therefore, the concentration of extracellular nucleotides depends on the action of the vascular endothelium which thus regulates the function of platelets. It is well known that their hyper-reactivity determines the occurrence of thromboembolic events which are still a huge challenge for modern medicine.

Despite the existence of many therapeutic solutions, a significant percentage of patients are refractory to standard treatment. These are mainly individuals who suffer from comorbidities such as diabetes or hypertension. The problem appears to be even more complex with the ongoing COVID-19 pandemic caused by the second coronavirus acute respiratory syndrome SARS-CoV-2. It has been observed that severe endothelial dysfunction leading to venous thrombosis is one of the complications that account for the leading cause of death.

Due to the unsatisfactory therapeutic efficacy, new antiplatelet solutions are still being sought, especially those affecting the functioning of vascular endothelial cells thus modulating platelet activity. Considering the scientific reports suggesting the involvement of adenosine receptors, particularly the A_{2A} and A_{2B} subtypes, in the anticoagulant activity, the dual concept depending on purinoceptors seems to be promising. It consists in the simultaneous blocking of the $P2Y_{12}$ receptor and activation of selected P1 receptors. The $P2Y_{12}$ receptor antagonization results in anti-platelet activity, while the stimulation of adenosine receptors additionally enhances the phenomenon.

The A_{2A}, A_{2B} and P2Y₁₂ receptors are expressed in vascular endothelial cells. Taking this into account, it seems important to verify the influence of the new therapeutic approach on the functioning of the vascular endothelium (Fig. 1). Considering the multiple signaling pathways associated with purinoceptor activation as well as the crosstalk between them, comprehensive studies on modulation of vascular hemostasis, angiogenesis and inflammation should be carried out to evaluate the proposed dual approach.

This paper presents the results of *in vitro* studies using the immortalized human microvascular endothelial cell line (HMEC-1). Their dysfunction is associated with development of numerous abnormalities in the circulatory system. For this reason, the article mainly focuses on the action of P1 adenosine receptor agonists and P2Y₁₂ nucleotide receptor antagonists in the context of the most important processes involving the vascular endothelium. In response to test compounds, used singly or in a dual experimental setup, changes in key determinants of angiogenesis, vascular hemostasis and inflammation were assessed. The analysis involved vascular endothelial growth factor (VEGF), thrombospondin-1 (TSP-1), nitric oxide synthase (eNOS), endothelin-1 (ET-1), VCAM-1 and ICAM-1 at the level of gene expression (PCR), proteins (Western Blot) and secretion (ELISA). The study also determined the level of phosphorylated proteins, i.e., VEGF 2 receptor (VEGFR-2), and kinases that are key signal transducers - focal-adhesive (p-FAK) and p-src. Additionally, the changes in the barrier function of the vascular endothelial monolayer (ECIS[®] analysis) were verified. Also, two functional tests, i.e., Wound Healing Test and Spheroids Structure Analysis, were performed to assess the angiogenic activity of HMEC-1.

The obtained results showed that individual P1R agonists induce different effects determined by the specific structure of the molecules and the strength of interaction with a specific receptor subtype. The compound which modulated the functioning of vascular endothelial cells most strongly was MRE0094, while NECA and UK-432,097 produced a slightly weaker effect. The remaining adenosine receptor agonists did not significantly change the examined factors. The experiments carried out in the dual system showed an unusual phenomenon. It was observed that the increased VEGF expression and release, and the proangiogenic effects induced by MRE0094 or NECA, were significantly reduced in response to blocking the P2Y₁₂ receptor, while the effects which occurred in the case of P2Y₁₂R antagonists alone were not significantly different from those obtained in

control. Additionally, in these groups, a significant reduction in the rate of HMEC-1 cell migration and a reduced ability to form capillaries were found. The described processes were accompanied by a change in the level of TSP-1 expression.

Analyses of phosphorylated src and FAK kinases showed that the changes observed were the result of modulation of the src-dependent pathway. Significant differences between the two ARC69931MX and R-138727 systems revealed that prasugrel was more active than cangrelor. Moreover, the enhancement of the barrier function of endothelial cells and a significant decrease in endothelin-1 in response to the dual approach suggest a positive effect on vascular hemostasis. In turn, the reduction of sVCAM-1 and sICAM-1 levels (previously stimulated with tumor necrosis factor) confirmed the anti-inflammatory properties of this therapy.

In conclusion, the results of the comprehensive analyses prove not only the enhancement of the antiplatelet effect of the vascular endothelium, but also protection of its cells against excessive activation and their dysfunction during therapeutic procedures. Therefore, this publication demonstrates the positive aspects of the proposed purinoceptor-dependent dual antiplatelet approach.

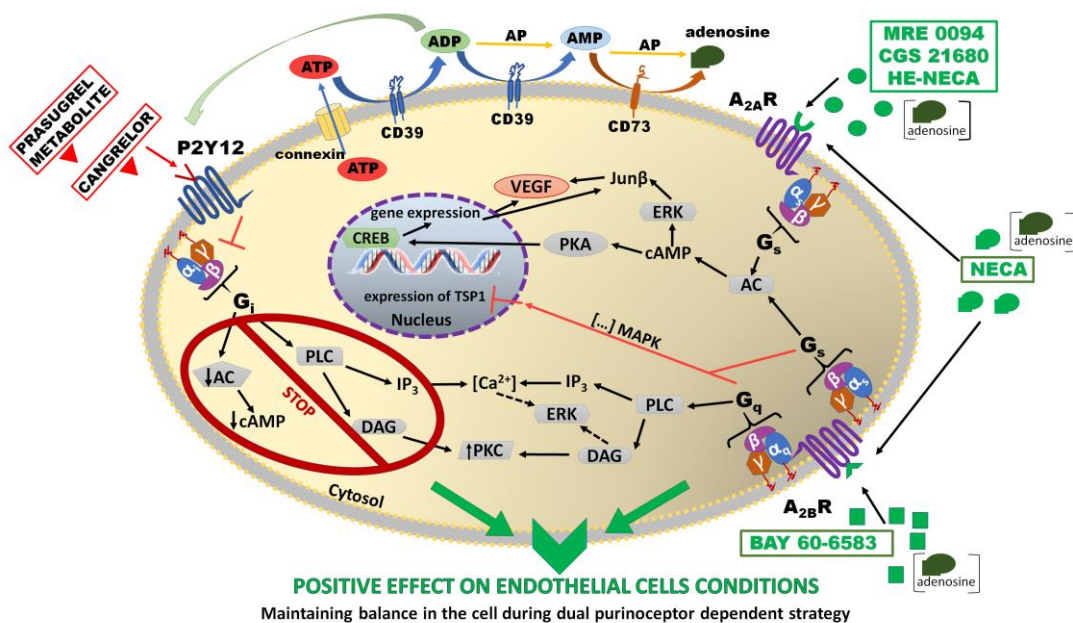


Figure 1. Graphical presentation of the assumptions of this scientific work

Słowa kluczowe: receptory adenozynowe, dualne podejście zależne od purynoceptorów, komórki śródbłonna mikrokrażenia skóry (HMEC-1), antagoniści receptora P2Y₁₂, purynoceptory, trombospondyna-1 (TSP-1), śródbłonek naczyniowy, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF)

Key words: adenosine receptors, dual purinoceptor-dependent approach, human microvascular endothelial cells (HMEC-1), P2Y₁₂ receptor antagonists, purinoceptor, thrombospondin-1 (TSP-1), vascular endothelium, vascular endothelial growth factor (VEGF),