

Akademia Medyczna w Gdańsku

Marzena Grdeń

**Receptory adenozynowe (A1, A2A, A2B i A3)
w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną
podaniem streptozotocyny**

Praca doktorska

Praca została wykonana w ramach grantu promotorskiego KBN 3P05A 054 24

Praca wykonana
w Zakładzie Medycyny Molekularnej
Katedry Biochemii Klinicznej
Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor:
Prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Zakładu:
Prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Katedry:
Prof. dr hab. Andrzej Szutowicz

Gdańsk 2005

Część wyników dotycząca badań ekspresji receptorów adenozynowych w nerce szczura została opublikowana w artykule:

Pawełczyk T., Grdeń M., Rzepko R., Sakowicz M., Szutowicz A.: Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat. *Am. J. Pathol.* 2005; 167: 315 – 325

*Składam serdeczne podziękowania
mojemu Promotorowi
Panu Profesorowi Tadeuszowi Pawełczykowi
za wyrozumiałość, cierpliwość i motywację
oraz
za ogromną i nieocenioną pomoc merytoryczną
i praktyczną przy wykonywaniu i redagowaniu
niniejszej pracy*

Serdecznie dziękuję moim koleżankom

Marzenie Podgórskiej,

Anecie Szulc,

Monice Sakowicz,

Kasi Kocbuch,

Basi Strzelczyk,

Ani Ochockiej

i Marzenie Łubkowskiej

za wszechstronną pomoc

i wspaniałą atmosferę pracy.

Dziękuję również dr Robertowi Rzepko za współpracę i wszystkim

dyżurującym pracownikom Toksykologii.

OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

ADA	deaminaza adenozyzny (ang. <i>adenosine deaminase</i>)
AK	kinaza adenozyzny (ang. <i>adenosine kinase</i>)
AR	receptory adenozyzny (ang. <i>adenosine receptors</i>)
BCIP	fosforan bromo-chloro-indolu (substrat dla alkalicznej fosfatazy) (ang. <i>Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate</i>)
BOA	bufor obciążający do elektroforezy agarozowej
BOB	bufor obciążający do elektroforezy białkowej
BSA	albumina wołowa (ang. <i>Bovine Serum Albumine</i>)
CNT	transporter nukleozydowy, przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺
DAG	diacyloglicerol
DEPC	dietylopirowęglan (ang. <i>diethylpyrocarbonate</i>)
DMEM	pożywka (<i>D</i> ulbecco's <i>M</i> odified <i>E</i> agle's <i>M</i> edium)
EDTA	sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego (ang. <i>ethylenediamine tetra acid</i>)
EHNA	chlorowodorek erytro-9-(2-hydroksy-3-nonyl) adeniny
ENT1	transporter nukleozydowy, przemieszczający nukleozydy przez błonę plazmatyczną zgodnie z gradientem stężenia, wrażliwy na hamowanie przez NBMPR
ENT2	transporter nukleozydowy, przemieszczający nukleozyd przez błonę plazmatyczną zgodnie z gradientem stężenia, niewrażliwy na hamowanie przez NBTI
GLUT4	transporter glukozy, typu czwartego, zależny od insuliny
Grb2	białko adaptorowe posiadające domenę SH2
IP₃	inozytolo(1,4,5) trifosforan (ang. <i>inositol-1,4,5-triphosphate</i>)

IR	receptor insulinowy (ang. <i>insuline receptor</i>)
IRS	białko fosforylowane przez kinazę tyrozynową receptora insuliny (ang. <i>insulin receptor substrat</i>)
JNK	N-terminalna kinaza c-Jun (ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
MAP	białko aktywowane przez mitogen (ang. <i>mitogen activated protein</i>)
MMLV-RT	odwrotna transkryptaza wyizolowana z wirusa mysiej białaczki (ang. <i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>)
NBTI	nitrobenzylotioinozyna
NBT	błękit tetrazoliowy (substrat dla alkalicznej fosfatazy) (ang. <i>nitro blue tetrazolium</i>)
Nck	białko adaptorowe oddziałujące z białkami IRS
5'-NT	5'-nukleotydaza
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PH	domena białkowa, poprzez którą białko oddziałuje z błoną lipidową (ang. <i>pleckstrin homology</i>)
PTB	domena białkowa, która odpowiada za rozpoznawanie i wiązanie fosfotyrozyny (ang. <i>phosphotyrosine-binding protein</i>)
PI3K	kinaza-3 fosfatydyloinozytolu
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
pz	par zasad
RNazin	inhibitor rybonukleaz
RT	reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. <i>reverse transcriptase</i>)
SAH	hydrolaza S-adenozylhomocysteiny
STZ	streptozotocyna
Tfl	termostabilna polimeraza izolowana z bakterii <i>Thermus flavus</i>

SPIS TREŚCI

1.	Streszczenie.....	11
2.	Wstęp.....	12
2.1	Cukrzyca.....	12
2.2.	Przemiany biochemiczne indukowane hiperglikemią.....	14
2.2.1.	Wzrost przepływu metabolicznego przez szlak polioloowy.....	14
2.2.2.	Wzrost poziomu glikacji białek.....	15
2.2.3.	Aktywacja kinazy białkowej C.....	16
2.2.4.	Wzrost przepływu metabolicznego przez szlak heksozoaminowy.....	17
2.2.5.	Produkcja ponadtlenków.....	18
2.3.	Mechanizm działania insuliny.....	20
2.4.	Działanie adenozyne.....	22
2.5.	Metabolizm adenozyne.....	23
2.6.	Transport adenozyne.....	25
2.7.	Receptory adenozyne.....	26
2.7.1.	Budowa receptorów adenozynowych.....	29
2.7.2.	Struktura i regulacja ekspresji genów AR.....	32
2.7.3.	Regulacja białka receptorów adenozynowych.....	34
2.7.4.	Szlaki przekazywania sygnału od receptorów adenozynowych.....	37
2.8.	Zaburzenia wrażliwości tkanek cukrzycowych na adenozyne.....	39
3.	Cele pracy.....	41
4.	Materiały.....	42
4.1	Zwierzęta.....	43
4.2	Bufory i roztwory.....	44
5.	Metody.....	47
5.1	Indukcja cukrzycy.....	47
5.2	Oznaczanie stężenia glukozy we krwi.....	47
5.3	Izolacja tkanek szczura.....	48
5.4	Izolacja kardiomiocytów.....	48

5.5	Izolacja i hodowla kardiofibroblastów.....	49
5.6	Izolacja RNA z tkanek.....	49
5.7	Izolacja RNA z kardiomiocytów.....	50
5.8	Izolacja RNA z kardiofibroblastów.....	50
5.9	Pomiar stężenia RNA.....	50
5.10.	Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	51
5.11.	Amplifikacja transkryptu genów receptorów adenozyiny.....	51
5.12.	Elektroforeza kwasów nukleinowych na żelu agarozowym.....	58
5.13.	Ocena względnej ilości transkryptu badanego genu.....	58
5.14.	Preparatyka ekstraktów białkowych.....	58
5.15.	Analiza Western blot.....	58
5.16.	Enzymatyczna deglikozylacja białek.....	59
5.17.	Preparatyka bloczków parafinowych.....	60
5.18.	Immunohistochemia.....	60
5.19.	Analiza statystyczna.....	61
6.	Wyniki.....	62
6.1.	Ekspresja receptorów adenozyiny w nerce szczura cukrzycowego.....	66
6.1.1.	Ekspresja receptora A1.....	66
6.1.2.	Ekspresja receptora A2a.....	69
6.1.3.	Ekspresja receptora A2b.....	69
6.1.4.	Ekspresja receptora A3.....	74
6.1.5.	Analiza immunohistochemiczna ekspresji receptora A1 i A2a w nerce szczura normalnego i cukrzycowego.....	77
6.2.	Ekspresja receptorów adenozyiny w wątrobie szczura cukrzycowego.....	79
6.3.	Ekspresja receptorów adenozyiny w sercu szczura cukrzycowego.....	84
6.3.1.	Ekspresja receptorów adenozyinowych w kardiomiocytach.....	87
6.3.2.	Wpływ glukozy i insuliny na ekspresję receptorów adenozyiny w kardiofibroblastach szczura.....	90
7.	Dyskusja.....	101
8.	Wnioski.....	116
9.	Piśmiennictwo.....	117

WYKAZ RYCIN I TABEL UMIESZCZONYCH W TEKŚCIE:

1. Schematyczne przedstawienie przemian adenozyiny i jej transport z i do komórki.....	24
2. Schemat budowy receptora A1 i A2a.....	30
3. Schematyczna prezentacja organizacji ludzkiego genu receptora A1 (<i>ADORA1</i>).....	32
4. Schematyczna prezentacja otoczenia promotorów w ludzkim genie receptora A1.....	33
5. Wtórne przekaźniki sygnału generowane w komórce w odpowiedzi na stymulację poszczególnych typów receptorów adenozyiny.....	37
6. Izolowane z serca szczura kardiomiocyty.....	48
7. Hodowane szczurze kardiofibroblasty.....	49
8. Sekwencja szczurzego cDNA receptora adenozyiny A1.....	54
9. Sekwencja szczurzego cDNA receptora adenozyiny A2a.....	55
10. Sekwencja szczurzego cDNA receptora adenozyiny A2b.....	56
11. Sekwencja szczurzego cDNA receptora adenozyiny A3.....	57
12. Analiza Western blot prowadzona na homogenacie nerki szczura bez oraz po inkubacji z N-glikozydazą F.....	64
13. Analiza Western blot prowadzona na homogenacie wątroby szczura bez oraz po inkubacji z N-glikozydazą F.....	65
14. Analiza Western blot prowadzona na homogenacie serca szczura bez oraz po inkubacji z N-glikozydazą F.....	65
15. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A1 w nerce szczura cukrzycowego.....	67
16. Dystrybucja komórkowa receptora A1 w nerce normalnej i cukrzycowej.....	68
17. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A2a w nerce szczura cukrzycowego.....	70
18. Dystrybucja komórkowa białka receptora A2a w nerce normalnej i cukrzycowej.....	71
19. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A2b w nerce szczura cukrzycowego.....	72
20. Dystrybucja komórkowa białka receptora A2b w nerce normalnej i cukrzycowej.....	73
21. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A3 w nerce szczura cukrzycowego.....	75
22. Dystrybucja komórkowa białka receptora A3 w nerce normalnej i cukrzycowej.....	76

23.	Ekspresja receptora A1 i A2a w nerce normalnej i cukrzycowej.....	78
24.	Poziom mRNA receptorów adenozyiny w wątrobie szczura.....	80
25.A.	Poziom białka receptorów adenozyiny w wątrobie szczura.....	81
25.B.	Procentowe zmiany ilości białka receptorów adenozyiny w homogenatach, frakcjach błonowych i cytosolowych izolowanych z wątroby szczura cukrzycowego.....	82
26.	Wpływ podania insuliny szczurowi cukrzycowemu na poziom białka receptorów adenozyiny w wątrobie.....	83
27.	Wpływ cukrzycy oraz podawania insuliny na poziom mRNA receptorów adenozyiny w sercu szczura.....	85
28.	Zmiany poziomu białka receptorów adenozyiny w sercu szczura cukrzycowego.....	86
29.	Wpływ cukrzycy na poziom mRNA receptorów adenozyiny w kardiomiocytach szczura.....	88
30.	Wpływ cukrzycy na poziom białka receptorów adenozyiny w kardiomiocytach szczura.....	89
31.	Wpływ wzrostu stężenia glukozy i braku insuliny na poziom białka receptorów adenozyiny w hodowanych kardiofibroblastach szczura.....	91
32.	Wpływ wzrostu stężenia glukozy i braku insuliny na poziom mRNA receptorów adenozyiny w hodowanych kardiofibroblastach szczura.....	92
33.	Zmiany poziomu mRNA receptora A1 w kardiofibroblastach hodowanych w różnych stężeniach glukozy w obecności i nieobecności insuliny.....	94
34.	Wpływ insuliny na poziom mRNA receptora A1 w hodowanych kardiofibroblastach szczura.....	95
35.	Wpływ zmian stężenia glukozy na poziom mRNA receptora A2a w hodowanych kardiofibroblastach szczura.....	96
36.	Poziom mRNA receptora A2b w kardiofibroblastach szczura hodowanych w różnych stężeniach glukozy w obecności i nieobecności insuliny.....	97
37.	Zmiany poziomu mRNA receptora A2b w kardiofibroblastach hodowanych we wzrastających stężeniach insuliny.....	98
38.	Wpływ zmian stężenia glukozy na poziom mRNA receptora A3 w hodowanych kardiofibroblastach szczura.....	99
Tabela 1	Sekwencje starterów używanych w reakcjach PCR.....	53
Tabela 2	Charakterystyka szczurów używanych w doświadczeniach.....	62

1. STRESZCZENIE.

Adenozyna jest związkiem endogennym o dużej aktywności biologicznej wpływającym na funkcję szeregu tkanek i narządów w organizmie poprzez wiązanie się do receptorów (A1, A2a, A2b, A3) zlokalizowanych na powierzchni komórek.

Celem tej pracy było zbadanie wpływu cukrzycy na poziom ekspresji receptorów adenozynowych. Cukrzycę indukowano u szczura podając streptozotocynę w dawce 75 mg/kg wagi ciała. Poziom mRNA poszczególnych receptorów oceniano na podstawie analizy wyników kompleksowego PCR z β -aktyną jako genem referencyjnym. Ilość białka receptorów adenozynowych była oceniana poprzez analizę Western blot, w której białkiem referencyjnym była β -aktyna oraz białko p14-3-3.

Uzyskane wyniki pokazują, że w nerce cukrzycowej dochodzi do regiono - specyficznych zmian w poziomie ekspresji receptorów adenozynowych, których kierunek zmian korelował z niektórymi zaburzeniami funkcji nerki obserwowanymi w cukrzycy. W wątrobie szczura z cukrzycą obserwowano znaczący wzrost ekspresji receptora A2a i A3. Poziom ekspresji receptora A1 nie ulegał zmianie, natomiast ilość mRNA receptora A2b ulegała znaczącemu obniżeniu przy niezmienionej ilości białka tego receptora. Zmiany ekspresji receptorów adenozynowych w sercu szczura cukrzycowego zależały od rodzaju komórki. W kardiomiocytach obserwowano wyraźny wzrost ilości białka receptora A1 i A3, natomiast w kardiofibroblastach hodowanych w warunkach braku insuliny i w wysokim stężeniu glukozy (20 mM) obserwowano wzrost ekspresji receptora A1, A2a, A2b oraz spadek ekspresji receptora A3. Doświadczenia prowadzone na kardiofibroblastach hodowanych w różnych stężeniach insuliny i glukozy pokazały, że poziom ekspresji receptora A2a i A3 regulowany jest zmianami stężenia glukozy, a ekspresja receptora A2b zależy od insuliny. Poziom ekspresji receptora A1 w szczurzych kardiofibroblastach zależał zarówno od stężenia glukozy jak i insuliny.

W podsumowaniu należy zaznaczyć, że prezentowane w tej pracy wyniki wskazują, że w cukrzycy dochodzi do tkankowo i narządowo specyficznych zmian w poziomie ekspresji poszczególnych subtypów receptorów adenozyny. Niektóre z tych zmian wywołane są hiperglikemią, podczas gdy inne powodowane są brakiem insuliny. Opierając się na swoich obserwacjach i danych z piśmiennictwa można przypuszczać, że zmiany ekspresji receptorów adenozynowych zachodzące w cukrzycy mogą stanowić jeden z mechanizmów prowadzących do niektórych patologii cukrzycowych.

2. WSTĘP

2.1. Cukrzyca

Cukrzyca to choroba, która występuje u ludzi niezależnie od wieku, płci i rasy, a także u zwierząt. Powstaje na skutek zaburzeń głównie gospodarki węglowodanowej organizmu. Wyróżnia się dwa podstawowe typy cukrzycy. Cukrzyca typu 1 rozwija się w wyniku zniszczenia komórek beta wysp trzustki, co prowadzi do bezwzględnego niedoboru insuliny. W cukrzycy typu 2, głównym czynnikiem patogenezy jest oporność komórek na endogenną insulinę [340]. Insulina jest hormonem produkowanym przez komórki beta trzustki, który reguluje wiele kluczowych dróg metabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek. Wpływa również na procesy wzrostu i różnicowania się komórek. Konsekwencją względnego lub bezwzględnego niedoboru insuliny obserwowanego w cukrzycy jest wzrost stężenia glukozy we krwi, pojawienie się jej w moczu oraz przebiegający w komórkach katabolizm tłuszczu i białek. Upośledzenie tkankowego zużycia glukozy oraz zwiększenie wytwarzania i uwalniania glukozy do krwi przez wątrobę prowadzi do hiperglikemii, obniżenia biosyntezy białek i kwasów tłuszczowych, dalej do mobilizacji kwasów tłuszczowych z trójglicerydów i do ketozy [7, 60, 342]. Niedobór insuliny odgrywa zasadniczą rolę również w zaburzeniach metabolizmu lipidów, które występują w cukrzycy niemal w takim samym stopniu jak zaburzenia metabolizmu węglowodanów [319].

Obszar patologicznych zmian obserwowany w cukrzycy jest bardzo rozległy i dotyczy zarówno przemian biochemicznych jak i funkcjonalnych szeregu narządów. Do głównych powikłań obserwowanych w cukrzycy można zaliczyć nefropatię cukrzycową, zmiany w układzie naczyniowo-sercowym (makroangiopatia, aterogeneza, choroba niedokrwienna serca), zaburzenia funkcji układu przewodzącego, retinopatię oraz neuropatię obwodową i autonomiczną.

Charakterystyczne zmiany obserwowane w nefropatii cukrzycowej to pogrubienie błony podstawnej kłębuszków nerkowych, rozrost mezangium, akumulacja białek macierzy, zmiany włókniste w tętniczkach doprowadzających i odprowadzających oraz upośledzenie funkcji bariery sączącej kłębuszka nerkowego [269, 319]. U ludzi powstanie jawnej nefropatii cukrzycowej poprzedzone jest okresem kilku lat, w czasie którego następują zmiany zarówno w budowie jak i czynności nerek. Pierwszą z nieprawidłowości jest powiększenie tych narządów [7, 114, 319] oraz ich przeciążenie, będące następstwem zmian czynnościowych, do których należy hiperfiltracja

kłębuszkowa i wzrost przepływu krwi przez nerki. Kłębuszki nerkowe ulegają twardnieniu, następnie szkliwieniu, co w konsekwencji prowadzi do ich niewydolności [210, 214].

Negatywne skutki cukrzycy dotyczą również układu naczyniowego i obejmują zmiany w mikrokrążeniu, których efektem są powikłania takie jak wspomniana wyżej nefropatia, ale także retinopatia i neuropatia, oraz przedwczesny i przyspieszony rozwój choroby dużych naczyń krwionośnych określanej mianem makroangiopatii [319]. Zmiany naczyniowe zachodzące w cukrzycy i będące następstwem rozwijającej się miażdżycy obserwowane są w obrębie dużych naczyń i widoczne przede wszystkim w tętnicach wieńcowych, mózgowych oraz obwodowych [319]. Jednak u chorych z długotrwałą cukrzycą mogą powstawać zmiany zwyrodnieniowe w mięśniu sercowym, które nie są wywoływane przez miażdżycę tętnic wieńcowych. Zmiany te określane są mianem kardiomiopatii cukrzycowej [341, 380]. Cechą charakterystyczną tego schorzenia są zaburzenia kurczliwości serca, obejmujące między innymi wydłużony czas skurczu i relaksacji [24, 293]. Kardiomiopatii towarzyszy choroba niedokrwienna serca, chociaż może ona występować również oddzielnie. Morfologicznie powikłanie to charakteryzuje się przerostem mięśnia sercowego i śródmiąższowym zwłóknieniem tętniczek, polegającym na odkładaniu zwiększonej ilości glikoprotein w obrębie ich ścian. Charakterystyczne procesy przebudowy serca, za które odpowiadają kardiofibroblasty obejmują ich udział w proliferacji, wydzielaniu białek matriks zewnątrzkomórkowego oraz zastępowaniu kardiomiocytów (bliznowacenie). Bliznowacenie zaś powoduje powiększenie serca i jego usztywnienie [73, 97].

W cukrzycy obserwuje się również zaburzenia funkcji układu przewodzącego [380]. W ludzkiej kardiomiopatii i niewydolności serca, a także w szeregu modelach zwierzęcych zaobserwowano, że dochodzi do zmian w wielu ważnych procesach regulujących stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia, między innymi w kanałach wapniowych typu L, odpowiedzialnych za uwalnianie wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej [279], w działaniu pompy Ca^{2+} -ATPazowej [61] i funkcjonowaniu wymiennika sodowo-wapniowego pośredniczącego w wypływie wapnia z komórki [126]. Skutkiem tych procesów jest zwolnienie relaksacji oraz zmniejszenie zdolności kurczliwej włókien serca [52]. Ponadto obserwuje się zmniejszenie aktywności ATPazowej aktomiozyny i miozyny [68]. Wynikiem utrzymującej się hiperglikemii jest również rozwój zaburzeń krzepliwości krwi oraz zmiany w gospodarce lipidowej serca

[390]. Spadek dostawy tlenu do komórek mięśnia sercowego i związany z tym przedłużający się niedobór energii jest kolejnym zjawiskiem charakterystycznym dla rozwijającej się cukrzycy [220].

Zmiany w metabolizmie glukozy w wątrobie cukrzycowej polegają na zmniejszeniu jej wychwytu z krwi, oraz na zwiększeniu wydzielania glukozy do krążenia ogólnego [340]. Dochodzi do aktywacji zarówno glikogenolizy jak i glukoneogenezy, zwiększonego wydzielania glukozy do krwi i pogłębienia tym samym hiperglikemii.

W tkance tłuszczowej w odpowiedzi na brak insuliny dochodzi do aktywacji lipolizy oraz uwalniania kwasów tłuszczowych do krwi, w wyniku czego, w wątrobie obserwuje się wzrost syntezy triglicerydów i lipoprotein [341].

2.2. Przemiany biochemiczne indukowane hiperglikemią

Pierwotną przyczyną wszystkich zmian metabolicznych w cukrzycy jest brak insuliny (cukrzyca typu I) lub zaburzenie jej działania (cukrzyca typu II). Jednym z bezpośrednich efektów takiego stanu rzeczy jest rozwijająca się hiperglikemia. Uważa się, że szereg komplikacji cukrzycowych jest następstwem przemian biochemicznych indukowanych podwyższonym poziomem glukozy. Wśród zmian, które podejrzewa się, że prowadzą do powstawania powikłań cukrzycowych wymienia się głównie aktywację szlaku polioloowego, wzrost poziomu glikacji białek, aktywację izoenzymów kinazy białkowej C (PKC) oraz aktywację szlaku heksozoaminowego.

2.2.1. Wzrost przepływu metabolicznego przez szlak polioloowy

W szlaku sorbitolowym (polioloowym) dochodzi do przekształcenia glukozy we fruktozę, a związkiem pośrednim jest sorbitol. Pierwszym enzymem tego szlaku przemian jest reduktaza aldozy, która z udziałem NADPH redukuje glukozę do sorbitolu. Reduktaza aldozy wykazuje niskie powinowactwo do glukozy i przy normalnych stężeniach glukozy metabolizm na tej drodze stanowi niewielki procent całkowitej przemiany glukozy [32]. W warunkach hiperglikemii, przy podwyższonym poziomie wewnątrzkomórkowym glukozy dochodzi do wzrostu przemiany tego cukru do alkoholu wielowodorotlenowego, czyli sorbitolu. Następnie sorbitol jest utleniany do fruktozy w reakcji katalizowanej przez enzym dehydrogenazę sorbitolu, czemu towarzyszy redukcja NAD^+ do NADH. Istnieje wiele teorii starających się

wytłumaczyć, dlaczego indukowana hiperglikemią przemiana glukozy do sorbitolu skutkuje szkodliwymi następstwami. Według jednej z teorii, stres osmotyczny indukowany wzrastającym stężeniem tego alkoholu, jest przyczyną między innymi osmotycznego uszkodzenia komórek mikronaczyń. Sorbitol nie dyfunduje łatwo przez błony komórkowe i uważano, że nagromadzając się w komórce, może powodować jej uszkodzenie. Okazało się jednak, że stężenie sorbitolu w komórkach naczyń i komórkach nerwowych w cukrzycy jest zbyt niskie, aby spowodować uszkodzenie osmotyczne. Inna teoria wiąże negatywne następstwa aktywacji szlaku polioloowego z obniżoną aktywnością (Na^+/K^+)ATPazy [32]. Okazało się jednak, że jest to efekt aktywacji kinazy białkowej C (PKC), która fosforylując fosfolipazę A_2 aktywuje ją, co z kolei prowadzi do powstania PGE_2 oraz arachidonianu, które to związki są inhibitorami (Na^+/K^+)ATPazy [371]. Zaproponowano również, że redukcja glukozy do sorbitolu przez reduktazę sorbitolu zużywa NADPH, który jest potrzebny do redukcji utlenionego glutationu. Upośledzenie tego procesu może mieć bardzo poważne następstwa, ponieważ zredukowany glutation (GSH) pełni ważną rolę w neutralizacji jonów nadtlennokowych i wolnych rodników [32]. Obniżony poziom GSH wykazano w soczewkach myszy transgenicznych ze zwiększoną ekspresją reduktazy aldozy i jest to najbardziej prawdopodobny mechanizm, poprzez który aktywowany szlak przemian sorbitolu wywiera szkodliwe następstwa [179]. Ten wniosek również wspierają wyniki doświadczeń z myszami, pozbawionymi reduktazy aldozy, które pokazały, że u zwierząt tych w przeciwieństwie do myszy typu dzikiego, cukrzyca nie obniżała poziomu zredukowanego glutationu w nerwie kulszowym ani szybkości przewodzenia nerwu motorycznego [32].

2.2.2. Wzrost poziomu glikacji białek

Glukoza z wieloma białkami np.: hemoglobina, albumina, czy kolagenem wchodzi w nieenzymatyczną reakcję glikacji (reakcja Maillarda), co prowadzi do powstania glikowanych białek [376]. Początkowym etapem glikacji jest utworzenie zasady Schiffa między glukozą, a N-końcową lub/i boczną grupą aminową lizyny. Kolejne przemiany obejmują powstanie acyklicznej formy glukozyloaminy i rearanżację do formy N_ϵ -(1-deoxy-D-frukto-1-yl) aminy (rearanżacja Amadori). Powstała w ten sposób reszta fruktozoaminowa podlega dalej szeregu reakcjom, aż do utworzenia stabilnych produktów końcowych określanych mianem AGE (ang. advanced glycation

end- products) [43]. Okazało się jednak, że AGE powstają również w komórce z dwukarbońlowych prekursorów powstałych z glukozy (3-deoksyglukozon, glioksal, metyloglioksal) i jest to proces o rząd wielkości szybszy niż zewnątrzkomórkowa glikacja [342]. Obecnie sądzi się, że wewnątrzkomórkowa hiperglikemia jest czynnikiem inicjującym powstawanie zarówno wewnątrzkomórkowych jak i zewnątrzkomórkowych AGE [32]. Tworzenie wewnątrzkomórkowych prekursorów AGE uszkadza komórki docelowe w wyniku trzech mechanizmów. Po pierwsze, białka wewnątrzkomórkowe zmodyfikowane przez prekursorsy AGE wykazują zmienione funkcje. Po drugie, składniki macierzy zewnątrzkomórkowej zmodyfikowane do AGE oddziałują anormalnie z innymi składnikami macierzy i z receptorami dla białek macierzy, takimi jak integryny. Po trzecie, zmodyfikowane przez glikację białka osocza wiążą się z receptorami dla AGE (RAGE) [363] na komórkach endotelialnych, mezangialnych i makrofagach, indukując produkcję reaktywnych form tlenu [32]. Wykazano również, że oddziaływanie AGE - RAGE aktywuje czynnik transkrypcyjny $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [28]. Jego aktywacja wpływa na ekspresję genów odpowiedzi zapalnej, na przykład cytokin. Tworzenie AGE zmienia właściwości funkcjonalne kilku ważnych białek macierzy. W przypadku kolagenu typu I, wewnątrzkomórkowe sieciowanie wywołane przez AGE indukuje zmianę molekularnego upakowania, które wpływa na funkcje zdrowych naczyń. U szczura z doświadczalnie indukowaną cukrzycą AGE wywołują między innymi spadek elastyczności dużych naczyń [139]. Tworzenie AGE na kolagenie IV, występującym w błonie podstawnej, hamuje wzajemne łączenie się cząsteczek i tworzenie struktury przypominającej sieć [354]. Glikacja lamininy powoduje upośledzenie tworzenia homopolimerów, zmniejszone wiązanie się do kolagenu typu IV i zmniejszenie wiązania do reszty siarczanu heparanu glikoprotein [46]. Na istotną rolę AGE w patogenezie powikłań cukrzycowych wskazują obserwacje poczynione na modelach zwierzęcych, gdzie podanie inhibitorów tworzenia AGE takich jak aminoguanidyna częściowo przeciwdziało zmianom cukrzycowym w siatkówce oka, nerkach i komórkach nerwowych [327].

2.2.3. Aktywacja kinazy białkowej C

W cukrzycy dochodzi również do aktywacji kinazy białkowej C (PKC). Rodzina PKC składa się przynajmniej z 11 izoform, z których 9 jest aktywowanych przez

diacyloglicerol (DAG) będący wtórnym przekaźnikiem sygnału. Wykazano, że wewnątrzkomórkowa hiperglikemia zwiększa ilość DAG w hodowanych komórkach mikronaczyń [370] oraz w siatkówce i kłębuszkach nerkowych zwierząt cukrzycowych [169]. Wydaje się, że obserwowany w tych warunkach wzrost ilości DAG następuje głównie poprzez syntezę *de novo* z fosfodihydroksyacetonu będącego produktem przejściowym glikolizy [140]. Głównymi izoformami PKC aktywowanymi w tych warunkach są izoformy β i δ , lecz wykazano również aktywację innych izoenzymów. W komórkach siatkówki oka szczurów cukrzycowych dochodzi do aktywacji PKC- α i PKC- ϵ [32], natomiast w kłębuszkach nerkowych, izolowanych od szczurów z cukrzycą obserwowano wzrost aktywności PKC- α i PKC- β [167, 168]. Do aktywacji PKC w komórkach hiperglikemicznych może także dochodzić poprzez reaktywne formy tlenu generowane ligacją receptorów AGE i/lub zwiększoną aktywnością szlaku poliowego [32]. W eksperymentach na szczurach z doświadczalnie indukowaną cukrzycą wykazano, że wzrost aktywności PKC- β jest odpowiedzialny za zmiany w mikrokrążeniu obserwowane w siatkówce i przepływie krwi w nerkach [143]. Uważa się, że zmiany w krążeniu obserwowane u zwierząt z cukrzycą są wynikiem zahamowania produkcji tlenu azotu i/lub wzrostu aktywności endoleliny-1 powodowanych wzrostem aktywności PKC [32]. Stwierdzono również, że aktywacja PKC przyczynia się do akumulacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej w mikronaczeniach, poprzez aktywację ekspresji TGF- β 1, fibronektyny oraz kolagenu typu IV [332]. Zależność przyczynowo-skutkową między aktywacją PKC i zmianami krążeniowymi obserwowano w doświadczeniach z użyciem specyficznego inhibitora PKC- β , podanie którego nie tylko przywracało normalny przepływ krwi w siatkówce, ale również normalizowało filtrację kłębuszkową i częściowo korygowało wydalanie albuminy z moczem [168].

2.2.4. Wzrost przepływu metabolicznego przez szlak heksozaminowy

Jak już wspomniano wzrost stężenia glukozy w komórce indukuje przemiany glukozy, które w normalnych warunkach zachodzą w ograniczonym zakresie. Wewnątrzkomórkowa hiperglikemia, poza indukcją przemian szlaku sorbitolowego, aktywuje również przemiany w obrębie szlaku heksozaminowego. Pierwszym etapem przemian tego szlaku jest konwersja fruktozo-6-fosforanu do glukozamino-6-fosforanu

katalizowana przez aminotransferazę glutaminianowo-fruktozo-6-fosforanową (GFAT, ang. *glutamin:fructose-6-phosphate amidotransferase*). Reakcja katalizowana przez ten enzym jest etapem ograniczającym szybkość przemiany glukozy do UDP-N-acetyloglukozaminy, która jest niezbędnym składnikiem syntezy glikoprotein. Okazało się, że zablokowanie aktywności GFAT blokuje indukowaną hiperglikemią ekspresję fibrynolitycznego inhibitora (PAI-1) oraz TGF- α i TGF- β [77, 165]. Wydaje się, że elementem odpowiedzialnym za zmianę transkrypcji pewnych genów indukowaną aktywacją szlaku heksozaminowego jest kowalencyjna modyfikacja czynników transkrypcyjnych przez N-acetyloglukozaminę [32]. Wykazano, że glikozylowana forma czynnika transkrypcyjnego Sp1 jest bardziej aktywna transkrypcyjnie, niż forma nieglikozylowana [153]. Ponadto okazało się, że O-acetyloglukozaminyłacja zachodzi na tych samych resztach serynowo-treoninowych, co fosforyłacja białek [119]. W komórkach endotelialnych aorty zaobserwowano, że hiperglikemia indukuje 2,4-krotny wzrost przepływu metabolitów przez szlak heksozaminowy czemu towarzyszył 1,7-krotny wzrost ilości glikozyłowanej formy białka Sp1 z jednoczesnym spadkiem o 80% ilości Sp1 fosforyłowanego na treoninie i serynie [77]. Jednocześnie okazało się, że ekspresja z promotora PAI-1 posiadającego dwa miejsca wiązania dla Sp1 wzrosła w tych warunkach 3.8-krotnie [77]. Wydaje się zatem, że przesunięcie stanu fosforyłacji białek w kierunku O-acetyloglukozaminyłacji może być czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowane w cukrzycy zmiany transkrypcji szeregu genów. Tym bardziej, że glikozylację wykazano w przypadku każdego z badanych czynników transkrypcyjnych związanych z kompleksem RNA polimerazy II [125]. W świetle istniejących danych można przypuszczać, że O-acetyloglukozaminyłacja czynników transkrypcyjnych jest ogólnym mechanizmem indukcji ekspresji genów w warunkach wzrostu stężenia glukozy w komórce.

2.2.5. Produkcja ponadtlenków

Wewnątrzkomórkowe spalanie glukozy rozpoczyna się w cytoplazmie, gdzie z glukozy powstaje pirogronian i NADH. Powstały pirogronian może ulec przemianie do mleczanu przy współdziałaniu NADH, bądź zostać przemieszczony do mitochondrium, gdzie ulega utlenieniu w cyklu kwasów trójkarboksylowych (TCA) do dwutlenku węgla, wody, czterech cząsteczek NADH i jednej cząsteczki FADH₂. Mitochondrialne NADH i FADH₂ w wyniku oksydacyjnej fosforyłacji w łańcuchu

oddechowym są źródłem ATP. Główne składniki łańcucha oddechowego uporządkowane są według rosnących potencjałów utleniająco - redukcyjnych, elektrony przepływają przez łańcuch od składników najbardziej elektroujemnych do najbardziej elektrododatniego tlenu. Podczas przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy dochodzi do powstania ponadtlennych intermediatów, których okres półtrwania zależy od gradientu elektrochemicznego. Powstają one podczas przenoszenia przez oksydazę cytochromową elektronu z cytochromu c na cząsteczkę O₂. W sytuacji kiedy zamiast czterech elektronów dojdzie do przeniesienia tylko jednego, powstaje anion ponadtlenny. W doświadczeniach prowadzonych na hodowanych komórkach endotelialnych aorty wołu wykazano, że indukowany hiperglikemią wzrost utleniania pirogronianu w cyklu TCA powoduje wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) [72]. Zastosowanie kombinacji specyficznych inhibitorów poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w połączeniu z technikami molekularnymi pozwoliło wykazać, że zahamowanie przemieszczania się elektronów w łańcuchu oddechowym na etapie kompleksu II zapobiega powstawaniu ROS. Ponadto wykazano, że zahamowanie produkcji ROS przeciwdziała indukowanej hiperglikemią stymulacji PKC, aktywacji szlaku heksozaminowego, powstawaniu AGE, akumulacji sorbitolu oraz aktywacji NFκB w komórkach endotelialnych [32]. Inne prace wykazały, że nadekspresja manganowej dysmutazy ponadtlennej (MnSOD) lub białka rozprzegającego-1 (UCP-1) przeciwdziała powstawaniu ROS i hamuje szereg zmian patologicznych indukowanych cukrzycą. W hodowli komórek mezangialnych, nadekspresja MnSOD przeciwdziała wzrostowi syntezy kolagenu indukowanego hiperglikemią. Wykazano, że nadekspresja MnSOD w komórkach neuronalnych zwoja pnia grzbietowego (DRG) hamuje apoptozę komórek indukowaną hiperglikemią [57]. Ponadto w komórkach endotelialnych nadekspresja UCP-1 lub MnSOD całkowicie blokuje wywołaną wzrostem stężenia glukozy adhezję monocytów, inhibicję syntazy prostacykliny oraz syntazy tlenu azotu (eNOS) [57]. Można zatem sądzić, że jednym z ogniw łączących szereg patologicznych zmian indukowanych wzrostem stężenia glukozy jest produkcja reaktywnych form tlenu przez łańcuch oddechowy.

2.3. Mechanizm działania insuliny.

Insulina jest hormonem peptydowym o masie 6 kDa, wytwarzanym przez komórki beta trzustki w odpowiedzi na zmiany stężenia glukozy. Działanie swe insulina wywiera poprzez wiązanie się ze swoistym receptorem insulinowym (IR), zlokalizowanym w błonach wielu komórek. IR należy do dużej rodziny receptorów dla czynników wzrostu [361]. Jest heterotetramerem, złożonym z dwóch podjednostek α i β , połączonych między sobą wiązaniami dwusiarczkowymi [361, 366]. Obydwie podjednostki są glikozylowane. Podjednostka α ma masę cząsteczkową 135 kDa i położona jest na zewnętrznej stronie błony plazmatycznej, natomiast podjednostka β o masie 95 kDa jest białkiem przezbłonowym, pełniącym funkcję przekaźnika sygnału. Część cytoplazmatyczna tej jednostki wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej oraz posiada obszar podlegający autofosforylacji. Receptor insuliny ulega nieustannej syntezie i degradacji, jego okres półtrwania wynosi 7-12 h. U ludzi gen kodujący IR jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 19 [366]. Przyłączenie się insuliny do podjednostki α indukuje zmianę konformacji i aktywuje kinazę połączoną z nią podjednostki β , która fosforyluje następnie grupy OH określonych reszt tyrozynowych w podjednostce β drugiego dimeru $\alpha\beta$ cząsteczki receptora. Wzajemna fosforylacja podjednostek β receptora (autofosforylacja) zwiększa ich aktywność kinazową w stosunku do cytoplazmatycznych białek biorących udział w wewnątrzkomórkowej transmisji sygnału. Zidentyfikowano wiele substratów dla kinazy tyrozynowej IR. Należą do nich cztery białka określane symbolem IRS1-4 (ang. *insulin receptor substrat*) [303], poza tym białka Gab-1, p60^{dok}, Cbl, APS oraz trzy izoformy białka Shc [77, 306]. Wszystkie (z wyjątkiem białka Shc) substraty posiadają w części N-końcowej domenę PH (ang. *pleckstrin homology*), poprzez którą białko oddziałuje z błoną lipidową. U wszystkich poza Gab-1 występuje region PTB (ang. *phosphotyrosine-binding protein*), który odpowiada za rozpoznawanie i wiązanie fosfotyrozyny [367]. Najlepiej poznanym białkiem jest IRS-1, które zawiera 21 reszt tyrozynowych [366]. Po związaniu z receptorem i fosforylacji IRS-1 łączy się z białkami posiadającymi domeny SH (ang. *Src homology*), które rozpoznają miejsca zawierające ufosforylowaną tyrozyne (SH2), albo motywy bogate w prolinę (SH3). Wśród tych białek można wyróżnić podjednostkę regulatorową (p85) kinazy-3 fosfatydyloinozytolu (PI-3K), białko Grb2, Nck (PAK-1, WASP), Crk (p130cas, C3G), oraz wiele innych [3, 178, 230, 306, 324, 366, 372]. Przekazywanie sygnału z udziałem PI-3K jest wielokierunkowe. Klasyczna

PI-3K zbudowana jest z podjednostki regulatorowej, nazwanej p85 i katalitycznej (p110). Połączenie kinazy z IR prowadzi do wzrostu poziomu PI(3,4)P₂ i PI(3,4,5)P₃ [3, 9, 56]. PI-3K oraz jej produkty regulują z kolei funkcje niektórych kluczowych kinaz i białek wewnątrzkomórkowych takich jak kinaza białkowa C (PKC). PI-3K reguluje różne procesy, między innymi transport glukozy, proliferację, chemotaksję czy funkcję wydzielniczą komórek. Wykazano, że w stymulacji przez insulinę transportu glukozy pośredniczy PI(3,4)P₂, natomiast stymulowany insuliną napływ glukozy do adipocytów jest znoszony przez zahamowanie aktywności PI-3K w wyniku zahamowania translokacji transporterów glukozy Glut 4 z cytoplazmy do błony [122, 245].

Inhibicja aktywności kinazy PI-3 wpływa na procesy zależne od insuliny na przykład: hamowanie lipolizy, aktywacja syntezy kwasów tłuszczowych, czy synteza DNA [3]. Kolejnym szlakiem przesyłania informacji, w którym pośredniczy insulina jest indukcja kaskady kinaz MAP i udział w regulacji ekspresji genów. Uczestniczy w tym procesie białko adaptorowe Grb2, które łącząc się z białkiem IRS-1 zmienia konformację i łączy się z aktywatorem wymiany nukleotydów guanylowych- białkiem SOS (ang. *Son-of-sevenless*). Białko to z kolei aktywuje poprzez stymulację wymiany GDP na GTP białko Ras, które po aktywacji stymuluje kinazę Raf, która uruchamia kaskadę kinaz MAP [196, 239, 372]. Do rodziny kinaz MAP należy kinaza aktywowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe ERK (ang. *extracellularly regulated kinase*), kinazy JNK, fosforylujące N-końcową domenę białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal protein kinases*) oraz p38MAP. Aktywacja kinaz MAP wpływa na ekspresję wielu genów kodujących między innymi czynniki transkrypcyjne np.: AP-1 (ang. *activating protein-1*), czy STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*), które oddziałują na ekspresję innych genów. Widać więc, że insulina wpływa pośrednio czy bezpośrednio na wiele ogniw metabolizmu komórkowego: na metabolizm kwasów nukleinowych, białek, węglowodanów, czy tłuszczów. Brak insuliny w cukrzycy typu I, czy niewrażliwość na nią charakterystyczna dla cukrzycy typu II powoduje, że nie ma sygnalizacji przez receptor insulinowy. Działanie insuliny modyfikowane jest przez szereg czynników, w tym adenozyne. Wykazano, że adenozyne w znacznym stopniu modyfikuje działanie insuliny na komórki mięśniowe, adipocyty oraz hepatocyty [50, 120, 214].

2.4. Działanie adenozyiny

Adenozyina (Ado) jest nukleozydem o dużej aktywności biologicznej. Swoje działanie na wiele układów i narządów łącznie z naczyniowo - sercowym, moczowo-płciowym, immunologicznym, oddechowym i nerwowym wywiera poprzez specyficzne receptory zlokalizowane na powierzchni komórek [55].

W nerkach adenozyina jest ważnym czynnikiem regulującym ich hemodynamikę [141, 234, 238, 329, 330]. Wykazano, że adenozyina jest mediatorem odpowiedzi TGF oraz, że hamuje uwalnianie reniny z komórek aparatu przykłębuszkowego [256, 271]. Wzrost poziomu adenozyiny w nerkach prowadzi do zmniejszenia przepływu moczu oraz obniżenia wydalania elektrolitów [221].

Na obwodzie adenozyina poprzez rozszerzenie naczyń krwionośnych zwiększa przepływ krwi w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych, mózgu i tkance tłuszczowej [25, 26, 71, 220]. Odgrywa również ważną rolę w tzw. procesie warunkowania przez niedokrwienie (ang. *ischemic preconditioning*). Dotyczy to ograniczenia stopnia rozmiaru uszkodzenia narządów dotkniętych niedotlenieniem, czy niedokrwieniem. Działanie takie wykazano w mózgu, sercu, wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerkach i płucach [21, 47, 142, 160, 344].

Od wielu lat znane jest immunosupresyjne i przeciwzapalne działanie adenozyiny [58, 83]. Związanie adenozyiny z jej receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek układu immunologicznego wpływa na prezentację antygenenu [369], fagocytozę [305], negatywną selekcję limfocytów [296], cytolityczną aktywność limfocytów oraz proliferację i aktywację komórek [285]. Ważnym aspektem regulacji procesów immunologicznych przez adenozyinę jest jej wpływ na produkcję mediatorów odpowiedzi immunologicznej takich jak cytokiny [31, 37, 127, 211, 264, 296, 316, 335, 338], wolne rodniki [127], oraz metabolity kwasu arachidynowego [173]. Wykazano również, że adenozyina lub jej niemetabolizujące się pochodne, głównie ligandy receptorów adenozyinowych wpływają na przebieg szeregu chorób o podłożu immunologicznym, takich jak zapalenie stawów [112, 338], zapalenie nerek [283], zapalenie błony naczyniowej oka [206], czy szoku wywołanego endotoksynami [264, 283].

Obecne dane wskazują na troficzną rolę adenozyiny w mechanizmach naprawczych mózgu po urazie i niedotlenieniu, kiedy jest ona uwalniana w dużych ilościach po zniszczeniu lub obumarciu komórki [348]. W warunkach stresowych podstawową

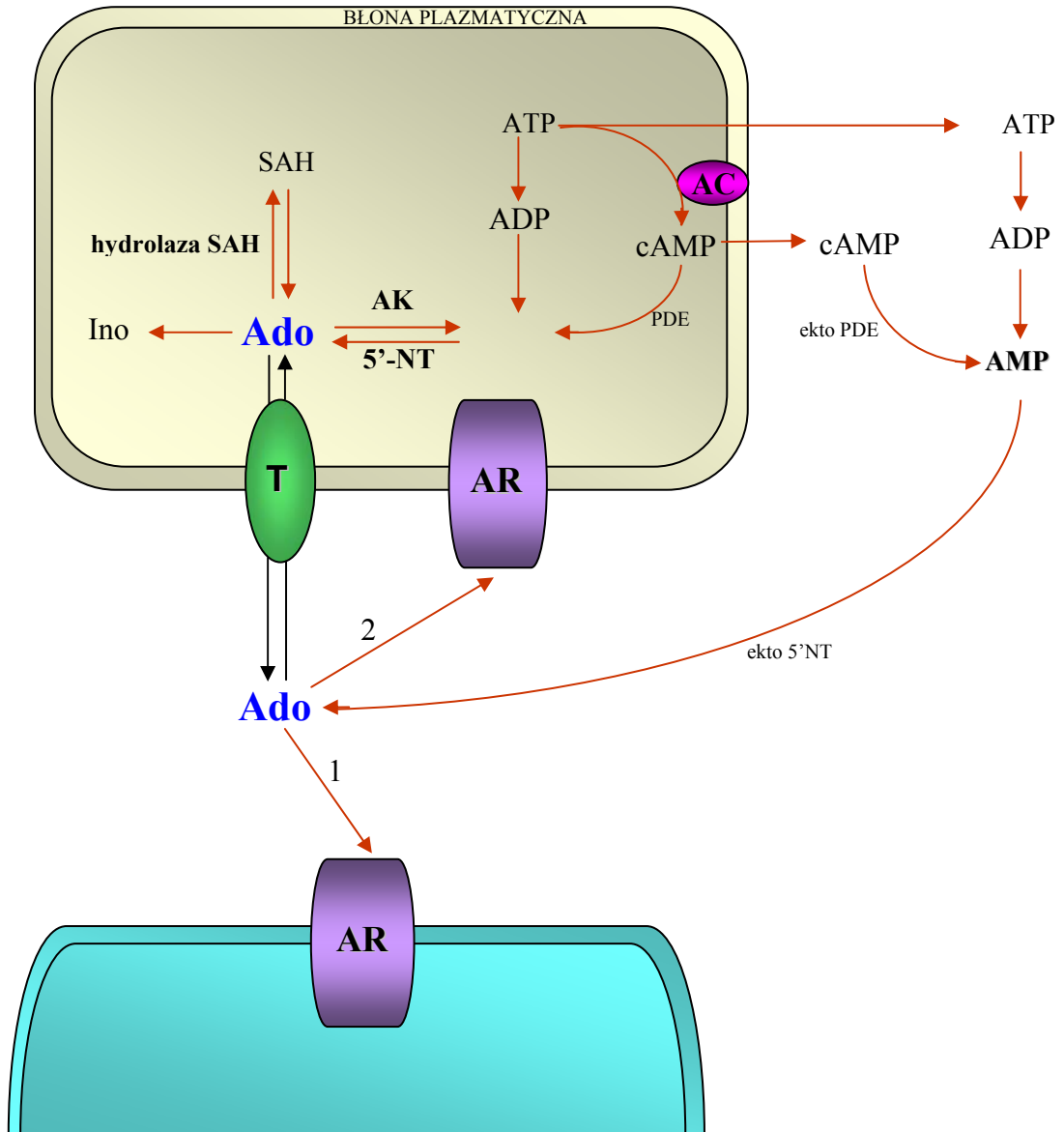
funkcją adenozyiny jest hamowanie aktywności neuronów przez zmniejszenie ilości neuroprzebiezników pobudzających, co zapobiega degradacji neuronów. Powstawanie glukozy w astrocytach i dopływ krwi do regionów objętych niedotlenieniem czy niedokrwieniem jest stymulowane przez adenozyinę poprzez rozszerzenie naczyń krwionośnych i hamowanie agregacji płytek krwi [75, 102, 280].

Sekrecja insuliny przez komórki beta trzustki jest hamowana przez adenozyinę [145, 330], która również moduluje działanie tego hormonu. Adenozyina jest ważnym endogennym regulatorem metabolizmu tkanki tłuszczowej [111]. W adipocytach w normalnych warunkach adenozyina zwiększa transport glukozy [195, 325], jej utlenianie i metabolizm indukowany insuliną [315, 357]. W hepatocytach proces glikogenolizy stymulowany jest przez ten nukleozyd na drodze aktywacji fosforylasy glikogenu [136, 243]. Z kolei proces glukoneogenezy jest hamowany przez adenozyinę [281, 377]. W wątrobie adenozyina stymuluje lipogenezę [146] i znosi hamujące działanie insuliny na wypływ glukozy z wątroby [214]. W mięśniach serca [6, 177, 368] i adipocytach [174, 358] adenozyina zmienia indukowany insuliną wychwyty glukozy. Wykazano, że zablokowanie receptoriów adenozyiny lub usunięcie adenozyiny z przestrzeni pozakomórkowej poprzez dodanie deaminazy adenozyiny obniża stymulowany insuliną transport glukozy [174, 177, 358, 368]. Ponadto wychwyty glukozy niezależny od insuliny (indukowany skurczem) jest w sercu stymulowany przez adenozyinę [6, 363]. Wcześniejsze prace z pracowni Newsholme wskazywały, że w mięśniach szkieletowych adenozyina obniża stymulowany insuliną transport i metabolizm glukozy [33, 49, 85]. Późniejsze prace nie potwierdziły jednak tych wyników wskazując, że usunięcie adenozyiny lub zablokowanie receptoriów adenozyiny prowadzi w mięśniach szkieletowych do obniżenia transportu glukozy stymulowanego insuliną, jak również transportu glukozy indukowanego skurczem [120, 134, 233].

2.5. Metabolizm adenozyiny

Na stężenie adenozyiny w płynach fizjologicznych mają wpływ procesy jej syntezy, degradacji i transportu przez błony. Czas półtrwania adenozyiny we krwi wynosi od 1 do kilku sekund [328], a jej stężenie waha się w granicach 100-300 nM [254]. W komórce jej stężenie w normalnych warunkach mieści się w przedziale 10-100 nM w zależności od typu komórki [64, 65, 173]. Zarówno w komórce jak i w przestrzeni

zewnątrzkomórkowej zlokalizowane są enzymy produkujące i metabolizujące adenozyne (Ryc.1).



Ryc.1. Schematyczne przedstawienie przemian adenozyne i jej transportu z i do komórki.

AR, receptor adenozyne; T, transporter nukleozydowy; AC, cyklaza adenylanowa; Ado, adenozyne; Ino, inozyne; ADA, deaminaza adenozyne; SAH, S-adenozylohomocysteina; PDE, fosfodiesteraza; 5'-NT, 5'-nukleotyda. 1- parakryne działanie adenozyne; 2- autokryne działanie adenozyne.

W komórce adenozyne oprócz syntezy *de novo* może powstawać w wyniku defosforylacji AMP lub hydrolizy S-adenozylhomocysteiny (SAH) [63, 66, 225, 244]. Aktywność hydrolazy SAH wykazano w wielu tkankach i typach komórek, jednak głównym źródłem adenozyne w komórce jest reakcja defosforylacji AMP katalizowana przez enzym 5'-nukleotydataz (5'-NT). W tkankach ssaczych opisano trzy formy 5'-nukleotydatazy. We frakcji cytosolowej odkryto dwie rozpuszczalne formy 5'-nukleotydataz [66, 348], z których jedna preferuje IMP jako substrat (c-N-II) a druga AMP (c-N-1). Aktywność c-N-1 jest 15-20 razy większa w stosunku do AMP niż IMP [175]. Przemiany adenozyne w komórce obejmują fosforylację do AMP [66], katalizowaną przez enzym kinazę adenozyne (AK) oraz degradację do inozyne przez deaminazę adenozyne (ADA) [84, 206]. Ze względu na duże powinowactwo AK do adenozyne ($K_m \sim 0.5 \mu\text{M}$) enzym ten uważany jest za kluczowy czynnik utrzymujący stałe niskie stężenie adenozyne w komórce w warunkach normalnych [170].

Pozakomórkowym źródłem adenozyne są nukleotydy uwolnione z komórek. Zarówno ATP jak i ADP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej są degradowane do AMP, które w reakcji katalizowanej przez ekto-5'-NT jest defosforylowane do adenozyne (Ryc.1). Ekto-5'-NT jest najlepiej scharakteryzowanym enzymatycznym źródłem adenozyne (e-N). Enzym ten wykazuje duże powinowactwo do AMP o K_m w zakresie mikromolarnym [175]. Kolejnym źródłem zewnątrzkomórkowej adenozyne jest uwalniany z komórki cykliczny AMP. W przestrzeni pozakomórkowej cAMP może być metabolizowany do 5'-AMP przez enzym ektofosfodiesterazę, a następnie do adenozyne przez ekto-5'-nukleotydataz [16, 175]. Postuluje się, że w nerce istotnym źródłem adenozyne jest właśnie cAMP [147].

Stężenie adenozyne w płynach fizjologicznych zależy nie tylko od aktywności enzymów które metabolizują adenozyne, ale również od procesów transportowych. W błonach komórkowych znajdują się różnego rodzaju białka transportujące nukleozydy.

1.6. Transport adenozyne.

Nukleozydy, w tym adenozyne nie mogą swobodnie przenikać przez błony plazmatyczne. W komórkach ssaków transport nukleozydów odbywa się w dwojaki sposób: zgodnie z gradientem stężeń, jest to transport bierny nośnikowy

(ang. *equilibrative nucleoside transport*) lub drogą aktywnego symportu z jonami sodu, gdzie nukleozydy transportowane są niezależnie od gradientu stężeń nukleozydu (ang. *sodium-dependent concentrative nucleoside transport*) [113].

Transport Na^+ -niezależny jest szeroko rozpowszechniony w komórkach ssaczych [14]. Na podstawie wrażliwości na nitrobenzylotioinozynę (NBTI) wyróżniono dwa typy Na^+ -niezależnego transportu. Transport typu *es* (ang. *equilibrative sensitive*), który jest hamowany przez NBTI oraz transport typu *ei*, który jest niewrażliwy na ten inhibitor (ang. *equilibrative insensitive*). Dotąd opisano cztery białka transportowe przemieszczające nukleozydy zgodnie z gradientem stężeń oznaczone jako ENT1, ENT2, ENT3 [14] oraz ENT4. Te białka transportowe obecne są w komórkach wielu typów i charakteryzują się niską selektywnością wobec przenoszonych cząsteczek [14, 103]. Najlepiej poznane są transportery ENT1 i ENT2.

Transportery, które przemieszczają nukleozydy w symporcie z jonami Na^+ transportują nukleozydy tylko do wnętrza komórki, mają różną specyficzność substratową i są niewrażliwe na NBTI [110]. Ze względu na specyficzność substratową wyróżnia się trzy typy transportu Na^+ -zależnego określane jako transport typu *cit* (ang. *concentrative, insensitive to NBTI and accepts thymidine as a permeant*), *cif* (ang. *concentrative, insensitive to NBTI and accepts formicin B as a permeant*) oraz *cib* (ang. *concentrative, insensitive to NBTI and accepts a broad range as a permeant*). Nukleozydy pirymidynowe oraz w mniejszym stopniu adenozyne przemieszczane są na drodze transportu typu *cit*. System transportowy specyficznie transportujący nukleozydy purynowe i urydynę określany jest jako transport typu *cif*. Z kolei system transportowy przemieszczający z taką samą wydajnością nukleozydy purynowe i pirymidynowe określany jest jako transport typu *cib* [42, 110]. Dotąd poznano i opisano trzy białka transportowe przemieszczające nukleozydy w symporcie z jonem Na^+ oznaczane jako CNT1, CNT2 oraz CNT3. Transporter CNT1 jest białkiem specyficznie przemieszczającym nukleozydy pirymidynowe, transporter CNT2 jest specyficzny w stosunku do nukleozydów purynowych, a białko CNT3 przemieszcza równie dobrze nukleozydy pirymidynowe oraz purynowe [297].

1.7. Receptory adenozyne

Adenozyne na komórkę działa poprzez aktywację specyficznych receptorów błonowych. Wyróżniono dwie rodziny receptorów purynowych: P1, których naturalnym

agonistą jest adenozyzna (AR, ang. *adenosine receptors*) oraz P2, które rozpoznają głównie ATP. Receptory Ado na podstawie właściwości farmakologicznych, biochemicznych i struktury pierwszorzędowej sklonowanych receptorów podzielono na cztery podtypy: A1, A2a, A2b i A3 [287].

Receptory A1

Receptor A1 sklonowano z biblioteki cDNA różnych gatunków zwierząt: szczura, myszy, psa, krowy, królika, świni, kurczaka i człowieka [95]. Ludzki gen dla tego receptora (*ADORA1*) zlokalizowany jest na chromosomie 1 w pozycji 1q32.1 [346]. Różnice w sekwencji aminokwasowej pomiędzy receptorem psim, szczurzym i krowim są mniejsze niż 10%, a między ludzkim i krowim różnica ta jest nawet mniejsza i wynosi 5%. Obecność tego typu receptora wykryto w centralnym układzie nerwowym, ze szczególnie wysokim poziomem ekspresji w korze mózgowej, hipokampie, mózdzku, wzgórzu wzrokowym, pniu mózgu oraz rdzeniu kręgowym [70, 294]. Transkrypt genu tego receptora wykryto również w oku, płucach, jelitach, jądrach, tkance tłuszczowej, aortie, sercu, wątrobie, żołądku, a także w nerkach i pęcherzu. Przy czym w płucach, nerkach i jelicie cienkim poziom mRNA receptora A1 jest niski [70, 294, 331]. Receptory A1 charakteryzują się wysokim powinowactwem do Ado, a ich pobudzenie prowadzi do spadku cAMP w komórce [356]. Wśród fizjologicznych efektów aktywacji receptora A1 można wymienić na przykład: zwolnienie akcji serca [253], zwężenie naczyń krwionośnych [253], hamowanie uwalniania neuroprzekaźników [204], skurcz komórek mezangium [252], hamowanie uwalniania reniny [229], chemotaksję neutrofilii [212], hamowanie lipolizy w adipocytach [194].

Receptory A2a

Receptor A2a sklonowano z biblioteki cDNA szczura, świnki morskiej, psa, myszy i człowieka [95]. Ludzki gen dla tego receptora (*ADORA2A*) znajduje się na chromosomie 22 w pozycji 22q11.23 [199]. Homologia sekwencji aminokwasowej szczurzego i ludzkiego receptora wynosi 84% [287]. Białko tego receptora charakteryzuje się masą cząsteczkową wynoszącą około 45 kDa, która jest znacznie większa w porównaniu z pozostałymi typami receptorów adenozynowych o masach wynoszących 36-37 kDa. Różnica ta wynika z obecności dłuższego końca C-terminalnego [248]. U człowieka największy poziom mRNA dla A2a wykazano w

oku, mięśniach szkieletowych, sercu, płucach, pęcherzu moczowym i macicy, nieco mniej w jelicie cienkim, nerce, śledzionie, żołądku, jądrze, skórze i wątrobie. Wykazano, że w ludzkich płytkach krwi wrażliwość tego receptora na agonistę wzrasta w wyniku długiego spożywania kofeiny prowadząc do zahamowania agregacji płytek [359]. W mózgu najwięcej receptorów A2a występuje w regionach bogatych w dopaminę. Pobudzenie receptorów A2a związane jest ze wzrostem cAMP w komórce i prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych [59, 158, 208, 249], hamuje agregację płytek krwi [246, 376] oraz moduluje funkcje neutrofilii [34, 226]. Receptor A2a jest też głównym receptorem limfocytów, poprzez który adenozyne wywiera swoje immunosupresyjne działanie [133].

Receptory A2b

Receptor A2b sklonowano z cDNA takich organizmów jak szczur, mysz, kurczak oraz człowiek [95]. U ludzi gen dla receptora A2b (*ADORA2B*) znajduje się na chromosomie 17 w pozycji 17p12-p11.2 [347]. Sekwencja aminokwasowa ludzkiego receptora A2b jest w 86% homologiczna do receptora szczurzego [331]. Obecność tego typu receptora stwierdzono w błonie plazmatycznej każdej ze zbadanych pod tym kątem komórek, ale jego liczba jest mała i do jego pobudzenia wymagane jest względnie wysokie stężenie adenozyne [323]. Stosunkowo wysoką ekspresję tego receptora wykazano w jelicie ślepym, jelicie grubym, pęcherzu moczowym, mniejszą w mózgu, rdzeniu kręgowym, płucu i niską w jelicie czczym, nerce, sercu, skórze, śledzionie i wątrobie szczura [287]. Pobudzenie receptora A2b powoduje wzrost cAMP w komórce lecz wykazano również, że w ludzkich komórkach tucznych prowadzi do stymulacji fosfolipazy C [88]. Udział receptora A2b wykazano w takich procesach jak kontrola napięcia naczyniówki, neurosekrecja, czy aktywacja komórek tucznych [89]. Aktywacja tego receptora wywołuje również rozszerzenie naczyń krwionośnych oraz skurcz serca [224].

Receptory A3

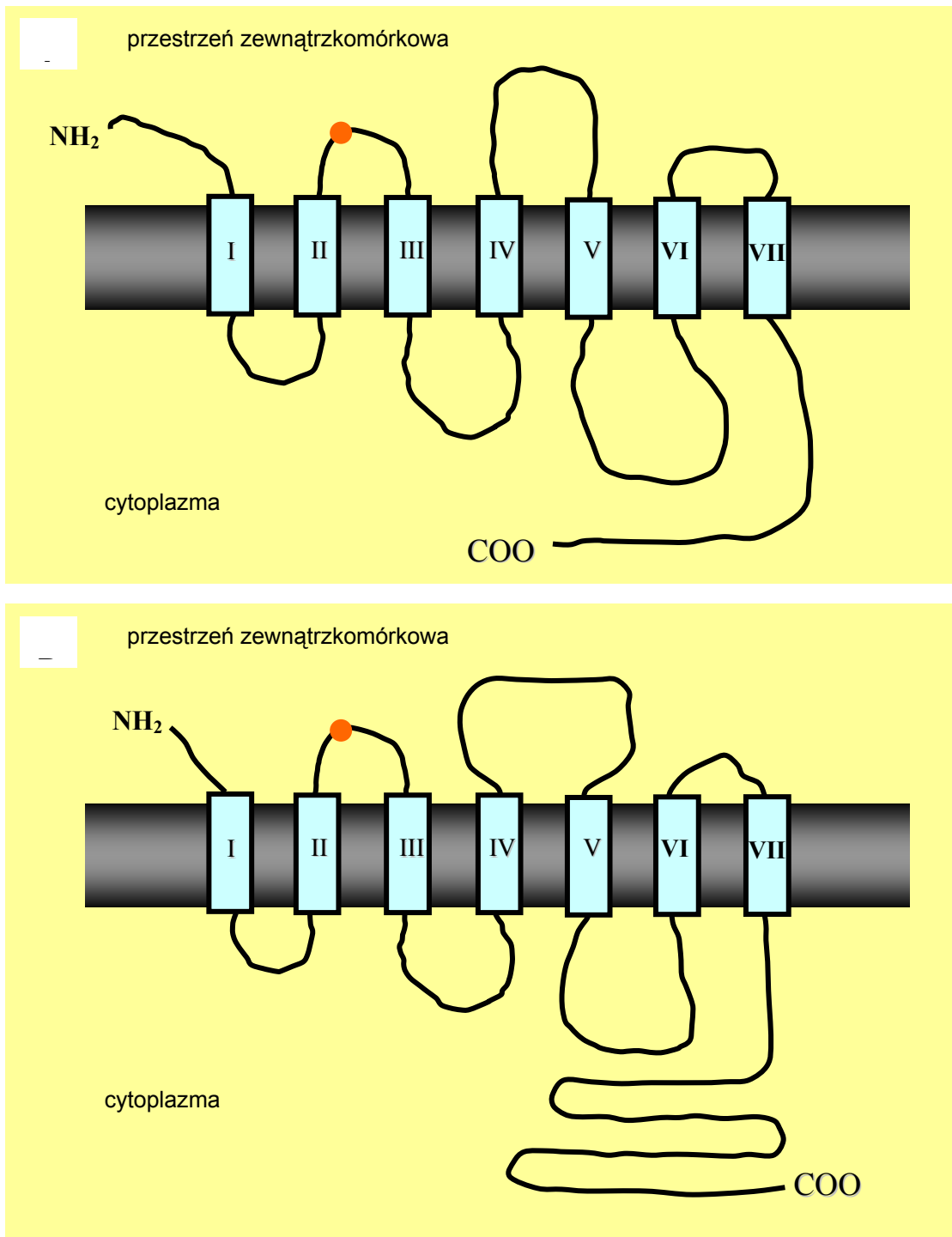
Ostatni, czwarty podtyp receptora adenozyne został odkryty dopiero w 1991 roku [218]. Został sklonowany z takich organizmów jak szczur, mysz, kurczak, pies, królik, owca oraz człowiek [95]. Homologia sekwencji pomiędzy szczurem a owcą i człowiekiem wynosi 74%. Ludzki gen dla tego receptora (*ADORA3*) zlokalizowany

jest na chromosomie 1 w pozycji 1p21-p13.3 [222]. U szczura najwyższy poziom tego receptora wykazano w jądrach. U człowieka najwięcej mRNA dla receptora A3 wykryto w wątrobie, mniej w aorcie, mózgu, sercu, nerkach i płucach [307]. Pobudzenie receptora A3 prowadzi do zahamowania cykazy adenylanowej [383]. Wykazano również, że w komórkach tucznych oraz w mózgu szczura aktywacja receptora A3 stymuluje fosfolipazę C β poprzez białko Gq/11 [1, 4]. Uważa się, że receptory A3 odgrywają rolę w ochronie komórki przed skutkami niedokrwienia i niedotlenienia oraz wywołują degranulację komórek tucznych [92]. Wykazano, że myszy pozbawione genu receptora A3 są chronione przed niedotlenieniem i mioglobinurią powstałą w wyniku uszkodzenia nerek. Zablokowanie receptora A3 chroni, a aktywacja zwiększa uszkodzenie nerek wywołane niedotlenieniem i mioglobinurią [181].

2.7.1. Budowa receptorów adenozytowych

Receptory adenozytowe są silnie konserwowaną klasą białek o dość dużym stopniu podobieństwa. Homologia pomiędzy szczurzym receptorem A1 i A2b wynosi 45% [331], a ludzki receptor A3 z receptorami A1, A2a, A2b wykazuje kolejno 50%, 43% i 40% homologii [186]. Natomiast stopień homologii między receptorami A1 w różnych gatunkach wynosi 87%. Wysoki stopień identyczności (93%) wykazano pomiędzy ludzkim i psim receptorem A2a [248]. Wszystkie AR należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR, ang. *G-protein-coupled receptors*) i posiadają wspólny plan budowy. Zbudowane są z siedmiu domen transbłonowych (ang. *transmembrane* TM 1-7), z których każda składa się z 21-28 hydrofobowych aminokwasów tworzących helisę. Regiony te są generalnie mocno konserwowane w toku ewolucji. Koniec łańcucha białkowego, który zawiera wolną grupę aminową (N-terminalny koniec) znajduje się na zewnątrz komórki, natomiast koniec C-terminalny występuje w obszarze cytoplazmatycznym (Ryc.2). Łańcuch aminokwasowy łączący domeny transbłonowe formuje trzy zewnątrzkomórkowe oraz trzy cytoplazmatyczne pętle (Ryc. 2). Największe różnice w sekwencji aminokwasowej pomiędzy receptorami Ado są obserwowane w drugiej pętli zewnątrzkomórkowej [185]. Domeny transmembranowe tworzą kieszeń, do której wiąże się ligand. Prace z zastosowaniem mutagenezy punktowej oraz użycie szeregu białek chimerycznych pozwoliły zidentyfikować reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie agonistów i antagonistów do każdego ze sklonowanych receptorów. W przypadku receptora A1

aminokwasy determinujące wiązanie ligandu znajdują się w obrębie TM1-TM3 oraz TM6 i TM7 [250]. Szczególnie ważna wydaje się His278 w TM7, gdyż mutacja w tym miejscu uniemożliwia związanie liganda [247]. Zastąpienie His256 w TM6 krowiego receptora A1 leucyną powoduje czterokrotny spadek powinowactwa do antagonisty bez zmian powinowactwa do agonisty [247]. Zamiana Gly w pozycji 14 na Thr w TM1 ludzkiego receptora A1 zwiększa 100-krotnie powinowactwo do agonisty [298].



Ryc.2. Schemat budowy receptora A1 (A) i A2a (B). Kółkiem zaznaczono miejsce glikozylacji receptora. Cyframi I-VII zaznaczone są domeny przezbłonowe.

W ludzkim receptorze A1 zidentyfikowano konserwowaną resztę Asp55 w TM2, która jest miejscem wiązania jonów Na⁺, regulujących powinowactwo tego receptora do agonisty [17]. W przypadku ludzkiego receptora A2a aminokwasy istotne w wiązaniu ligandu znajdują się w TM3, TM5-7 oraz w drugiej petli zewnątrzkomórkowej [156, 157, 250]. Wykazano ponadto, że lizyna 209 i kwas glutaminowy 212 zlokalizowane w trzeciej petli cytoplazmatycznej ludzkiego receptora A2a są niezbędne w oddziaływaniu receptora z białkiem Gs [249]. Okazało się, że w ludzkim receptorze A2a treonina znajdująca się w C-końcowym ogonku w pozycji 298 jest niezbędna do szybkiej desensytyzacji receptora indukowanej związaniem ligandu [262].

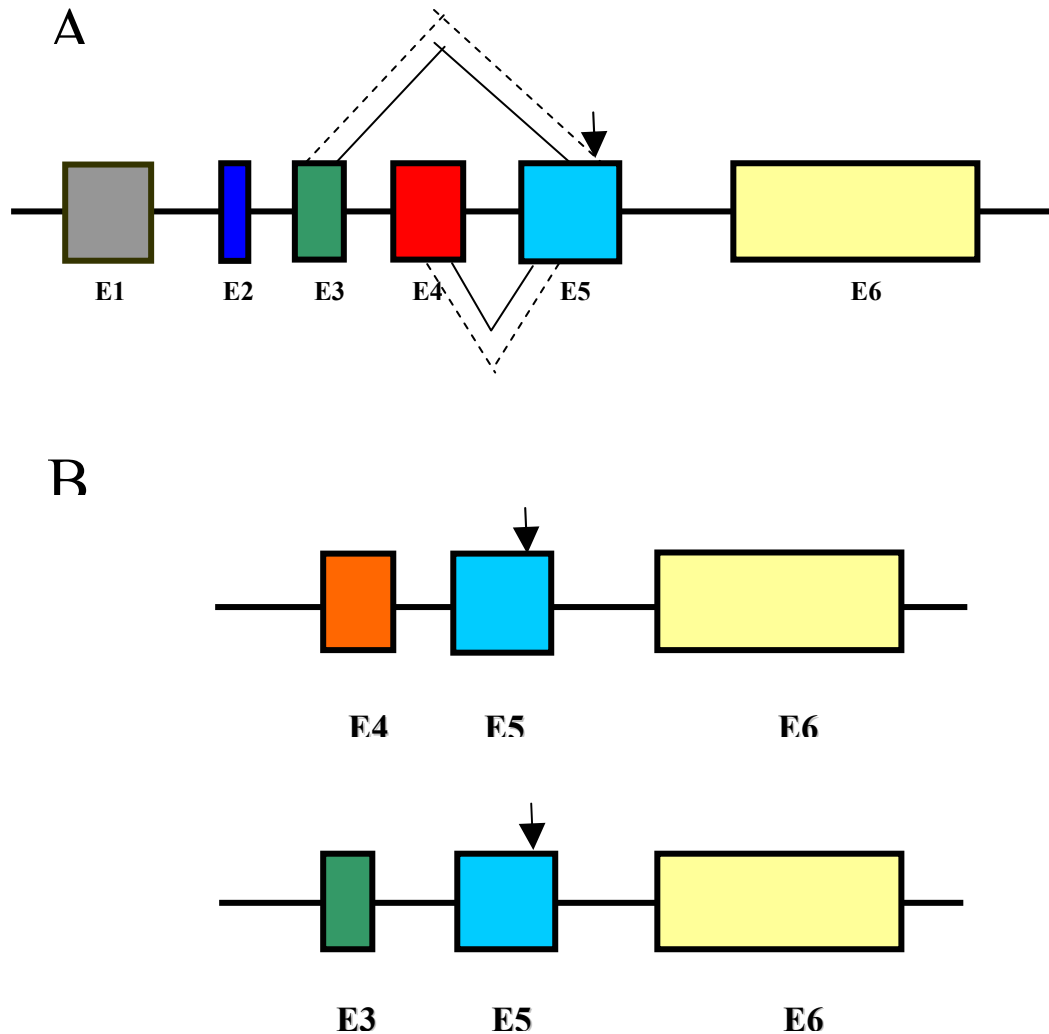
Receptory często ulegają glikozylacji, która wpływa na stabilizację konformacji białka receptorowego i stanowi ochronę przed proteazami. Każdy z receptorów adenozyiny posiada miejsce konsensusowe dla glikozylacji (N-X-S/T, gdzie X to każdy aminokwas z wyjątkiem proliny) w obrębie drugiej zewnątrzkomórkowej petli [248]. W przypadku receptora A3 poza tym miejscem (Asn 161) znaleziono dodatkowe miejsce glikozylacji w pobliżu N-końca (Asn 4), które występuje w receptorach A3 u wszystkich przebadanych dotąd gatunków, ale brak jest go w receptorach A1, A2a i A2b [136]. Rodzaj przyłączonych cukrów do białka receptorowego, a także długość łańcucha cukrowego, różnią się w poszczególnych komórkach czy tkankach. Nakata pokazał, że szczurzy receptor A1 z jąder ma ruchliwość elektroforetyczną odpowiadającą masie 41 kDa, natomiast receptor z mózgu 34 kDa. Potraktowanie obydwu receptorów endoglikozydazą F zwiększyło ruchliwość elektroforetyczną obu białek tak, że oba migrowały w żelu z szybkością odpowiadającą białku o masie 30 kDa [231].

Masa receptora A2a z mózgu wołu wynosi 45 kDa, a po inkubacji z endoglikozydazą F białko receptora A2a migruje w żelu z szybkością odpowiadającą białku o masie 38 kDa [18].

Wszystkie receptory adenozynowe za wyjątkiem A2a zawierają resztę cysteiny w obrębie C-końca, będącą potencjalnym miejscem palmitylacji [136, 186]. Przypuszcza się, że cysteina ta po palmitylacji może być zaangażowana w tworzenie czwartej wewnątrzkomórkowej petli. Znaczenie funkcjonalne powstałej w ten sposób struktury nie jest w tej chwili znane. Gao i wsp. pokazali, że palmitylacja receptora A1 ma niewielki wpływ na łączenie się receptora z efektozem, internalizację indukowaną agonistą oraz „down-regulation” [99].

2.7.2. Struktura i regulacja ekspresji genów AR

Struktura genów AR jest podobna. Cechą wspólną ludzkich genów AR jest pojedynczy intron, który przerywa sekwencję kodującą drugą pętlę zewnątrzkomórkową [94, 250, 290]. Najlepiej poznany jest gen receptora A1, który składa się z 6 eksonów i 5 intronów, z czego sekwencja kodująca białko receptora zlokalizowana jest w eksonie 5 i 6 (Ryc. 3).

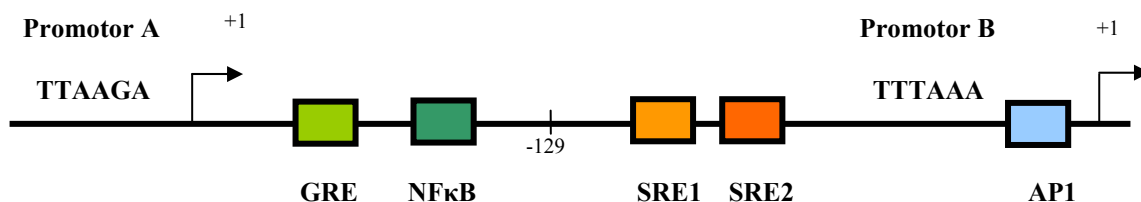


Ryc. 3. Schematyczna prezentacja organizacji ludzkiego genu receptora A1 (*ADORA1*).

A. Start sekwencji kodującej białko receptora znajduje się w eksonie 5 (strzałka). Liniami przerywanymi zaznaczono transkrypty powstałe w wyniku działania dwóch różnych promotorów.

B. Organizacja alternatywnych transkryptów obecnych w ludzkich tkankach.

W analizowanych pod tym kątem tkankach wykazano obecność dwóch głównych transkryptów *ADORAI* (Ryc. 3B). Jeden z tych transkryptów zawiera sekwencje kodowane przez eksony 4, 5, 6, a drugi sekwencje kodowane przez eksony 3, 5, 6 [290]. Transkrypt obejmujący eksony 4, 5 i 6 znaleziono we wszystkich tkankach wykazujących ekspresję receptora, podczas gdy obecność transkryptu obejmującego eksony 3, 5 i 6 znaleziono w takich tkankach jak: mózg, jądro i nerki, które charakteryzują się dużą ekspresją receptora A1. Początkowo sądzono, że powstają one w wyniku alternatywnego składania mRNA lecz późniejsze badania pokazały, że są one wynikiem działania dwóch promotorów zlokalizowanych w obrębie genu receptora A1 (Ryc 4). W ludzkim genie *ADORAI* zidentyfikowano dwie sekwencje promotorowe określane jako promotor proksymalny A i położony ~600 pz poniżej promotor dystalny B [291]. Cechą charakterystyczną obu promotorów jest nietradycyjna sekwencja kasety TATA [291, 298]. Wykazano, że myszy promotor A w obrębie 500 pz posiada wszystkie elementy niezbędne do indukcji ekspresji genu *Adora1*. Sekwencja ta zawiera również miejsca wiązania dla białek GATA-4 i Nkx2.5, które jako czynniki transkrypcyjne w sposób addytywny stymulują aktywność promotora A [298].



Ryc. 4. Schematyczna prezentacja otoczenia promotorów w ludzkim genie receptora A1.

Start transkrypcji dla promotora A i B oznaczono jako +1. Oba promotory oddalone są od siebie o około 600 pz. GRE, miejsce wiązania receptora kortykoidowego; NFκB, miejsce wiązania czynnika NFκB; SRE1 i SRE2, miejsca wiązania surowiczego czynnika transkrypcyjnego SRF; AP1, miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego AP1.

Promotor B jest mniej aktywny niż promotor A, niemniej odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genu receptora A1. W obrębie promotora B wykazano istnienie sekwencji SRE-1 i SRE-2 (ang. *serum response element*) będących miejscem wiązania surowiczego czynnika transkrypcyjnego SRF (ang. *serum response factor*), kasety TATA, sekwencji rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny AP1 oraz sekwencji GRE (ang. *glucocorticoid response element*) warunkującej wiązanie receptora glukokortykoidowego [292]. Istnienie miejsca wiązania receptora sterydowego w obrębie promotora B tłumaczy wcześniej zaobserwowane zjawisko stymulacji przez glukokortykoidy ekspresji receptora A1 w linii komórkowej DDT₁ MF-2 wywodzącej się z mięśni gładkich, oraz w mózgu [103, 292, 336]. Uważa się, że istnienie dwóch promotorów w genie receptora A1 umożliwia regulację ekspresji tego genu przez różne czynniki i determinuje poziom obu transkryptów w poszczególnych tkankach.

Sekwencja kodująca w genie receptora A2a, podobnie jak w genie receptora A1, jest przedzielona intronem w miejscu kodującym drugą zewnątrzkomórkową pętlę [54, 273]. W obrębie ludzkiego genu *ADORA2A* wykazano istnienie nieklasycznej kasety TATA, podczas gdy w szczurzym genie *Adora2a* wykazano brak tej sekwencji. Zarówno ludzki jak i szczurzy gen receptora A2a zawiera miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych takich jak: AP-1, NF1 i AP4 [54, 273]. W przeanalizowanych dotąd tkankach wykazano istnienie pojedynczego transkryptu genu receptora A2a [202, 273, 331]. Regulacja ekspresji genu receptora A2a jest stosunkowo słabo poznana. Wykazano, że w szczurzych komórkach PC12 w warunkach obniżonego poziomu tlenu dochodzi do wzrostu ilości mRNA dla receptora A2a [163]. Również w komórkach SH-SY5Y wywodzących się z ludzkiego nerwiaka niedojrzałego stymulacja kinazy białkowej C prowadzi do wzrostu poziomu mRNA dla A2a [274]. Nie wiadomo jednak jakie czynniki transkrypcyjne uczestniczą w obu procesach.

Analiza sekwencji genu receptora A2b wskazuje na organizację podobną do genów dla receptorów A2a i A1. W analizowanych tkankach z reguły natrafia się na dwa transkrypty genu receptora A2b o wielkości 1,8 i 2,2 kpz [331]. Przez analogię do genu dla receptora A1 można przypuszczać, że ekspresja genu receptora A2b jest kontrolowana przez więcej niż jeden region promotorowy.

Ogólna organizacja genu dla receptora A3 jest podobna do genów pozostałych receptorów adenozynowych [386]. W mysim genie *Adora3* znaleziono trzy miejsca

startu transkrypcji lecz jednocześnie stwierdzono brak kasety TATA oraz CAAT. Wykazano jednak, że sekwencja w obrębie 1 pz do -254 pz pełni funkcję promotora. W regionie tym znaleziono miejsca wiążące czynnik transkrypcyjny AP1 oraz białka z rodziny GATA [386]. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że wielkość i ilość transkryptów genu receptora A3 zależy od rodzaju tkanki oraz organizmu. W szczurzych komórkach mięśni gładkich wykryto transkrypt wielkości 1,8 kpz, a w komórkach tucznych transkrypt wielkości 2,1 kpz [386]. W ludzkich tkankach wykazano istnienie dwóch transkryptów genu *ADORA3* o wielkości 2 i 5 kpz [12].

2.7.3. Regulacja białek receptorów adenozynowych.

Elastyczność odpowiedzi komórkowej zapewniona jest przez współdziałanie pomiędzy sygnałami, w których pośredniczą receptory oraz poprzez regulację działania samych receptorów [348]. Receptory sprzężone z białkami G (GPCR, ang. *G-protein-coupled receptor*) podlegają desensytyzacji indukowanej przez agonistę, jest to mechanizm, który kończy odpowiedź komórkową na stymulację przez agonistę endo- i egzogenego [30, 91, 129]. Mechanizmy leżące u podstaw gwałtownej desensytyzacji angażują często fosforylację receptora przez kinazę z rodziny kinaz GRK (GRK, ang. *G-protein-coupled receptor kinases*). [209, 282]. Fosforylacja receptora promuje wiązanie arestyny, co prowadzi do dysocjacji kompleksu receptor-białko G [35, 40, 91]. Wiele receptorów z rodziny GPCR po dysocjacji od białka G ulega internalizacji w procesie zależnym od arestyny i zachodzącym w zagłębieniach błony plazmatycznej opłaszczonych klatrynami [109]. W wyniku tego procesu ilość receptora w błonie plazmatycznej może znacząco się obniżyć. Internalizowany receptor we wczesnych endosomach może zostać defosforylowany i zostaje ponownie przemieszczony do błony plazmatycznej (proces resensytyzacji) bądź podlega degradacji w lizosomach [172, 326]. Dłuższa aktywacja agonistą zwykle prowadzi do przekierowania zinternalizowanego receptora do przedziałów lizosomalnych z następującą później degradacją, chociaż niektóre GPCR ulegają temu procesowi po względnie krótkim traktowaniu agonistą [164, 353]. Mechanizm desensytyzacji GPCR może również obejmować zmianę oddziaływania cząsteczek uczestniczących w przekazywaniu sygnału od receptora. W tym przypadku jednak mamy często do czynienia

z desensytyzacją heterologiczną (obejmującą różne receptory) ponieważ wiele molekuł stanowi wspólne ogniwa wielu różnych szlaków sygnalizacyjnych [250].

Receptory adenosynowe jako białka należące do rodziny GPCR również podlegają typowym dla tej klasy białek procesom regulacji. Badania dotąd przeprowadzone wskazują jednak, że stopień odpowiedzi poszczególnych receptorów adenosyny na ligację receptora oraz mechanizm desensytyzacji jest różny. Różnice te najwyraźniej widać w przypadku receptora A1 i A3. Doświadczenia prowadzone na komórkach CHO ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora A1 pokazały, że 30 minutowa ekspozycja na agonistę nie wpływa na hamowanie aktywności cykazy adenylanowej [261]. Natomiast w przypadku komórek CHO ze stabilną ekspresją receptora A3 już po 10 minutach ekspozycji na agonistę receptora A3 obserwowano 8-krotny spadek odpowiedzi receptora mierzonej zdolnością do hamowania cykazy adenylanowej [288]. Relatywnie wolną desensytyzację receptora A1 obserwowano również w innych układach doświadczalnych. W komórkach DDT1 MF-2 wywodzących się z komórek mięśni gładkich świnki morskiej $t_{0.5}$ dla desensytyzacji receptora A1 wynosi $\sim 6-8$ godz. [285]. Podobną szybkość desensytyzacji receptora A1 wykazano w izolowanych kardiomiocytach kurczenia dla których $t_{0.5}$ wynosił ~ 7.5 godz. [184]. Z kolei szybką desensytyzację receptora A3 obserwowano w szczurzych komórkach białaczkowych RBL-2H3 gdzie już 3 minutowa ekspozycja na agonistę (NECA) całkowicie znosiła zdolność tego receptora do indukcji wzrostu poziomu cytozolowego wapnia [4]. W przypadku receptora A3 zarówno proces internalizacji jak i proces powrotu receptora do błony plazmatycznej jest procesem szybkim. W ludzkich komórkach gwiazdziaka powrót internalizowanego receptora A3 do błon plazmatycznych obserwowano już po 2 godz od usunięcia agonisty [349]. Mechanizm desensytyzacji receptora A3 polega na fosforylacji reszt treoninowych i serynowych w C-końcowej części receptora. Fosforylację tę można obserwować już po 15 sekundach od związania agonisty, a maksimum zostaje osiągnięte po 4 minutach [258]. Za fosforylację tą odpowiadają kinazy z rodziny kinaz GRK, a nie PKA oraz PKC. Ostatnio opublikowane wyniki wskazują, że w fosforylacji i desensytyzacji receptora A3 w komórkach CHO biorą również udział kinazy MAP [350]. W przypadku receptora A1 związanie agonisty również wiąże się z fosforylacją receptora lecz jest to proces znacznie wolniejszy oraz fosforylacji ulegają reszty tyrozynowe i w mniejszym stopniu serynowe [55]. Fosforylacji tej nie towarzyszy spadek zdolności do hamowania cykazy adenylanowej

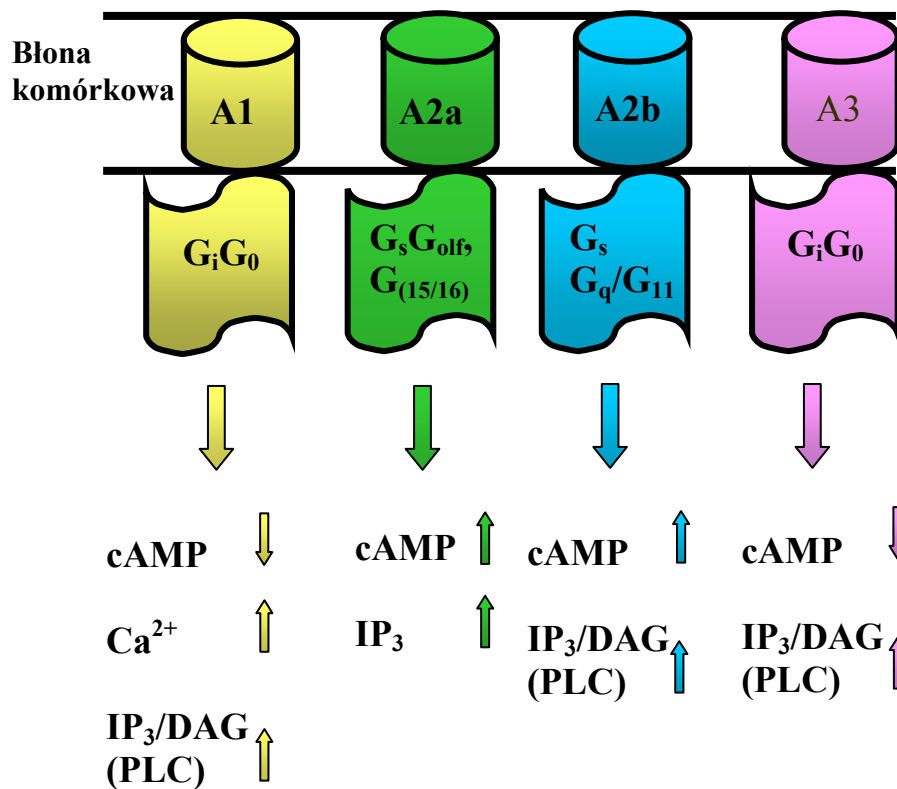
(w czasie następuje on znacznie później) lecz spadek indukowanej aktywacją A1 akumulacji wapnia i fosfoinozytolu. Również internalizacja receptora A1 następuje dopiero po okresie 5-12 godzin od stymulacji [135]. W doświadczeniach na komórkach DDT1MF-2 wykazano, że receptor A1 jest fosforylowany zarówno przez PKC jak i PKA [55]. W pracach na komórkach LLC-PK1 wywodzących się z epitelialnych komórek świńskiej nerki zademonstrowano, że w internalizacji receptora A1 uczestniczy kawolina i deaminaza adenozy, które tworzą kompleks z receptorem [107].

Desensytyzacja receptora A2a przebiega szybko, lecz nieco wolniej od receptora A3 [51, 227, 288]. Ekspozycja komórek CHO na agonistę receptora A2a (NECA) powoduje po 30 min około 40% spadek odpowiedzi cykazy adenylnowej [262]. Doświadczenia z użyciem rekombinowanego receptora oraz szeregu mutantów wykazały, że proces szybkiej desensytyzacji receptora A2a zależy od fosforylacji reszty treoninowej w pozycji 298 [262]. Kinazą odpowiedzialną za tę fosforylację jest GRK2 [106, 227].

Desensytyzacja i internalizacja receptora A2b podobnie jak w przypadku receptora A2a jest procesem relatywnie szybkim. Znaczący spadek zdolności receptora do aktywacji cykazy adenylnowej obserwowano w komórkach COS-7 i komórkach CHO po 1 godzinnej ekspozycji na agonistę [275]. Miejscem fosforylacji determinującej internalizację receptora w szurzym receptorze A2b jest seryna 326 leżąca w C-terminalnej części receptora [209].

2.7.4. Szlaki przekazywania sygnału od receptorów adenozykowych.

Szlaki przekazywania sygnału z udziałem receptorów adenozy generalnie sprzężone są z hamowaniem lub stymulacją cykazy adenylnowej poprzez białka G. Wiadomo, że jeden receptor może być sprzężony z więcej niż jednym białkiem G. Dodatkowo jednak wykazano, że sygnalizacja z udziałem receptorów adenozy może aktywować również kinazy MAP [314] (Ryc.5).



Ryc.5. Wtórne przekaźniki sygnału generowane w komórce w odpowiedzi na stymulację poszczególnych typów receptorów adenozyiny. IP₃: inozytolo-1,4,5-trifosforan, DAG: diacyloglicerol, PLC: fosfolipaza C. Strzałki przedstawiają kierunek zmian.

Sygnalizacja poprzez receptor A1 sprzężona jest z hamowaniem cykazy adenylationowej, co wywołuje spadek wtórnego przekaźnika sygnału, którym jest cAMP [193, 355]. Pobudzenie receptorów A1 może wyzwać kaskadę wtórnych przekaźników informacji, której rezultatem jest aktywacja kinazy białkowej C (PKC) oraz wzrost wewnątrzkomórkowego wapnia [215, 270], aktywacja fosfolipazy C (PLC), fosfolipazy A₂ (PLA₂), zależnych od wapnia kanałów potasowych oraz syntazy tlenku azotu (NOS). Opisano również aktywację fosfolipazy D poprzez receptory A1 w komórkach DDT₁MF-2 [104, 105]. Wykazano, że receptor A1 ulegający przejściowo ekspresji w komórkach COS-7 aktywuje ERK1/2 poprzez podjednostki β i γ białka G_{i/o} [87]. Dalsze doświadczenia w komórkach CHO wykazały, że aktywacja ERK1/2 przez receptor A1 jest zależna od czasu i stężenia agonisty [312] i wrażliwa na inhibitory

kinazy PI-3K, takie jak wortmanin i LY294002 [67]. Ponadto w szczurzych komórkach DDT₁MF-2, wywodzących się z komórek mięśni gładkich, receptor A1 sprzężony jest z kinazami ERK1/2 oraz SAPK p38 w sposób zależny od białka Gi [299].

Receptor A2a związany jest z białkami Gs i za ich pośrednictwem aktywuje cyklazę adenylanową, powodując wzrost stężenia cAMP w komórce [193, 248]. Wykazano również udział tego receptora w transmisji synaptycznej i uwalnianiu transmittera poprzez wzmocnienie presynaptycznych kanałów Ca²⁺, włączenie cyklazy adenylanowej i aktywację cAMP-zależnej kinazy A [161]. Prace z użyciem transfekowanych stabilnie komórek CHO [137, 159, 312], komórek PC12 [11, 159] oraz ludzkich komórek endotelialnych [318] pokazały że sygnał adenozynowy od receptora A2a może być przekazywany, bądź poprzez białko Gas do cyklazy adenylanowej i dalej przez PKA do białka CREB, lub poprzez białka G_{12/13} i SOS do kaskady RAS-(Raf-1)-MEK-ERK1/2. Otrzymano również przesłanki doświadczalne wskazujące, że sygnał na etapie PKA może zostać także przeniesiony na kinazy Rac1/Cdc42 i dalej do p38. Przypuszcza się również, że kinaza Src może mostkować sygnał między PKA, a białkiem Ras [314].

Receptory A2b podobnie jak A2a sprzężone są z białkami Gs i za ich pośrednictwem aktywują cyklazę adenylanową. Dodatkowo poprzez białka G_{αq}/G₁₁ aktywują fosfolipazę C, co prowadzi do wzrostu inozytolo(1,4,5)trifosforanu (IP₃) [88, 369]. Wykazano również, że sygnalizacja poprzez ten receptor może przebiegać z udziałem kinaz MAP [187, 188, 189]. Pokazano, że aktywacja receptora A2b stymuluje nie tylko ERK1/2 ale również JNK i p38. W ludzkich komórkach tucznych stymulacja tego receptora wpływa na fosforylację (aktywacja) ERK1/2, która osiąga maksimum po 5 min., podczas gdy p38 i JNK wykazują maksymalną fosforylację po 1-15 min. [90]. Pośredniczona przez receptor A2b aktywacja szlaku kinaz MAP ma związek z sekrecją IL-8 i w rezultacie z aktywacją komórek tucznych [88]. Jak dotąd receptor A2b jest jedynym receptorem adenozynowym, który przekazuje swój sygnał poprzez wszystkie trzy rodziny kinaz MAPK tj. ERK1/2, p38 i JNK [90, 98, 309, 312].

Aktywacja receptora A3 prowadzi do zahamowania produkcji cAMP [383] poprzez białko G_{αi} [259]. W komórkach RBL-2H3 (linia szczurzych granulocytów zasadochłonnych) aktywacja tego receptora indukuje zwiększoną produkcję IP₃ oraz związany z tym wzrost stężenia Ca²⁺ w cytoplazmie [4, 289, 343]. Ponadto obserwowano również aktywację fosfolipazy C β, wynikiem czego była aktywacja

enzymów przeciwutleniających, np. dyzmutazy nadtlenkowej [203, 343]. Stymulacja receptora A3 prowadzi również do aktywacji ERK1/2 w ludzkich płodowych astrocytach [235] oraz w komórkach CHO [312]. Wykazano, że sygnał od receptora A3 do kinaz ERK1/2 przenoszony jest przez uwolniony dimer $\beta\gamma$, który stymuluje kinazę PI3K(γ), która z kolei aktywując białko Ras uruchamia kaskadę Ras-Raf-1-Mek-ERK1/2-c-fos [313].

2.8. Zaburzenia wrażliwości tkanek cukrzycowych na adenozyne.

Komórka może posiadać wiele różnych typów AR w rozmaitych kombinacjach ilościowych i jakościowych [287, 322], co może prowadzić do zmienionej wrażliwości tkanek na adenozyne w wielu stanach fizjologicznych i patologicznych. Zjawisko zmniejszonej wrażliwości niektórych tkanek i komórek obserwuje się w cukrzycy. Dane doświadczalne wskazują, że zmiany te są specyficzne dla danej tkanki lub rodzaju komórki. Wykazano obniżoną wrażliwość płytek krwi na hamowanie agregacji przez adenozyne u pacjentów z cukrzycą typu 1 [100]. Natomiast relaksacyjne działanie Ado na mięśniówkę naczyń trzustki u szczurów z cukrzycą indukowaną podaniem streptozotocyny (STZ) jest obniżone, podczas gdy u tych samych zwierząt wrażliwość mięśniówki aorty na ten nukleozyd jest znacząco podwyższona [176]. Wykazano, że lewe przedsionki serca szczurów cukrzycowych charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na Ado [117]. Wzrost wrażliwości na relaksacyjne działanie Ado obserwuje się także w mięśniach gładkich ciała jamistego zarówno u ludzi jak i u szczurów z cukrzycą [118]. W piśmiennictwie można również znaleźć doniesienia wskazujące na wielokrotny wzrost wrażliwości na adenozyne naczyń nerek [276] oraz hipokampa [223] u szczurów cukrzycowych. W cukrzycy dochodzi również do zmiany wrażliwości mięśniówki kłębuszków nerkowych na adenozyne. Wykazano, że kłębki izolowane od szczurów ze średnio podwyższonym poziomem glukozy (do 18 mM) miały obniżoną wrażliwość na adenozyne podczas gdy kłębki szczurów z wysokim poziomem glukozy (ponad 27 mM) charakteryzowały się wzrostem wrażliwości na ten nukleozyd [339]. W badaniach tych wykazano, że czynnikiem determinującym zmienioną wrażliwość kłębków na adenozyne była zmiana aktywności receptora A1.

Wydaje się, że wiele ze zmian obserwowanych w cukrzycy wynika z zaburzeń w funkcjonowaniu receptorów adenozynowych lub w zmianie ich ekspresji i dystrybucji w komórce.

4. MATERIAŁY

Odczynniki i materiały użyte w doświadczeniach były czystości analitycznej lub biochemicznej i pochodziły z następujących firm:

Firma	Odczynnik
A & A Biotechnology	Fenozol Zestaw do izolacji RNA Zestaw DNA gel Out
Bio-Rad Laboratories	akrylamid N,N-metylenobisakryamid TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylodiamina)
DacoCytomation	Zestaw LSAB™2
DNA Gdańsk	marker masowy DNA (M1)
Chemicon	Przeciwciała przeciw receptorowi A2b
Epicentre	chlerek magnezu deoksyrybonukleotydy DTT (ditiotretitol) Master Amp PCR enhancer odwrotna transkryptaza (MMLV-RT) wraz z buforem polimeraza Tfl wraz z buforami
Integrated DNA Technologies (IDT)	startery do PCR
Invitrogen	agaroza
Merck	sacharoza
Millipore	membrana poliwinylowa (PVDF)-Immobilon-P
Pointe Scientific	zestaw Glukoza-Hexo (odczynnik G)
POCh	pozostałe odczynniki
Promega	RN-asin
Roche	leupeptyna oligo(dT) Pefabloc S.C.
Santa Cruz	Przeciwciała przeciw: β -aktynie, p14-3-3; receptorom adenozyne A2a i A3 oraz peptydy blokujące

Sigma-Aldrich	albumina wołowa (BSA, V frakcja) BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indylo phosphate) bromek etydyny Coomassie Brilliant Blue G-250 i R-250 deoksychofan sodu DEPC (dietylopirowęglan) Glicerol glukoza HEPES (kwas N-2-hydroksyetylopiperazino-N-2-etano sulfonowy) IgG królicze znakowane fosfatazą alkaliczną izopropanol IPTG (izopropyl β-D-tiogalaktozyd) NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chloride) Przeciwciała przeciw receptorowi adenozyiny A1 i peptyd blokujący Pożywka DMEM SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu) Streptozotocyna (STZ) sól sodowa kwasu etylenodwuamino- czteroocetowego (EDTA) Tris (Tri(hydroksymetylo)aminometan)
Whatmann	bibuła chromatograficzna 3mm Chr

4.1 ZWIERZĘTA

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, samcach o ciężarze 200-220 g, które karmione były paszą standartową Murigran (*Wytwórnia Pasz-Motycz*) i pojone wodą do woli. Po indukcji cukrzycy zwierzęta podzielono na dwie grupy: pierwszą stanowiły zwierzęta z hiperglikemią; drugą - zwierzęta z hiperglikemią, którym podawano insulinę (Actraphane HM, *Novo-Nordisk*) w dawce 10 U na 1 kg masy ciała zwierzęcia. Trzecia grupa - to szczury, które nie otrzymały STZ, tylko vehiculum (bufor cytrynianowy) i traktowane były jako grupa kontrolna. Doświadczenia rozpoczynano w godzinach porannych, między 8.00 a 9.00.

4.2. BUFORY I ROZTWORY

AKRYLAMIDY (30%)

29,2 g akrylamidu
0,8 g N,N'-metylenobisakrylamidu
H₂O do 100 ml

BCIP

0,5 g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate rozpuszczono w 10 ml 100%
dimetyloformamidu

BUFOR A

50 mM Tris-HCl, pH 7.2
1 mM DDT
0,2 mM Pefabloc SC
5 µl leupeptyny

BUFOR B

140 mg kwasu cytrynowego - KOH, pH 4,6
100 mg glukozy
8 mg Na₂HPO₄
10,5 mg KH₂PO₄
H₂O do objętości 50 ml

BUFOR DO ELEKTROFOREZY TAE (Tris- kwas octowy)

4,84 g Tris
1,142 ml 99% kwasu octowego
2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
H₂O do objętości 1L

BUFOR OBCIĄŻAJĄCY DO ELEKTROFOREZY AGAROWEJ (BOA)

0,25% błękit bromofenylowy

0,25% ksylen cyjanu FF

30 % glicerol w wodzie

BUFOR OBCIĄŻAJĄCY DO ELEKTROFOREZY POLIAKRYLAMIDOWEJ (BOB)

30 mM Tris-HCl pH 6,8

10% β -merkaptoetanol

2% SDS

10% glicerol

0,1% błękit bromofenolowy

BUFOR DO ALKALICZNEJ FOSFATAZY

100 mM Tris-HCl pH 9,0

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

BUFOR DO ELEKTROTRANSFERU

5,8 g Tris

2,9 g glicyny

200 ml metanolu

całość rozpuszczano w 1 L H₂O, doprowadzając pH do 8,3

COOMASSIE BRILLIANT BLUE

0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250

40% metanol

10% kwas octowy

NBT

0,5 g błękitu tetrazoliowego rozpuszczono w 10 ml 70%

dimetyloformamidu

ODCZYNNIK BRADFORDA na 1 L

0,4 g Coomassie Brilliant G - 250

200 ml 96 % etanolu

400 ml 85 % kwasu ortofosforanowego

H₂O do objętości 1 L

TBS

8 g NaCl

0,2 g KCl

3 g Trisu

H₂O do objętości 1 L

pH 7,4 doprowadzone HCl

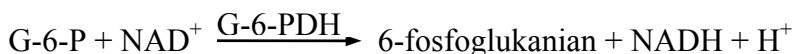
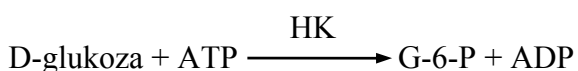
5. METODY

5.1. Indukcja cukrzycy.

Cukrzyca u szczurów była wywoływana poprzez iniekcję streptozotocyny (STZ), która działa cytotoksycznie na komórki beta trzustki, wytwarzające insulinę. W wyniku działania streptozotocyny dochodzi do nieodwracalnego uszkodzenia narządu i zmniejszenia poziomu insuliny lub całkowitego braku tego hormonu, co prowadzi do rozwoju cukrzycy typu I. Streptozotocynę w buforze B [mat.4.2.] podawano szczurom w dawce 75 mg na 1 kg masy ciała zwierzęcia. Z uwagi na to, iż nie u wszystkich szczurów podanie STZ prowadzi do rozwoju cukrzycy konieczna jest selekcja szczurów dla wybrania grupy chorych zwierząt. W tym celu zwierzętom oznaczano stężenie glukozy.

5.2. Oznaczanie stężenia glukozy we krwi.

Materiałem biologicznym, w którym oznaczano poziom glukozy była surowica, otrzymana poprzez zwirowanie krwi żyłnej, pobranej przez nacięcie koniuszka ogona szczura do próbówki z fluorkiem sodowym, który hamuje proces glikolizy w krwinkach. Stężenie glukozy oznaczano metodą enzymatyczną (heksokinazową) z wykorzystaniem zestawu Glukoza - Hexo firmy Pointe Scientific. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu reakcji katalizowanej przez heksokinazę (HK) oraz dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (G-6-PDH).



Heksokinaza fosforyluje glukozę używając cząsteczkę ATP. Powstający glukozo-6-fosforan jest utleniany przez dehydrogenazę z jednoczesną redukcją NAD^+ . Powstaniu NADH towarzyszy wzrost absorpcji przy długość fali 340 nm, który jest proporcjonalny do stężenia glukozy w surowicy krwi. W celu pomiaru stężenia glukozy w surowicy do próbek rozdozowywano 1 ml odczynnika G [Mat.4.] i 5 μl badanej surowicy. Jako kontrolę stosowano odczynnik G i 5 μl soli fizjologicznej, a wzorzec stanowił roztwór glukozy o stężeniu 100 mg/100 ml. Inkubację prowadzono w

temperaturze pokojowej przez 3 minuty, następnie dokonywano pomiaru absorbancji próbek w spektrofotometrze przy długości fali 340 nm. Stężenie glukozy obliczano ze wzoru:

$$\text{glukoza [mg/100 ml]} = \text{abs. próbki} / \text{abs. stand} \times \text{stęż. stand}$$

5.3 Izolacja tkanek szczura.

Zwierzęta dekapitowano, a badane narządy - nerki, serce i wątrobę usuwano. Wątrobę, serce i jedną nerkę umieszczano natychmiast w ciekłym azocie, drugą nerkę umieszczoną na schłodzonym na lodzie szkiełku cięto i rozdzielano na korę i rdzeń, następnie zamrażano w ciekłym azocie. Od pobrania narządu do zamrożenia tkanki mijało nie więcej jak 15 minut.

5.4. Izolacja kardiomiocytów.

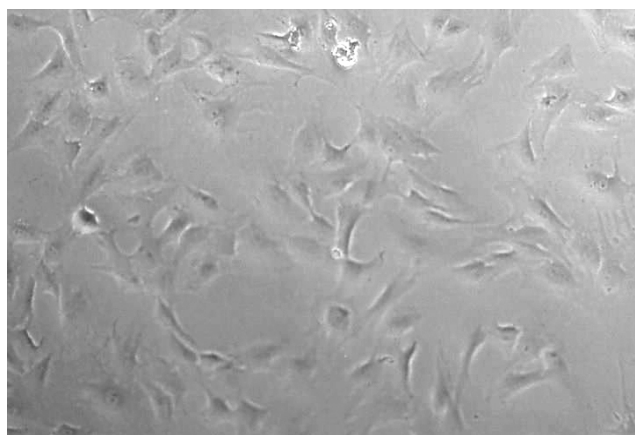
Miocyty izolowane z serc szczurzych (Ryc.6) według zmodyfikowanej metody opisanej przez Lewartowskiego [201] otrzymano od mgr Marzeny Podgórskiej [Zakład Medycyny Molekularnej]. Czystość otrzymanych preparatów oceniano pod mikroskopem. Zazwyczaj preparaty zawierały 70-80% kardiomiocytów. Izolowano z nich RNA [Met. 5.7] do przeprowadzenia reakcji kompleksowego PCR oraz białko do analizy Western blot [Met. 5.15].



Ryc. 6. Izolowane z serca szczura kardiomiocyty.

5.5. Izolacja i hodowla kardiofibroblastów.

Pierwotną hodowlę fibroblastów z serc szczurzych otrzymano od mgr Marzeny Podgórskiej [Zakład Medycyny Molekularnej]. Kardiofibroblasty izolowane były według zmodyfikowanej metody opisanej przez Dubey [79] z trawieniem enzymatycznym i selektywnym rozdziałem komórek. Komórki były hodowane w pożywce DMEM z 5 mM glukozą i 10% wołową surowicą płodową. W doświadczeniach, w których badano wpływ glukozy i insuliny, do pożywki DMEM dodawano różne stężenia tych związków i komórki były hodowane w tych warunkach przez 48 godzin. Żywołność komórek była oceniana na podstawie stopnia penetracji 0,4% błękitu trypanu do komórek. Do doświadczeń używano preparatów zawierających nie mniej niż 95% komórek nie wybarwionych (żywych). Zdjęcie przykładowej hodowli kardiofibroblastów szczura pokazane jest na Ryc.7.



Ryc. 7. Hodowane szczurze kardiofibroblasty.

5.6. Izolacja RNA z tkanek.

Izolację całkowitego RNA wykonywano przy użyciu zestawu RNA Prep Plus (A&A Biotechnology) z własnymi modyfikacjami. Około 100-200 mg tkanki umieszczano w jałowej probówce, dodawano 1 ml fenozolu i homogenizowano przy użyciu homogenizatora nożykowego. Po 5-minutowej inkubacji homogenatu w lodzie, dodawano 200 μ l chloroformu, intensywnie wytrząsano i dalej inkubowano w lodzie

przez 15 minut. Warstwę wodną mieszaniny rozdzielano przez wirowanie w wirówce z chłodzeniem przy maksymalnych obrotach (12000 obr./min.) przez 15 minut w temperaturze 4⁰C. Do nowej probówki typu Eppendorf pobierano górną (wodną) frakcję, dodawano równoważną ilość izopropanolu i po wymieszaniu pozostawiano w temperaturze -20⁰C na 18 godzin w celu precypitacji RNA. Po tym czasie mieszaninę (około 800 µl) nanoszono na minikolumnę ze złożem do izolacji RNA i wirowano przez minutę. Związane na złożu RNA przemywano dwukrotnie 800 µl i 300 µl roztworu A1, osuszając złożę przez wirowanie (45 s). Osuszoną kolumnienkę umieszczano w nowej probówce i do złoża znajdującego się na dnie kolumnienki dodawano 100 µl jałowej, wolnej od RNaz wody destylowanej. Inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej i wirowano 40 sekund w mikrowirówce. Znajdujące się w probówce oczyszczone RNA przechowywano w temperaturze -20⁰C do dalszych analiz.

5.7. Izolacja RNA z kardiomiocytów.

Osadzone przez wirowanie kardiomiocyty rozpuszczano w 5 ml fenozolu i inkubowano w lodzie 10 minut, po czym dodawano chloroform o objętości 250 µl na 1 ml fenozolu, intensywnie wytrząsano i inkubowano w lodzie 15 minut. Otrzymaną zawiesinę wirowano 10 minut w 4⁰C przy 13000 obr/min. Do zebranej fazy wodnej dodawano równoważną objętość izopropanolu. Po wymieszaniu próby były inkubowane w temperaturze -20⁰C 18 h. Następnie RNA izolowano według metody opisanej przez Chomczyńskiego/Sacchi [53]. Próby wirowano 15 minut w 4⁰C przy 13000 obr/min. Usuwano supernatant, a do osadu dodawano schłodzony 70% etanol w celu przepłukania RNA. Wirowano 10 minut w temperaturze 4⁰C przy 13000 obr/min, usuwano etanol i suszono osad w temperaturze pokojowej. Po osuszeniu osad rozpuszczano w 25 µl jałowej wody destylowanej. Przygotowane w ten sposób RNA było przechowywane w temperaturze -20⁰C do dalszych analiz.

5.8. Izolacja RNA z kardiofibroblastów.

RNA z kardiofibroblastów izolowano jak podano dla kardiomiocytów [Met. 5.7].

5.9. Pomiar stężenia RNA.

Stężenie oraz czystość RNA oznaczano spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy długościach fali 260 i 280 nm. Przyjęto, że jednostka absorbancji (1 OD₂₆₀) odpowiada 40 µg/ml pojedynczej nici RNA [308]. Czystość preparatów RNA oceniano na podstawie wartości stosunku OD₂₆₀/OD₂₈₀. Przyjęto, że preparat RNA charakteryzujący się stosunkiem OD₂₆₀/OD₂₈₀ w granicach 1,7-2,0 ma zadowalającą czystość.

5.10. Reakcja odwrotnej transkrypcji.

Proces odwrotnej transkrypcji umożliwia uzyskanie DNA komplementarnego (cDNA) do RNA. Enzym odwrotna transkryptaza syntetyzuje cDNA na matrycy mRNA z wykorzystaniem startera oligo (dT), komplementarnego do sekwencji poli(A) znajdującej się na końcu większości eukariotycznych mRNA. Reakcję przeprowadzano w jałowej probówce, gdzie umieszczano 20 µl mieszaniny reakcyjnej o składzie: 50 mM Tris- HCl, pH 8,3; 10 mM MgCl₂; 75 mM KCl; 10 mM DTT; 1 mM dNTPs; 12 U Rnasinu; 14 U MMLV-RT; 0,4 µg startera oligo (dT) oraz 5 µl matrycy (RNA) izolowanej jak opisano w metodach [5.6-5.8]. Objętość mieszaniny uzupełniano wodą do 20 µl, następnie próbki wirowano przez 40 s w mikrowirówce i umieszczano w termocyklerze Eppendorf. Reakcję prowadzono przez 60 min. w temp. 42⁰C (przyłączanie startera i wydłużanie cDNA), a następnie przez 5 min. w temp. 95⁰C (denaturacja hybrydu RNA - cDNA). Uzyskane cDNA przechowywano przez kilka dni w +4⁰C lub w -20⁰C do czasu dalszych doświadczeń.

5.11. Amplifikacja transkryptu genów receptorów adenozyiny.

Amplifikacja transkryptu genów receptorów adenozyiny A1, A2a, A2b, A3 o długości odpowiednio 404, 420, 252, 254 par zasad z równoczesną amplifikacją transkryptu genu referencyjnego (β-aktyna) o długości 511 par zasad prowadzono w celu sprawdzenia zmian ilości transkryptów dla AR. Reakcję PCR przeprowadzano w objętości 20 µl środowiska zawierającego: 50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 20 mM siarczan amonu; 3,75 mM MgCl₂; 0,375 mM mieszaninę nukleotydów (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 2 µl Master Amp PCR Enhancer; 1 U termostabilnej polimerazy DNA (Tfl); 1 µM każdego startera dla β-aktyny (Bact 1 i Bact 2) i 1 µM każdego startera dla AR

(Tabela 1) oraz odpowiednią ilość matrycy (cDNA). Każda reakcja amplifikacji prowadzona była również w warunkach kontrolnych, gdzie zamiast matrycy dodawano wodę. Reakcję amplifikacji przeprowadzano przy użyciu termocyklera Eppendorf. Profil czasowo - temperaturowy reakcji był następujący:

- wstępna denaturacja: 95°C / 3 min.

- cykle 1 - 32

denaturacja: 95°C / 30 sek.

przyłączanie startera: 64°C / 30 s dla receptora A1 i A2a

65°C / 30 s dla receptora A2b

59°C / 30 s dla receptora A3

wydłużanie: 72°C / 50 sek.

- wydłużanie końcowe: 72°C / 10 min.

Produkty reakcji PCR były rozdzielane elektroforetycznie, a następnie analizowane densytometrycznie za pomocą systemu Gel Doc 2000 firmy Bio - Rad.

Tabela 1. Sekwencje starterów używanych w reakcjach PCR

Rodzaj cDNA	Nazwa startera	Sekwencja
Receptor A1	A1-1	5'-CAACTTCTTCGTCTGGGTGCTGC-3'
	A1-2	5'-CTTCATCGATGGGAGGCTTAGGC-3'
Receptor A2a	A2a-1	5'-CATCTTCTCCCACAGCAATCC-3'
	A2a-2	5'-GGGGCAAACCTCTGAAGACCATG-3'
Receptor A2b	A2b-1	5'-GCTGCTGCCCTGTGAAGTGTC-5'
	A2b-2	5'-AAGTCCCGGTTCTGTAGGCA-3'
Receptor A3	A3-1	5'-GCTGTTGGGGTGCTGGTCATAC-5'
	A3-2	5'-ATGACAACCAGGGGGATGAGGA-3'
β-aktyna	Bact-1	5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3'
	Bact-2	5'-GCTAGAAGCATTGCGGTGGA-3'

1 tgtctgctga tgtgcccagc tctgcccac **catg**ccgccc tacatctcgg ccttcaggc
61 tgcctacatt ggcatcgagg tgctcattgc ctgggtctct gtgcccggaa atgtactggt
121 gatttgggct gtgaagggtga accaggcact tcgcatgcc accttctgct tcacgtgtc
181 actggcggta gctgatgtgg ccgttggegc cctggtcac ccaactggcca tcctatcaa
241 cattgggcca cagacctact tccacacctg cctcatgggtg gcctgccctg tcctcatct
301 caccagagc tccattctgg ctctgctcgc cattgctgtg gatcgatacc tccagatcaa
361 gatccctctc cggtaacaaga cagtgggtgac ccagcggcgg gcggcagtgg ccatagctgg
421 ctgctggatt ctctcccttg tggtaggcct gacacccatg tttggctgga acaacctgag
481 tgtgtagag caagactgga gagccaacgg cagtgttggg gagcccgtga tcaagtgtga
541 gttgagaag gttatcagca tggagtacat ggtctacttc **aacttcttg tctgggtgct**
601 **gc**gccactg ctctcatgg tcctcatcta cctggaggtc ttctacctga tccgtaagca
661 gctcaacaaa aaggtgtcag cctcctccgg tgacccccag aagtactacg ggaaggagct
721 gaagatgcc aagtcgctgg ccctcatct ctctctttt gcctcagct ggctgccgct
781 gcatacttg aactgtatca ccctctctg cccacctgc cagaaacca gcattctgat
841 ctacatgcc atcttctca cacacggcaa ctccgccatg aacccatcg tctatgcctt
901 ccggatccac aagttccggg tcacctttct gaagatttgg aatgaccact tccgatgcca
961 **gcctaagcct cccatcgatg aag**acctccc agaggagaaa gctgaggact **ag**actctgcc
1021 ttgetccgct tagcccatgc ccagcggctc tctgttcaac tcccagtte tcctgtccc
1081 accctgct

Ryc. 8. Sekwencja szczurzego cDNA receptora adenyliny A1. Początek (atg) i koniec (tag) sekwencji kodującej zaznaczono na czerwono, a miejsca przyłączenia starterów na niebiesko.

1 ctgctgagcc tgcccaagtg tggctgctcc cacc**atgggc** tctcgggtg acatcacggt
61 ggagctggcc atcgtgtgc tggccatcct gggcaacgtg ctcgtgtgct gggccgtgtg
121 gatcaacagt aacctgcaga acgtcaccaa cttctttgtg glatcgtggt cggcggctga
181 cattgcagtg ggtgtgctcg ccatcccctt cgctatcacc atcagcaccg gcttctgcgc
241 cgctgccac ggctgctct tcttcgctg tttgtcctg gtctcacgc agagtccat
301 ctttagcctc ttggctatcg ccatcgaccg ctacatgcc atccgaattc cactccgta
361 caatggcttg gtgacaggtg tgagggcgaa gggcatcatt gcaatttctt ggtgtgtgc
421 gtttgccatt ggcctgacc ccatgctggg ctggaacaac tgcagtcaga aagacgggaa
481 ctccacgaag acctgcccgc agggccgggt gacctgtctg ttcgaggacg tgggtcccat
541 gaattacatg gttactaca acttcttgc gttcgtgta ctgcccctt tgetcatgct
601 ggccatctac ctacggattt ttctggcggc ccggagacag ctgaagcaga tggagagcca
661 gccctgccca ggggagcggg ctcggccac gctgcagaag gaggtccacg ctgccaagtc
721 cctggccatc atcgtcgggc tcttctctt gctgtggtt cgcctgcaca tcatcaactg
781 tttaccttc ttctgtcca cgtgccgga cggccctcg tggctcatgt acctggccat
841 **catctctcc cacagcaact ccgtctcaa** ccccttctc tacgctaca ggatccggga
901 gttccgccag acctccgga agatcatccg aaccacgctc ctgaggcggc aggaaccctt
961 ccaggcaggg ggttcagtg cctgggcctt ggcagctcac agcactgagg gagagcaggt
1021 tagcctccgc ctaatggcc acccctggg ggtatgggcc aacggcagtg ccaccattc
1081 cggacggcgg ccaatggct acactctggg gctgggggggt ggaggagtg cccaaggctc
1141 tctcgggat gtggagctt ctaccagga gcgccaggaa ggccaagagc acctggcct
1201 aaggggtcat ctggtccagg cttagtagg agcttctc**ca tggcttctag agtttgeccc**
1261 **ttctga**ggg aaagacattt taatatttt ggttgctgg accaatctca ctaaggaag
1321 agaaaccaa tgggc

Ryc. 9. Sekwencja szczyrzego cDNA receptora adenozyiny A2a. Początek (atg) i koniec (tga) sekwencji kodującej zaznaczono na czerwono, a miejsca przyłączenia starterów na niebiesko.

1 ggcacgagcg gtctcggcgc tgtggccatg cctggcggca ccttagcggc tgtcctgagc
61 ccgacacaac cccggtagag gactccccgg gcccggtgg cccggccatg cagctagaga
121 cgcaggacgc gctgtacgtg gcgctggagc tggttatcgc cgcgctggca gtggcgggca
181 acgtgctggt gtgcgctgcg gtgggagcct cgagtgttt acagaccccc accaactact
241 ttctggtgtc cctggcgacg gcggacgtgg ctgtgggact ctcgccatc ccctttgcca
301 tcaccatcag cctgggcttc tgcacggact ttacagctg cctcttctc gcctgcttcg
361 tgctggtgct cacacagage tccatcttta gcctcttggc ggtggctgtc gaccggtatc
421 tggccattcg cgtcccgtc aggtataaag gtttgtcac tggaaacga gcaagaggga
481 tcatcgtgt cctctgggtc ctgctttg gcattggact gactccttc ctgggttga
541 acagtaaaga ccgtgccacc agcaactgca cagaacctgg ggatggcatc acgaataaga
601 gctgctgccc tgtgaagtgt ctctttgaga acgtagtcc catgagctac atggtttatt
661 tcaactctt tgggtgtgtc ctctccac tgcctcat gatggtgac tacatcaaaa
721 tctcatggt ggctgcaag cagcttcagc acatggaact gatggagcac tccaggacca
781 cgctgcagcg ggagatccac gcggccaagt cactggctat gattgtgggc atctttgctc
841 tgtgtggct cccgtgcat gccatcaact geatcacct ctccatcca gcctggcca
901 aggacaagcc caaatgggtg atgaatgtgg ccatcctct gtacacgcc aattcagttg
961 tcaatcccat tgtctatgcc tacaggaacc gggacttccg ctacagttc cacaggatca
1021 tctccagata cgttctctgc cagacggaca ccaaggggtgg gagcgggcag gccgggggac
1081 agtcaacttt cagtctgagc ttgtgacctt ggctctggcc ttgggagaa gaaggcttaa
1141 aataaacaat ggactggaca cagctggtga cctcactgtg gaggacaact acccttcaa
1201 gcatgtggcc cacctgcct gaacgcttc caggagtcac acaagtctgg ctacacgta
1261 catgcaacta ggaggccctg aggctaacag atacacttag gaatctatc agctgctctt

Ryc. 10. Sekwencja szczurzego cDNA receptora adenozyiny A2b. Początek (atg) i koniec (tga) sekwencji kodującej zaznaczono na czerwono, a miejsca przyłączenia starterów na niebiesko.

1 gaagccctgt ctctgtctgc ccaggaagt aagaacagca gcaactcttg atttggctgc
61 atagaactgt gtcctccagg ttatcaggag ggcagggcta agtggtgag gtctacgate
121 ctgtcaagga cctttctga gaaaagtctc taaaagagca tcacaccaga aggaataagc
181 aagtcagaa ttctccggac tgttgctacc ttctaacttc tgggcagatg tctgtcaaga
241 gctaggtcca ctggccata cacatcctgc tgaagaagca acagaagttt ccagctgaag
301 cttctctgag acagcatgaa agccaacaat accacgacga gtgccttgtg gttgcaaate
361 acctacgtca ccatggaggc tgccattggt ctctgtgctg tagtgggcaa catgtgtgct
421 atctgggtgg tcaagctgaa ccgactctg aggaccacca ccttctatct catcgtctcc
481 ctgacctgg cagacattgc tgttgggtg ctggcatac ccttgccat tgccgtcage
541 ctggaggtcc agatgcactt ctatgcctgc ctttcatgt cctgtgtgct tctggtcttc
601 acctatgctt ccatcatgct cttgctggcc attgctgtag accgatacct gcgagcaag
661 ctgacagtca gatatagaac ggttaccact caaagaagaa tatggctatt cctgggcctc
721 tgctggctag tgtcctttct ggtgggactg accccatgt ttggctggaa tagaaaagtg
781 acctagagc tctctcaaaa cagctccacc ctctcatgcc acttccgttt cgtggctggc
841 ttgattaca tggcttctt cagcttcatc acctggatcc tcatccccct ggtgtcatg
901 tgcacatct atctggacat cttctacatc atccgaaaca aactcagtca gaatctgact
961 ggcttcagag agacgcgtgc atttacgtt cgggagtca agaccgctaa gtcctgttt
1021 ctggttctct tcttgtttgc cttgtgctgg ctgcctttgt ccatcatcaa tttgtttcc
1081 tactttaatg tgaagatacc agagattgca atgtgcctgg gcatcctgtt gtccatgcg
1141 aactccatga tgaacctat tgtctacgcc tgcaaaaata aaaaagtca aagaaccac
1201 tttgtgatcc tcagagcttg caggctctgt cagacctcgg attctttgga ctcaaactt
1261 gaacagacta ctgagtagtt accatgacag ataaagagcc agctcattta ccttcacagt
1321 tcgcatcggg aaacactata aggactaac agccattctt gcttacttcc actgcagtgg

Ryc. 11. Sekwencja szczurzego cDNA receptora adenozyiny A3. Początek (atg) i koniec (tag) sekwencji kodującej zaznaczono na czerwono, a miejsca przyłączenia starterów na niebiesko.

5.12. Elektroforeza kwasów nukleinowych na żelu agarozowym.

Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny o stężeniu 1 µg/ml w buforze TAE [Mat. 4.2.]. DNA zawieszano w buforze obciążającym o objętości 20 µl [Mat. 4.2.] i wprowadzano do studzienek w żelu. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 4 V/cm odległości między elektrodami. Rozdziały DNA analizowano w świetle UV.

5.13. Ocena względnej ilości transkryptu badanego genu.

Rozdzielone elektroforetycznie produkty reakcji kompleksowego PCR analizowano densytrometrycznie za pomocą systemu Gel-Doc 2000 firmy Bio-Rad. Poziom ekspresji transkryptów genów dla receptorów adenozyliny wyrażano jako stosunek intensywności prążka odpowiadającego transkryptowi badanego genu do intensywności prążka odpowiadającego transkryptowi genu referencyjnego (β- aktyna). Intensywność prążka podawał program komputerowy w arbitralnych jednostkach, po odjęciu intensywności tła.

5.14. Preparatyka ekstraktów białkowych.

Odpowiednie tkanki rozdrabniano wstępnie skalpelem i homogenizowano w szklanoteflonowym homogenizatorze w trzech objętościach schłodzonego buforu A [Mat.4.2.]. Otrzymany homogenat wirowano przy 1000 g przez 15 minut. Otrzymany ekstrakt tkankowy zbierano i wirowano przy 50000 g przez 45 minut. Otrzymany w wyniku tego wirowania supernatant zbierano do innych probówek i przechowywano w -20°C jako frakcję cytosolową. Osad po wirowaniu przy 50000 g przepłukiwano dwa razy buforem do homogenizacji, następnie zawieszano w tym samym buforze z dodatkiem 0,2% Tritonu X-100 i homogenizowano. Otrzymaną zawiesinę przechowywano również w -20°C jako frakcję błonową. W przypadku komórek (kardiomiocyty, kardiofibroblasty), zawieszano je w buforze A [Mat.4.2.] z dodatkiem 0,2% TritonuX-100 i rozbijano ultradźwiękami. Otrzymaną zawiesinę przechowywano w -20°C jako ekstrakt białkowy do analiz Western blot.

5.15. Analiza Western blot.

Poziom białka receptorowego oceniano metodą Western blot. Odpowiednią ilość białka nanoszono na 12% żel poliakrylamidowy z 3% żelem zagęszczającym grubości 0,75

mm. Analizowaną próbkę denaturowano w 100⁰C przez 3 minuty w 50 mM buforze Tris - HCl, pH 6,8 zawierającym 100 mM DTT; 2% SDS; 0,1% błękit bromofenolowy i 10% glicerol. Elektroforezę prowadzono w buforze o pH 8,3 zawierającym 25 mM Tris, 250 mM glicynę i 0,1% SDS. Elektroelucję białek z żelu poliakrylamidowego na błonę poliwinylową (Immobilion P Transfer membrane, Millipore) prowadzono w buforze o pH 8,3 zawierającym 48 mM Tris; 39 mM glicynę i 20% metanol. Elektrotransfer prowadzono przez całą noc przy natężeniu prądu 0,7 mA/cm². Następnie na podstawie pozycji wybarwionych markerów masowych, błonę cięto w poprzek na odpowiedniej wysokości i inkubowano przez 5 godzin w temperaturze pokojowej w 3% roztworze albuminy wołowej (BSA, V frakcja) zawierającym 0,02% azydek sodu. Błonę przenoszono do świeżego roztworu BSA, zawierającego królicze przeciwciała przeciwko receptorom adenozyiny w rozcieńczeniu 1:1000 (A1), 1:200 (A2a, A2b i A3), bądź przeciwciała dla β -aktyny lub białka p14-3-3 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Po zakończeniu inkubacji, błonę trzykrotnie przemywano 200 ml buforu TBS [Mat. 4.2.]. Potem umieszczano w 3% roztworze albuminy z przeciwciałami (dla przeciwciał króliczych) sprzężonymi z fosfatazą alkaliczną, w rozcieńczeniu 1 : 5000. Roztwór ten inkubowano z łagodnym wytrząsaniem przez 1 godzinę. Błonę płukano następnie czterokrotnie w 200 ml TBS. W celu przeprowadzenia reakcji fosfatazy alkalicznej z substratem BCIP/NBT [Mat. 4.2.] błonę przenoszono do 100 mM buforu Tris-HCl, pH 9,5 zawierającego 5 mM MgCl₂ oraz BCIP/NBT. Zazwyczaj reakcję prowadzono przez 30 min. w temperaturze pokojowej i po ukazaniu się wyraźnych prążków reakcję zatrzymywano przez dodanie 20 mM EDTA w buforze TBS. Otrzymane prążki analizowano densytometrycznie za pomocą systemu Gel-Doc 2000 firmy Bio-Rad. Jako białko referencyjne w przypadku analizy frakcji cytozolowej używano białko p14-3-3. Natomiast w przypadku analizy ekstraktów tkankowych i frakcji błonowej białkiem referencyjnym była β -aktyna, bądź białko p14-3-3.

5.16. Enzymatyczna deglikozylacja białek.

Ekstrakty białkowe (100 μ g białka) były denaturowane w 0,2% SDS z dodatkiem 1% β -merkaptetanolu, a następnie ogrzewane w 80⁰C przez 10 min. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej do ekstraktu był dodawany EDTA do końcowego stężenia 10 mM, Triton X-100 do stężenia 0,5% oraz 50 U rekombinowanej N-glikozydazy F

(z *Flavobacterium meningosepticum*) i otrzymaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 16-24 godzin w temperaturze pokojowej. Reakcję deglikozylacji przerywano poprzez ogrzanie mieszaniny do 100⁰C.

5.17. Preparatyka bloczków parafinowych.

Fragmety tkanek utrwalano w 4% formalinie. Proces utrwalania przerywano poprzez wypłukanie utrwalacza z materiału. Płukanie przeprowadzano przez około 30 minut w wodzie bieżącej. Aby nasycić tkankę parafiną, która jest substancją niepolarną należy usunąć z tkanki wodę. W procesie odwadniania zastępuje się wodę obecną w tkance alkoholem, przeprowadzając materiał przez szereg roztworów alkoholowych o wzrastającym stężeniu: 70%, 96%, alkohol absolutny. Ponieważ parafina nie rozpuszcza się również w alkoholu nasycano tkankę płynem pośrednim, który rozpuszcza się łatwo zarówno w odwadniaczu jak i w zatapiaczu. Stosowanym w tej procedurze płynem pośrednim był ksylen. Następnie przeprowadzono nasycenie parafiną dwa, trzy razy, aby usunąć nawet śladowe resztki płynu pośredniego, którego obecność wpłynęłaby niekorzystnie na własność materiału podczas krojenia. Po zakończeniu procesu zatapiania w parafinie materiał wkładano do specjalnych foremek wypełnionych płynną parafiną i szybko oziębiano poprzez zanurzenie w zimnej wodzie, co prowadziło do zestalenia parafiny.

5.18. Immunohistochemia.

Preparaty o grubości 4 μm z bloczków parafinowych odparafinowywano w ksylenie a następnie nawadniano w gradiencie etanolu. Odslonięcie antygenów następowało w wyniku podgrzewania w temperaturze 95⁰C przez 20 minut w 10 mM buforze cytrynianowym o pH 6,0. Następnie trzykrotnie po 2 minuty płukano w wodzie destylowanej i inkubowano w 0,3% roztworze H₂O₂ z metanolem przez 30 minut w temperaturze 20⁰C w celu zablokowania aktywności endogennej peroksydazy. Po przepłukaniu buforem PBS następowała inkubacja w 20% roztworze surowicy świńskiej, którą zlewano bez płukania i następnie nakładano przeciwciała pierwotne. Inkubacja z przeciwciałami trwała 20 h w 4⁰C. Po trzykrotnym przepłukaniu buforem PBS nakładano przeciwciała drugorzędowe, którymi były anty-królicze biotynylowane przeciwciała w roztworze PBS. Po inkubacji trwającej 30 minut i przebiegającej w temperaturze 20⁰C i kolejnym przepłukaniu buforem PBS następowała inkubacja w

roztworze streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową w buforze PBS w temperaturze 20⁰C przez 30 minut. Następnie наносzono chromogen, czyli 10% roztwór diaminobenzydyny w buforze Tris-HCl i 30% roztworze H₂O₂ i inkubowano w temperaturze 20⁰C przez 10 minut. Po 5 minutowym przepłukaniu wodą destylowaną przeprowadzano 5 - 8 sekundowe barwienie hematoksyliną Harrisa i płukano znowu w wodzie destylowanej 5 minut. Następnie zanurzano kilka razy preparaty w 37 mM roztworze wody amoniakalnej, płukano 4 minuty w wodzie destylowanej, odwadniano, prześwietlano w ksylenie pokrywano balsamem kanadyjskim i zamykano szkiełkiem nakrywkowym.

5.19. Analiza statystyczna.

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano program STATISTICA 5.0 PL (StatSoft, Polska). Przedstawione w pracy wyniki są średnimi arytmetycznymi \pm odchylenie standardowe z kilku doświadczeń. Prawdopodobieństwo identyczności dwóch średnich oceniano testem t - studenta.

6. WYNIKI

Badania nad wpływem cukrzycy na ekspresję receptorów adenylinowych (AR) prowadzono na modelu zwierzęcym oraz hodowlach pierwotnych izolowanych komórek. W celu indukcji cukrzycy szczurom podawano streptozotocynę (STZ) [Met.5.1.]. Pierwsze objawy zaburzenia gospodarki węglowodanowej manifestujące się wzrostem poziomu glukozy we krwi obserwowano już w pierwszej dobie po podaniu STZ. W 14 dniu od podania STZ waga zwierząt była znacząco niższa niż zwierząt kontrolnych (Tabela 2.).

Tabela 2. Charakterystyka szczurów używanych w doświadczeniach.

Parametr	Szczury kontrolne	Szczury cukrzycowe	Szczury cukrzycowe otrzymujące insulinę
waga ciała (g)	215 ± 8,2	183 ± 11,5*	189 ± 14,0*
waga nerek (g/100 g wagi ciała)	1,11 ± 0,13	1,25 ± 0,17	1,30 ± 0,15
waga serca (g)	0,86 ± 0,05	0,90 ± 0,07	0,89 ± 0,09
waga wątroby (g)	10,83 ± 0,25	10,22 ± 0,31	10,36 ± 0,34
glukoza we krwi (mM)	6,1 ± 0,7	24,5 ± 2,8*	7,8 ± 1,1

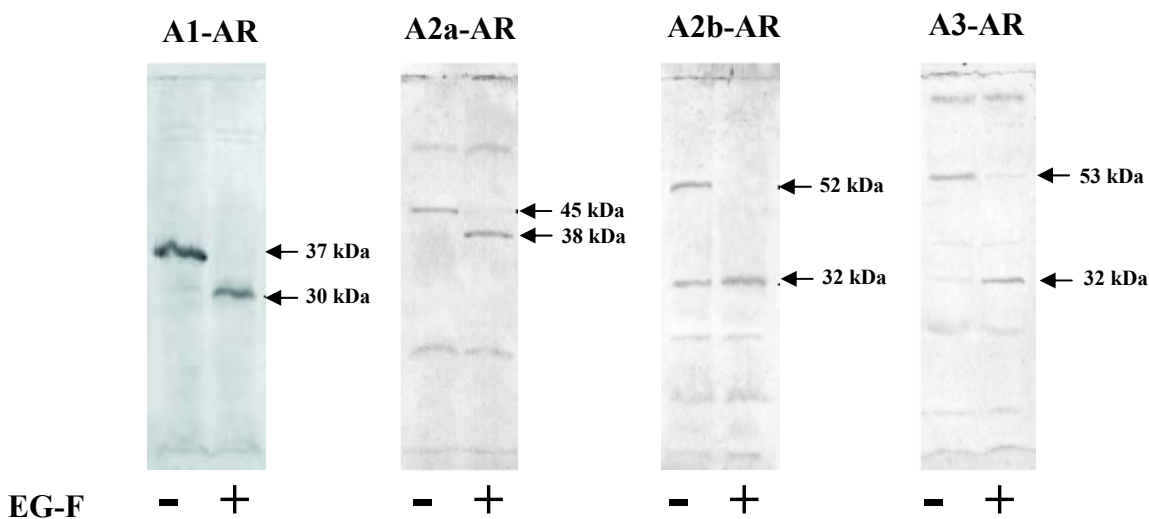
Parametry szczurów cukrzycowych zostały zmierzone w 14 dniu od podania streptozotocyny (szczury cukrzycowe) lub cytrynianu (szczury kontrolne). Szczurom otrzymującym przez 4 dni insulinę w dawce (10 U/kg) hormon ten rozpoczęto podawać w dziesiątym dniu od podania STZ. * p<0,05 w stosunku do kontroli.

Obserwowano ponadto nieznaczny wzrost wagi nerek szczurów cukrzycowych lecz nie był on znaczący statystycznie. Również waga serca oraz wątroby szczurów cukrzycowych nie różniła się znacząco od wagi tych narządów u szczurów kontrolnych (Tabela 2). W piśmiennictwie można znaleźć dane wskazujące, że streptozotocyna poza niszczącym działaniem na komórki β trzustki również

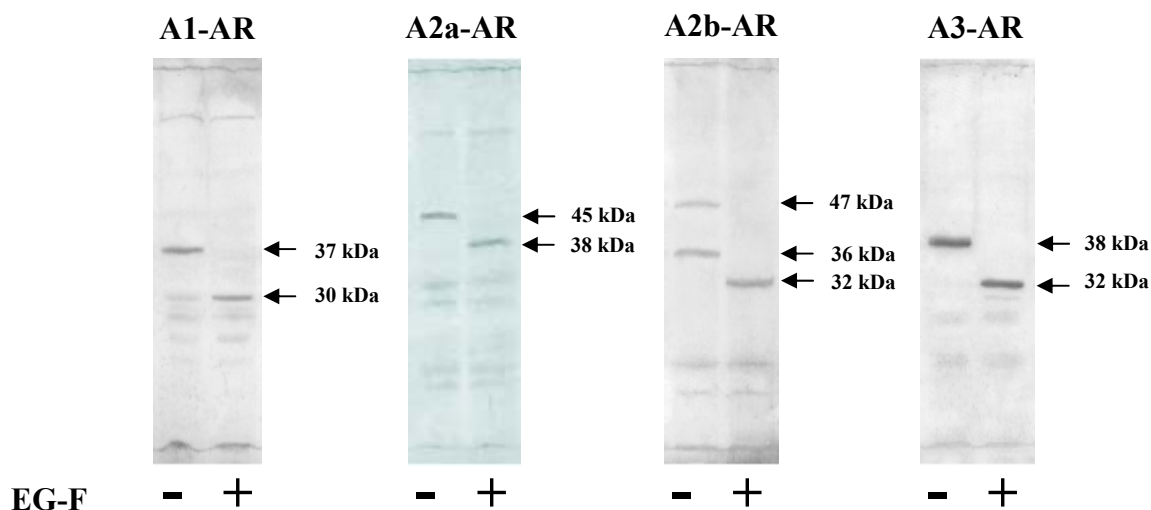
niekorzystnie oddziałują na inne komórki indukując zmiany w obrębie DNA polegające na pojawieniu się szeregu pęknięć podwójnej helisy DNA [101]. Dlatego dla odróżnienia efektów cukrzycy od bezpośredniego wpływu STZ jednej grupie zwierząt cukrzycowych przez cztery dni podawano insulinę aby doprowadzić do normalizacji poziomu glukozy. Założono, że zmiany wywołane brakiem insuliny oraz wysokim poziomem glukozy powinny ustąpić po powrocie do wartości normalnych tych dwóch parametrów, natomiast zmiany, które nie uległyby w tych warunkach normalizacji można by przyporządkować do zmian wywołanych przez STZ.

Poziom ekspresji receptorów adenozyiny oceniano poprzez pomiar zmian ilości mRNA oraz ocenę ilości białka receptorowego w analizowanych tkankach. Analiza Western blot przeprowadzona na homogenatach nerki, wątroby i serca szczura pokazała, że przeciwciała w każdej z analizowanych tkanek, poza przeciwciałami dla receptora A1, reagują z prążkami białkowymi o innej ruchliwości elektroforetycznej (Ryciny 12-14). Ponadto przeciwciała te rozpoznawały więcej niż jeden prążek białkowy, co nasuwało pytanie, który z nich reprezentuje białko danego receptora adenozyiny. Z danych zawartych w piśmiennictwie wiadomo, że każdy receptor adenozyiny w komórce występuje jako glikoproteina zawierająca różnego rodzaju komponentę cukrową [189]. Dlatego dla identyfikacji receptorów analizowane ekstrakty białkowe poddano trawieniu peptydową N-glikozydazą F [Met. 5.16] w celu usunięcia łańcucha cukrowego. Okazało się, że po tym zabiegu przeciwciała dla poszczególnych receptorów adenozyiny rozpoznają w poszczególnych ekstraktach prążki białkowe o tej samej ruchliwości elektroforetycznej. Przedstawione na rycinach 12-14 wyniki wskazują, że przeciwciała dla receptora A1 rozpoznają we wszystkich analizowanych ekstraktach prążek o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej białku o masie 37 kDa, natomiast po trawieniu glikozydazą ruchliwość tego prążka wynosiła 30 kDa. Z kolei przeciwciała dla receptora A2a najsilniej reagowały z prążkiem białkowym o ruchliwości elektroforetycznej 45 kDa w nerce i wątrobie (Ryc. 12, 13) oraz prążkami 50 i 45 kDa w sercu (Ryc. 14). Po trawieniu glikozydazą przeciwciała dla receptora A2a we wszystkich tkankach rozpoznawały prążek białkowy o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej białku o masie 38 kDa. Przeciwciała dla receptora A2b w ekstraktach z nerki reagowały najsilniej z prążkami białkowymi o ruchliwości charakterystycznej dla białek o masach 52 i 32 kDa (Ryc. 12), w ekstraktach z serca z prążkiem białkowym o ruchliwości odpowiadającej masie 35 kDa (Ryc. 14) natomiast w wątrobie przeciwciała te reagowały z prążkami o masach 47 i 36 kDa (Ryc. 13). Po

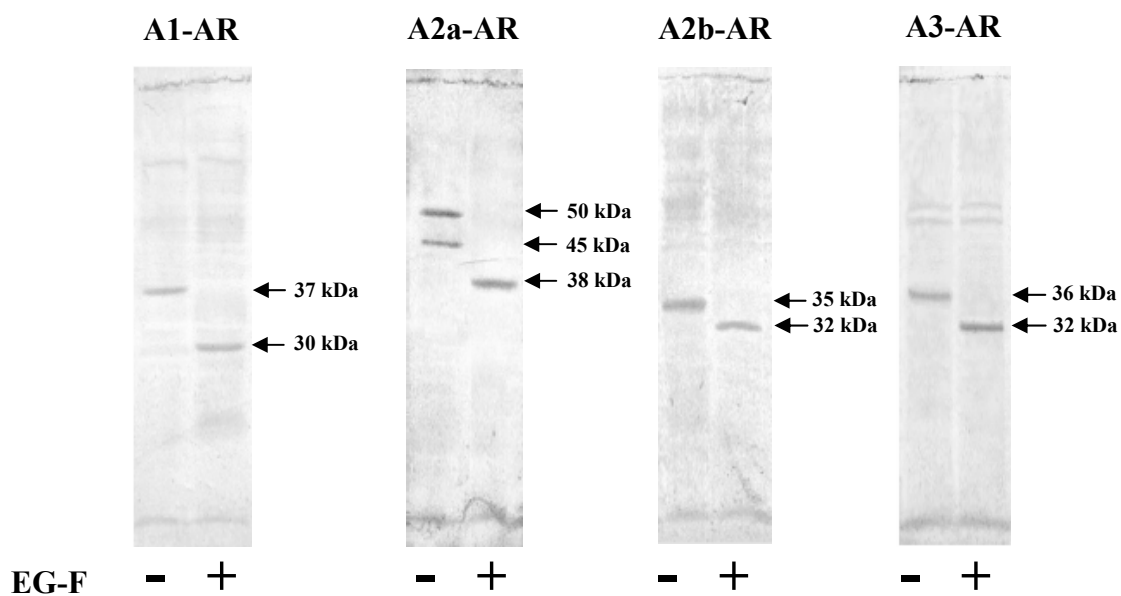
inkubacji badanych ekstraktów z glikozydazą przeciwciała dla receptora A2b we wszystkich tkankach rozpoznawały głównie prążek białkowy o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej białku o masie 32 kDa. Przeciwciała dla receptora A3 reagowały najsilniej z prążkami białkowymi o ruchliwościach elektroforetycznych odpowiadających białkom o masie 52 kDa (nerka), 36 kDa (serce) oraz 38 kDa (wątroba). W wyniku inkubacji ekstraktów z glikozydazą we wszystkich badanych tkankach ruchliwość elektroforetyczna prążka rozpoznawanego przez przeciwciała dla receptora A3 odpowiadała białku o masie 32 kDa (Ryc.12-14). Ruchliwości elektroforetyczne innych białek rozpoznawanych słabo przez poszczególne przeciwciała nie ulegały zasadniczej zmianie po inkubacji z glikozydazą, dlatego uznano je jako niespecyficzne. Z uwagi na dosyć dużą różnicę wydajności procesu deglikozylacji białek AR oraz zmienny odzysk, dalsze badania prowadzono na ekstraktach bez inkubacji z glikozydazą analizując prążki białkowe scharakteryzowane za pomocą trawienia glikozydazą jako prążki odpowiadające białkom poszczególnych receptorów adenozyiny.



Ryc. 12. Analiza Western blot prowadzona na homogenacie nerki szczura bez (-) oraz po inkubacji z N-glikozydazą F (+). Na poszczególne ścieżki naniesiono 60 µg białka. Inkubację z N-glikozydazą F (EG-F) prowadzono jak opisano w [Met. 5.16].



Ryc. 13. Analiza Western blot prowadzona na homogenacie wątroby szczura bez (-) oraz po inkubacji z N-glikozydazą F (+). Na poszczególne ścieżki naniesiono 60 μ g białka. Inkubację z N-glikozydazą F (EG-F) prowadzono jak opisano w [Met. 5.16].



Ryc.14. Analiza Western blot prowadzona na homogenacie serca szczura bez (-) oraz po inkubacji z N-glikozydazą F (+). Na poszczególne ścieżki naniesiono 80 μ g białka. Inkubację z N-glikozydazą F (EG-F) prowadzono jak opisano w [Met. 5.16].

6.1. Ekspresja receptorów adenozyiny w nerce szczura cukrzycowego.

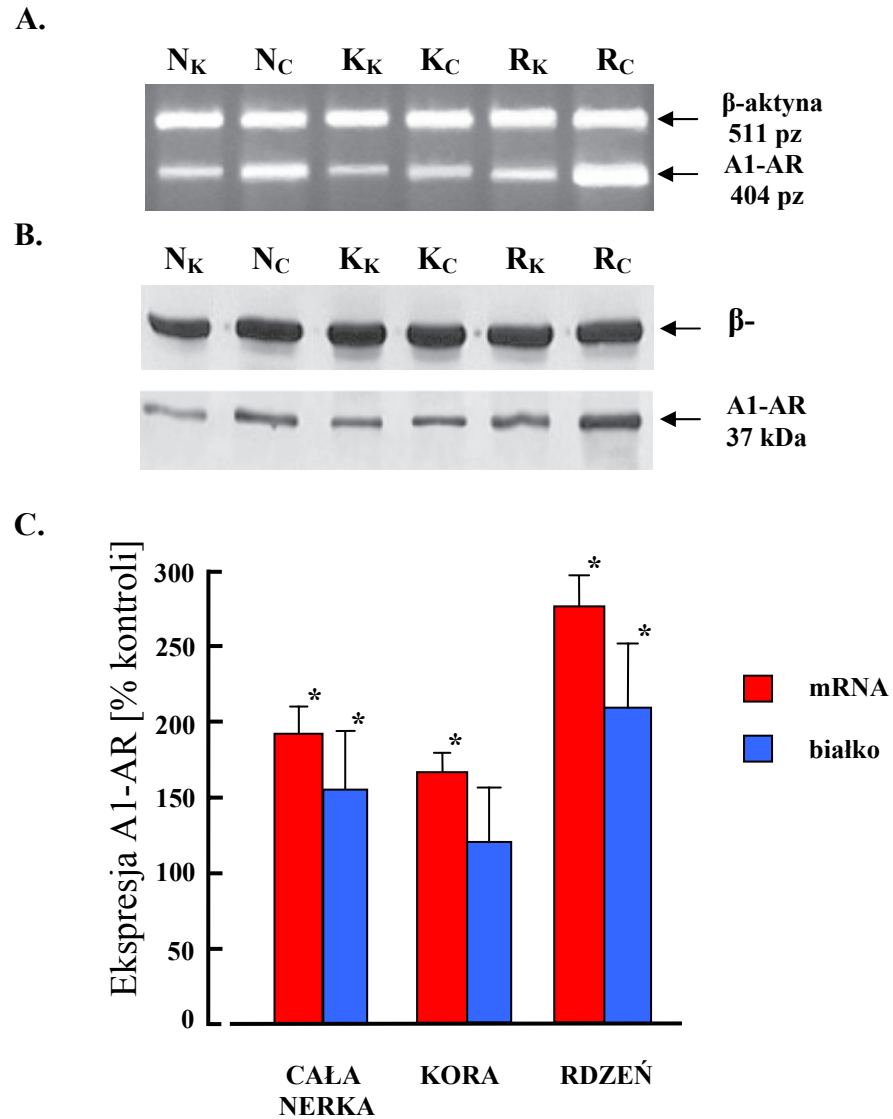
Przedstawione poniżej wyniki badań nad ekspresją receptorów adenozyinowych w nerce szczura cukrzycowego ukazały się drukiem w roku 2005 pod tytułem „Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat“ w *American Journal of Pathology* vol. 167, str. 315-325 [268].

6.1.1. Ekspresja receptora A1.

Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że ilość mRNA dla receptora A1 (A1-AR) w nerce cukrzycowej rośnie 1,7-krotnie w korze i blisko 3-krotnie w rdzeniu (Ryc. 15A, C). Zwiększeniu poziomu mRNA receptora A1 towarzyszył podwyższony poziom białka receptorowego w analizowanych tkankach. Analiza densytometryczna Western blot wykazała, że przeciwciała dla receptora A1 reagowały z prążkiem białkowym o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej białku o masie 37 kDa. Poziom białka receptora A1 w homogenacie całej nerki i rdzenia nerki wzrastał odpowiednio 1,5 i 2,1- krotnie. Zaobserwowano również niewielki wzrost poziomu białka A1-AR w homogenacie z kory nerki cukrzycowej, ale nie był on znamieny statystycznie (Ryc. 15B, C).

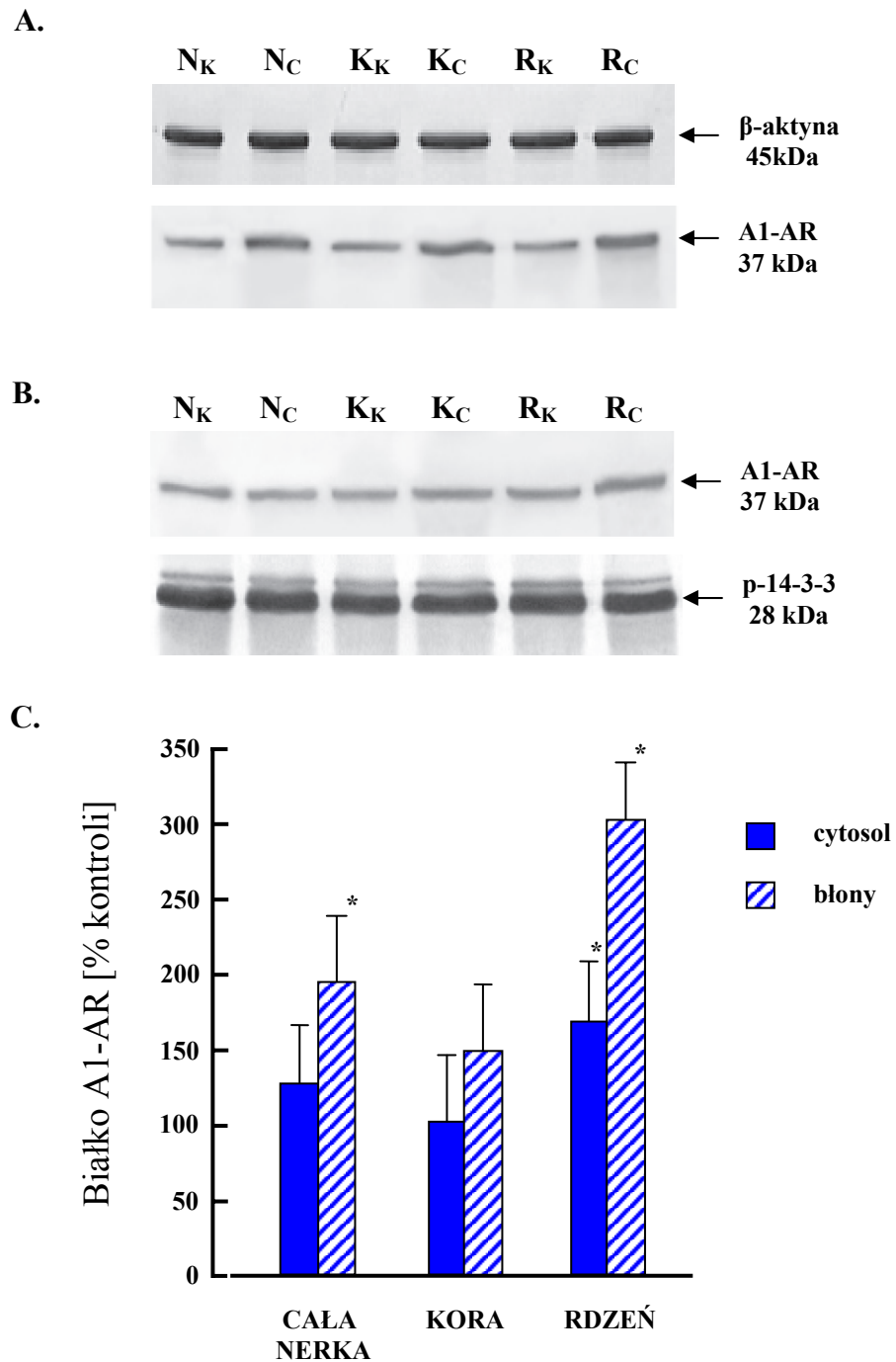
Receptory adenozyiny należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G, które podlegają internalizacji w kwaśnych endosomach, z których mogą zostać ponownie wbudowane w błonę plazmatyczną albo ulec degradacji. Dlatego brak widocznych zmian ilości białka receptorowego w homogenatach z całych tkanek, niekoniecznie oznacza niezmienny ich poziom w błonach komórkowych. W celu określenia komórkowego i tkankowego rozmieszczenia białka A1-AR przeprowadzono analizę Western blot we frakcjach błonowych i cytosolowych izolowanych z całej nerki oraz osobno z kory i rdzenia tego narządu. Analizując poziom białka receptora A1 we frakcji błonowej kory i rdzenia nerki stwierdzono 3-krotny wzrost białka w błonach z rdzenia nerki cukrzycowej, podczas gdy we frakcji błonowej izolowanej z kory nerek obserwowano jedynie wzrost poziomu białka A1 o 50% w stosunku do kontroli (Ryc. 16). Poziom białka receptora A1 we frakcji cytosolowej w rdzeniu nerki szczurów cukrzycowych wzrósł o 60%, a w korze pozostał bez zmian.

Podawanie szczurom cukrzycowym insuliny przez cztery dni powodowało powrót poziomu mRNA i białka receptora A1 do wartości obserwowanych w nerkach szczurów kontrolnych [268].



Ryc. 15. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A1 w nerce szczura cukrzycowego.

A. Przykładowy rozdziel elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR przeprowadzonego na cDNA otrzymanym z RNA izolowanego z nerki kontrolnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki kontrolnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki kontrolnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). **B.** Przykładowy immunoblot homogenatów analizowanych tkanek. Na każdą ścieżkę naniesiono 50 μ g białka. **C.** Procentowe zmiany ilości mRNA i białka receptora A1 w nerce cukrzycowej. Poziom mRNA i białka normalizowano do β -aktyny (A1/ β -aktyna) i przedstawiano jako % kontroli (tkanka szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu (PCR) i trzech (Western blot) doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.



Ryc. 16. Dystrybucja komórkowa receptora A1 w nerce normalnej i cukrzycowej.

Frakcje błonowe (**A**) i cytosolowe (**B**) izolowano z nerki normalnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki normalnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki normalnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). Na ścieżki nanoszono 30 μg (dla frakcji błonowej) i 70 μg (dla frakcji cytosolowej) białka. **C.** Procentowe zmiany ilości białka receptora A1 w subfrakcjach komórkowych nerki cukrzycowej. Poziom białka receptora normalizowano w stosunku do odpowiedniego białka referencyjnego (β -aktyna w błonach i p-14-3-3 w cytosolu) i przedstawiono jako % kontroli (tkanka szczura normalnego). Podane wartości są średnimi \pm SD ($n=3$). * $p<0,05$ w stosunku do kontroli.

6.1.2. Ekspresja receptora A2a.

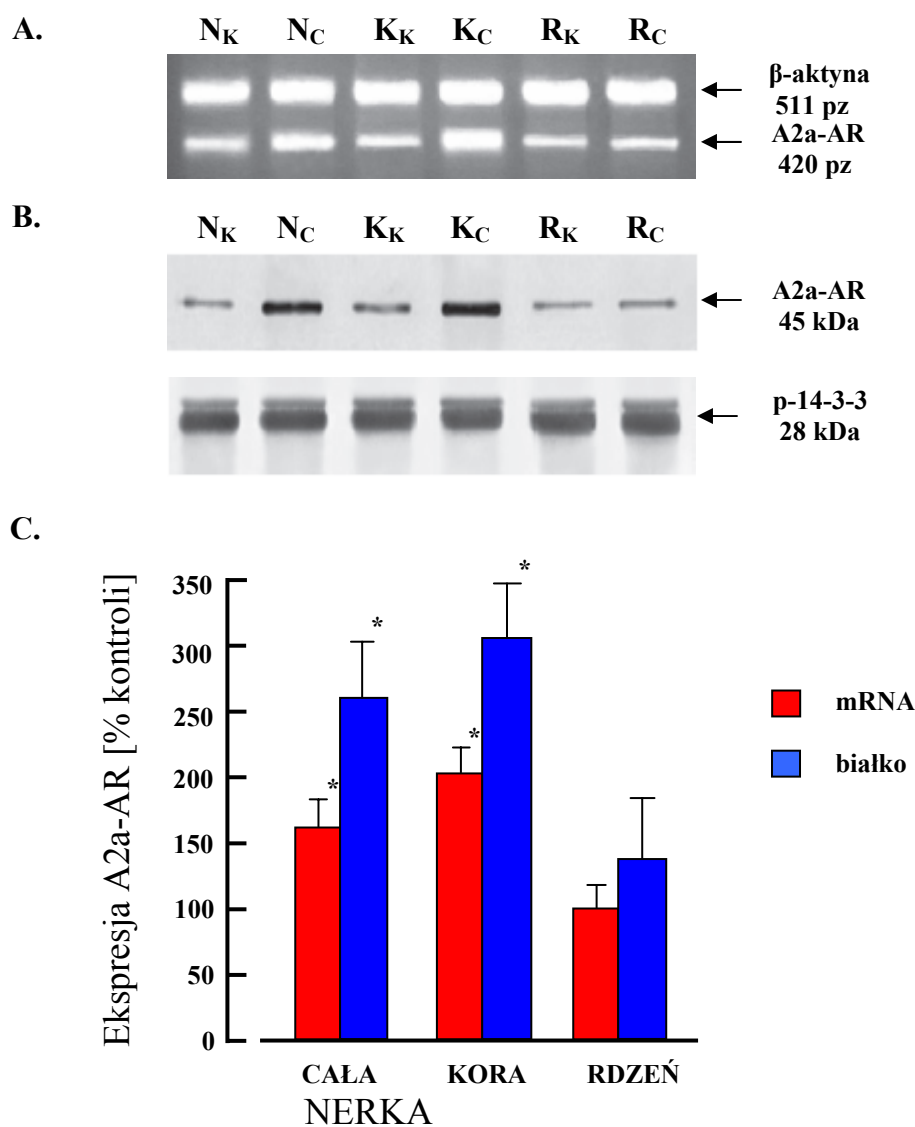
Porównanie poziomu mRNA receptora A2a w nerkach szczurów normalnych i cukrzycowych pokazało 2-krotny wzrost poziomu tego mRNA w korze nerki cukrzycowej, bez zmian w rdzeniu (Ryc.17A). Analiza densytometryczna immunoblotu wykazała, że przeciwciała dla receptora A2a reagowały z prążkiem białkowym na wysokości 45 kDa. Poziom białka tego receptora wzrastał ponad 3-krotnie w homogenacie z kory nerki szczura cukrzycowego, ale nie w rdzeniu. Obserwowano również 2,6-krotnie podwyższoną ilość białka A2a w homogenacie z całej nerki cukrzycowej (Ryc. 17B). We frakcji błonowej i cytosolowej izolowanej z kory nerki cukrzycowej wykazano zwiększony poziom białka A2a-AR odpowiednio 3,5- i 2,7-krotnie w porównaniu ze szczurem normalnym (Ryc.18). Natomiast w rdzeniu nerki cukrzycowej wykazano wzrost 75% białka receptora A2a we frakcji błonowej, a w cytosolu nie zaobserwowano żadnych zmian.

Podawanie szczurom cukrzycowym insuliny przez cztery dni powodowało powrót poziomu mRNA i białka receptora A2a do wartości obserwowanych w nerkach szczurów kontrolnych [268].

6.1.3. Ekspresja receptora A2b.

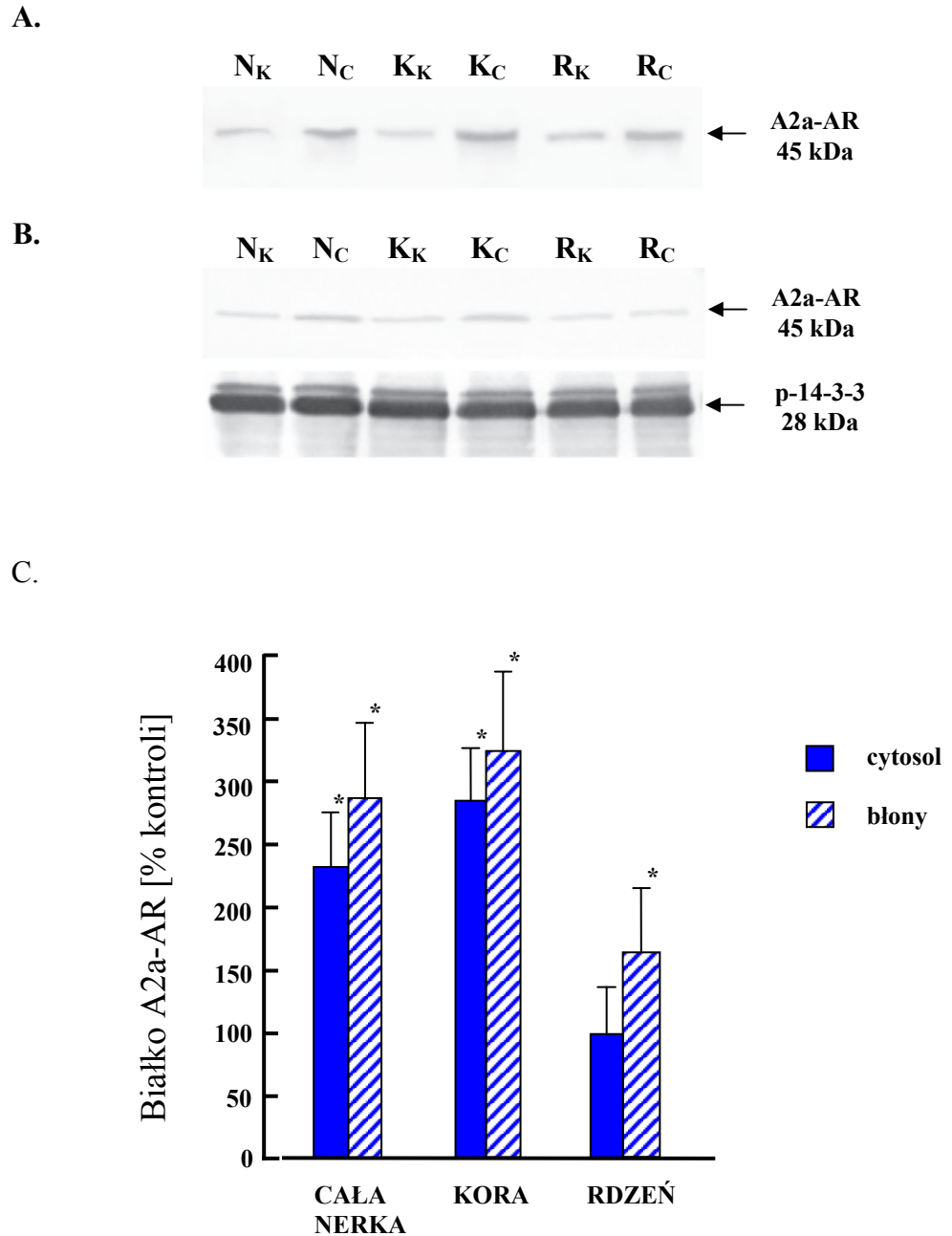
Porównanie poziomu mRNA dla adenozynowego receptora A2b w nerkach szczurów cukrzycowych z poziomem tego mRNA w nerkach szczurów kontrolnych wykazało niewielki wzrost mRNA w nerce cukrzycowej (Ryc.19). Analiza Western blot homogenatu całej nerki pokazała dwa prążki białkowe immunoreaktywne z przeciwciałem anty-A2b-AR (52 kDa i 32 kDa). U szczurów cukrzycowych nie obserwowano żadnych znaczących zmian poziomu białka tego receptora (52 kDa i 32 kDa) w homogenatach z całej nerki, ani z poszczególnych jej części, czyli z kory i rdzenia (Ryc. 19). Zaobserwowano, że we frakcji cytosolowej przeciwciała anty-A2b-AR reagowały tylko z prążkiem białkowym na wysokości 32 kDa, natomiast w błonach, tylko z prążkiem o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej białku o masie 52 kDa (Ryc. 20). Poziom białka receptora A2b we frakcji cytosolowej nerki cukrzycowej nie ulegał istotnym zmianom, natomiast w błonach rdzenia nerki cukrzycowej obserwowano znamieny spadek (~60%) białka A2b-AR (Ryc. 20). Natomiast w błonach kory nerki cukrzycowej ilość białka A2b-AR nie ulegała zmianie.

Podawanie szczurom cukrzycowym insuliny przez cztery dni powodowało powrót poziomu mRNA i białka receptora A2b do wartości obserwowanych w nerkach szczurów kontrolnych [268].



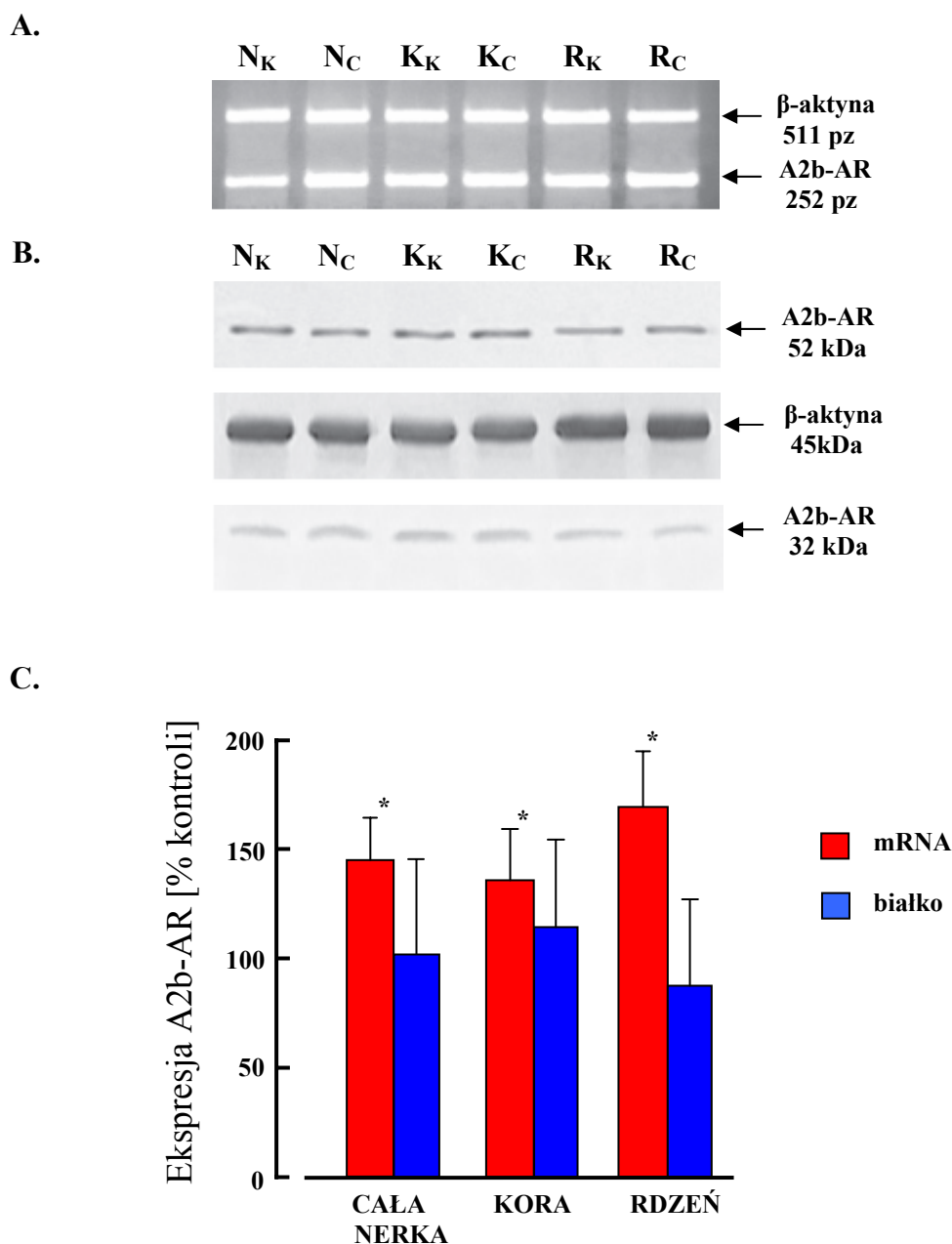
Ryc. 17. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A2a w nerce szczura cukrzycowego.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z RNA izolowanego z nerki normalnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki normalnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki normalnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). **B.** Przykładowy immunoblot homogenatów analizowanych tkanek. Na każdą ścieżkę naniesiono 80 μ g białka. **C.** Procentowe zmiany ilości mRNA i białka receptora A2a w nerce cukrzycowej. Poziom mRNA i białka normalizowano odpowiednio do β -aktyny i p-14-3-3 i przedstawiono jako % kontroli (tkanka szczura kontrolnego). Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu (PCR) i trzech (Western blot) doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.



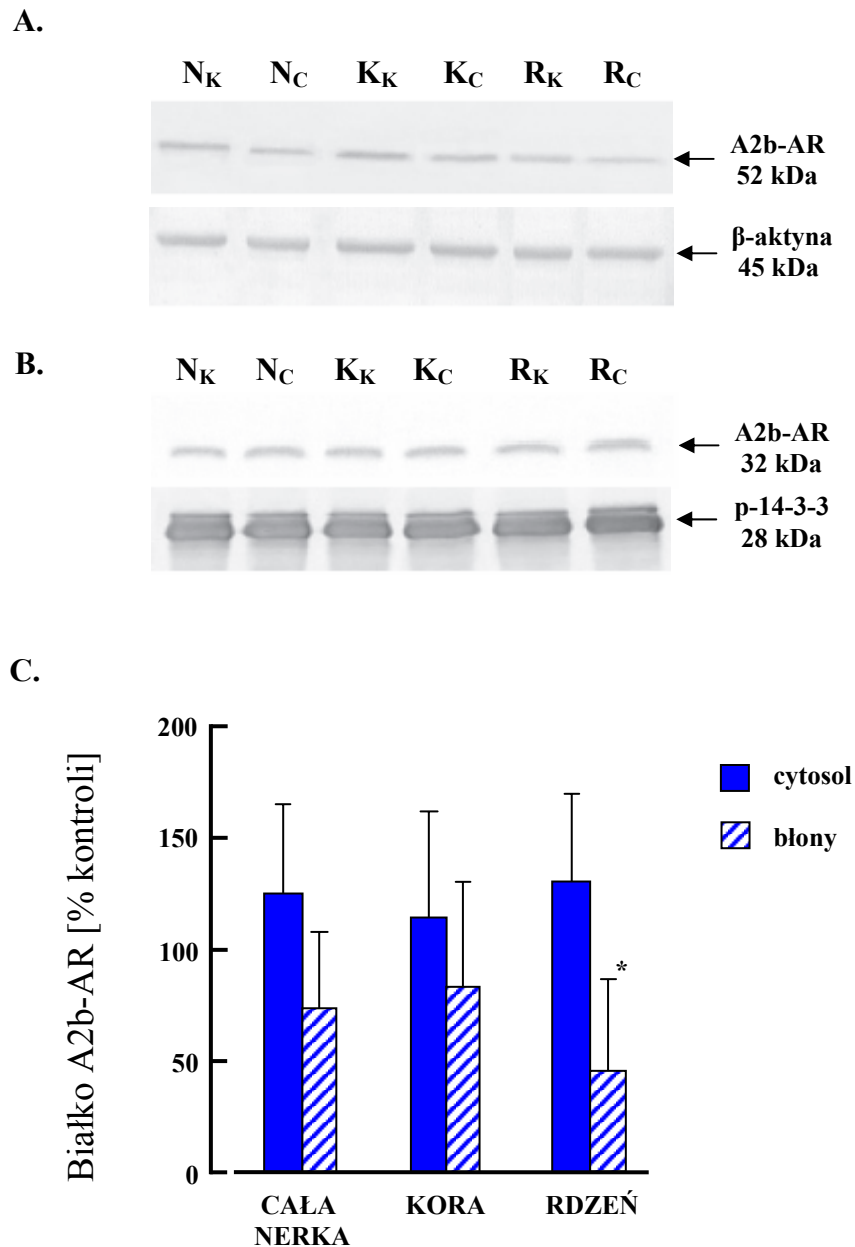
Ryc. 18. Dystrybucja komórkowa białka receptora A2a w nerce normalnej i cukrzycowej.

Fracje błonowe (A) i cytosolowe (B) izolowano z nerki normalnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki normalnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki normalnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). Na ścieżki nanoszono 50 μ g (dla frakcji błonowej) i 70 μ g (dla frakcji cytosolowej) białka. C. Procentowe zmiany ilości białka receptora A2a we frakcjach subkomórkowych nerki cukrzycowej. Poziom białka receptora normalizowano do białka referencyjnego p-14-3-3 (A2a/p-14-3-3) i przedstawiono jako % kontroli (tkanka szczura kontrolnego). W błonach mierzono całkowitą intensywność prążka. Podane wartości są średnimi \pm SD (n=4). * p<0,05 w stosunku do kontroli.



Ryc. 19. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A2b w nerce szczura cukrzycowego.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR przeprowadzonego na cDNA otrzymanym z RNA izolowanego z nerki normalnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki normalnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki normalnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). **B.** Przykładowy immunoblot homogenatów analizowanych tkanek. Na każdą ścieżkę naniesiono 80 μ g białka. **C.** Procentowe zmiany ilości mRNA i białka receptora A2b w nerce cukrzycowej. Poziom mRNA i białka normalizowano do β -aktyny (A2b/ β -aktyna) i przedstawiono jako % kontroli (tkanaka szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu (PCR) i trzech (Western blot) doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.



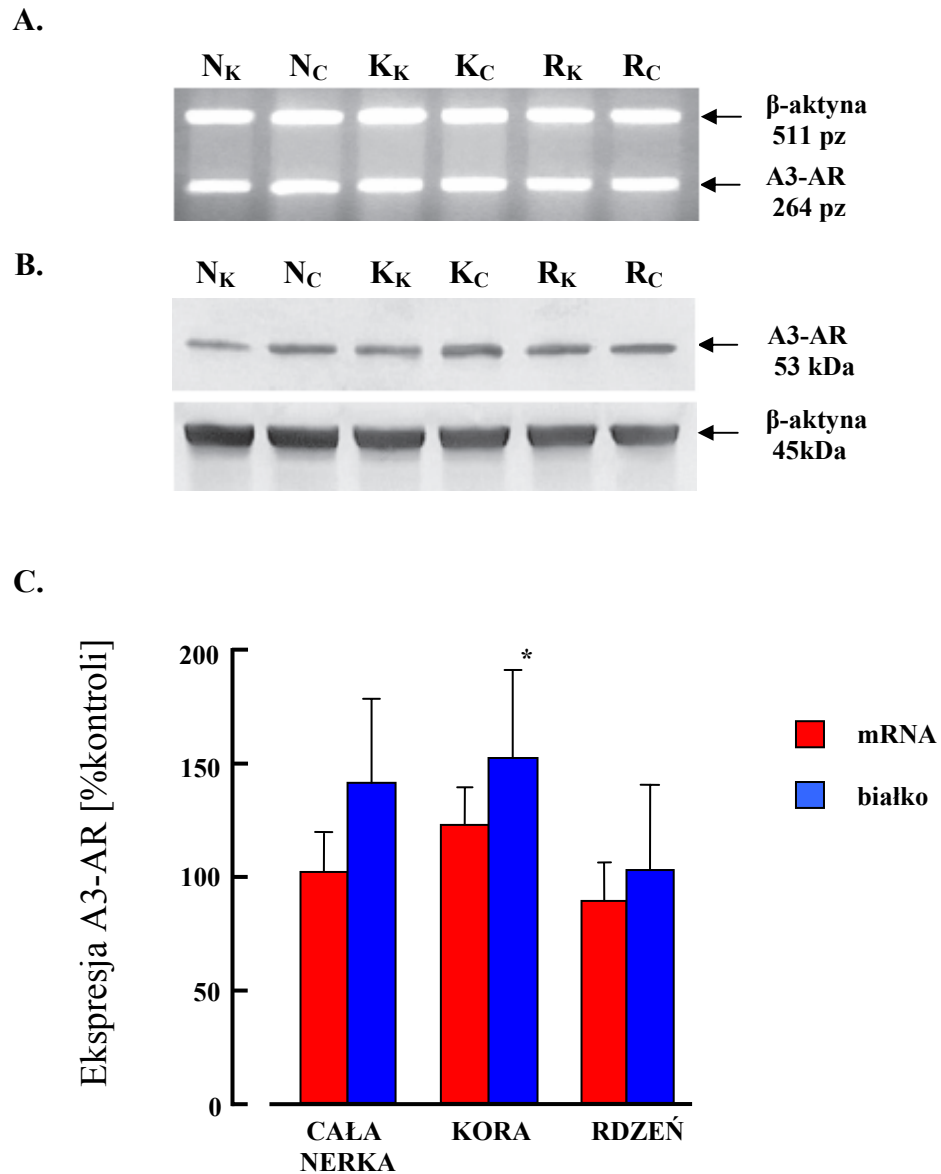
Ryc. 20. Dystrybucja komórkowa białka receptora A2b w nerce normalnej i cukrzycowej.

Fracje błonowe (A) i cytosolowe (B) izolowano z nerki normalnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki normalnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki normalnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). Na ścieżki nanoszono 50 μ g (dla frakcji błonowej) i 70 μ g (dla frakcji cytosolowej) białka. C. Procentowe zmiany ilości białka receptora A2b we frakcjach subkomórkowych nerki cukrzycowej. Poziom białka normalizowano do odpowiedniego białka referencyjnego (β -aktyna w błonach, p-14-3-3 w cytosolu) i przedstawiono jako % kontroli (tkanka szczura normalnego). Podane wartości są średnimi \pm SD (n=3). * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

6.1.4. Ekspresja receptora A3.

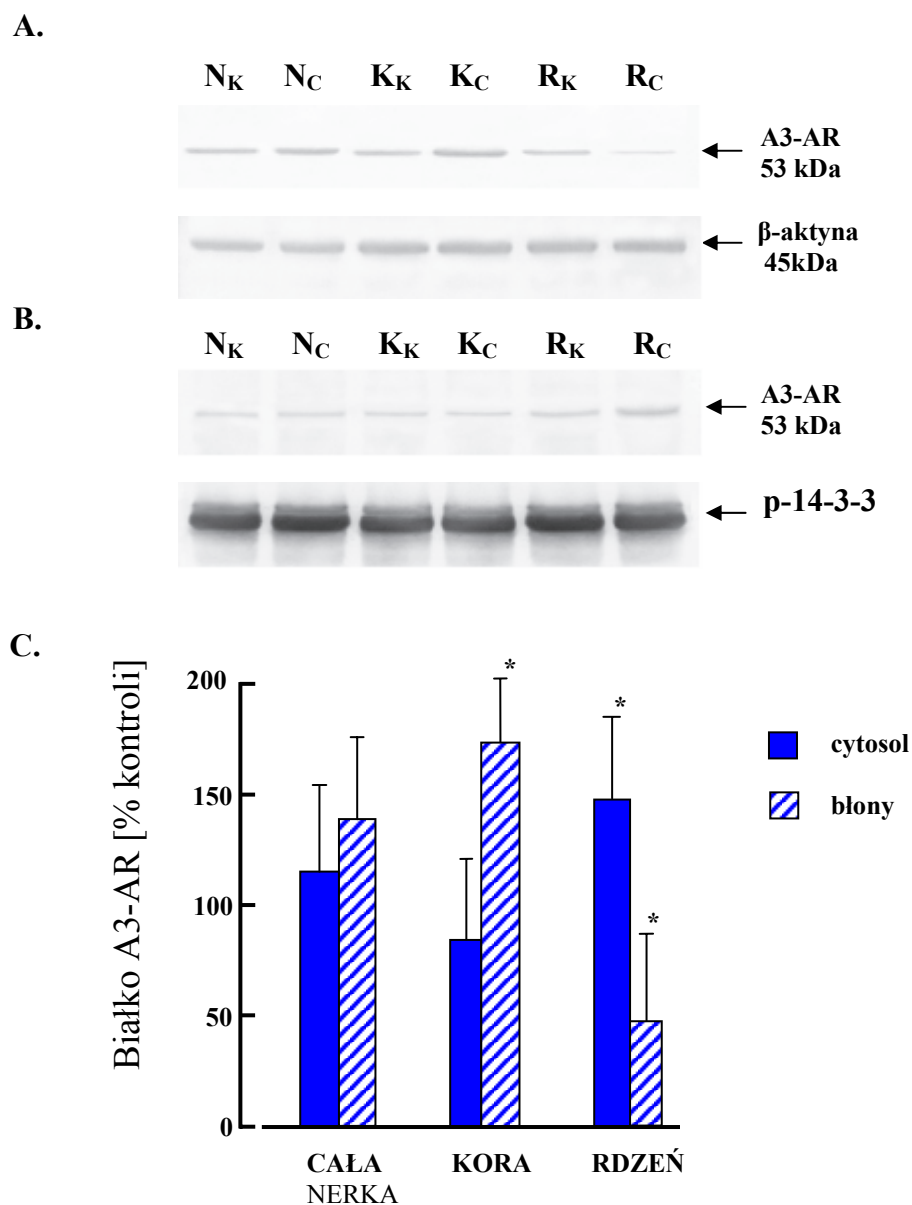
Poziom mRNA receptora A3 w nerce szczura cukrzycowego był niezmienny w porównaniu do poziomu obserwowanego u szczurów normalnych (Ryc. 21A). Analiza densytometryczna immunoblotów wykazała, że używane przeciwciało rozpoznawało prążek białkowy na wysokości 53 kDa. Obserwowano niewielki wzrost ilości białka receptora A3 w homogenatach z całej nerki, nie był on jednak znamieny statystycznie (Ryc. 21B). Natomiast w homogenatach z kory nerki cukrzycowej stwierdzono znamieny statystycznie wzrost ilości białka receptora A3 (Ryc. 21B). Zaobserwowano 70% wzrost ilości białka A3-AR w błonach kory nerki cukrzycowej, natomiast ilość tego białka w błonach rdzenia nerki cukrzycowej spadała o 80% (Ryc. 22). Spadkowi białka w błonach towarzyszył 50% wzrost poziomu białka A3-AR we frakcji cytosolowej nerki cukrzycowej. Natomiast we frakcji błonowej izolowanej z kory nerki cukrzycowej zaobserwowano nieznamieny statystycznie 25% spadek ilości białka receptora A3.

Podawanie szczurom cukrzycowym insuliny przez cztery dni powodowało powrót poziomu mRNA i białka receptora A3 do wartości obserwowanych w nerkach szczurów kontrolnych [268].



Ryc. 21. Zmiany poziomu mRNA i białka receptora A3 w nerce szczura cukrzycowego.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z RNA izolowanego z nerki normalnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki normalnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki normalnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). **B.** Przykładowy immunoblot homogenatów analizowanych tkanek. Na każdą ścieżkę naniesiono 80 μ g białka. **C.** Procentowe zmiany ilości mRNA i białka receptora A3 w nerce cukrzycowej. Poziom mRNA i białka normalizowano do β -aktyny (A3/ β -aktyna) i przedstawiono jako % kontroli (tkanka szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu (PCR) i trzech (Western blot) doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.



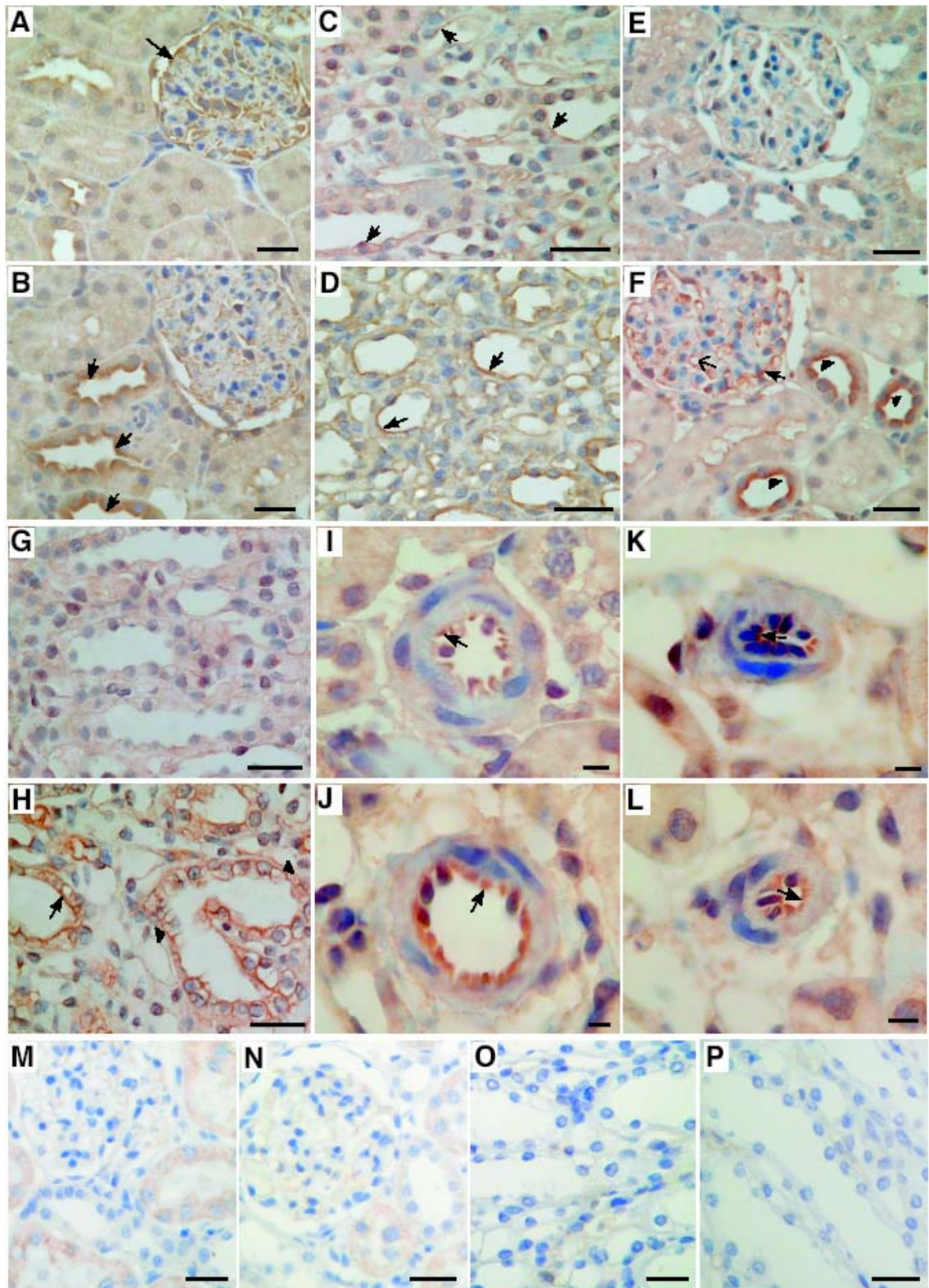
Ryc. 22. Dystrybucja komórkowa białka receptora A3 w nerce normalnej i cukrzycowej.

Fracje błonowe (**A**) i cytosolowe (**B**) izolowano z nerki normalnej (N_K), nerki cukrzycowej (N_C), kory nerki normalnej (K_K), kory nerki cukrzycowej (K_C), rdzenia nerki normalnej (R_K), rdzenia nerki cukrzycowej (R_C). Na ścieżki nanoszono 50 μg (dla frakcji błonowej) i 70 μg (dla frakcji cytosolowej) białka. **C.** Procentowe zmiany ilości białka receptora A3 w badanych frakcjach. Poziom białka normalizowano do odpowiedniego białka referencyjnego (β -aktyna w błonach, p-14-3-3 w cytosolu) i przedstawiono jako % kontroli (tkanka szczura normalnego). Podane wartości są średnimi \pm SD ($n=3$). * $p<0,05$ w stosunku do kontroli.

6.1.5. Analiza immunohistochemiczna ekspresji receptora A1 i A2a w nerce szczura normalnego i cukrzycowego.

Analizę immunohistochemiczną ekspresji adenozynowych receptorów A1 i A2a w nerce szczura normalnego i cukrzycowego przeprowadzono na skrawkach tkankowych o grubości 4 μm , wykorzystując przeciwciała anty-A1 i anty-A2a, gdyż tylko te dwa spośród wszystkich używanych do doświadczeń Western blot dawały widoczny odczyn dla badanych receptorów. Wyraźną ekspresję receptora A1 obserwowano w korze nerki normalnej, w komórkach nabłonka kłębuszków nerkowych, natomiast w części luminalnej błony komórkowej komórek nabłonka kanalików krętych dalszych była ona słabo widoczna (Ryc. 23). W nerce cukrzycowej obserwowano słaby odczyn receptora A1 w kłębku nerkowym oraz zwiększoną jego ekspresję w kanalikach krętych dalszych (Ryc. 23B). W kanalikach rdzeniowych nerki normalnej stwierdzono jedynie słaby odczyn receptora A1 w części luminalnej błony komórkowej, natomiast w nerce cukrzycowej obserwowano wysoką ekspresję receptora w kanalikach rdzeniowych, zwłaszcza w kanaliku zbiorczym oraz ramieniu grubym części wstępującej pętli Henlego (Ryc. 23D). Nie stwierdzono natomiast obecności receptora A1 w naczyniach doprowadzających i odprowadzających kłębuszka nerkowego.

W nerkach normalnych ekspresja receptora A2a była bardzo słaba, zarówno w korze jak i w rdzeniu (Ryc. 23E, 23G). Natomiast w korze nerki cukrzycowej obserwowano wyraźną ekspresję tego receptora w części luminalnej błony komórek korowych kanalików zbiorczych (Ryc. 23F). Ponadto zaobserwowano również wyraźną ekspresję receptora A2a w komórkach nabłonkowych kłębka i naczyniach włosowatych kłębuszka nerkowego. Zwiększenie ekspresji receptora A2a w nerce cukrzycowej stwierdzono także w kanalikach rdzeniowych. Zaobserwowano również, że większość komórek kanalików zbiorczych wykazuje ekspresję receptora A2a w części zarówno luminalnej jak i bazolateralnej błony komórkowej w nabłonku kanalików zbiorczych (Ryc. 23H). Obserwowano również zwiększoną gęstość receptora A2a w komórkach nabłonkowych naczyń doprowadzających kłębka cukrzycowego, podczas gdy w naczyniach odprowadzających była widoczna niewielka ekspresja tego receptora (Ryc. 23J, 23L).



Ryc. 23. Ekspresja receptora A1 i A2a w nerce normalnej i cukrzycowej. Zdjęcia przedstawiają analizę immunohistochemiczną poszczególnych części nerki normalnej (A, C, E, G, I, K, M, N, O, P) i cukrzycowej (B, D, F, H, J, L). Preparaty (A-D, M, O) inkubowano z przeciwciałami anti-A1-AR, natomiast (E-L, N, P) z anti-A2a-AR. Zdjęcia M, O i N, P przedstawiają analizę prowadzoną w obecności peptydu blokującego przeciwciała odpowiednio A1 oraz A2a. W nerce normalnej ekspresja receptora A1 jest widoczna w komórkach nabłonkowych kłębuszka (A, strzałka) oraz w komórkach nabłonkowych

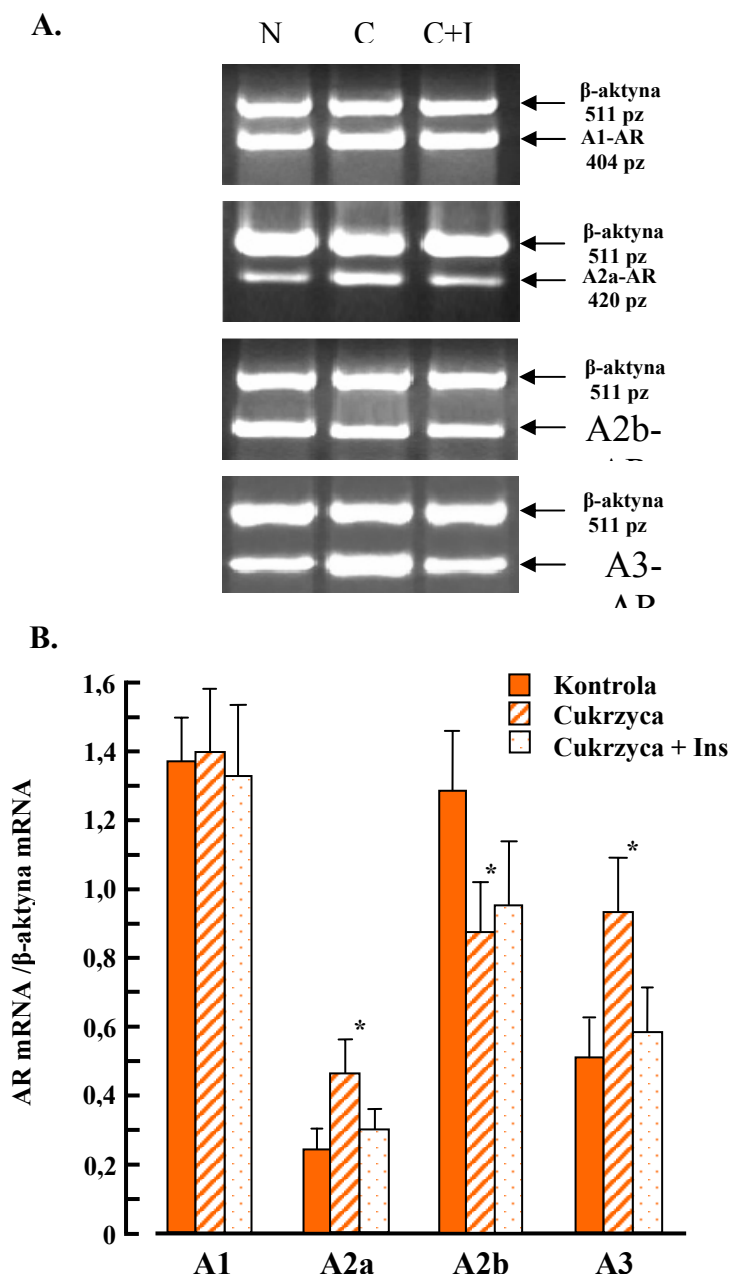
kanalików rdzeniowych (C, strzałka). Natomiast w nerce cukrzycowej wyraźnie zwiększona ekspresja receptora A1 jest widoczna w komórkach nabłonkowych korowych kanalików krętych dalszych (B, strzałka) i kanalikach rdzeniowych (D, strzałka). W kłębuszkach nerki cukrzycowej (B) można zaobserwować spadek ekspresji receptora A1. Ekspresja receptora A2a w preparatach z kory (E) i rdzenia (G) nerki normalnej była słabo widoczna, natomiast w korze nerki cukrzycowej (F) zaobserwować można bardzo wyraźną ekspresję tego receptora w kłębuszkach (strzałka) i kłębkowych pętlach włosniczkowych (strzałka z szerokim grotem) oraz w części apikalnej błony nabłonka komórek kanalików krętych dalszych (grot strzałki). W nerce cukrzycowej odczyn receptora A2a był bardzo wyraźny zarówno w błonach luminalnych (strzałka) jak i basolateralnych (grot strzałki) komórek nabłonkowych kanalików rdzeniowych (H). W nerce cukrzycowej widać również silną ekspresję receptora A2a w komórkach nabłonkowych naczyń doprowadzających krew do nerki (J, strzałka), natomiast komórki naczyń odprowadzających są słabo wyznakowane przeciwciałami anti-A2a-AR (K, L, strzałka). Skala na zdjęciach A-H i M-P przedstawia 50 μm , natomiast I-L 10 μm .

6.2. Ekspresja receptorów adenozyiny w wątrobie szczura cukrzycowego.

Analiza cDNA otrzymanego z wyizolowanego z wątroby szczura RNA pokazała, że poziom mRNA dla receptora A1 nie ulega zmianie w wątrobie szczura cukrzycowego. W wątrobie cukrzycowej obserwowano natomiast znaczący wzrost ilości mRNA dla receptora A2a i A3 odpowiednio 2- i 1,8-krotny (Ryc. 24). Z kolei ilość mRNA dla receptora A2b była obniżona o blisko 40% w wątrobie szczura cukrzycowego. Podawanie szczurowi cukrzycowemu insuliny przez cztery dni powodowało normalizację poziomu mRNA dla receptora A2a i A3 (Ryc. 24). Ilość mRNA dla receptora A2b w wątrobie szczura cukrzycowego otrzymującego insulinę wzrastała nieznacznie, lecz nie była to zmiana statystycznie znamienne w stosunku do poziomu obserwowanego w wątrobie cukrzycowej. Jednak ta niewielka zmiana powodowała zanik statystycznej różnicy między poziomem A2b-AR mRNA w wątrobie szczura normalnego. Ze statystycznego punktu widzenia można zatem przyjąć, że podanie insuliny szczurowi cukrzycowemu normalizowało również poziom mRNA dla receptora A2b. Zmianom w poziomie mRNA dla receptora A2a i A3 towarzyszyły również zmiany ilości białka obu receptorów. Analiza Western blot pokazała, że ilość białka receptora A2a i receptora A3 wzrastała w homogenatach wątroby cukrzycowej odpowiednio o 70% i 40% (Ryc. 25A, B). Wzrost ilości białka obydwu receptorów był jeszcze bardziej widoczny w błonach wątroby cukrzycowej, gdzie obserwowano

odpowiednio 90% i 60% wzrost ilości białka A2a-AR i A3-AR. Z kolei ilość białka receptora A2b nie ulegała wyraźnej zmianie w homogenacie i frakcji cytosolowej wątroby cukrzycowej. Jedynie we frakcji błonowej wątroby cukrzycowej obserwowano blisko 50% spadek ilości białka receptora A2b (Ryc. 25A, B).

Po czterech dniach od rozpoczęcia podawania szczurom cukrzycowym insuliny obserwowano normalizację ilości białka receptorów adenozynowych w wątrobie (Ryc. 26).

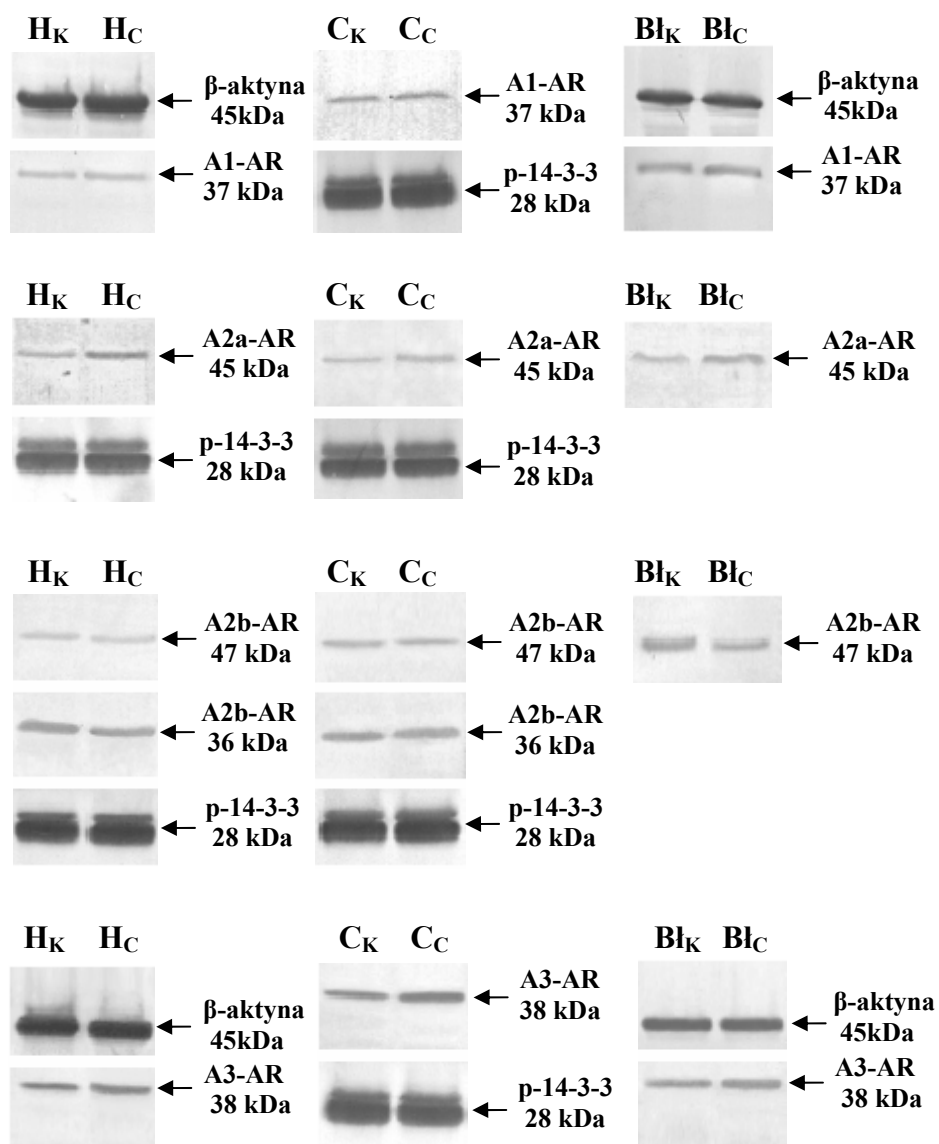


Ryc. 24. Poziom mRNA receptorów adenozyny w wątrobie szczura.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z RNA izolowanego z wątroby szczura normalnego (N), cukrzycowego (C), cukrzycowego, któremu przez 4 dni podawano insulinę (C+I).

B. Względna ilość mRNA AR w wątrobie szczura kontrolnego, cukrzycowego i cukrzycowego, któremu przez 4 dni podawano insulinę. Poziom mRNA normalizowano do β-aktyny. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR ± SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

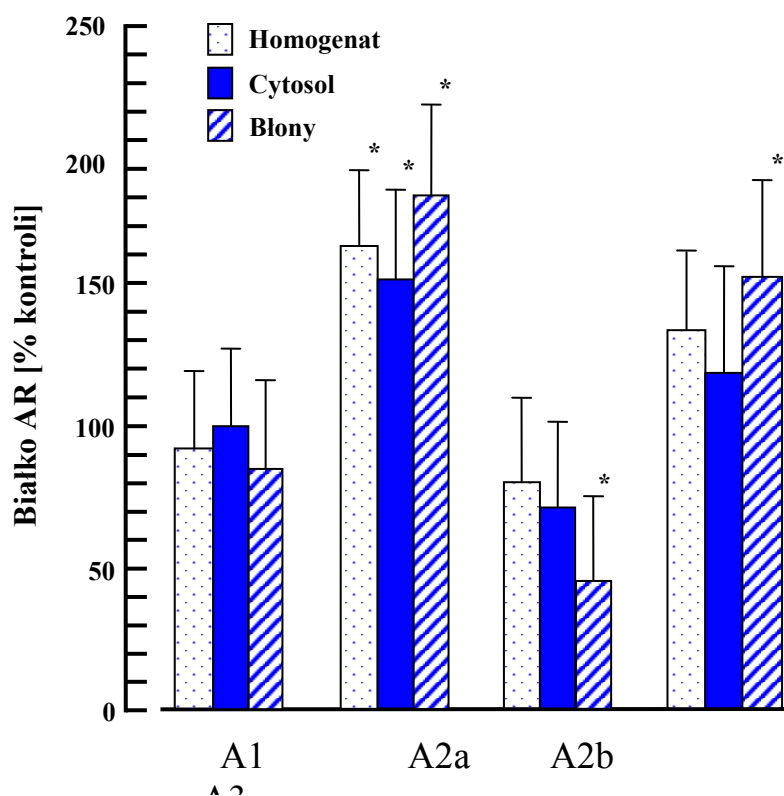
A.



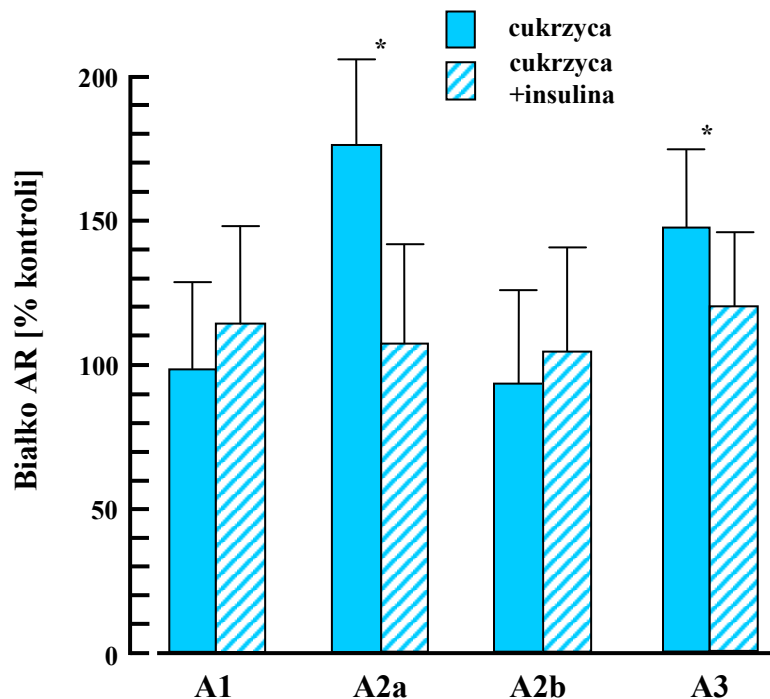
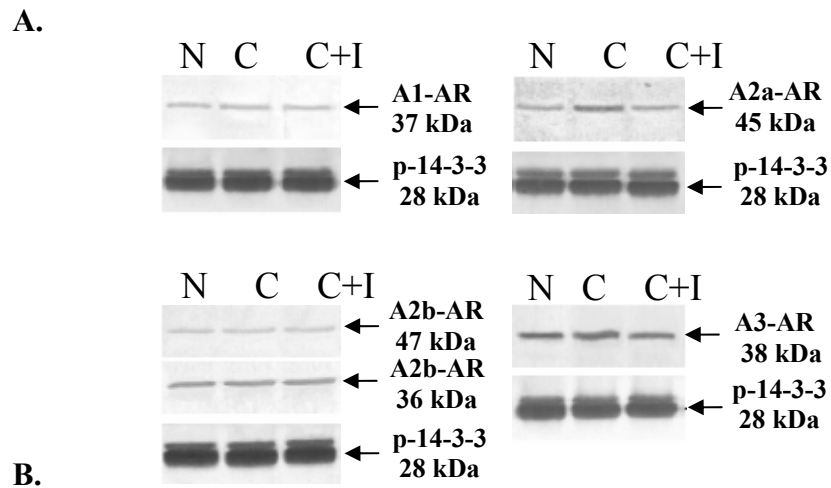
Ryc. 25A. Poziom białka receptorów adenozyiny w wątrobie szczura.

Przykładowe immunobloty homogenatów wątroby szczurów kontrolnych (H_K) i cukrzycowych (H_C); frakcji cytosolowych wątroby szczurów kontrolnych (C_K) i cukrzycowych (C_C); frakcji błonowych wątroby szczurów kontrolnych ($B1_K$) i cukrzycowych ($B1_C$). Na każdą ścieżkę naniesiono 50 μ g białka.

B.



Ryc. 25B. Procentowe zmiany ilości białka receptorów adenozyiny w homogenatach, frakcjach błonowych i cytosolowych izolowanych z wątroby szczura cukrzycowego. Poziom białka normalizowano do β -aktyny lub białka p-14-3-3 i przedstawiono jako % kontroli (poziom u szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń Western blot. \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.



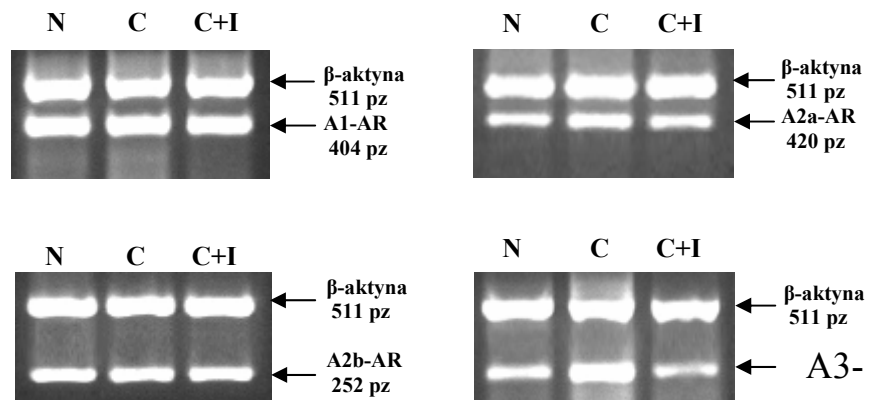
Ryc. 26. Wpływ podania insuliny szczurowi cukrzycowemu na poziom białka receptorów adenozyiny w wątrobie.

A. Przykładowe immunoblotty homogenatów z wątroby szczura normalnego (N), cukrzycowego (C) i cukrzycowego, któremu 4 dni podawano insulinę (C+I). Na każdą ścieżkę naniesiono 50 μ g białka. **B.** Procentowe zmiany białka receptorów adenozyiny w wątrobie cukrzycowej i cukrzycowej z insuliną. Poziom białka normalizowano do p-14-3-3 i przedstawiono jako % kontroli (poziom u szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń Western blot. \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

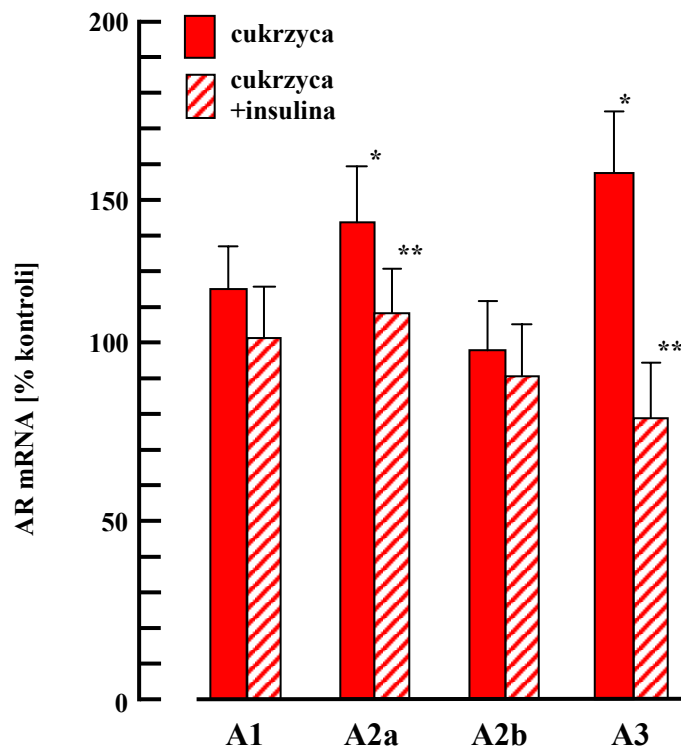
6.3. Ekspresja receptorów adenozyiny w sercu szczura cukrzycowego.

Analiza poziomu mRNA receptorów adenozyinowych w sercu szczura wykazała, że poziom mRNA receptorów A1 i A2b w sercu szczura cukrzycowego nie ulega zmianie, natomiast w przypadku receptorów A2a i A3 obserwowano wzrost ilości mRNA odpowiednio o 40% i 60%. Podanie szczurom insuliny powodowało powrót poziomu mRNA do tego obserwowanego u szczurów kontrolnych (Ryc. 27). Analiza Western blot prowadzona na homogenatach serca szczura kontrolnego oraz cukrzycowego pokazała wzrost ilości białka receptora A1 i A3 w sercu cukrzycowym. Jednak tylko 42% wzrost ilości białka A3-AR był statystycznie znamienne (Ryc. 28). Podawanie szczurom cukrzycowym insuliny przez cztery dni powodowało powrót poziomu białka tego receptora do poziomu obserwowanego w sercu szczura normalnego. W sercu cukrzycowym obserwowano również blisko 30% spadek ilości białka receptora A2b, lecz była to zmiana nieznamienne statystycznie. Pomimo znacznego wzrostu poziomu mRNA receptora A2a nie obserwowano żadnych znaczących zmian poziomu tego białka w homogenatach serc szczurów cukrzycowych.

A.



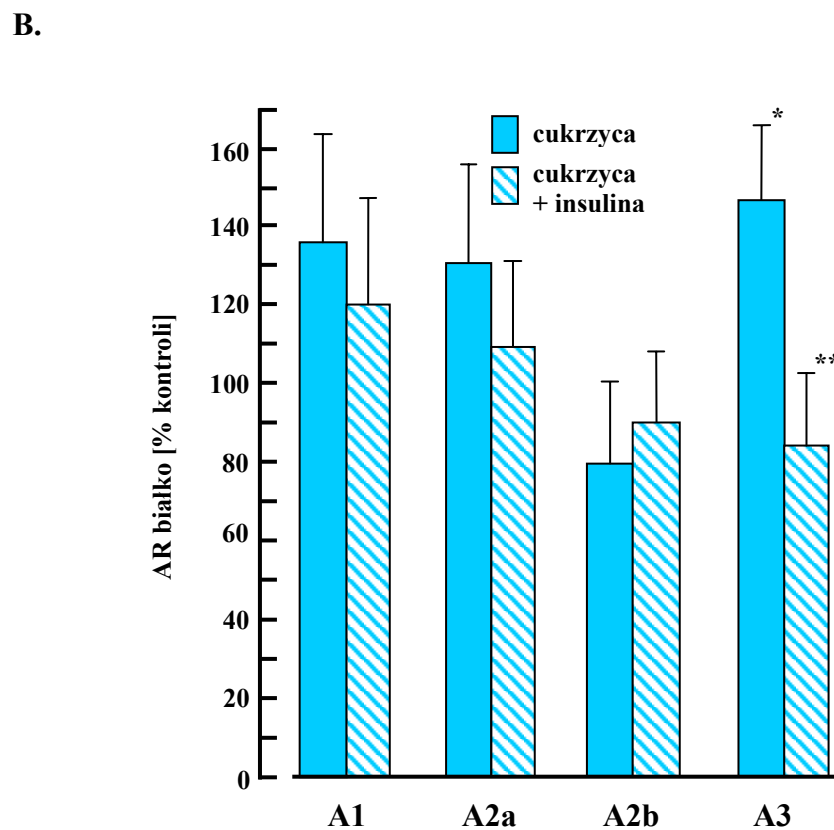
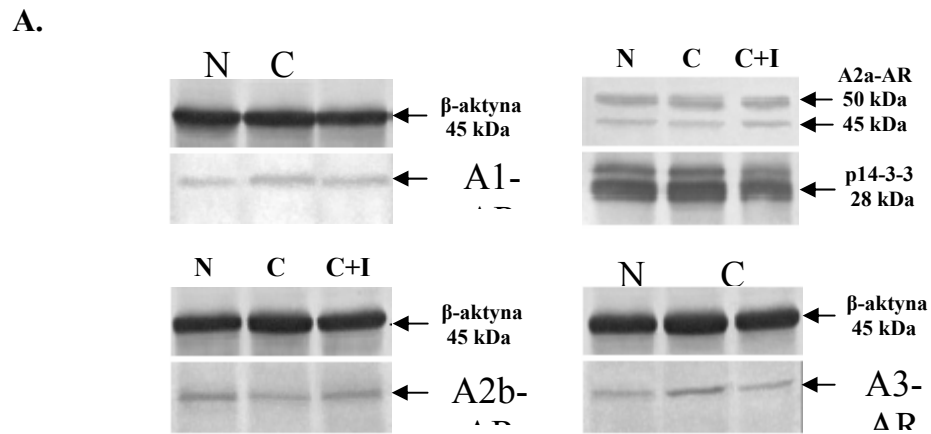
B.



Ryc. 27. Wpływ cukrzycy oraz podawania insuliny na poziom mRNA receptorów adenyzy w sercu szczura.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z RNA izolowanego z serca szczura normalnego (N), cukrzycowego (C), cukrzycowego, któremu przez 4 dni podawano insulinę (C+I).

B. Procentowe zmiany ilości mRNA AR w sercu cukrzycowym. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny i przedstawiono jako % kontroli (poziom u szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; ** $p < 0,05$ w stosunku do cukrzycy.



Ryc. 28. Zmiany poziomu białka receptorów adenosyny w sercu szczura cukrzycowego.

A. Przykładowe immunoblotty homogenatów z serca szczura normalnego (N), cukrzycowego (C) i cukrzycowego, któremu 4 dni podawano insulinę (C+I). Na każdą ścieżkę naniesiono 40 μ g białka.

B. Procentowe zmiany białka receptorów adenosyny w sercu szczura cukrzycowego i cukrzycowego z insuliną. Poziom białka normalizowano do odpowiedniego białka referencyjnego (β -aktyna, p14-3-3) i przedstawiono jako % kontroli (poziom u szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń Western blot. \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

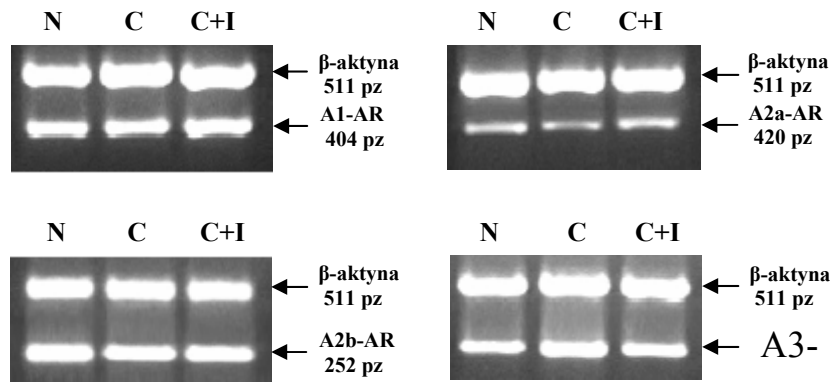
6.3.1. Ekspresja receptorów adenozynowych w kardiomiocytach.

Tkanka mięśnia sercowego zbudowana jest z kilku typów komórek, wśród których kardiomiocyty stanowią tylko 30-40% liczby komórek budujących mięsień sercowy. Z drugiej strony jednak ten typ komórek zajmuje blisko 75% całkowitej objętości serca [364] i stanowi znaczącą funkcjonalną i strukturalną jednostkę serca. Dlatego też przeprowadzono doświadczenia pozwalające określić poziom ekspresji receptorów adenozyny w izolowanych kardiomiocytach szczura.

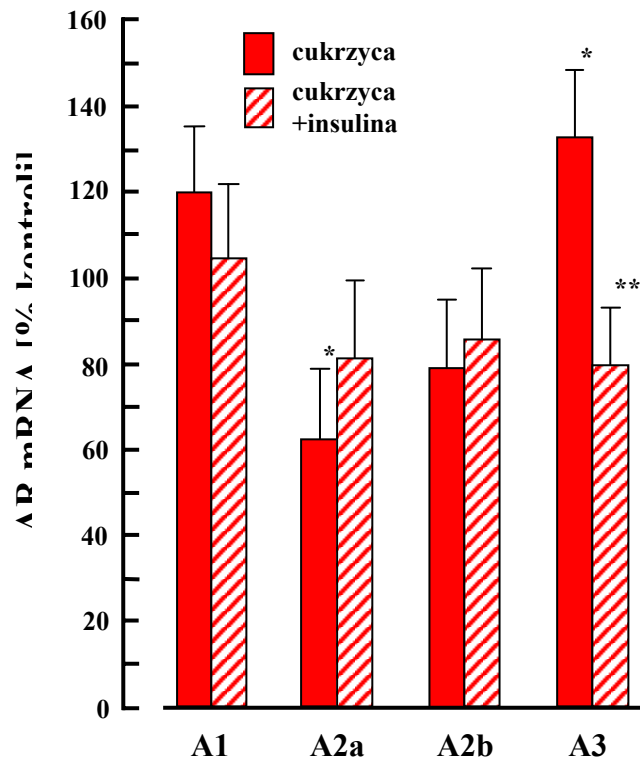
Badając poziom mRNA receptorów adenozynowych w izolowanych kardiomiocytach szczura stwierdzono niezmienny poziom mRNA receptorów A1 i A2b w komórkach izolowanych z serc szczurów cukrzycowych (Ryc. 29). Porównanie poziomu mRNA receptora A2a w kardiomiocytach izolowanych z serc szczurów normalnych i cukrzycowych pokazało znaczący spadek poziomu tego mRNA w komórkach cukrzycowych. Zatem kierunek zmian poziomu mRNA dla tego receptora w kardiomiocytach jest przeciwny do tego obserwowanego w ekstraktach z całych serc szczurzych (Ryc. 27). Natomiast obserwowany wzrost poziomu mRNA receptora A3 w kardiomiocytach cukrzycowych był podobny do tego obserwowanego w całym sercu cukrzycowym (Ryc. 27).

Analiza Western blot przeprowadzona na homogenatach z kardiomiocytów izolowanych z serc normalnych i cukrzycowych nie wykazała żadnych znaczących zmian poziomu białka receptorów A2a i A2b w kardiomiocytach cukrzycowych. Obserwowano natomiast 50% wzrost poziomu białka receptora A1 w kardiomiocytach cukrzycowych (Ryc. 30). Podobny wzrost poziomu białka obserwowano w przypadku receptora A3. Traktowanie szczurów cukrzycowych przez cztery dni insuliną powodowało powrót ilości białka receptorów A1 i A3 do poziomu obserwowanego w kardiomiocytach izolowanych ze szczurów normalnych.

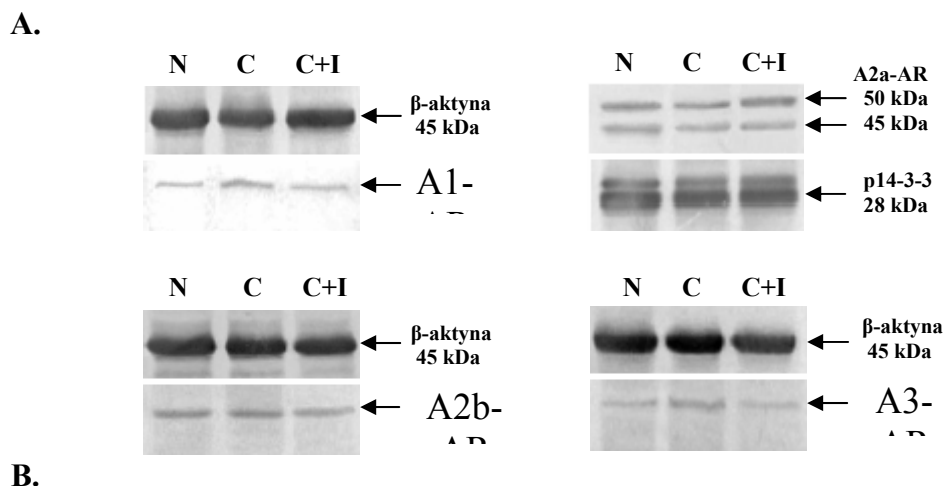
A.



B.



Ryc. 29. Wpływ cukrzycy na poziom mRNA receptorów adenozyiny w kardiomiocytach szczura. **A.** Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z RNA izolowanego z kardiomiocytów szczura normalnego (N), cukrzycowego (C), cukrzycowego, któremu przez 4 dni podawano insulinę (C+I). **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA AR w kardiomiocytach cukrzycowych. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny i przedstawiono jako % kontroli (poziom u szczura normalnego). Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * p < 0,05 w stosunku do kontroli; ** p < 0,05 w stosunku do cukrzycy.



Ryc. 30. Wpływ cukrzycy na poziom białka receptorów adenozyiny w kardiomiocytach szczura.

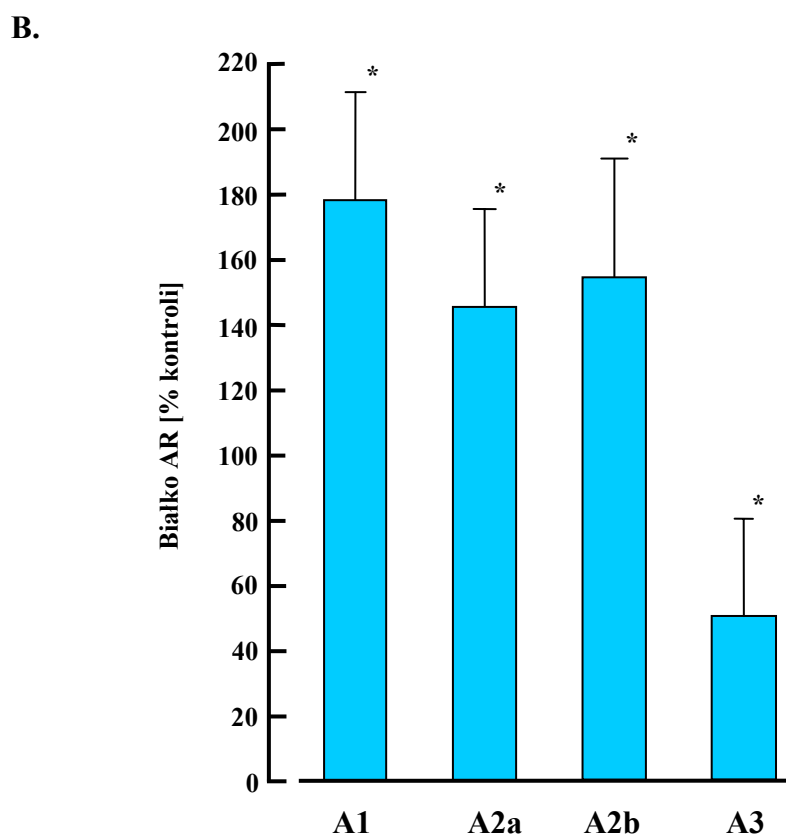
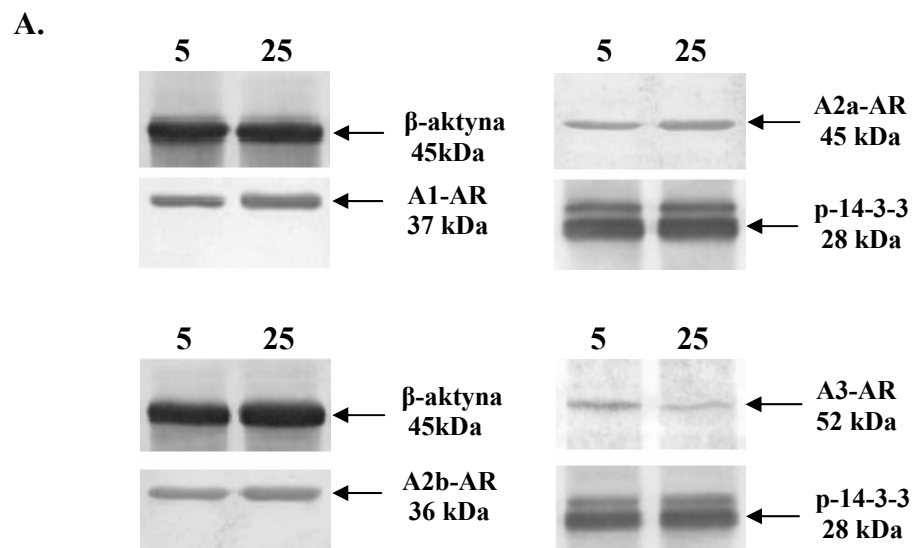
A. Przykładowe immunoblotty homogenatów kardiomiocytów izolowanych ze szczura normalnego (N), cukrzycowego (C) i cukrzycowego, któremu 4 dni podawano insulinę (C+I). Na każdą ścieżkę naniesiono 30 μ g białka. **B.** Procentowe zmiany białka receptorów adenozyiny w kardiomiocytach izolowanych z serca szczura cukrzycowego (cukrzyca) i cukrzycowego, któremu 4 dni podawano insulinę (cukrzyca+insulina). Poziom białka normalizowano do odpowiedniego białka referencyjnego (β -aktyny, p14-3-3) i przedstawiono jako % kontroli (N). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń Western blot. \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; ** $p < 0,05$ w stosunku do cukrzycy.

6.3.2. Wpływ glukozy i insuliny na ekspresję receptorów adenozyiny w kardiofibroblastach szczura

Kardiofibroblasty stanowią najliczniejszą populację komórek serca, bo ~70% wszystkich komórek sercowych [38]. Komórki te w sercu odpowiadają za produkcję większości białek matriks zewnątrzkomórkowego jak również wydzielają czynniki regulujące funkcje miocytów i pozostałych komórek serca [150]. Jeszcze do niedawna kardiofibroblasty uważane były jako pasywne komórki serca, których główną rolą była produkcja białek matriks zewnątrzkomórkowego jednak wyniki ostatnich badań wskazują na o wiele aktywniejszą funkcję tych komórek w sercu [200]. Z uwagi na stosunkową łatwość izolacji tych komórek oraz ich hodowlę postanowiłam użyć ich do zbadania specyficznego wpływu insuliny i glukozy na ekspresję receptorów adenozyiny.

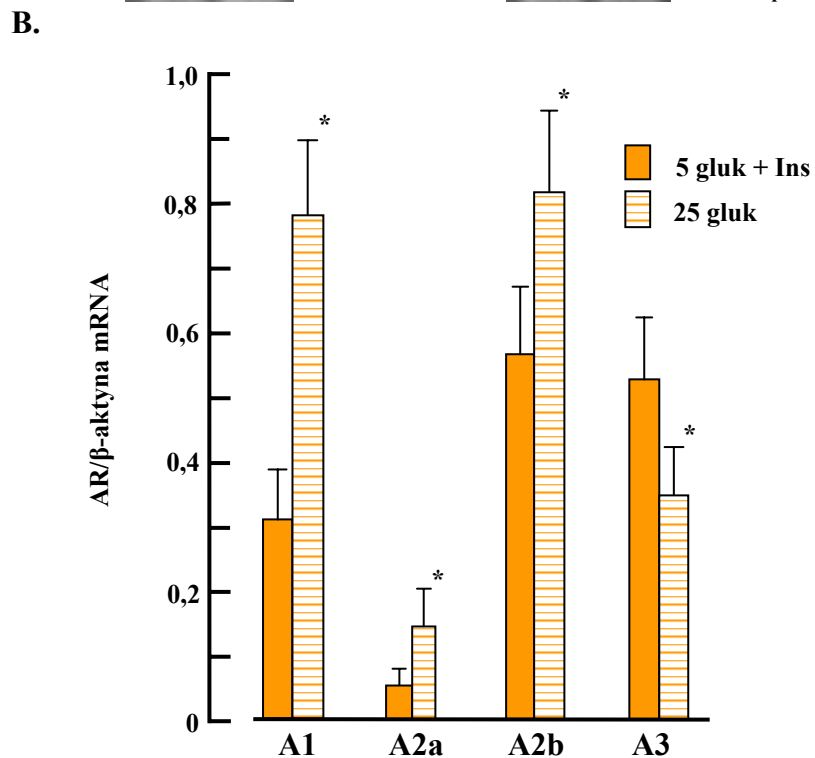
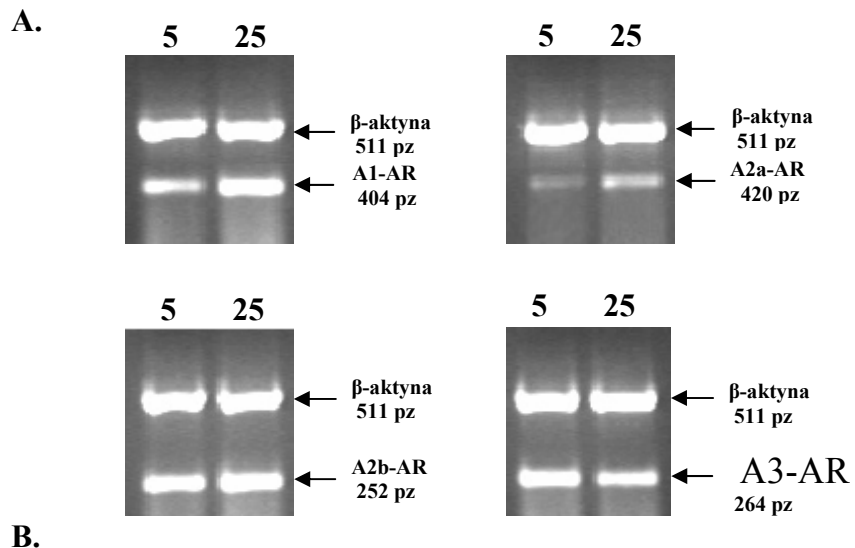
Komórki hodowane w środowisku zawierającym 5 mM glukozę oraz 10 nM insulinę przyjąłam jako komórki normalne, natomiast komórki hodowane w obecności 25 mM glukozy i nieobecności insuliny jako komórki rosnące w warunkach cukrzycopodobnych. Analiza Western blot wykonana na homogenatach hodowanych komórek pokazała, że ilość białek receptorów adenozyiny zależy od warunków hodowli kardiofibroblastów. Komórki hodowane w obecności 25 mM glukozy i nieobecności insuliny miały znacząco więcej białka receptora A1, A2a i A2b, natomiast ilość białka receptora A3 była wyraźnie obniżona (Ryc. 31). Zmianom w ilości białka receptorów adenozyinowych towarzyszyła zmiana ilości mRNA dla poszczególnych AR. W kardiofibroblastach hodowanych w warunkach cukrzycopodobnych obserwowano 2,7-; 3,6-; i 1,4-krotny wzrost ilości mRNA odpowiednio dla receptora A1, A2a i A2b (Ryc. 32). Poziom mRNA dla A3-AR był obniżony w tych komórkach o blisko 40%.

W celu zbadania, które ze zmian w ekspresji receptorów adenozyinowych zależą od insuliny, a które indukowane są wzrastającym stężeniem glukozy, kardiofibroblasty hodowałam w różnych stężeniach tych związków. Pomiar ilości mRNA dla receptora A1 w komórkach hodowanych w różnych stężeniach glukozy pokazał, że wzrost jej stężenia prowadzi do zwiększenia ilości mRNA dla A1-AR zarówno w obecności jak i nieobecności insuliny (Ryc. 33). Analiza otrzymanych wyników pokazała również, że insulina hamuje ekspresję genu A1-AR. Doświadczenia przeprowadzone na komórkach hodowanych we wzrastających stężeniach insuliny wykazały, że maksymalny efekt insuliny obserwuje się przy stężeniu 10 nM i dalsze zwiększanie stężenia insuliny nie zwiększa jej hamującego efektu (Ryc. 34).



Ryc. 31. Wpływ wzrostu stężenia glukozy i braku insuliny na poziom białka receptorów adenosyny w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

A. Przykładowe immunoblotty homogenatów kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym 5 mM glukozy oraz 10 nM insuliny (5) oraz komórek hodowanych w obecności 25 mM glukozy i nieobecności insuliny (25). Na każdą ścieżkę naniesiono 30 μ g białka. **B.** Procentowe zmiany białka receptorów adenosyny w kardiofibroblastach hodowanych w pożywce bez insuliny z 25 mM glukozy. Poziom białka normalizowano do odpowiedniego białka referencyjnego (β -aktyny, p-14-3-3) i przedstawiono jako % kontroli (5 mM glukoza, 10 nM insulina). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń Western blot. \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.



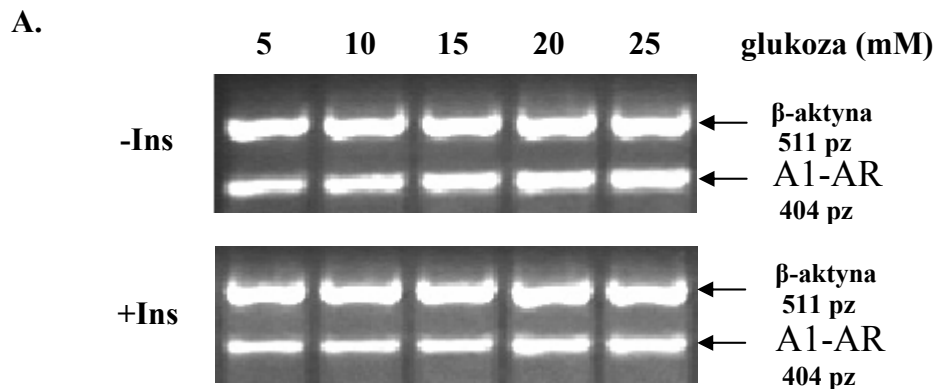
Ryc. 32. Wpływ wzrostu stężenia glukozy i braku insuliny na poziom mRNA receptorów adenyzy w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym 5 mM glukozę oraz 10 nM insulinę (5) lub w obecności 25 mM glukozy i nieobecności insuliny (25). **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA. Poziom mRNA normalizowano do β-aktyny i przedstawiono jako % kontroli (5 mM glukoza, 10 nM insulina). Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR ± SD. * p<0,05 w stosunku do kontroli.

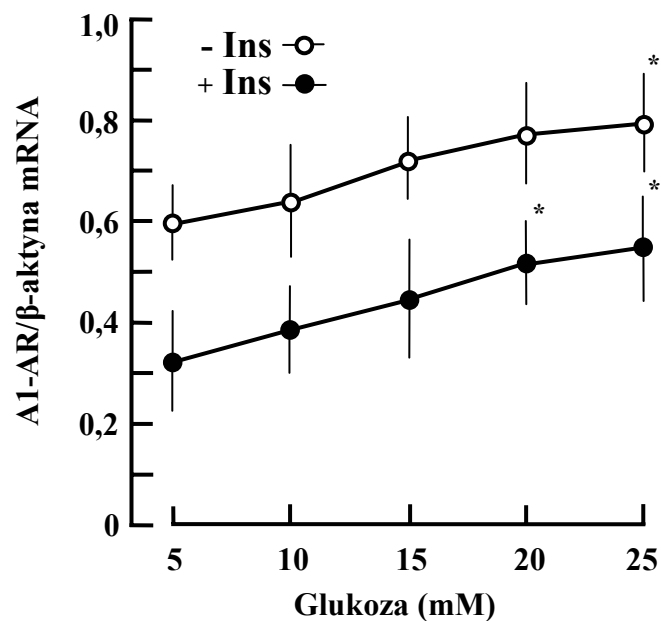
Analiza ilości mRNA dla receptora A2a w komórkach hodowanych przy różnych stężeniach glukozy w obecności i przy braku insuliny pokazała, że wzrost stężenia glukozy zwiększa poziom ekspresji genu receptora A2a, natomiast insulina nie ma wpływu na to zjawisko (Ryc. 35).

Pomiar ilości mRNA receptora A2b w komórkach hodowanych w różnych stężeniach glukozy oraz obecności i nieobecności insuliny pokazał, że zmiany stężenia glukozy nie mają wpływu na poziom ekspresji tego receptora (Ryc. 36). Okazało się również, że insulina podobnie jak w przypadku receptora A1 hamuje ekspresję receptora A2b. Badania komórek hodowanych we wzrastających stężeniach insuliny pokazały, że maksymalny efekt insuliny można obserwować przy 10 nM stężeniu (Ryc. 37).

Wzrost stężenia glukozy w pożywce hodowlanej powodował spadek ilości mRNA receptora A3 w kardiofibroblastach hodowanych w obecności i nieobecności insuliny (Ryc. 38). Doświadczenia te wykazały, że insulina nie ma wpływu na poziom ekspresji receptora A3.

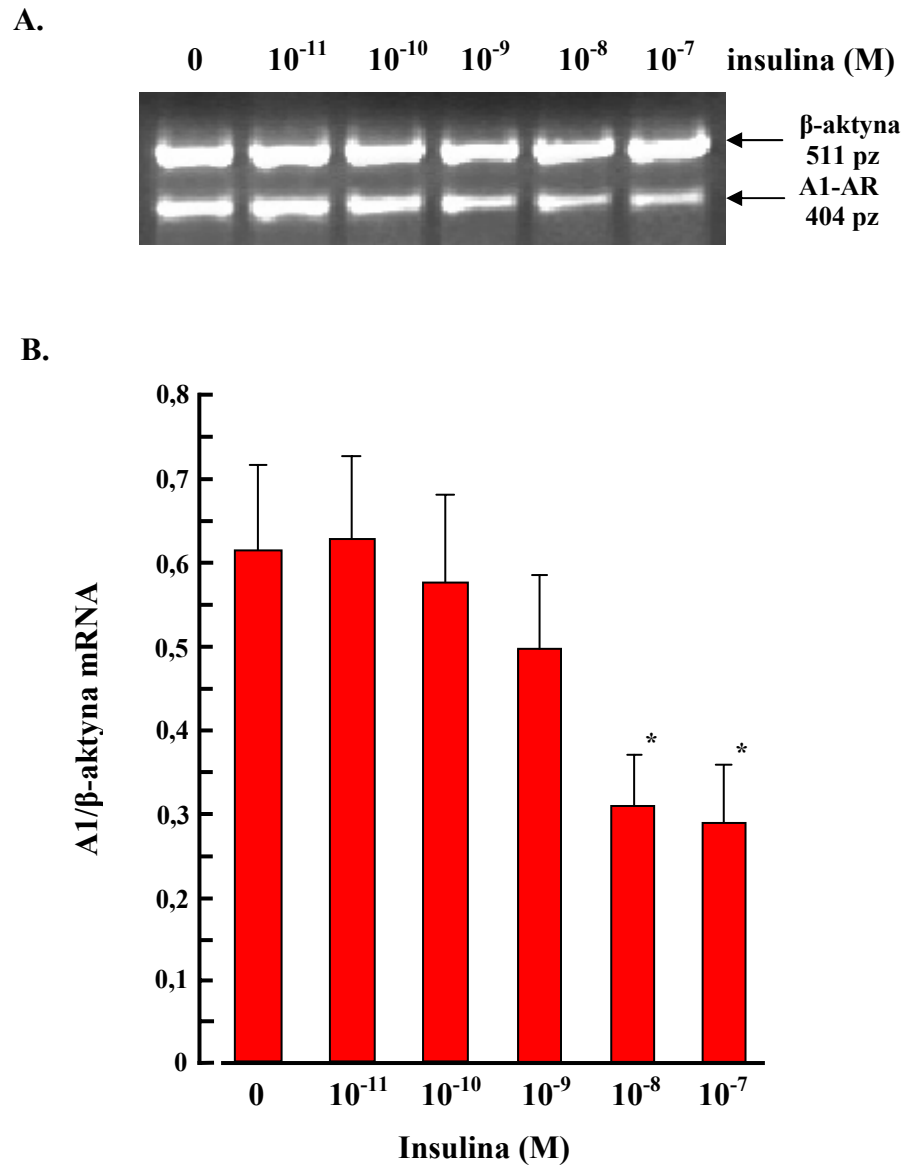


B.



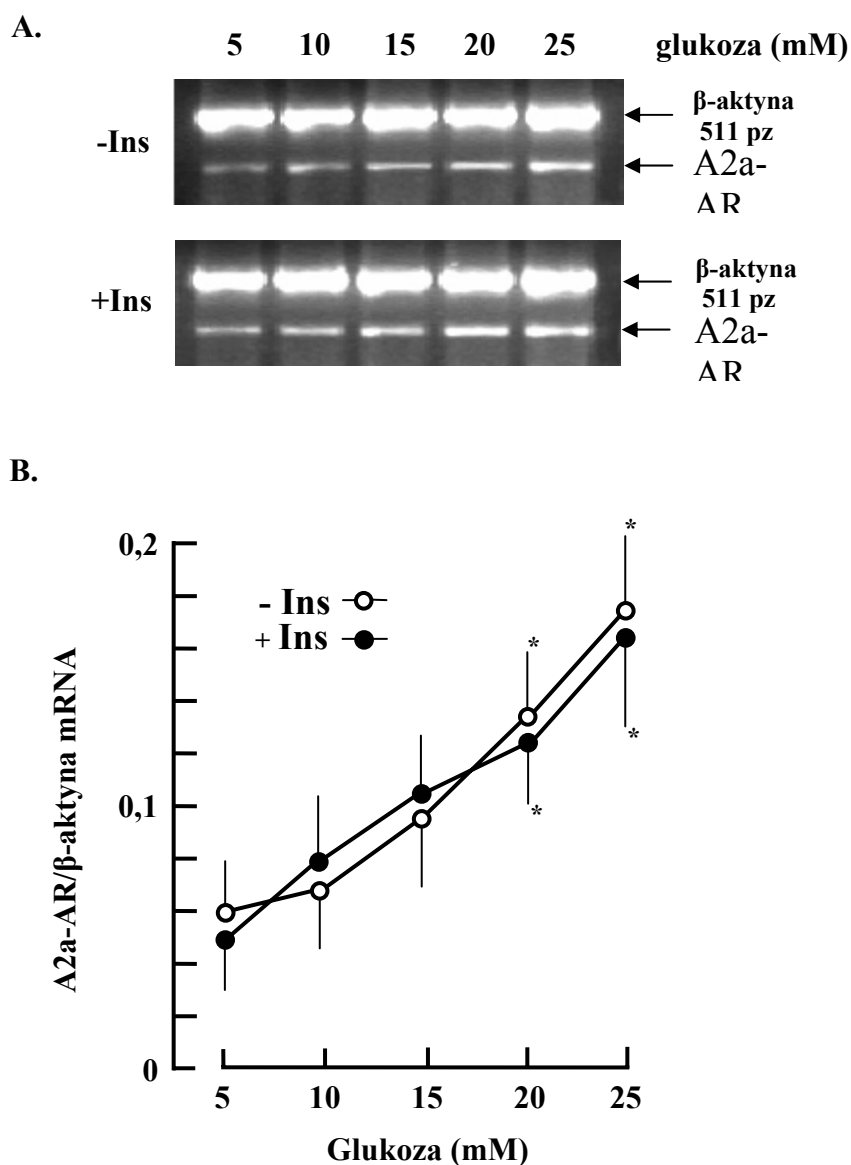
Ryc. 33. Zmiany poziomu mRNA receptora A1 w kardiocytofibroblastach hodowanych w różnych stężeniach glukozy w obecności i nieobecności insuliny.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z kardiocytofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym różne stężenia glukozy w obecności (+Ins) i nieobecności (-Ins) insuliny (10 nM). **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA receptora A1. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (5 mM glukoza).



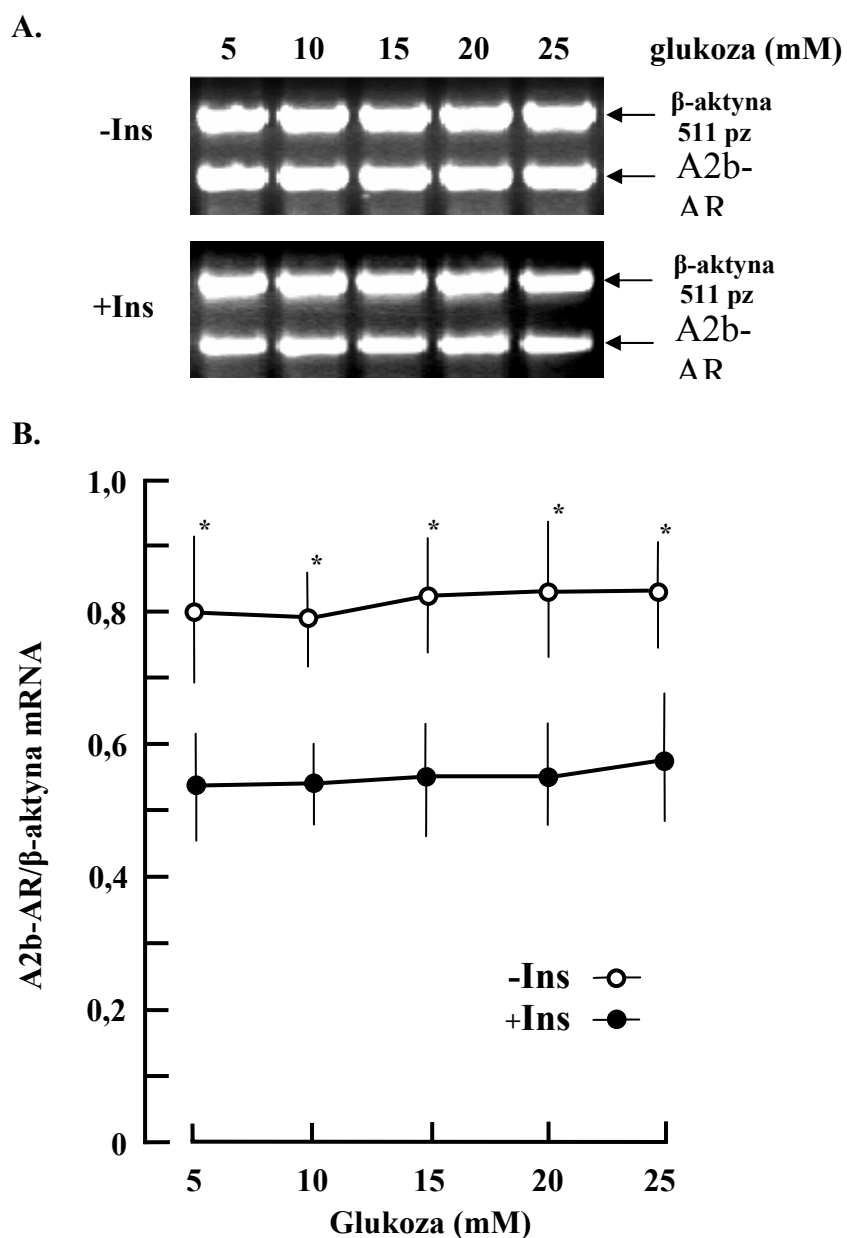
Ryc. 34. Wpływ insuliny na poziom mRNA receptora A1 w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym różne stężenia insuliny. **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA receptora A1. Poziom mRNA normalizowano do β-aktyny. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (komórki hodowane bez insuliny).



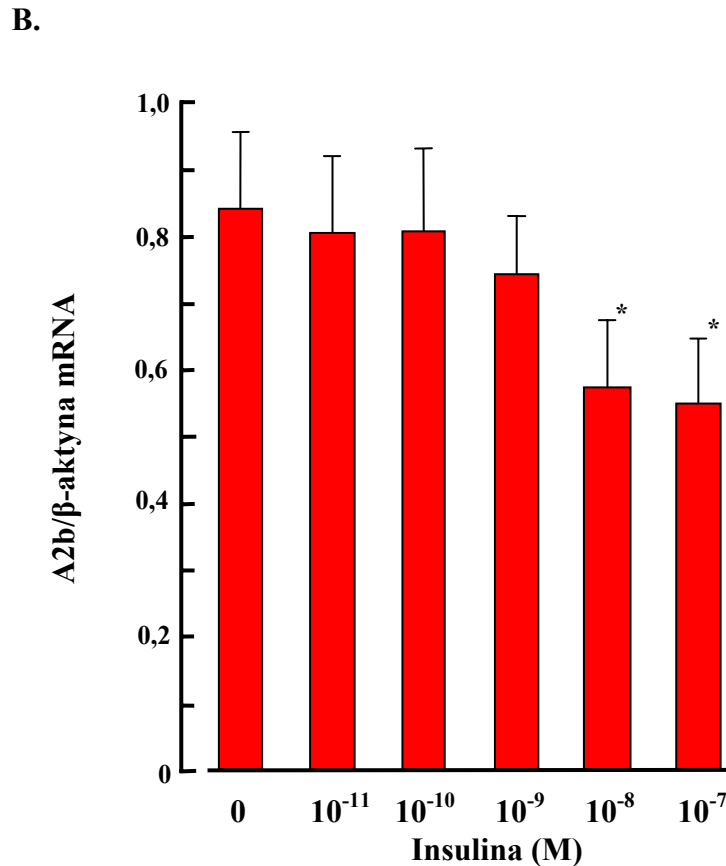
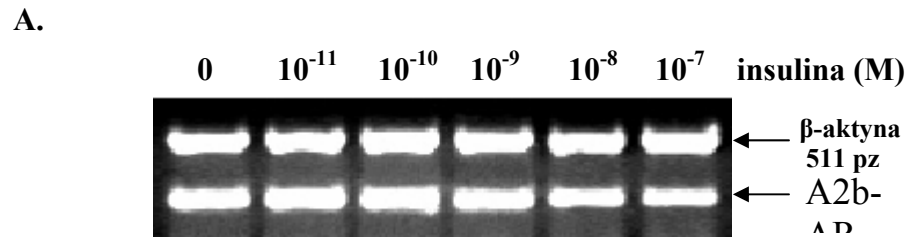
Ryc. 35. Wpływ zmian stężenia glukozy na poziom mRNA receptora A2a w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym różne stężenia glukozy w obecności (+Ins) i nieobecności (-Ins) insuliny (10 nM). **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA receptora A2a. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (5mM glukoza).



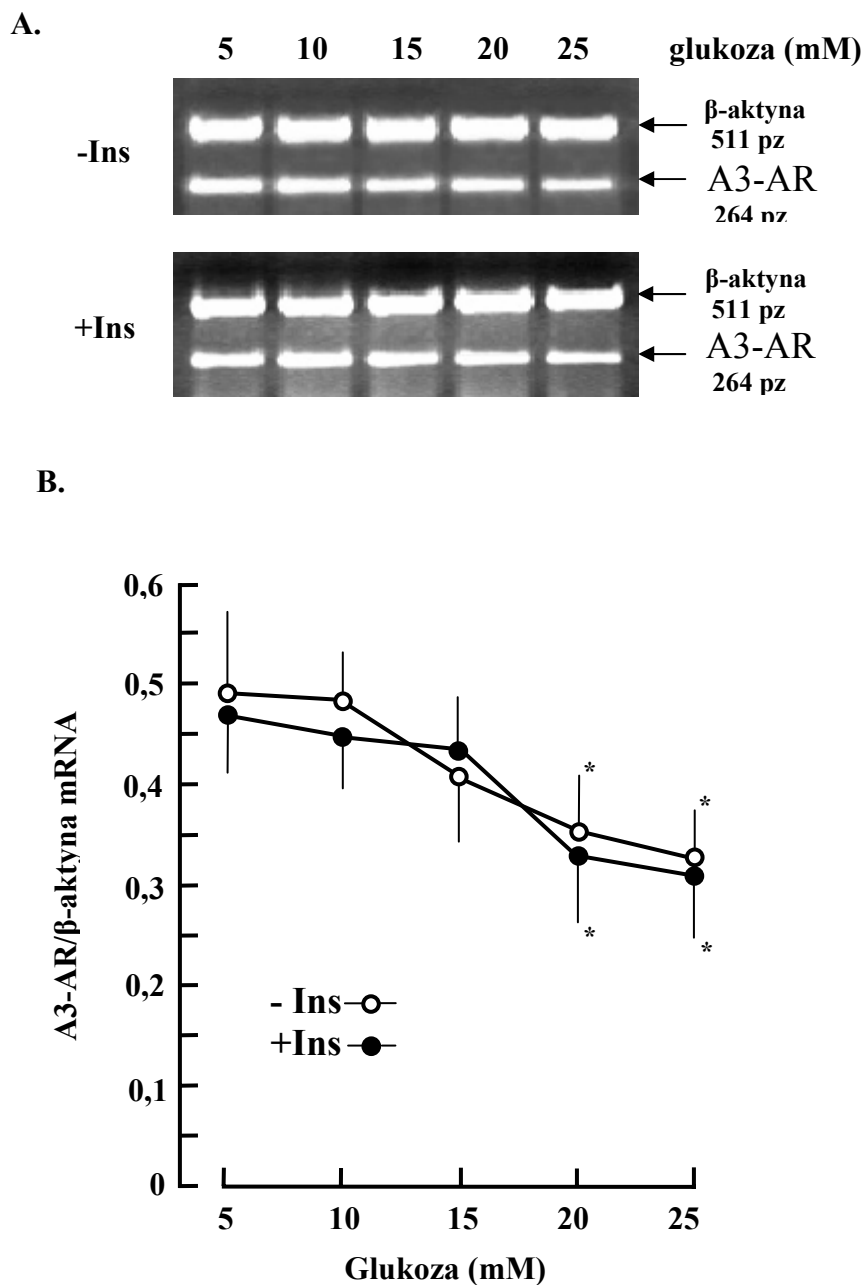
Ryc. 36. Poziom mRNA receptora A2b w kardiofibroblastach szczura hodowanych w różnych stężeniach glukozy w obecności i nieobecności insuliny.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym różne stężenia glukozy w obecności (+Ins) i nieobecności (-Ins) insuliny (10 nM). **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA receptora A2b. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w obecności 10 nM insuliny.



Ryc. 37. Zmiany poziomu mRNA receptora A2b w kardiofibroblastach hodowanych we wzrastających stężeniach insuliny.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym różne stężenia insuliny. **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA receptora A2b. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do hodowli w nieobecności insuliny.



Ryc. 38. Wpływ zmian stężenia glukozy na poziom mRNA receptora A3 w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

A. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Na ścieżki naniesiono produkty kompleksowego PCR prowadzonego na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym różne stężenia glukozy w obecności (+Ins) i nieobecności (-Ins) insuliny (10 nM). **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA receptora A3. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu reakcji PCR \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (5 mM glukoza).

Powyższe wyniki wskazują, że poziom ekspresji receptorów adenylicznych w kardiofibroblastach szczura jest w sposób specyficzny i zróżnicowany regulowany przez insulinę oraz zmiany stężeń glukozy. Ekspresja receptorów A2a oraz A3 zależy od zmian stężenia glukozy natomiast jest niezależna od insuliny. Z kolei na poziom ekspresji receptora A2b zmiany stężenia glukozy nie mają wpływu, a insulina powoduje obniżenie ilości mRNA dla tego receptora w komórce. Jedynym receptorem, którego ekspresja zależy zarówno od insuliny jak i glukozy jest receptor A1, na którego ekspresję oba czynniki działają przeciwnie tj. wzrost stężenia insuliny powoduje obniżenie ilości mRNA A1-AR, natomiast wzrost stężenia glukozy zwiększa poziom tego mRNA w komórce.

7. DYSKUSJA.

Wyniki doświadczeń przedstawione w tej pracy pokazują, że ruchliwość elektroforetyczna białek rozpoznawanych przez przeciwciała dla danego receptora adenozynowego różni się wyraźnie (za wyjątkiem receptora A1) w poszczególnych rodzajach analizowanych tkanek. Na podstawie wyników doświadczeń z użyciem N-glikozydazy F można przypuszczać, że zmienna ruchliwość elektroforetyczna poszczególnych typów receptora wynika z różnic w stopniu glikozylacji. Obserwowana po deglikozylacji ruchliwość elektroforetyczna receptora A1, która odpowiadała białku o masie 30 kDa jest podobna do tej obserwowanej w doświadczeniach innych badaczy [231]. Również w przypadku receptora A2a, którego ruchliwość elektroforetyczna po inkubacji z glikozydazą zmieniła się z 45 kDa do 38 kDa jest zgodna z poprzednimi obserwacjami poczynionymi na receptorze A2a z mózgu wołu [18]. Doświadczenia z receptorem A2b pochodzącym z linii ludzkich komórek tucznych (HMC-1) oraz ludzkich embrionalnych komórek nerkowych (linia 293) pokazały, że ruchliwość elektroforetyczna tego białka po inkubacji z glikozydazą F zmieniła się z 35 kDa do 32.8 kDa [188]. Dokładnie taką samą zmianę ruchliwości elektroforetycznej obserwowałam w przypadku receptora A2b w sercu szczura (Ryc.14). Można zatem przyjąć, że zidentyfikowane za pomocą trawienia glikozydazą białka należały do poszczególnych receptorów adenozynowych. Obserwowana w moich doświadczeniach dosyć wysoka zmienność odzysku białka receptorowego po inkubacji z glikozydazą była prawdopodobnie wynikiem działania proteaz w badanych ekstraktach tkankowych, które nie ulegały całkowitej inaktywacji w dosyć łagodnych warunkach denaturacji, jakie były niezbędne do prawidłowego działania glikozydazy. Mniejszy stopień degradacji proteolitycznej (większy odzysk) obserwowałam skracając czas inkubacji z glikozydazą, lecz w takich warunkach następowała tylko częściowa deglikozylacja. Dlatego ewaluację poziomu białka receptorów adenozynowych prowadzono na ekstraktach tkankowych nie poddawanych trawieniu glikozydazą po uprzedniej identyfikacji prążków białkowych odpowiadających poszczególnym receptorom w odrębnych doświadczeniach.

Wyniki doświadczeń prowadzonych w ramach opisanych w tej pracy badań ukazują kompleksowe zmiany jakie zachodzą w ekspresji poszczególnych receptorów adenozynowych na poziomie mRNA, białkowym, oraz rozmieszczenia komórkowego. Niektóre z tych zmian, które postaram się poniżej opisać, korespondują z rodzajem

zmian patologicznych obserwowanych w cukrzycy. W swoim omówieniu nie odnoszę się do możliwych zmian w systemach przenoszenia sygnału od poszczególnych receptorów adenozynowych jakie również mogą mieć miejsce w cukrzycy, gdyż zagadnienia te nie były tematem moich prac. Niemniej należy zdawać sobie sprawę z tego, że rozważając możliwe konsekwencje zmian ilości białka danego receptora nasuwa się pytanie o jego stan funkcjonalny. Jak opisano to we wstępie, w przekazywaniu sygnału od poszczególnych receptorów adenozyne zaangażowane jest wiele białek sygnalizacyjnych tworzących szlaki sygnalizacyjne, które w wielu miejscach krzyżując się posiadają wspólne elementy [217, 314]. Ponadto, w komórce poza oddziaływaniem w obrębie jednego rodzaju receptorów ma miejsce wzajemne oddziaływanie różnych rodzajów receptorów za pomocą elementów stanowiących wspólne ogniwa kaskad sygnalizacyjnych [81]. Biorąc pod uwagę różnorodność tkanek i rodzajów komórek uwzględnienie tych wzajemnych powiązań w niniejszym omówieniu ograniczyłoby znacznie czytelność tej części rozprawy. Adenozyne postrzegana jest jako autokryny czynnik regulujący funkcję i metabolizm nerki, dlatego zmiany w receptorach adenozynowych mogą znacząco przyczyniać się do powstawania mechanizmów leżących u podłoża nefropatii cukrzycowej. Dane zawarte w piśmiennictwie wskazują, że adenozyne poprzez receptory A1 wpływa na obkurczanie naczyń doprowadzających krew do kłębka nerkowego, wydzielanie reniny, nerkową gospodarkę sodem, działanie wazopresyny, oraz mechanizm zwrotnego sprzężenia kanalikowo-kłębkowego [82, 327, 334]. Poprzednie badania nad ekspresją receptora A1 w nerce szczura pokazały, że poziom mRNA w komórkach kanalików nerkowych wraz z przesuwaniem się w kierunku rdzenia wyraźnie wzrasta [362, 375]. Wyniki badań przedstawione w tej pracy pokazują, że w nerce cukrzycowej korowo-rdzeniowy gradient ekspresji receptora A1 pozostaje zachowany pomimo znaczących zmian w poziomie ekspresji tego receptora. Stwierdzony w moich doświadczeniach wzrost poziomu ekspresji receptora A1 w rdzeniu nerki cukrzycowej, a zwłaszcza w kanaliku zbiorczym koreluje z obserwowanymi w cukrzycy zmianami reabsorpcji kanalikowej sodu [121, 166]. Zarówno dane eksperymentalne jak i kliniczne pokazują, że początkowe etapy cukrzycy związane są ze wzrostem całkowitego ładunku reabsorbowanego sodu w części proksymalnej kanalika nerkowego któremu towarzyszy spadek frakcyjnej reabsorpcji, co pociąga za sobą wzrost wydalania sodu z moczem [121, 166]. Ostatnie badania prowadzone na szczurach z cukrzycą indukowaną podaniem STZ wskazują, że ilość

transportera Na^+ - fosforan typu 2, transportera Na-K-2Cl, transportera chlorkowo-sodowego wrażliwego na tiazyd, transportera Na-HCOO₃ oraz podjednostki 1 Na-K-ATPazy jest niezmieniona w nerce cukrzycowej w porównaniu do nerki normalnej [236]. Z drugiej strony wiadomo, że stymulacja receptora A1 powoduje spadek potencjału transkanalikowego grubej części wstępującej pętli Henlego [2], redukuje reabsorpcję sodu i chlorków w pętli Henlego [22, 317] oraz obniża reabsorpcję sodu w kanalik zbiorczym rdzenia wewnętrznego nerki [82]. Biorąc pod uwagę powyższe dane można przypuszczać, że zmiany reabsorpcji i wydalania sodu zachodzące w cukrzycy mogą być wynikiem wzrostu poziomu ekspresji receptora A1 w kanalikach rdzeniowych nerki cukrzycowej. Inną cechą charakterystyczną nerki cukrzycowej jest upośledzona zdolność do zagęszczania moczu pomimo podwyższonego poziomu wazopresyny [2]. Pacjenci chorujący na cukrzycę charakteryzują się odwracalną opornością na wazopresynę argininową (AVP) [213]. Wyniki doświadczeń prowadzonych na szczurach wskazują, że gęstość oraz wrażliwość na AVP w nerce cukrzycowej nie ulega zmianie [351]. Z drugiej strony, aktywacja receptora A1 prowadzi do upośledzenia zagęszczania moczu indukowanego przez AVP [213]. Stąd też można przypuszczać, że oporność na AVP nerki cukrzycowej może być związana ze wzrostem gęstości receptora adenozyнового A1, który obserwowaliśmy w kanalik zbiorczym nerkii zolowanej ze szczura z cukrzycą. W dywagacjach nad możliwymi skutkami zmian w poziomie ekspresji receptorów adenozyновых na funkcje nerki cukrzycowej nie można zapomnieć o źródłach adenozyны w nerce. W nerce zachodzi szereg przemian, w wyniku których może dojść do zmian stężenia adenozyны w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Komórki poszczególnych odcinków nefronu wyposażone są w enzymy katalizujące reakcje których produktem końcowym jest adenozyна (Ryc. 1). Prace prowadzone w naszym Zakładzie pokazały, że aktywność kinazy adenozyны, która jest uważana za kluczowy element kontrolujący poziom adenozyны w komórce, jest znacząco obniżona w nerce cukrzycowej [266]. Może to sugerować, że cykl przemian adenozyны-AMP jest upośledzony w cukrzycy, co z kolei może prowadzić do wzrostu stężenia adenozyны w komórce z następującym jej wypływem. Przypuszczenie to wspierają obserwacje wskazujące istotnie podwyższony poziom adenozyны we krwi żyły nerkowej z towarzyszącym brakiem zmian stężenia adenozyны we krwi tętnicy nerkowej szczura cukrzycowego [7]. Potencjalnym źródłem adenozyны w nerce jest również cAMP, którego produkcja zmienia się w poszczególnych obszarach tego narządu w odpowiedzi

na stymulację przez szereg czynników [146]. Ponadto, zwiększone wydalanie cAMP z moczem obserwowano u szczurów z cukrzycą indukowaną podaniem STZ [274]. Doświadczenia prowadzone na komórkach izolowanych z kanalika zbiorczego pokazały, że stymulacja cykazy adenylanowej prowadzi do wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, który jest szybko przemieniany do AMP i adenozyiny [148]. W naszych doświadczeniach wykazaliśmy, że aktywność ekto-5'-nukleotyduzy wzrasta 4,5-krotnie w błonach izolowanych z rdzenia nerki cukrzycowej [268]. Dane te wskazują, że zewnątrzkomórkowy potencjał defosforylacyjny AMP w nerce cukrzycowej wzrasta znacząco. Hiperfiltracja jest wczesnym objawem rozwijającej się cukrzycy prowadzącym w perspektywie do rozwoju nefropatii cukrzycowej. Zmiany w hemodynamice nerki cukrzycowej przyporządkowuje się zmianom zachodzącym w naczyniach nerkowych i unaczynieniu kłębuszka nerkowego. Uważa się, że za rozszerzenie naczyń doprowadzających oraz obkurczenie naczyń odprowadzających kłębka, które to zjawiska przyczyniają się do zaistnienia hiperfiltracji cukrzycowej, odpowiada szereg czynników takich jak zmiany w obrębie kanałów potasowych i wapniowych, brak działania insuliny, podwyższony poziom peptydu natiuretycznego oraz lokalny wzrost produkcji angiotensyny [10]. Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na hemodynamikę nerki jest adenozyina, o której już od lat 20-tych ubiegłego wieku wiadomo, że ogranicza przepływ krwi i moczu przez nerki [76]. Późniejsze badania pokazały, że działanie adenozyiny na nerkę jest dwufazowe. W pierwszym etapie adenozyina działa obkurczająco, który to efekt jest mediowany przez receptory A1, a następnie uwidacznia się relaksacyjny efekt mediowany przez receptory A2a [246]. Wyniki prezentowanej tej pracy pokazują, że w cukrzycy dochodzi do wzrostu ekspresji receptora A2a w korze nerki. Analiza immunohistochemiczna skrawków nerek pokazała, że poziom białka receptora A2a jest znacząco podwyższony w kłębkach i naczyniach przedkłębkowych, podczas gdy w naczyniach odprowadzających krew z kłębka obserwowano tylko niewielki wzrost ilości receptora A2a (Ryc. 23). Zmianom tym towarzyszył brak wyraźnych różnic w ilości receptora A1 w naczyniach nerkowych. Tego typu zmiany w ekspresji receptorów adenozynowych w obrębie naczyń nerki cukrzycowej korespondują dobrze z danymi uzyskanymi z doświadczeń mikrodializacyjnych wykazujących spadek oporności przepływowej naczyń przedkłębkowych w nerce cukrzycowej [311] oraz badań videometrycznych średnic naczyń nerkowych dokumentujących zwiększoną średnicę naczyń doprowadzających

w nerkach cukrzycowych [41]. Z drugiej strony, jeżeli przyjąć poziom obserwowanego białka receptorowego za wyznacznik potencjalnych zmian funkcjonalnych, to brak różnic w poziomie ekspresji receptora A1 w naczyniach nerki cukrzycowej i normalnej stoi w niejkiej sprzeczności z wynikami doświadczeń pokazujących wzrost wrażliwości nerki cukrzycowej na obkurczające działanie adenozyliny [276]. Przypuszczam, że tego typu odpowiedź nerki cukrzycowej może być również spowodowana stymulacją receptora A3, która prowadzi do obniżenia cAMP w komórce. W moich doświadczeniach obserwowałam wzrost ilości receptora A3 w błonach plazmatycznych izolowanych z kory nerki cukrzycowej. Dane zawarte w piśmiennictwie wskazują, że stymulacja receptora A3 w komórkach mięśni gładkich prowadzi do obniżenia poziomu cAMP [385]. Ponadto dane uzyskane z doświadczeń prowadzonych na myszach z “wybitym” genem dla receptora A3 pokazują, że wpływ adenozyliny na poziom cAMP zależy silnie od poziomu ekspresji receptora A3 [387]. W chwili obecnej jest bardzo trudno oszacować wpływ zmian w dystrybucji receptora A3 na funkcję nerki ponieważ jego rola w tym narządzie pozostaje niewyjaśniona. Nadmierna kurczliwość naczyń w odpowiedzi na podany kontrast jest głównym powikłaniem badań radiologicznych prowadzonych u pacjentów z niewydolnością nerek. Na przedłużony spadek przepływu krwi przez nerki w szczególności narażeni są pacjenci chorujący na cukrzycę, u których często dochodzi do ostrej niewydolności nerek [301]. Doświadczenia prowadzone na zwierzętach oraz badania kliniczne pokazały, że podanie antagonisty receptora A1 przywraca przepływ krwi przez nerki i chroni przed ostrą niewydolnością nerek wywołaną podaniem związków kontrastowych [278]. W ostatnich latach wykazano, że w indukcji niewydolności nerek wywołanej spadkiem przepływu krwi bierze również udział receptor A3 [180]. W tych badaniach pokazano, że podanie antagonisty receptora A3 przed wystąpieniem ischemii jest w stanie zabezpieczyć funkcje nerki, podczas gdy podanie agonisty receptora A3 pogarsza uszkodzenia wywołane ischemią. Ponadto negatywny skutek stymulacji receptora A3 na funkcję nerki jest obserwowany tylko w warunkach reperfuzji, podczas gdy w stanie normalnym stymulacja bądź blokowanie receptora A3 nie wpływa na funkcjonowanie tego narządu. Wyniki te zostały ostatnio potwierdzone w pracach na myszach z nieaktywnym genem receptora A3, u których spadek przepływu krwi przez nerki nie wywoływał ostrej niewydolności nerek [181]. We wczesnych stadiach rozwoju cukrzycy zarówno u ludzi jak i w doświadczeniach na zwierzętach obserwuje się zmianę nerkowego transportu nieorganicznego fosforanu, co

proceeds to the loss of phosphorus with urine [69, 148]. In the kidney, most phosphorus undergoes reabsorption in the proximal tubule, but the final regulation of phosphorus excretion with urine occurs in the collecting duct [5]. Results of experiments presented in this work show that in the kidney, the level of the A2a receptor protein increases significantly in the cortical and medullary collecting duct cells, suggesting an increased potential for cAMP production in response to adenosine stimulation. At the cellular level, an increase in cAMP stimulates protein kinase A, which triggers a phosphorylation cascade and leads to the inhibition of phosphorus transport [162]. On the other hand, it should be remembered that the lack of insulin, which inhibits cAMP accumulation in the cell and the glucose-induced increase in cAMP, can be a cause of transport disorders. However, the increasing cAMP level caused by insulin deficiency and hyperglycemia can be an intracellular source of adenosine [147]. As we can see, diabetes in the kidney induces region-specific changes in the expression of adenosine receptors, which can be one of the mechanisms leading to kidney dysfunction. A characteristic feature of diabetes and a cause of a series of serious diabetic complications is hyperglycemia. An increase in glucose concentration, which we deal with in diabetes, results from two main causes, i.e., impaired glucose uptake by tissues and increased synthesis and release of glucose by the liver [29, 152]. The main processes in the liver that result in glucose production are gluconeogenesis and glycogenolysis. Studies conducted on isolated hepatocytes and liver sections indicate that both processes are regulated by adenosine. The first publications on this topic appeared almost 30 years ago in the mid-1970s of the last century [44, 123, 198]. Data from that time indicate that adenosine, acting through its receptors localized in the membranes of liver cells, stimulates glycogen breakdown and glucose synthesis [19, 38, 138, 381]. In the liver, the presence of mRNA for all four types of adenosine receptors was demonstrated at the time [70, 307]. Results of my experiments indicate that the expression of adenosine receptors in the liver of a diabetic mouse undergoes significant changes, with the exception of the A1 receptor, whose mRNA level and protein level did not change in diabetic conditions. As of now, the role of individual adenosine receptors in the liver is relatively poorly understood. The adenosine receptor in the liver that has been studied most thoroughly is the A1 receptor, of which it is known that its activation leads to glycogen breakdown

i wzrostu syntezy mocznika [36, 108, 115, 287]. Brak zmian w ilości receptora A1 w wątrobie szczura cukrzycowego mógłby sugerować, że wpływ adenozyiny na proces glikogenolizy w komórkach wątroby cukrzycowej jest podobny do tego obserwowanego w warunkach normalnych. Jednak w cukrzycy ilość adenozyiny w wątrobie szczura wzrasta [267, 304] co może prowadzić do zwiększonej aktywacji receptora A1. Ponadto jak wykazały prace prowadzone w naszym Zakładzie ekspresja transporterów nukleozydowych w wątrobie cukrzycowej ulega obniżeniu [267], co może prowadzić do upośledzenia wychwytu adenozyiny powstającej w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wyniki doświadczeń prezentowane w tej pracy pokazują, że w wątrobie cukrzycowej ma miejsce znaczący wzrost ekspresji receptora A2a i A3. Znaczenie tego zjawiska dla metabolizmu wątroby cukrzycowej jest trudne do oszacowania z uwagi na słabo poznaną rolę obydwu receptorów w wątrobie. Ostatnio opublikowane dane wskazują, że stymulacja receptora A2a prowadzi do wzrostu glukoneogenezy w izolowanych hepatocytach szczura [108]. Autorzy tej pracy pokazują, że zdolność do stymulacji glikogenolizy dla specyficznych agonistów poszczególnych receptorów adenozyinowych maleje w porządku $A1 > A2a > A3$, natomiast zdolność do stymulacji glukoneogenezy układu się $A2a > A1 > A3$. Na podstawie tych danych można wnioskować, że w wątrobie adenozyina stymuluje proces glikogenolizy działając głównie poprzez receptor A1, a proces glukoneogenezy poprzez receptor A2a. Wyniki moich doświadczeń pokazują, że w cukrzycy w wątrobie poziom mRNA dla receptora A2b ulegał obniżeniu czemu nie towarzyszyła zmiana ogólnej ilości białka A2b (homogenat) przy jednoczesnym obniżeniu poziomu tego białka receptorowego w błonach plazmatycznych. Brak korelacji między zmianą mRNA receptora A2b a ilością jego białka może wskazywać, że w warunkach cukrzycowych dochodzi do obniżenia szybkości biosyntezy białka A2b w taki sposób, że pomimo wzrostu ilości matrycy ilość końcowego produktu translacji pozostaje nie zmieniona. Możliwe jest również, że wzrost ilości transkryptu genu *ADORA2B* prowadzi do powstania większej ilości białka A2b-AR lecz o zmniejszonym czasie półtrwania, co w efekcie może również skutkować brakiem zmian ilości białka A2b-AR. Dla rozstrzygnięcia, który z tych mechanizmów ma miejsce w wątrobie szczura cukrzycowego niezbędne są jednak dalsze badania. Z uwagi na brak specyficznych agonistów i antagonistów receptora A2b niewiele wiadomo o roli tego receptora w komórce. Dotychczasowe badania nad tym receptorem polegają na stosowaniu szeregu związków o różnym powinowactwie do pozostałych receptorów adenozyinowych, a

wnioski możliwe do wysunięcia opierają się na analizie porównawczej uwzględniającej różnice specyficzności użytych agonistów i antagonistów. Dodatkowym problemem w badaniach nad receptorami adenozyiny jest stosunkowo duża zmienność gatunkowa pierwszorzędowej struktury receptora A2b i pozostałych receptorów adenozyiny (za wyjątkiem receptora A1) co wpływa na specyficzność danego związku w poszczególnych modelach doświadczalnych [89, 95, 373]. Ostatnio opublikowane wyniki doświadczeń prowadzonych na izolowanych szczurzych hepatocytach sugerują, że aktywacja receptora A2b prowadzi do wzrostu glikogenolizy oraz glukoneogenezy [377]. Autorzy tej pracy sformułowali swoje wnioski na podstawie różnic w odpowiedzi na zmieniające się stężenia szeregu niespecyficznych agonistów receptorów adenozyinowych. Jednak wyniki te należy traktować ostrożnie mając na uwadze powyżej przedstawione problemy. Mimo niejasnej roli poszczególnych typów receptorów adenozyinowych w wątrobie obserwowane w mojej pracy zmiany poziomu ekspresji receptorów adenozyinowych w wątrobie cukrzycowej mogą w pewnym stopniu przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów prowadzących do wzrostu wydzielania glukozy przez wątrobę w cukrzycy. Rozwój cukrzycy prowadzi do szeregu powikłań wśród których obok cukrzycowej nefropatii istotnym zagrożeniem dla życia jest upośledzenie funkcji układu sercowo-naczyniowego. Dane zebrane podczas długoletnich obserwacji pacjentów chorujących na cukrzycę wskazują, że ryzyko wystąpienia zastoinowej niewydolności serca jest u nich znacznie podwyższone [151, 237]. Wiele danych eksperymentalnych jak i obserwacje kliniczne wskazują, że w sercu cukrzycowym zachodzą istotne zmiany strukturalne, funkcjonalne oraz biochemiczne [130]. Funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego reguluje szereg czynników w tym adenozyina, która działając poprzez swoje receptory wpływa na przemiany biochemiczne komórek serca i naczyń oraz ich mechanikę [225, 300]. Doświadczenia prowadzone na zwierzętach wskazują, że w cukrzycy poza szeregiem innych zmian dochodzi do wzrostu poziomu adenozyiny w sercu [149, 267].

Jednym z elementów determinujących działanie adenozyiny na komórkę są receptory adenozyinowe. Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy dokumentują obecność wszystkich czterech typów receptora adenozyinowego w sercu. Jest to zgodne z wcześniejszymi danymi, chociaż jeżeli chodzi o kardiomiocyty to większość danych pochodzi z badań na hodowlach komórek izolowanych z embrionów [13, 216]. W swojej pracy prezentuję dowody, które dokumentują istnienie tych receptorów w

komórkach dojrzałych. Dotychczasowe dowody wskazujące na występowanie receptora A2b i A3 w kardiomiocytach pochodzą z badań farmakologicznych [132]. W piśmiennictwie co prawda można znaleźć dane wskazujące na obecność mRNA dla receptora A3 w sercu jednak bezpośrednich dowodów potwierdzających ekspresję tego receptora w kardiomiocytach jak dotąd brakuje [365, 383]. Badania na myszach z “wybitym” genem dla receptora A2a pośrednio wskazują na obecność receptora A2b w naczyniach wieńcowych [224, 251]. Przypuszczam, że w swoich doświadczeniach po raz pierwszy nie tylko wykazałam obecność w kardiomiocytach mRNA dla receptora A2b i A3, ale również udokumentowałam obecność białek tych receptorów. Ponadto prezentowane w tej pracy wyniki pokazują zmiany w ekspresji receptorów adenozynowych jakie zachodzą w sercu szczura z cukrzycą. Niektóre z tych zmian korelują z cechami charakterystycznymi dla cukrzycowej kardiomiopatii. Tradycyjnie receptor A1 uważany jest jako kluczowy element niezbędny dla kardioprotekcyjnego działania adenozy. Stymulacja receptora A1 w sercu prowadzi do zahamowania produkcji cAMP i powoduje otwarcie kanałów potasowych, przeciwdziała otwarciu kanałów wapniowych typu L [320] oraz przeciwdziała β -adrenergicznej stymulacji [72]. Związanie adenozy z receptorem A1 wpływa również stymulująco na tlenową glikolizę zwiększając efektywność zużycia glukozy przez mięsień sercowy [368]. Na podstawie danych zawartych w piśmiennictwie można powiedzieć ogólnie, że stymulacja receptora A1 prowadzi w sercu do redukcji pracy serca i obniżenia zużycia tlenu. Szereg danych eksperymentalnych oraz obserwacji klinicznych potwierdza niezwykle istotną rolę receptora A1 w mediowaniu antyischemicznego działania adenozy [132]. W swoich doświadczeniach nie obserwowałam znaczących zmian w poziomie mRNA dla receptora A1 w sercu cukrzycowym oraz izolowanych kardiomiocytach. Jednak ilość białka receptora A1 w kardiomiocytach izolowanych z serca szczura cukrzycowego była znacząco podwyższona. Może to wskazywać, że szybkość procesu translacji mRNA dla A1-AR wzrosła, bądź wydłużył się okres półtrwania tego białka. Z uwagi na ważną funkcję receptora A1 dla kardioprotekcyjnego działania adenozy w stanach niedotlenienia mięśnia sercowego oraz reperfuzji można przypuszczać, że wzrost jego ilości powinien być korzystny dla kardiomiocytów w cukrzycy. Przypuszczenia te potwierdzają badania na ludzkich kardiomiocytach, które stają się bardziej odporne na uszkodzenia wywołane niedotlenieniem w sytuacji kiedy wprowadzi się do nich dodatkowy gen dla receptora A1, co skutkuje zwiększoną ekspresją tego receptora [74]. Z kolei dane epidemiologiczne wskazują, że pacjenci

chorujący na cukrzycę są bardziej narażeni na zawał serca, a pozawałowe komplikacje są u nich znacznie poważniejsze niż u zdrowych osób [237, 242]. Jeżeli przyjąć, że zmiany ekspresji receptorów adenozynowych w sercu ludzi chorych na cukrzycę zachodzą w ten sam sposób jak u szczura, to można przypuszczać, że w cukrzycy dochodzi do wzrostu ilości niefunkcjonalnego receptora A1, bądź co jest bardzo prawdopodobne, mamy do czynienia z obniżeniem poziomu adenozyiny. Prace prowadzone w naszym Zakładzie pokazały, że w cukrzycy dochodzi do zmian ekspresji transporterów nukleozydowych co pociąga za sobą zmiany w transporcie adenozyiny [267, 303, 304]. Wyniki tych badań wskazują, że serce jest jedynym narządem wśród przebadanych narządów szczura (nerka, wątroba, serce), w którym, w cukrzycy dochodzi do bardzo dużego wzrostu ekspresji Na^+ -zależnych transporterów nukleozydowych [267]. Transportery te przemieszczają nukleozyd tylko w jednym kierunku tj. do komórki w związku z tym wzrost ich ilości może powodować zwiększony wychwyty adenozyiny i prowadzić do obniżenia jej stężenia w przestrzeni pozakomórkowej. Ponadto w sercu jak i w innych narządach szczura w cukrzycy dochodzi do spadku ekspresji transporterów nukleozydowych Na^+ -niezależnych, które przemieszczają nukleozyd w obu kierunkach zgodnie z gradientem stężeń. Dlatego w cukrzycy może dochodzić do zmniejszenia szybkości uwalniania adenozyiny generowanej w komórkach serca.

Kolejnym czynnikiem który wskazuje, że w sercu cukrzycowym poziom adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej może być niższy są zmiany aktywności enzymów metabolizujących adenozyinę. Jednym z kluczowych enzymów utrzymującym stężenie adenozyiny na stałym niskim poziomie w komórce jest kinaza adenozyiny (AK). We wcześniejszych pracach prowadzonych w naszym Zakładzie pomiar aktywności tego enzymu w homogenatach całego serca wykazywał 35% spadek aktywności AK w cukrzycy [266]. Obecnie prowadzone doświadczenia przez mgr Marzenę Podgóorską na izolowanych kardiomiocytach wykazały, że aktywność AK w cukrzycy nie ulega zmianie. Różnica między wcześniejszymi pomiarami, a obecnymi może wynikać z przyczyn technicznych. W poprzednich doświadczeniach aktywność enzymu była mierzona w ekstraktach wykonanych z serca pobranego na badanie poziomu mRNA, a więc przy użyciu szczypiec zamrożonych w ciekłym azocie bezpośrednio od uśpionego zwierzęcia. Taki sposób pobrania wyklucza odpłukanie narządu z krwi, a w limfocytach aktywność AK w cukrzycy spada ponad 70% [267]. Ponadto doświadczenia mgr

Podgórskiej wykazały, że aktywność AK spada również w kardiofibroblastach izolowanych z serca szczura cukrzycowego, chociaż jest to niewielki spadek aktywności ~15%. Powyżej przytoczone fakty wskazują, że w sercu w cukrzycy dochodzi do zmian w transporcie adenozyiny, które mogą prowadzić do obniżenia stężenia tego nukleozydu w przestrzeni pozakomórkowej przy jednoczesnym zachowaniu zdolności kardiomiocytów do efektywnej przemiany adenozyiny do AMP. Tego typu zmiany mogą prowadzić do upośledzenia zdolności serca cukrzycowego do hartowania przez krótkotrwałe niedotlenienie (ang. preconditioning) i w konsekwencji prowadzić do większych powikłań pozawałowych. Wyniki doświadczeń prowadzonych na zwierzętach zdają się potwierdzać te przypuszczenia, gdyż pokazują brak zdolności serca cukrzycowego do warunkowania przez niedokrwienie [190, 345]. Wyniki moich doświadczeń wskazują, że poziom mRNA dla receptora A2a w kardiomiocytach izolowanych z serca szczura cukrzycowego był wyraźnie obniżony, czemu towarzyszył spadek ilości białka tego receptora chociaż nie był on znamieny statystycznie. Porównując ilości białka receptora A1 i A2a w kardiomiocytach widzimy, że stosunek A1-AR/A2a-AR wyraźnie wzrasta w cukrzycy. W sytuacji, kiedy oba typy receptora adenozyinowego znajdują się na tej samej komórce i ich powinowactwo do adenozyiny jest podobne [93], a ponadto aktywacja receptora A2a przeciwdziała zmianom wywołanym aktywacją receptora A1 [240] zmiana w stosunku ich ilości może mieć poważne konsekwencje fizjologiczne. Wyniki badań prowadzonych na zwierzętach wskazują, że aktywacja receptora A2a zabezpiecza serce przed uszkodzeniami powstałymi podczas reperfuzji, prawdopodobnie poprzez modulację napięcia mięśniówki gładkiej naczyń [39, 197, 384]. Niedawno wykazano, że stymulacja receptora A2a poprzez modulację poziomu ekspresji antyapoptycznego białka Bcl2 oraz proapoptycznego białka Bax prowadzi do zahamowania apoptozy [388]. Jednak dokładna rola receptora A2a w kardiomiocytach nie jest obecnie znana. Można przypuszczać, że wzrost stosunku A1-AR/A2a-AR może wpłynąć na fizjologiczną równowagę pomiędzy pro- i antyadrenergicznym działaniem adenozyiny, co może mieć znaczące konsekwencje dla niewydolnego serca.

Wyniki doświadczeń prezentowane w tej pracy dokumentują wyraźny wzrost ekspresji receptora A3 w sercu cukrzycowym jak i w kardiomiocytach izolowanych z serca cukrzycowego. Większość prac prowadzonych na zwierzętach z użyciem specyficznych agonistów i antagonistów wskazuje na istotną rolę receptora A3 dla mięśnia sercowego

w okresie po niedotlenieniu [132]. Jednak jak już wcześniej wspominałam z uwagi na dużą zmienność gatunkową sekwencji receptora A3 [136] specyficzność poszczególnych agonistów i antagonistów receptora A3 różni się znacząco w poszczególnych modelach doświadczalnych [189]. Związek, który u jednego zwierzęcia oddziałuje specyficznie z receptorem A3, u innego może wiązać się do receptora A1. Potwierdzają to badania prowadzone na szczurach i królikach, które pokazują, że blokada receptora A1 (co do którego nie obserwuje się zmienności gatunkowej, a więc związek który jest antagonistą w jednym układzie doświadczalnym zachowuje się podobnie niezależnie od gatunku zwierzęcia) prowadzi do zniesienia kardioprotekcyjnego efektu agonisty receptora A3 [155]. Negatywny wpływ stymulacji receptora A3 na komórkę dokumentują prace, w których nadekspresja receptora A3 lub jego aktywacja prowadzi do apoptozy szeregu rodzajów komórek z kardiomiocytami włącznie [321, 389], zjawiska obserwowanego w sercu cukrzycowym [96, 191]. Szkodliwe działanie adenozyiny mediowane przez receptor A3 potwierdzają również wyniki doświadczeń prowadzonych na myszkach pozbawionych w wyniku genetycznych manipulacji aktywnego genu receptora A3, u których zakres uszkodzeń tkanki po niedotlenieniu jest znacznie ograniczony [116, 124]. Można zatem wnioskować, że obserwowany przeze mnie wzrost poziomu białka receptora A3 w miokardium cukrzycowym jest zjawiskiem niekorzystnie wpływającym na serce w cukrzycy. Tkanka serca zbudowana jest z dwóch głównych rodzajów komórek tj. kardiomiocytów i kardiofibroblastów. Pod względem masy kardiomiocyty stanowią około 75% masy serca, lecz tylko 25% ogólnej liczby komórek [379]. Najliczniejszą populację komórek w sercu stanowią kardiofibroblasty, które wypełniają każdą przestrzeń między kardiomiocytami stanowiąc niejako wypełnienie w którym poszczególne warstwy kardiomiocytów są zanurzone [38]. Jedną z głównych przyczyn niewydolności serca w cukrzycy jest kardiomiopatia charakteryzująca się hipertrofią kardiomiocytów i fibrozą [86]. Fibroza jest stanem w którym dochodzi do zwiększonej proliferacji kardiofibroblastów i nieproporcjonalnie dużej syntezy białek matriks zewnątrzkomórkowego głównie kolagenu co prowadzi do zwiększenia masy serca i sztywności komór [337]. Zwiększona ilość białek matriks zewnątrzkomórkowego upośledza kurczliwość i relaksację mięśnia sercowego, a także, poprzez separację kardiomiocytów powoduje ich rozprężenie elektryczne [205]. Szereg danych uzyskanych w doświadczeniach na hodowlach komórkowych wskazuje, że adenozyina hamuje proliferację kardiofibroblastów oraz produkcję białek matriks

zewnątrzkomórkowego [360]. Pewne obserwacje kliniczne wskazują, że również w warunkach *in vivo* adenozyne może odgrywać istotną rolę w hamowaniu przebudowy serca. Obserwacje poczynione u pacjentów z mutacją genu deaminazy AMP-1 wskazują, że obniżenie aktywności tego enzymu co jak sugerują autorzy pracy może skutkować podwyższeniem poziomu adenozyne prowadzi do zwiększonego przeżycia pacjentów cierpiących na niewydolność sercową [192]. Wyniki moich doświadczeń prowadzonych na hodowli pierwotnej kardiofibroblastów pokazały, że w warunkach cukrzycopodobnych tj. przy wysokim stężeniu glukozy (20 mM) i braku insuliny dochodzi do zmian ekspresji wszystkich czterech typów receptora adenozyne. Ocena znaczenia tych zmian dla funkcji kardiofibroblasta jest trudna do przeprowadzenia z uwagi na brak danych na temat roli poszczególnych receptorów adenozyne w kardiofibroblacie. Jak dotąd jedynym receptorem adenozyne o którym wiadomo, że wpływa na tą komórkę jest receptor A2b. Wykazano, że stymulacja receptora A2b hamuje biosyntezę białek matriks zewnątrzkomórkowego oraz proliferację kardiomiocytów [48, 79, 80]. Ostatnio prace prowadzone na hodowli kardiofibroblastów szczura zdają się wskazywać na brak zdolności receptora A1 oraz A3 do modulacji poziomu cAMP w kardiofibroblastach [48]. Obserwowany w moich doświadczeniach wzrost ilości białka receptora A2b w kardiofibroblastach hodowanych w warunkach cukrzycopodobnych wskazuje, że hamujący wpływ adenozyne na funkcje kardiofibroblastów w cukrzycy powinien wzrastać, oczywiście gdyby nie dochodziło do zaburzeń w transporcie adenozyne. Wyniki prac prowadzonych w naszym Zakładzie pokazują, że poziom adenozyne w sercu szczura cukrzycowego wzrasta ponad trzykrotnie [267, 304]. Jednak badania transportu adenozyne przez komórki serca wskazują, że jest to głównie adenozyne wewnątrzkomórkowa. Doświadczenia prowadzone przez mgr Podgórską pokazują, że w kardiofibroblastach hodowanych w obecności wysokich stężeń glukozy i braku insuliny dochodzi do bardzo dużego spadku (~80%) ekspresji transporterów nukleozydowych przemieszczających adenozyne zgodnie z gradientem stężeń. Natomiast poziom ekspresji transporterów Na⁺-zależnych wrasta ponad dwukrotnie [Marzena Podgórska]. Pomiar transportu adenozyne w tych komórkach wykazał znaczący wzrost wychwytu adenozyne przez te komórki w stosunku do komórek hodowanych w obecności insuliny i 5 mM glukozy. Na podstawie powyższych danych i pamiętając o wszelkich ograniczeniach wynikających z porównywania wyników uzyskiwanych w różnych systemach doświadczalnych można przypuszczać, że stężenie adenozyne w przestrzeni pozakomórkowej serca

cukrzycowego jest niższe i/lub zmiany tego stężenia generowane przez różne czynniki również mogą mieć znacznie bardziej ograniczony charakter niż w sercu normalnym.

Prowadzone przeze mnie badania pokazały, że ekspresja receptorów adenozytowych jest w sposób zróżnicowany regulowana przez zmiany stężenia insuliny oraz glukozy. Okazało się, że poziom mRNA receptora A2a i A3 zależy od zmian stężenia glukozy natomiast insulina nie wpływa na ekspresję tych receptorów. Z kolei ekspresja receptora A2b zależy tylko od insuliny, natomiast na poziom ekspresji receptora A1 wpływa zarówno insulina jak i zmiany stężenia glukozy. Dane zawarte w piśmiennictwie wskazują, że wyniki moich doświadczeń po raz pierwszy dokumentują zmiany ekspresji receptorów adenozyminy pod wpływem zmieniających się stężeń glukozy i insuliny. Badania prowadzone w naszym Zakładzie oraz dane zawarte w piśmiennictwie wskazują, że również poziom ekspresji transporterów nukleozydowych jest regulowany przez glukozę oraz insulinę. W hodowanych komórkach mięśni gładkich ludzkiej aorty wzrost stężenia glukozy po 48 godzinach indukował wzrost ekspresji transportera typu ENT1 co pociągało za sobą wzrost transportu adenozyminy do tych komórek [183]. Z kolei w ludzkich komórkach endotelialnych z żyły pępkowej wzrastające stężenie glukozy prowadzi do obniżenia ekspresji transportera ENT1 i spadku transportu adenozyminy [265]. Prace prowadzone na limfocytach T i B pokazały, że ekspresja transportera ENT1 jest hamowana przez wzrastające stężenie glukozy, natomiast poziom ekspresji transporterów ENT2 i CNT2 zależy od insuliny [303, 304]. Czas niezbędny na wystąpienie tych zmian jest różnorodny, ale generalnie maksymalny efekt insuliny obserwowany jest po 7 godz, natomiast maksymalne zmiany indukowane wysokimi stężeniami glukozy zachodzą po 48 godz. Ta różnorodność w dynamice zmian generowanych przez insulinę i glukozę może mieć istotne znaczenie dla chorych na cukrzycę przyjmujących insulinę i może tłumaczyć niektóre patologie obserwowane w cukrzycy zwłaszcza u chorych z niewyrównaną glikemią. W podsumowaniu należy zaznaczyć, że prezentowane w tej pracy wyniki wskazują, że w cukrzycy dochodzi do tkankowo i narządowo specyficznych zmian w poziomie ekspresji poszczególnych subtypów receptorów adenozyminy. Niektóre z tych zmian wywołane są hiperglikemią podczas gdy inne powodowane są brakiem insuliny. Przedstawione wyniki są pierwszym etapem badań nad receptorami adenozyminy w cukrzycy i stanowią punkt wyjścia do dalszych prac nad

funkcjonowaniem systemów przekąźnictwa komórkowego w warunkach zmieniających się stężeń glukozy i insuliny.

8. WNIOSKI

1. U szczura w cukrzycy dochodzi do tkankowo i narządowo - specyficznych zmian ekspresji receptorów adenozynowych.
2. Cukrzyca w nerce szczura indukuje regiono - specyficzne zmiany ekspresji receptorów adenozynowych, co może stanowić jeden z mechanizmów prowadzących do nefropatii cukrzycowej.
3. Brak zmian ilości białka receptora A2b w wątrobie szczura cukrzycowego przy jednoczesnym obniżeniu ilości mRNA dla tego receptora może być wynikiem zmiany szybkości translacji lub/i zmiany okresu półtrwania tego białka.
4. Poziom ekspresji receptora adenozynowego A2a i A3 w kardiofibroblastach szczura regulowany jest zmianami stężenia glukozy.
5. Ekspresja receptora adenozynowego A2b w kardiofibroblastach szczura regulowana jest przez insulinę.
6. Ekspresja receptora adenozynowego A1 w kardiofibroblastach szczura regulowana jest zarówno przez insulinę jak i zmiany stężenia glukozy.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Abbracchio M.P., Brambilla R., Ceruti S., Kim H.O., von Lubitz D.K., Jacobson K.A., Cattabeni F.: G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 1995; 48: 1038-1045
2. Ahloulay M., Schmitt F., Dechaux M., Bankir L.: Vasopressin and urinary concentrating activity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 1999; 25: 213-222
3. Alessi D.R., Downes C.P.: The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1436: 151-164
4. Ali H., Cunha - Melo J.R., Saul W.F., Beaven M.A.: Activation of phospholipase C via adenosine receptors provides synergistic signals for secretion in antigen-stimulated RBL-2H3 cells. Evidence for a novel adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 745-753
5. Amiel C.: Sites of renal tubular reabsorption of phosphate. Renal handling of phosphate. Edited by Massry S.G., Fleisch H. New York, Plenum, 1980; pp 39-57
6. Angello D.A., Berne R.M., Coddington N.M.: Adenosine and insulin mediate glucose uptake in normoxic rat hearts by different mechanism. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: H880-H885
7. Angielski S., Jakubowski Z., Pawelczyk T., Piec G., Redlak M.: Renal handling and metabolism of adenosine in diabetic rats. *Contrib. Nephrol.* 1989; 73: 52-58
8. Angielski S., Jakubowski Z., Dominiczak M.H.: Diagnostyka cukrzycy. *Biochemia kliniczna.* Gdańsk, 1996: 96-215
9. Antonetti D.A., Algenstaedt P., Kahn C.R.: Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 2195-2203
10. Arima S., Sadayoshi I.: The mechanisms underlying altered vascular resistance of glomerular afferent and efferent arterioles in diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18: 966-969
11. Arslan G., Fredholm B.B.: Stimulatory and inhibitory effects of adenosine A(2A) receptors on nerve growth factor-induced phosphorylation of extracellular regulated kinases 1/2 in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 2000; 292(3): 183-186
12. Atkinson M.R., Townsend-Nicholson A., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Schofield P.R.: Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene. *Neurosci. Res.* 1997; 29(1): 73-79
13. Auchampach J.A., Bolli R.: Adenosine receptor subtypes in the heart: therapeutic opportunities and challenges. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1999; H1113-H1116

14. Baldwin S.A., Beal P.R., Yao S.Y.M., King A.E., Cass C.E., Young J.D.: The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.- Eur. J. Physiol.* 2004; 447: 735-743
15. Baldwin S.A., Yao S.Y.M., Hyde R.J., Ng A.M.L., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M.W.L., Cass C.E., Young J.D.: Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 15880-15887
16. Barber R., Butcher R.W.: The egress of cyclic AMP from metazoan cells. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 1983; 15: 119-138
17. Barbhuiya H., McClain R., Ijzerman A.P., Rivkees S.A.: Site-directed mutagenesis of the human A1 adenosine receptor: influences of acidic and hydroxy residues in the first four transmembrane domains on ligand binding. *Mol. Pharmacol.* 1996; 50(6): 1635-1642
18. Barrington W.W., Jacobson K.A., Stiles G.L.: Glycoprotein nature of the A2-adenosine receptor binding subunit. *Mol. Pharmacol.* 1990; 38: 177-183
19. Bartrons R., VanSchaftingen E., Hers H.G.: The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect. *Biochem. J.* 1984; 218(1): 157-163
20. Baumgold J., Cooperman B.B., White T.M.: Relationship between desensitization and sequestration of muscarinic cholinergic receptors in two neuronal cell lines. *Neuropharmacology* 1989; 28(11): 1253-1261
21. Baxter G.F.: Ischaemic preconditioning of myocardium. *Ann. Med.* 1997; 29: 345-352
22. Beach R.E., Good D.W.: Effect of adenosine on ion transport in rat medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: F482-F487
23. Beaumont V., Hepworth M.B., Luty J.S., Kelly E., Henderson G.: Somatostatin receptor desensitization in NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 33174-33183
24. Belke D.D., Larsen T.S., Gibbs E.M., Severson D.L.: Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 279: E1104-E1113
25. Berne R.M., Rubio R., Curnish R.R.: Release of adenosine from ischaemic brain: effect of cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral nucleotides. *Circ. Res.* 1974; 35: 262-271
26. Berne R.M.: The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res.* 1980; 47: 807-813

27. Beukers M.W., den Dulk H., van Tilburg E.W., Brouwer J., Ijzerman A.P.: Why are A_{2B} receptors low-affinity adenosine receptors? Mutation of Asn273 to Tyr increases affinity of human A_{2B} receptor for 2-(1-Hexynyl) adenosine. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58: 1349-1356
28. Bierhaus A., Chevion A., Chevion M., Hofmann M., Quehenberger P., Illmer T., Luther T., Berentshtein E., Tritschler H., Muller M., Wahl P., Ziegler R., Nawroth P.P.: Advanced glycation end product (AGEs) induced activation of NKκB is suppressed by α-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997; 46: 1481-1490
29. Bogardus C., Lillioja S., Howard B.V., Reaven G., Mott D.: Relationships between insulin secretion, insulin action, and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 1984; 74(4): 1238-1246
30. Bohm S.K., Grady E.F., Bunnet N.W.: Regulatory mechanism that modulate signalling by G-protein coupled receptors. *Biochem. J.* 1997; 322: 1-18
31. Bouma M.G., Stad R.K., van den Wildenberg F.A., Buurman W.A.: Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J. Immunol.* 1994; 153: 4159-4168
32. Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820
33. Budohoski L., Challiss R.A.J., McManus B., Newsholme E.A: Effects of analogues of adenosine and methyl xanthenes on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett.* 1984; 167: 1-4
34. Bullough D.A., Magill M.J., Firestein G.S., Mullane K.M.: Adenosine activates A₂ receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated cardiac myocytes. *J. Immunol.* 1995; 155: 2579-2586
35. Bünemann M., Hosey M.M.: G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J. Physiol.* 1999; 517: 5-23
36. Buxton D.B., Fisher R.A., Robertson S.M., Olson M.S.: Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction by adenosine and adenosine analogues in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 1987; 248(1): 35-41
37. Cain B.S., Meldrum D.R., Dinarello C.A., Meng X., Benerjee A., Harken A.H.: Adenosine reduces cardiac TNF-α production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion. *J. Surg. Res.* 1998; 76: 117-123
38. Camelliti P., Borg T.K., Kohl P.: Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65(1): 40-51
39. Cargnoni A., Ceconi C., Boraso A., Bernocchi P., Monopoli A., Curello S., Ferrari R.: Role of A_{2A} receptor in the modulation of myocardial reperfusion damage. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33: 883-893

40. Carman C.V., Benovic J.L.: G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998; 8(3): 335-344
41. Carmines P.K., Ohishi K., Ikenaga H.: Functional impairment of renal afferent arteriolar-gated calcium channels in rats with diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 2564-2571
42. Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A.: Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem. Cell Biol.* 1998; 76: 761-770
43. Cerami A., Vlassara H., Brownlee M.: Role of nonenzymatic glycosylation in atherogenesis. *J. Cell. Biochem.* 1986; 30(2): 111-20
44. Chagoya de Sanchez V., Briones R., Pina E.: Inhibition by adenosine of the cortisol-induced liver glycogen accumulation in adrenal ectomized rats. *Biochem. Pharmacol.* 1971; 20(10): 2535-2541
45. Chagoya de Sanchez V., Brunner A., Sanchez M.E., Lopez C., Pina E.: Utilization of adenosine as a tool in studies on the regulation of liver glycogen biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1974; 160(1): 145-150
46. Charonis A.S., Reger L.A., Dege J.E., Kouzi-Koliakos K., Furcht L.T., Wohlhueter R.M., Tsilibary E.C.: Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glucosylation. *Diabetes* 1998; 39: 807-814
47. Chen J., Simon R.: Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* 1997; 48: 306-311
48. Chen Y., Epperson S., Makhsudova L., Ito B., Suarez J., Dillmann W., Villarreal F.: Functional effects of enhancing or silencing adenosine A_{2b} receptors in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 287: 2478-2486
49. Cheng J.T., Chi T.C., Liu I.M.: Activation of adenosine A₁ receptors by drugs to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Aut. Neurosc. Bas. Clin.* 2000; 83: 127-133
50. Cheng J.T., Liu I.M., Chi T.C., Shinozuka K., Lu F.H., Wu T.J., Chang C.J.: Role of adenosine in insulin-stimulated release of leptin from isolated white adipocytes of Wistar rats. *Diabetes* 2000; 49: 20-24
51. Chern Y., Chiou J.Y., Lai H.L., Tsai M.S.: Regulation of adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A_{2a} adenosine receptor-mediated cyclic AMP response: role for protein phosphatase 2A. *Mol. Pharmacol.* 1995; 48: 1-8
52. Choi K.M., Zhong Y., Hoit B.D., Grupp I.L., Hahn H., Dilly K.W., Guatimosim S., Lederer W.J., Matlib M.A.: Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 283: H1308-H1408
53. Chomczyński P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159

54. Chu Y.Y., Tu K.H., Lee Y.C., Kuo Z.J., Lai H.L., Chern Y.: Characterization of the rat A_{2a} adenosine receptor gene. *DNA Cell Biol.* 1996; 15(4): 329-337
55. Ciruela F., Saura C., Canela E.I., Mallol J., Lluís C., Franco R.: Ligand-induced phosphorylation, clustering, and desensitization of A₁ adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* 1997; 52: 778-797
56. Clark S.F., Martin S., Carozzi A.J., Hill M.M., James D.E.: Intracellular localization of phosphatidylinositol 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: potential involvement of a membrane skeleton. *J. Cell. Biol.* 1998; 140: 1211-1225
57. Craven R.P., Philip S.L., Melhem M.F., Liachenko J., DeRubertis F.R.: Overexpression of Mn²⁺ superoxide dismutase suppresses increases in collagen accumulation induced by culture in mesangial cells in high media glucose. *Metabolism* 2001; 50(9): 1043-1048
58. Cronstein B.N., Daguma L., Nicholas D., Hutchinson A.J., Williams M.: The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A₁ and A₂ receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 1150-1157
59. Cushing D.J., Brown G.L., Sabouni M.H., Mustafa S.J.: Adenosine receptor-mediated coronary artery relaxation and cyclic nucleotide production. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1991; 261: 343-348
60. Czyżyk A.: *Patofizjologia i klinika cukrzycy*. PWN, Warszawa, 1997
61. Dash R., Frank K.F., Carr A.N., Moravec C.S., Kranias E.G.: Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ - handling in failing human heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2001; 33: 1345-1353
62. Degenhardt T.P., Thorpe S.R., Baynes J.W.: Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol.* 1998; 44: 1139-1145
63. De la Haba G., Cantoni G.L.: The enzymatic synthesis of S-adenosylhomocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 603-608
64. Deussen A., Brost M., Schrader J.: Formation of S-adenosylhomocysteine in the heart. An index of free intracellular adenosine. *Circ. Res.* 1988; 63: 240-249
65. Deussen A., Stappert M., Schafer S., Kelm M.: Quantification of extracellular and intracellular adenosine production. Understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 1999; 99: 2041-2047
66. Deussen A.: Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 362: 351-363
67. Dickenson J.M., Blank J.L., Hill S.J.: Human adenosine A₁ receptor and P2Y₂-purinoceptor-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in transfected CHO cells. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124: 1491-1499

68. Dillman W.H.: Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin in the rat. *Diabetes* 1980; 29: 579-582
69. Ditzel J., Brochner-Mortensen J., Kawahara R.: Dysfunction of tubular phosphate reabsorption related to glomerular filtration and blood glucose control in diabetic children. *Diabetologia* 1982; 23: 406-410
70. Dixon A.K., Gubitza A.K., Sirinathsinghji D.J.S., Richardson P.J., Freeman T.C.: Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 118: 1461-1468
71. Dobson J., Rubio R., Berne R.M.: Role of adenine nucleotides adenosine and inorganic phosphate in the regulation of skeletal muscle blood flow. *Circ. Res.* 1971; 29: 375-384
72. Dobson J.G., Fenton R.A., Romano F.D.: The antiadrenergic actions of adenosine in the heart. In *Topics and Perspectives in Adenosine Research*. E Gerlach, BF Becker (eds) Berlin, Springer-Verlag, 1987, p. 356
73. Doering C.W., Jalil J.E., Janicki J.S.: Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 1998; 22: 686-695
74. Dougherty C., Barucha J., Schofield P.R., Jacobson K.A., Liang B.T.: Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A1 or A3 receptor. *FASEB J.* 1998; 12: 1785-1792
75. Dragunow M., Faull R.L.M.: Neuroprotective effects of adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988; 9: 193-194
76. Drury A.N., Szent-Gyorgyi A.: The physiological activity of adenosine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 1929; 68: 213-237
77. Du X.L., Edelstein D., Rossetti L., Fantus I.G., Goldberg H., Ziyadeh F., Wu J., Brownlee M.: Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 12222-12226
78. Du X.D., Edelstein D., Dimmeler S., Ju Q., Sui Ch., Brownlee M.: Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the AKT site. *J. Clin. Invest.* 2001; 108: 1341-1348
79. Dubey R.K., Gillespie D.G., Mi Z., Jackson E.K.: Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A_{2B} receptors. *Circulation* 1997; 96: 2656-2666

- 80.** Dubey R.K., Gillespie D.G., Zacharia L.C., Mi Z., Jackson E.K.: A_{2B} receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 2001; 37: 716-721
- 81.** Dzimir N.: Receptor crosstalk: Implications for cardiovascular function, disease and therapy. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269: 4713-4730
- 82.** Edwards R.M., Spielman W.S.: Adenosine A1 receptor-mediated inhibition of vasopressin action in inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: F791-F796
- 83.** Eigler A., Matschke V., Hartmann G., Erhardt S., Boyle D., Firestein G.S., Endres S.: Suppression of TNF-alpha production in human mononuclear cells by an adenosine kinase inhibitor. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68: 97-103
- 84.** Ely S.W., Berne R.M.: Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992; 85: 893-904
- 85.** Espinal J., Challiss R.A.J., Newsholme E.A.: Effects of adenosine deaminase and an adenosine analogue on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett.* 1983; 158: 103-106
- 86.** Factor S.M., Minase T., Sonnenblick E.G.: Clinical and morphological features of human hypertensive - diabetic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 1980; 99(4): 446-58
- 87.** Faure M., Voyno-Yasenetskaya T.A., Bourne H.R.: cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 7851-7854
- 88.** Feoktistov I., Biaggioni I.: Adenosine A_{2b} receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J. Clin. Invest.* 1995; 96(4): 1979-1986
- 89.** Feoktistov I., Biaggioni I.: Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacol. Rev.* 1997; 49: 381-402
- 90.** Feoktistov I., Goldstein A.E., Biaggioni I.: Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A_{2B} receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55: 726-734
- 91.** Ferguson S.: Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 1-24
- 92.** Fozard J.R., Pfannkuche H.J., Schuurman H.J.: Mast cell degranulation following adenosine A₃ receptor activation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 298(3): 293-297.
- 93.** Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Daly J.W., Harden T.K., Jacobson K.A., Leff P., Williams W.: Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 143-156

94. Fredholm B.F., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G., Wasserman W.: Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 362: 364-374
95. Fredholm B.B., Ijzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linsen J.: International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 527-552
96. Frustaci A., Kajstura J., Chimenti C., Jakoniuk I., Leri A., Maseri A., Nadal-Ginard B., Anversa P.: Myocardial cell death in human diabetes. *Circ. Res.* 2000; 87: 1123-1132
97. Fullerton M.J., Funder J.W.: Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc. Res.* 1994; 28: 1863-1867
98. Gao Z., Chen T., Weber M.J., Linden J.: A_{2B} adenosine and P2Y₂ receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. Cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathways. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 5972-5980
99. Gao Z., Ni Y., Szabo G., Linden L.: Palmitoylation of the recombinant human A1 adenosine receptor: enhanced proteolysis of palmitoylation - deficient mutant receptors. *Biochem. J.* 1999; 342(Pt 2): 387-95
100. Gasser J.A., Cooper M.B., Tan K.C., Saggerson E.D., Batteridge D.J.: Decreased sensitivity to adenosine in platelets from patients with familial hypercholesterolaemia - a change reversed by cholestyramine treatment. *Eur. J. Clin. Invest.* 1993; 23(12): 803-811
101. Gaulton G.N., Schwartz J.L., Eardley D.D.: Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. *Diabetologia* 1985; 28(10): 769-775
102. Gerber U., Greene R.W., Haas R.W., Stevens D.R.: Characterization of inhibition mediated by adenosine in the hippocampus of the rat in vitro. *J. Physiol.* 1989; 417: 567-578
103. Gerwins P., Fredholm B.B.: Glucocorticoid receptor activation leads to up-regulation of adenosine A1 receptors and down-regulation of adenosine A2 responses in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 1991; 40: 149-155
104. Gerwins P., Fredholm B.B.: Activation of adenosine A1 and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1995; 351(2): 186-193
105. Gerwins P., Fredholm B.B.: Activation of phospholipase C and phospholipase D by stimulation of adenosine A1, bradykinin or P2U receptors does not correlate well with protein kinase C activation. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1995; 351(2): 194-201

- 106.** Ghadessy R.S., Willets J.M., Kelly E.: G protein-coupled receptor kinase 6 (GRK6) selectively regulates endogenous secretin receptor responsiveness in NG108-15 cells. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 138(4): 660-670
- 107.** Ginés S., Ciruela F., Burgueño J., Casadó V., Canela E.I., Mallol J., Lluís C., Franco R.: Involvement of caveolin in ligand - induced recruitment and internalization of A₁ adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59: 1314-1323
- 108.** Gonzalez-Benitez E., Guinzberg R., Diaz-Cruz A., Pina E.: Regulation of glycogen metabolism in hepatocytes through adenosine receptors. Role of Ca²⁺ and cAMP. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 437(3): 105-111
- 109.** Goodman O.B. Jr., Krupnick J.G., Santini F., Gurevich V.V., Penn R.B., Gagnon A.W., Keen J.H., Benovic J.L.: Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 1996; 383(6599): 447-450
- 110.** Gray J.H., Owen R.P., Giacomini K.M.: The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.- Eur. J. Physiol.* 2004; 447: 728-734
- 111.** Green A.: Adenosine receptor down-regulation and insulin resistance following prolonged incubation of adipocytes with an A₁ adenosine receptor agonist. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 15702-15707
- 112.** Green P.G., Basbaum A.I., Helms C., Levine J.D.: Purinergic regulation of bradykinin-induced plasma extravasation and adjuvant-induced arthritis in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88: 4162-4165
- 113.** Griffith D.A., Jarvis S.M.: Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1286: 153-181
- 114.** Grzeszczak W.: Jak zapobiegać nefropatii cukrzycowej lub opóźnić jej rozwój. *Pol. Arch. Med. Wew.* 1995; 94: 1-7
- 115.** Guo Y., Bolli R., Bao W., Wu W.J., Black R.G. Jr., Murphree S.S., Salvatore C.A., Jacobson M.A., Auchampach J.A.: Targeted deletion of the A₃ adenosine receptor confers resistance to myocardial ischemic injury and does not prevent early preconditioning. *J. Moll. Cell Cardiol.* 2001; 33: 825-830
- 116.** Gur S., Ari N., Ozturk Y.: Increased responses to adenosine in isolated left atria from streptozotocin-induced diabetes rats: evidence for the involvement of hypothyroidism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1997; 29(2): 174-179
- 117.** Gur S., Ozturk B.: Altered relaxant responses to adenosine and adenosine 5'-triphosphate in the corpus cavernosum from men and rats with diabetes. *Pharmacology* 2000; 60(2): 105-112
- 118.** Haltiwanger R.S., Grove K., Philipsberg G.A.: Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 3611-3617

- 119.** Han D.H., Hansen P.A., Nolte L.A., Holloszy J.O.: Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. *Diabetes* 1998; 47: 1671-1675
- 120.** Hannedouche T.P., Delgado A.G., Gniosahe D.A., Boitard C., Lacour B., Grunfeld J.P.: Renal haemodynamics and segmental tubular reabsorption in early type 1 diabetes. *Kidney Int.* 1990; 37: 1126-1133
- 121.** Hara K.: 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad.* 1994; 91: 7415-7419
- 122.** Harris R.A., Yount R.A.: Inhibition of hepatic lipogenesis by adenine nucleotides. *Lipids* 1975; 10(11): 673-80
- 123.** Harrison G.J., Ceniway R.J., Peart J., Berr S.S., Regan S., Matherne G.P., Headrick J.P.: Effects of A3 adenosine receptor activation and gene knock-out in ischemic-reperfused mouse heart. *Cardiovasc. Res.* 1998; 53: 147-155
- 124.** Hart G.W.: Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1997; 66: 315-335
- 125.** Hasenfuss G.: Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 1998; 37: 279-289
- 126.** Haskó G., Szabó C., Németh Z.H., Kvetan V., Pastores S.M., Vizi E.S.: Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* 1996; 157: 4634-4640
- 127.** Haskó G., Kuhel D.G., Chen J.F., Schwarzschild M.A., Deitch E.A., Mabley J.G., Marton A., Szabo C.: Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanism. *FASEB J.* 2000; 14: 2065-2074
- 128.** Hausdorff W.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: Turning off the signal: desensitization of beta-drenergic receptor function. *FASEB J.* 1990; 4: 2881-2889
- 129.** Hayat S.A., Patel B., Khattar R.S., Malik R.A.: Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clin. Science* 2004; 107: 539-557
- 130.** Haynes J. Jr., Obiako B., Babal P., Stevens T.: 5-(N-ethylcarboxamido)adenosine desensitizes the A_{2b}-adenosine receptor in lung circulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1999; 276: 1877-1883
- 131.** Headrick J.P., Hack B., Ashton K.J.: Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic reperfused hearts. *Am. J. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285: H1797-H1818
- 132.** Hershfield M.S.: New insights into adenosine- receptor- mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35(1): 25-30

- 133.** Hespel P., Richter E.A.: Role of adenosine in regulation of carbohydrate metabolism in contracting muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 441: 97-106
- 134.** Hettinger B.D., Leid M., Murray T.F.: Cyclopentyladenosine-induced homologous down-regulation of A1 adenosine receptors (A1AR) in intact neurons is accompanied by receptor sequestration but not a reduction in A1AR mRNA expression or G protein alpha-subunit content. *J. Neurochem.* 1998; 71(1): 221-230
- 135.** Hill R.J., Oleynek J.J., Hoth Ch.F., Ravi Kiron M.A., Weng W., Wester R.T., Tracey W.R., Knight D.R., Buchholz R.A., Kennedy S.P.: Cloning, expression and pharmacological characterization of rabbit adenosine A₁ and A₃ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 280: 122-128
- 136.** Hirano D., Aoki Y., Ogasawara H., Kodama H., Waga I., Sakanaka C., Shimizu T., Nakamura M.: Functional coupling of adenosine A2a receptor to inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade in chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 1996; 316(Pt 1): 81-86
- 137.** Hoffer L.J., Lowenstein J.M.: Effects of adenosine and adenosine analogues on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1986; 35: 4529-4536
- 138.** Huijberts M.S.P., Wolffenbuttel B.H., Boudier H.A., Crijns F.R., Kruseman A.C., Poitevin P., Levy B.I.: Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1407-1411
- 139.** Hayat S.A., Patel B., Khattar R.S., Malik R.A.: Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clin. Science.* 2004; 107: 539-557
- 140.** Inoguchi T., Sonta T., Tsubouchi H., Etoh T., Kakimoto M., Sonoda N., Sato N., Sekiguchi N., Kobayashi K., Sumimoto H., Utsumi H., Nawata H.: Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: S227-S232
- 141.** Inscho E.W.: Modulation of renal microvascular function by adenosine. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 285: R23-R25
- 142.** Ishida T., Yarimizu K., Gute D.C., Korthuis R.J.: Mechanism of ischemic preconditioning. *Shock* 1997; 8: 86-94
- 143.** Ishii H., Jirousek M.R., Koya D., Takagi Ch., Xia P., Clermont A., Bursell S.E., Kern T.S., Ballas L.M., Heath W.F., Stramm L.E., Feener E.P., King G.L.: Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 1996; 272: 728-731
- 144.** Ismail N.A., Denshary E.E.E.I., Montague W.: Adenosine and the regulation of insulin secretion by isolated rat islets of Langerhans. *Biochem. J.* 1977; 164: 409-413
- 145.** Ismail N.A., Hems D.A.: Effects of adenosine on glucose and lipid metabolism and hepatic blood flow. *Biochem. Pharmacol.* 1978; 27: 1341-1345

- 146.** Jackson E.K., Raghvendra K.D.: Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001; 281: F597-F612
- 147.** Jackson E.K., Mi Z., Zhu C., Dubey R.: Adenosine biosynthesis in the collecting duct. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 307: 888-896
- 148.** Jenkins R.L., McDaniel H.G., Digerness S., Parrish S.W., Ong R.L: Adenine nucleotide metabolism in hearts of diabetic rats. Comparison to diaphragm, liver, and kidney. *Diabetes* 1988; 37: 629-636
- 149.** Kanekar S., Hirozanne T., Terracio L., Borg T.K.: Cardiac fibroblasts: form and function. *Cardiovasc. Pathol.* 1998; 7: 127-133
- 150.** Kannel W.B., McGee D.L.: Diabetes and cardiovascular disease; the Framingham study. *JAMA* 1979; 241: 2035-2038
- 151.** Kashiwagi A.: Rationale and hurdles of inhibitors of hepatic gluconeogenesis in treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1995; 28 Suppl: S195-S200
- 152.** Kdonaga J.T., Courey A.J., Ladika J., Tjian R.: Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 1998; 242: 1566-1570
- 153.** Keogh R.J., Dunlop M.E., Larkins R.G.: Effect of inhibition of aldolase reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism* 1997; 46: 41-47
- 154.** Kilpatrick E.L., Narayan P., Mentzer R.M. Jr., Lasley R.D.: Adenosine A3 agonist cardioprotection in isolated rat and rabbit hearts is blocked by the A1 antagonist DPCPX. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281: H847-H853
- 155.** Kim J., Wess J., vanRhee A.M., Schöneberg T., Jacobson K.A.: Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A2a adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 13987-13997
- 156.** Kim J., Jiang Q., Glashofer M., Yehle S., Wess J., Jacobson K.A.: Glutamate residues in the second extracellular loop of the human A2a adenosine receptor are required for ligand recognition. *Mol. Pharmacol.* 1996; 49: 683-691
- 157.** Kleppisch T., Nelson M.T.: Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A₂ receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 12441-12445
- 158.** Klinger M., Kudlacek O., Seidel M.G., Freissmuth M., Sexl V.: MAP kinase stimulation by cAMP does not require RAP1 but SRC family kinases. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 32490-32497
- 159.** Kloner R.A., Yellon D.: Does ischemic preconditioning occur in patients? *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994; 24: 1133-1142

- 160.** Klotz K.N.: Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 362: 382-391
- 161.** Knox F.G., Hoppe A., Kempson S.A., Shah S.V., Dousa T.P.: Cellular mechanism of phosphate transport. Renal handling of phosphate. Edited by Massry SG, Fleisch H. New York, Plenum, 1980; pp79-114
- 162.** Kobayashi S., Beitner-Johnson D., Conforti L., Millhorn D.E.: Chronic hypoxia reduces adenosine A_{2A} receptor-mediated inhibition of calcium current in rat PC12 cells via downregulation of protein kinase. *Am. J. Physiol.* 1998; 512: 351-363
- 163.** Kojro E., Fahrenholz F.: Ligand-induced cleavage of the V₂ vasopressin receptor by a plasma membrane metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 6476-6481
- 164.** Kolm-Litty V., Saurer U., Nerlich A., Lehmann R., Schleicher E.D.: High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 160-169
- 165.** Komers R., Cooper M.E.: Renal sodium handling in experimental diabetes: role of NO. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996; 11: 2170-2177
- 166.** Koya D., Jirousek M.R., Lin Y.W., Ishii H., Kuboki K., King G.L.: Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 115-126
- 167.** Koya D., King G.L.: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47: 859-866
- 168.** Koya D., Haneda M., Nakagawa H., Isshiki K., Sato H., Maeda S., Sugimoto T., Yasuda H., Kashiwagi A., Wada D.K., King G.L., Kikkawa R.: Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion in diabetic db/db mice a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J.* 2000; 14: 439-447
- 169.** Kroll K., Decking U.K.M., Dreikorn K., Schrader J.: Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ. Res.* 1991; 73: 846-856
- 170.** Kroll K., Deussen A., Sweet I.R.: Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and S-adenylhomocysteine in the guinea pig heart. *Circ. Res.* 1992; 71: 590-604
- 171.** Krueger K.M., Daaka Y., Pitcher J.A., Lefkowitz R.J.: The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 5-8
- 172.** Krump E., Lemay G., Borgeat P.: Adenosine A_{2a} receptor-induced inhibition of leukotriene B₄ synthesis in whole blood *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 117: 1639-1644
- 173.** Kuroda M., Honnor R.C., Cushman S.W., Londos C., Simpson I.A.: Regulation of insulin-stimulated glucose transport in the isolated rat adipocyte. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 245-253

- 174.** Latini S., Pedata F.: Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 2001; 79: 463-484
- 175.** Laurent F., Hillaire-Buys D., Chapal J., Dietz S., Portet K., Cros G., Petit P., Michel A.: Contrasting effects of streptozotocin-induced diabetes on the in vitro relaxant properties of adenosine in rat pancreatic vascular bed and thoracic aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1999; 360(3): 309-316
- 176.** Law W.R., Raymond R.M.: Adenosine potentiates insulin-stimulated myocardial glucose uptake in vivo. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: H970-H975
- 177.** Lee C.H.: Nck associates with the SH2 domain docking protein IRS-1 in insulin stimulated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 11713-11711
- 178.** Lee A.Y., Chung S.S.: Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 1999; 13: 23-30
- 179.** Lee H.T., Emala C.W.: Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A1 and A3 receptors. *Am. J. Physiol.* 2000; 278: F380-F387
- 180.** Lee H.T., Ota-Setlik A., Xu H., D'Agati V.D., Jacobson M.A., Emala C.W.: A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia and myoglobinuria-induced renal failure. *Am. J. Physiol.* 2003; 284: F267-F273
- 181.** Lehmann R., Schleicher E.D.: Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin. Chim. Acta* 2000; 297: 135-144
- 182.** Leung G.P.H., Man R.Y.K., Tse Ch.M.: D-glucose upregulates adenosine transport in cultured human aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288: 2756-2762
- 183.** Liang B.T., Donovan L.A.: Differential desensitization of A1 adenosine receptor-mediated inhibition of cardiac myocyte contractility and adenylate cyclase activity. Relation to the regulation of receptor affinity and density. *Circ. Res.* 1990; 67: 406-414
- 184.** Linden J., Taylor H.E., Robeva A.S., Tucker A.L., Stehle J.H., Rivkees S.A., Fink J.S., Reppert S.M.: Molecular cloning and functional expression of a sheep A3 adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol. Pharmacol.* 1993; 44: 524-532
- 185.** Linden J.: Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1994; 15: 298-306
- 186.** Linden J., Auchampach J.A., Jin X., Figler R.A.: The structure and function of A1 and A2b adenosine receptors. *Life Sci.* 1998; 62: 1519-1524
- 187.** Linden J., Thai T., Figler R.A., Jin X., Robeva A.S.: Characterization of human A(2B) adenosine receptors radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in

human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* 1999; 56: 705-713

188. Linden J.: Molecular approach to adenosine receptors: receptor mediated mechanism of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001; 41: 775-787

189. Liu Y., Thornton J.D., Cohen M.V., Downey J.M., Schaffer S.W.: Streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes protects hearts from infarction. *Circulation* 1993; 88: 1273-1278

190. Lockshin R.A., Facey C.O., Zakeri Z.: Cell death in the heart. *Cardiol. Clin.* 2001; 19(1): 1-11

191. Loh E., Rebbeck T.R., Mahoney P.D., DeNofrio D., Swain J.L., Holmes E.W.: Common variant in *AMPD1* gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation* 1999; 99: 1422-1425

192. Londos C., Cooper D.M.F., Wolff J.: Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980; 77: 2551-2554

193. Londos C., Honnor R.C., Dhillon G.: cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes: III-Multiple models of insulin regulation of lipolysis and regulation of insulin responses by adenylate cyclase regulators. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 15139-15145

194. Lonroth P., Davies J.I., Lonroth I., Smith U.: The interaction between the adenylate cyclase system and insulin-stimulated glucose transport: evidence for the importance of both cyclic-AMP-dependent and -independent mechanism. *Biochem. J.* 1987; 243: 789-795

195. Lowenstein E.J.: The SH2 and SH3 domain-containing proteins GRB2 links receptor tyrosine kinase to ras signaling. *Cell* 1992; 70: 431-442

196. Lozza G., Conti A., Ongini E., Monopoli A.: Cardioprotective effects of adenosine A1 and A2A receptor agonists in the isolated rat heart. *Pharmacol. Res.* 1997; 35:57-64

197. Lund P., Cornell N.W., Krebs H.A.: Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes. *Biochem. J.* 1975; 152(3): 593-9

198. MacCollin M., Peterfreund R., MacDonald M., Fink J.S., Gusella J.: Mapping of a human A2a adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22. *Genomics* 1994; 20(2): 332-333

199. MacKenna D., Summerour S.R., Villarreal F.J.: Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc. Res.* 2000; 46(2): 257-63

200. Mackiewicz U., Emanuel K., Lewartowski B.: Dihydropyridine receptors functioning as voltage sensors in cardiac myocytes. *J. Physiol. Pharmacol.* 2000; 51(4): 777-798

- 201.** Maenhaut C., Van Sande J., Libert F., Abramowicz M., Parmentier M., Vanderhaegen J.J., Dumont J.E., Vassart G., Schiffmann S.: RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 173(3): 1169-1178
- 202.** Maggirwar S.B., Dhanraj D.N., Somani S.M., Ramkumar V.: Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 201(2): 508-515
- 203.** Malhotra J., Gupta Y.K.: Effect of adenosine receptor modulation on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 282-288
- 204.** Manabe I., Shindo T., Nagai R.: Gene expression in fibroblasts and fibrosis: Involvement in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 2002; 91: 1103-1113
- 205.** Manfredi J.P., Holmes E.W.: Purine salvage pathways in myocardium. *Annu. Rev. Physiol.* 1985; 47: 691-705
- 206.** Marak G.E., de Kozak Y., Faure J.P., Rao N.A., Romero J.L., Ward P.A., Till G.O.: Pharmacologic modulation of acute ocular inflammation. I. Adenosine. *Ophthalmic. Res.* 1988; 20: 220-226
- 207.** Marala R.B., Mustafa S.J.: Immunological characterization of adenosine A_{2A} receptors in human and porcine cardiovascular tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 286: 1051-1057
- 208.** Matharu A.L., Mundell S.J., Benovic J.L., Kelly E.: Rapid agonist-induced desensitization and internalization of the A_{2B} adenosine receptor is mediated by serine residue close to the COOH terminus. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(32): 30199-30207
- 209.** Matuszkiewicz-Rowińska J., Ostrowski K.: Nefropatia cukrzycowa. Patologia i patogenez. *Pol. Arch. Med. Wew.* 1992; 88
- 210.** Mayne M., Shepel P.N., Jiang Y., Geiger J.D., Power C.: Dysregulation of adenosine A1 receptor-mediated cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 633-639
- 211.** McGarrity S.T., Stephenson A.H., Webster R.O.: Regulation of human neutrophil functions by adenine nucleotides. *J. Immunol.* 1989; 142: 1986-1994
- 212.** McKenna K., Morris A.D., Ryan M., Newton R.W., Frier B.M., Baylis P.H., Saito T., Ishikawa S., Thompson C.J.: Renal resistance to vasopressin in poorly controlled type 1 diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* 2000; 279: E155-E160
- 213.** McLane M.P., Black P.R., Law W.R., Raymond R.M.: Adenosine reversal of *in vivo* hepatic responsiveness to insulin. *Diabetes* 1990; 39: 62-69
- 214.** Megson A.C., Dickenson J.M., Townsend-Nicholson A., Hill S.J.: Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A₁ - receptors and

constitutive P₂ - purinoreceptors in CHO - K₁ cells. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 115: 1415-1424

215. Mentzer R.M. Jr., Jahania M.S., Lasley R.D.: Myocardial protection. *Card. Surg. Adult.* 2003; 2: 413-438

216. Merighi S.A., Mirandola P., Varani K., Gessi S., Leung E., Baraldi P.B., Tabrizi M.A., Borea P.A.: A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol. Ther.* 2003; 100(1): 31-48

217. Meyerhof W., Muller-Brechlin R., Richter D.: Molecular cloning of a novel putative G - protein coupled receptor expressed during rat spermiogenesis. *FEBS Lett.* 1991; 284: 155-160

218. Miller R.L., Adamczyk D.L., Miller W.H.: Adenosine kinase from rabbit liver. Purification by affinity chromatography and properties. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 2339-2345

219. Miller T.B.: Cardiac performance of isolated perfused hearts from alloxan diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 1979; 230: H808-H812

220. Miyamoto M., Yagil Y., Larson T., Robertson C., Jamison L.: Effects of intrarenal adenosine on renal function and medullary blood flow in the rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 1988; 255: F1230-F1234

221. Monitto C.L., Levitt R.C., DiSilvestre D., Holroyd K.J.: Localization of the A₃ adenosine receptor gene (ADORA3) to human chromosome 1p. *Genomics* 1995; 26(3): 637-8

222. Morrison P.D., Mackinnon M.W., Bartrup J.T., Skett P.G., Stone T.W.: Changes in adenosine sensitivity in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105(4): 1004-1008

223. Morrison R.R., Talukder M.A.H., Ledent C., Mustafa S.J.: Cardiac effects of adenosine in A_{2A} receptor knock out hearts: uncovering A_{2B} receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282: 437-444

224. Mubagwa K., Mullane K., Flameng W.: Role of adenosine in the heart and circulation. *Card. Res.* 1996; 32: 797-813

225. Mullane K., Bullough D.: Harnessing an endogenous cardioprotective mechanism: cellular sources and site so faction of adenosine. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1995; 27(4): 1041-1054

226. Mundell S.J., Benovic J.L., Kelly E.: A dominant negative mutant of the G protein-coupled receptor kinase 2 selectively attenuates adenosine A₂ receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* 1997; 51: 991-998

227. Mundell S.J., Kelly E.: Evidence for co-expression and desensitization of A_{2a} and A_{2b} adenosine receptors in NG108-15 cells. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 55(5): 595-603

- 228.** Munger K.A., Jackson E.K.: Effects of selective A₁ receptor blockade on glomerular hemodynamics: involvement of renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: F783-F790
- 229.** Myers M.G.: The role of IRS-1/GRB2 complex in insulin signaling. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 3577-3587
- 230.** Nakata H.: Development of an antiserum to rat-brain A₁ adenosine receptor: application for immunological and structural comparison of A₁ adenosine receptors from various tissues and species. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; 1177(1): 93-98
- 231.** Nandagopal K., Dawson T.M., Dawson V.L.: Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2001; 297: 474-478
- 232.** Natali A., Bonadonna R., Santoro D., Galvan A.Q., Baldi S., Frascerra S., Polombo C., Ghione S., Ferrannini E.: Insulin resistance and vasodilation in essential hypertension. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 1570-1576
- 233.** Navar L.G., Incho E.W., Majid D.S.A., Imig J.D., Harrison-Bernard L.M., Mitchell K.D.: Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol. Rev.* 1996; 76: 425-536
- 234.** Neary J.T., McCarthy M., Kang Y., Zuniga S.: Mitogenic signaling from P₁ and P₂ purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci. Lett.* 1998; 242(3): 159-162
- 235.** Nejsum L.N., Kwon T.H., Marples D., Flyvbjerg A., Knepper M.A., Frokiaer J., Nielsen S.: Compensatory increase in AQP2, p-AQP2, and AQP3 expression in rats with diabetes mellitus. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001; 280: F715-F726
- 236.** Nichols G.A., Hillier T.A., Erbey J.R., Brown J.B.: Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors. *Diabetes Care* 2001; 24: 1614-1619
- 237.** Nishiyama A., Kimura S., He H., Miura K., Rahman M., Fujisawa Y., Fukui T., Abe Y.: Renal interstitial adenosine metabolism during ischemia in dogs. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001; 280: F231-F238
- 238.** Noguchi T., Matozaki T., Horita K., Fujioka Y., Kasuga M.: Role of Sh-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated ras activation. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 6674-6682
- 239.** Norton G.R., Woodiwiss A.J., McGinn R.J., Lorbar M., Chung E.S., Honeyman T.W., Fenton R.A., Dobson J.G. Jr., Meyer T.E.: Adenosine A₁ receptor-mediated antiadrenergic effects are modulated by A_{2a} receptor activation in rat heart *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1999; 276: 341-349
- 240.** Nowak J.Z., Zawilska J.B.: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. PWN, Warszawa, Dixon 2004

- 241.** O'Connor C.M., Hathaway W.R., Bates E.R.: Clinical characteristics and long-term outcome in patients in whom congestive heart failure develops after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: development of a predictive model. *Am. Heart J.* 1997; 133: 663-673
- 242.** Oetjen E., Schweickhardt C., Unthan-Fechter K., Probst I.: Stimulation of glucose production from glycogen by glucagon, noradrenalin and non-degradable adenosine analogues is counteracted by adenosine and ATP in cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1990; 271: 337-344
- 243.** Ohisalo J.J.: Regulatory functions of adenosine. *Med. Biol.* 1987; 65: 181-191
- 244.** Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O., Ui M.: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmanin. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 3568-3573
- 245.** Okusa M.D.: A_{2A} adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2002; 282: 10-18
- 246.** Olah M.E., Ren H., Ostrowski J., Jacobson K.A., Stiles G.L.: Cloning, expression, and characterization of the unique bovine A₁ receptor. Studies on the ligand binding site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 10764-10770
- 247.** Olah M.E., Stiles G.L.: Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995; 35: 581-606
- 248.** Olah M.E.: Identification of A_{2a} adenosine receptor domains involved in selective coupling to G_s. Analysis of chimeric A₁/A_{2a} adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 337-344
- 249.** Olah M.E., Stiles G.L.: The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol. Ther.* 2000; 85(2): 55-75
- 250.** Olanrewaju H.A., Mustafa S.J.: Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors mediated nitric oxide production in coronary artery endothelial cells. *Gen. Pharmacol.* 2000; 35: 171-177
- 251.** Olivera A., Lamas S., Rodriguez-Puyol D., Lopez-Novoa J.M.: Adenosine induces mesangial cell contraction by an A₁-type receptor. *Kidney Int.* 1989; 35: 1300-1305
- 252.** Olsson R.A., Pearson J.D.: Cardiovascular purinoreceptors. *Physiol. Rev.* 1990; 70: 761-845
- 253.** Ontyd J., Schrader J.: Measurement of adenosine, inosine, and hypoxanthine in human plasma. *J. Chromatogr.* 1984; 307: 404-409
- 254.** Osswald H., Nabakowski G., Hermes H.: Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int. J. Biochem.* 1980; 12: 253-267

- 255.** Osswald H., Hermes H., Nabakowski G.: Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int. Suppl.* 1982; 12: S136-S142
- 256.** Palmer T.M., Gettys T.W., Jacobson K.A., Stiles G.L.: Desensitization of the canine A2a adenosine receptor: delineation of multiple processes. *Mol. Pharmacol.* 1994; 45: 1082-1094
- 257.** Palmer T.M., Benovic J.L., Stiles G.L.: Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 29607-29613
- 258.** Palmer T.M., Gettys T.W., Stiles G.L.: Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A₃ adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16895-16902
- 259.** Palmer T.M., Stiles G.L. Neurotransmitter receptors VII: Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 1995; 7: 683-694
- 260.** Palmer T.M., Benovic J.L., Stiles G.L.: Molecular basis for subtype-specific desensitization of inhibitory adenosine receptors. Analysis of a chimeric A₁- A₃ adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 15272-15278
- 261.** Palmer T.M., Stiles G.L.: Identification of an A2a adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization. *Biochemistry* 1997; 36(4): 832-838
- 262.** Palmer T.M., Stiles G.L.: Structure-function analysis of inhibitory adenosine receptor regulation. *Neuropharmacology* 1997; 36: 1141-1147
- 263.** Parmely M.J., Zhou W.W., Edwards C.K. III, Borcharding D.R., Silverstein R., Morrison D.C.: Adenosine and a related carbocyclic nucleoside analogue selectively inhibit tumor necrosis factor- α production and protect mice against endotoxin challenge. *J. Immunol.* 1993; 151: 389-396
- 264.** Parodi J., Flores C., Aguayo C., Rudolph M.I., Casanello P., Sobrevia L.: Inhibition of nitrobenzylthioinosine-sensitive adenosine transport by elevated D-glucose involves activation of P_{2Y2} purinoceptors in human umbilical vein endothelial cells. *Circ. Res.* 2002; 90: 570-577
- 265.** Pawełczyk T., Sakowicz M., Szczepańska-Konkel M., Angielski S.: Decreased expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 375: 1-6
- 266.** Pawełczyk T., Podgórska M., Sakowicz M.: The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. *Mol. Pharmacol.* 2003; 63: 81-88
- 267.** Pawełczyk T., Grdeń M., Rzepko R., Sakowicz M., Szutowicz A.: Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat. *Am. J. Pathol.* 2005; 167: 315-325

- 268.** Pączek L., Lao M.: Mechanizmy wiodące do szkliwienia kłębków nerkowych. *Pol. Tyg. Lek.* 1993; 48: 442-450
- 269.** Peakman M.C., Hill S.J.: Adenosine A₁ receptor - mediated changes in basal and histamine-stimulation levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 115: 801-810
- 270.** Persson A.E.G., Brown B., Liu R., Ollerstam A.: Nitric oxide modulates and adenosine mediates the tubuloglomerular feedback mechanism. *Acta Physiol. Scand.* 2002; 176: 91-94
- 271.** Pessin J.E., Saltiel A.R.: Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 165-169
- 272.** Peterfreund R.A., MacCollin M., Gusella J., Fink J.S.: Characterization and expression of the human A_{2a} adenosine receptor gene. *J. Neurochem.* 1996; 66(1): 362-368
- 273.** Peterfreund R.A., Gies E.K., Fink J.S.: Protein kinase C regulates adenosine A_{2a} receptor mRNA expression in SH-SY5Y cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 336(1): 71-80
- 274.** Peters D.M., Gies E.K., Gelb C.R., Peterfreund R.A.: Agonist-induced desensitization of A_{2B} adenosine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 55: 873-882
- 275.** Pflueger A.C., Schenk F., Osswald H.: Increased sensitivity of the renal vasculature to adenosine in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: F529-F535
- 276.** Pflueger A., Berndt T.J., Knox F.G.: Effect of renal interstitial adenosine infusion on phosphate excretion in diabetes mellitus rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1998; 274: R1228-R1235
- 277.** Pflueger A., Larson T.S., Nath K.A., King B.F., Gross J.M., Knox F.G.: Role of adenosine in contrast media-induced acute renal failure in diabetes mellitus. *Mayo Clin. Proc.* 2000; 75: 1275-1283
- 278.** Philips R.M., Narayan P., Gomez A.M., Dilly K., Jones L.R., Lederer W.J., Altschuld R.A.: Sarcoplasmic reticulum in heart failure: central player or bystander? *Cardiovasc. Res.* 1998; 37: 346-351
- 279.** Picano E., Abbracchio M.P.: Adenosine, the imperfect endogenous anti-ischemic cardio-neuroprotector. *Brain Res. Bull.* 2000; 52: 75-82
- 280.** Pina M.Z., Cruz A.D., Guinzberg P.R., Pina E.: "Hormone-like" effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. *Life Sci.* 1989; 45: 2269-2274

- 281.** Pitcher J.A., Freedman N.J., Lefkowitz R.J.: G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 653-692
- 282.** Poelstra K., Heynen E.R., Baller J.F., Hardonk M.J., Bakker W.W.W.: Modulation of anti-Thy1 nephritis in the rat by adenine nucleotides: evidence for an anti-inflammatory role for nucleotides. *Lab. Invest.* 1992; 66: 555-563
- 283.** Portilla D., Dai G., Peters J.M., Gonzalez F.J., Crew M.D., Proia A.D.: Etomoxir-induced PPAR alpha-modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000; 278: F667-F675
- 284.** Priebe T., Platsoucas C.D., Nelson J.A.: Adenosine receptors and modulation of natural killer cell activity by purine nucleosides. *Cancer Res.* 1990; 50: 4328-4331
- 285.** Radegran G., Hellsten Y.: Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilation. *Acta Physiol. Scand.* 2000; 168: 575-591
- 286.** Ralevic V., Burnstock G.: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharm. Reviews* 1998; 50: 415-437
- 287.** Ramkumar V., Olah M.E., Jacobson K.A., Stiles G.L.: Distinct pathways of desensitization of A1- and A2-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol. Pharmacol.* 1991; 40: 639-647
- 288.** Ramkur V., Stiles G.L., Beaven M.A., Ali H.: The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 16887-16890
- 289.** Ren H., Stiles G.L.: Characterization of the human A1 adenosine receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 3104-3110
- 290.** Ren H., Stiles G.L.: Separate promoters in the human A1 adenosine receptor gene direct the synthesis of distinct messenger RNAs that regulate receptor abundance. *Mol. Pharmacol.* 1995; 48: 975-980
- 291.** Ren H., Stiles G.L.: Dexamethasone stimulates human A₁ adenosine receptor (A₁AR) gene expression through multiple regulatory sites in promoter B. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55: 309-316
- 292.** Ren J., Sowers J.R., Walsh M.F., Brown R.A.: Reduced contractile response to insulin and IGF-1 in venticular myocytes from genetically obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 279: H1708-H1714
- 293.** Reppert S.M., Weaver D.R., Stehle J.H., Rivkees S.A.: Molecular cloning and characterization of a rat A1-receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol. Endocrinol.* 1991; 5: 1037-1048
- 294.** Resta R., Hooker S.W., Laurent A.B., Jamshedur Rahman S.M., Franklin M., Knudsen T.B., Nadon N.L., Thompson L.F.: Insights into thymic purine metabolism and

adenosine deaminase deficiency revealed by transgenic mice overexpressing ecto-5'-nucleosidase (CD73). *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 676-683

295. Ritchie P.K., Spangelo B.L., Krzymowski D.K., Rossiter T.B., Kurth E., Judd A.M.: Adenosine increases interleukin 6 release and decreases tumor necrosis factor release from rat adrenal zona glomerulosa cells, ovarian cells, anterior pituitary cells, and peritoneal macrophages. *Cytokine* 1997; 9: 187-198

296. Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Ritzel R.G., Mowles D.A., Carpenter P., Chen X.Z., Karpinski E., Hyde R.J., Baldwin S.A., Cass C.E., Young J.D.: Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system *cib*). *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2914-2927

297. Rivkees S.A., Chen M., Kulkarni J., Browne J., Zhao Z.: Characterization of the murine A1 adenosine receptor promoter, potent regulation by GATA-4 and Nkx2.5. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 14204-14209

298. Robinson A.J., Dickenson J.M.: Regulation of p42/p44 MAPK and p38 MAPK by the adenosine A(1) receptor in DDT(1)MF- 2 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 413(2-3): 151-161

299. Rosales O.R., Eades B., Assali A.R: Cardiovascular drugs: adenosine role in coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. *Catheter Cardiovasc. Interv.* 2004; 62: 358-363

300. Rudnick M.R., Goldfarb S., Wexler L., Ludbrook P.A., Murphy M.J., Halpern E.F., Hill J.A., Winniford M., Cohen M.B., VanFossen D.B.: Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial: the Iohexol cooperative study. *Kidney Int.* 1995; 47: 254-261

301. Sakowicz M., Pawełczyk T.: Insulin restores expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 236: 163-171

302. Sakowicz M., Szutowicz A., Pawełczyk T.: Insulin and glucose induced changes in expression level of nucleoside transporters and adenosine transport in rat T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68(7): 1309-20

303. Sakowicz M., Szutowicz A., Pawełczyk T.: Differential effect of insulin and elevated glucose level on adenosine transport in rat B lymphocytes. *Int. Immunol.* 2005; 17: 145-154

304. Salmon J.E., Brogle N., Brownlie C., Edberg J.C., Kimberly R.P., Chen B.N., Erlanger B.F.: Human mononuclear phagocytes express adenosine A₁ receptors. *J. Immunol.* 1993; 151: 2775-2785

305. Saltiel A.R., Kahn R.: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806

- 306.** Salvatore C.A., Jacobson M.A., Taylor H.E., Linden J., Johnson R.G.: Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10365-10369
- 307.** Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: Molecular Cloning. Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989
- 308.** Schmitt J.M., Stork P.J.: PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol. Cell.* 2002; 9(1): 85-94
- 309.** Schnermann J.: Adenosine mediates tubuloglomerular feedback. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2002; 283: R276-R277
- 310.** Scholey J.W., Meyer T.W.: Control of glomerular hypertension by insulin administration in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 1384-1389
- 311.** Schulte G., Fredholm B.B.: Human adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ receptors expressed in Chinese Hamster Ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular - regulated kinase 1/2. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58: 477-482
- 312.** Schulte G., Fredholm B.B.: Signaling pathway from the human adenosine A₃ receptor expressed in Chinese hamster ovary cells to the extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62: 1137-1146
- 313.** Schulte G., Fredholm B.B.: Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* 2003; 15(9): 813-827
- 314.** Schwabe U., Schonhofer P.S., Ebert R.: Facilitation by adenosine of the action of insulin on the accumulation of adenosine 3'5'-monophosphate, lipolysis, and glucose oxidation in isolated fat cells. *Eur. J. Biochem.* 1974; 46: 537-545
- 315.** Schwaninger M., Neher M., Viegas E., Schneider A., Spranger M.: Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *J. Neurochem.* 1997; 69: 1145-1150
- 316.** Seney F.D., Seikaly M.G.: Adenosine inhibits sodium uptake in the loop of Henle. *Clin. Res.* 1989; 37: 501A
- 317.** Sexl V., Mancusi G., Höller Ch., Gloria-Maercker E., Schütz W., Freissmuth M.: Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A_{2A}-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 5792-5799
- 318.** Shawa K.M.: „Powikłania cukrzycy”, Gdańsk, 1998
- 319.** Shen W.K., Kurachi Y.: Mechanism of adenosine-mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin. Proc.* 1995; 70: 274-291
- 320.** Shneyvays V., Nawrath H., Jacobson K.A., Shainberg A.: Induction of apoptosis in cardiac myocytes by an A₃ adenosine receptor agonist. *Exp. Cell Res.* 1998; 243: 383-397

- 321.** Shryock J.C., Belardinelli L.: Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* 1997; 79: 2-10
- 322.** Sitaraman S.H., Si-Tahar M., Merlin D., Strohmeier G.R., Madara J.L.: Polarity of A2b adenosine receptor expression determines characteristics of receptor desensitization. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000; 278: C1230-1236
- 323.** Skolnik E.Y.: The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathways. *Science* 1993; 260: 1953-1955
- 324.** Smith U., Kuroda M., Simpson I.A.: Counterregulation of insulin-stimulated glucose transport by catecholamines in the isolated rat adipose cell. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 8758-8763
- 325.** Sorkin A., Von Zastrow M.: Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002; 3(8): 600-614
- 326.** Soulis T., Cooper M.E., Sastra S., Thallas V., Panagiotopoulos S., Bjerrum O.J., Jerums G.: Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine-mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia* 1997; 40: 1141-1151
- 327.** Sparks H.V., Bardenheuer H.: Regulation of adenosine formation by the heart. *Cir. Res.* 1986; 58: 193-201
- 328.** Spielman W.S., Thompson C.I.: A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1982; 242: F423-F435
- 329.** Spielman W.S., Arend L.J., Adenosine receptors and signaling in the kidney. *Hypertension* 1991; 17: 117-130
- 330.** Stehle J.H., Rivkees S.A., Lee J.J., Weaver D.R., Deeds J.D., Reppert S.M.: Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* 1992; 6: 384-393
- 331.** Studer R.K., Craven P.A., DeRubertis F.C.: Role of protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes* 1993; 42: 118-126
- 332.** Suarez J., Valles V.E., Chagoya de Sanchez V.: Effect of adenosine on the serum levels of glucose, insulin and glucagon in vivo. *Int. J. Biochem.* 1987; 19: 85-88
- 333.** Sun D., Samuelson L.C., Yang T., Huang Y., Paliege A., Saunders T., Briggs J., Schnermann J.: Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: Evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 9983-9988

- 334.** Sullivan G.W., Linden J.: Role of A_{2A} adenosine receptors in inflammation. *Drug Dev. Res.* 1998; 45: 103-112
- 335.** Svenningsson P., Fredholm B.B.: Glucocorticoids regulate the expression of adenosine A₁ but not A_{2A} receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 280: 1094-1101
- 336.** Swynghedauw B.: Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 215-262
- 337.** Szabó C., Scott G.S., Virág L., Egnaczyk G., Salzman A.L., Shanley T.P., Hascó G.: Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 125: 379-387
- 338.** Szczepańska-Konkel M., Langner G., Bednarczyk G., Stiepanow-Trzeciak A., Jankowski M., Angielski S.: Renal hemodynamics and natriuretic responses to intravenous administration of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in rat. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 54(2): 163-173
- 339.** Tatoń J., Czech A.: *Diabetologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001
- 340.** Tatoń J.: *Powikłania cukrzycy*. PZWL, Warszawa, 1997
- 341.** Thornalley P.J.: The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 1990; 269: 1-11
- 342.** Tilley S.L., Wagoner V.A., Salvatore Ch.A., Jacobson M.A., Koller B.H.: Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A₃ receptors on mast cells. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 361-367
- 343.** Tomai F., Crea F., Chiariello L., Gioffre P.A.: Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation* 1999; 100: 559-563
- 344.** Tosaki A., Engelman D.T., Engelman R.M., Das D.K.: The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working hearts. *Cardiovasc. Res.* 1996; 31: 526-536
- 345.** Townsend-Nicholson A., Baker E., Schofield P.R., Sutherland G.R.: Localization of the adenosine A₁ receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1. *Genomics* 1995; 26(2): 423-425
- 346.** Townsend-Nicholson A., Baker E., Sutherland G.R., Schofield P.R.: Localization of the adenosine A_{2b} receptor subtype gene (ADORA2B) to chromosome 17p11.2-p12 by FISH and PCR screening of somatic cell hybrids. *Genomics* 1995; 25(2): 605-707
- 347.** Trincavelli M.L., Tuscano D., Cecchetti P., Falleni A., Benzi L., Klotz K.N., Gremigni V., Cattabeni F., Lucaachini A., Martini C.: Agonist-induced internalization and recycling of the human A₃ adenosine receptors: role in receptor desensitization and resensitization. *J. Neurochem.* 2000; 75: 1493-1501

- 348.** Trincavelli M.L., Tuscano D., Marroni M., Falleni A., Gremigni V., Ceruti S., Abbraccio M.P., Jacobson K.A., Cattabeni F., Martini C.: A₃ adenosine receptors in human astrocytoma cells: agonist-mediated desensitization, internalization, and down-regulation. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62: 1373-1384
- 349.** Trincavelli M.L., Tuscano D., Marroni M., Klotz K.N., Lucacchini A., Martini C.: Involvement of mitogen protein kinase cascade in agonist-mediated human A(3) adenosine receptor regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1591(1-3): 55-62
- 350.** Trinder D., Phillips P.A., Stephenson J.M., Risvanis J., Aminian A., Adam W., Cooper M., Johnston C.I.: Vasopressin V1 and V2 receptors in diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: E217-E223
- 351.** Troung V.L., Collinson A.R., Lowenstein J.M.: 5'-Nucleotidases in rat heart. Evidence for the occurrence of two soluble enzymes with different substrate specificities. *Biochem. J.* 1988; 253: 117-121
- 352.** Tsao P., von Zastrow M.: Down-regulation of G protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 270: 365-369
- 353.** Tsilbary E.C., Charonis A.S., Reger L.A., Wohlhueter R.M., Furcht L.T.: The effect of nonenzymatic glucosylation the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 4302-4308
- 354.** Van Calker D., Muller M., Hamprecht B.: Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 1978; 276(5690): 839-41
- 355.** Van Calker D., Muller M., Hamprecht B.: Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* 1979; 33: 999-1005
- 356.** Vannucci S.J., Klim C.M., Martin L.F., LaNouke K.F.: A₁ - adenosine receptor-induced adipocyte adenylate cyclase and lipolysis in Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: E871-E878
- 357.** Vannucci S.J., Nishimura H., Satoh S., Cushman S.W., Holman G.D., Simpson I.A.: Cell surface accessibility of GLUT4 glucose transporters in insulin-stimulated rat adipose cells. Modulation by isoprenaline and adenosine. *Biochem. J.* 1992; 288: 325-330
- 358.** Varani K., Portaluppi F., Gessi S., Merighi S., Ongini E., Belardinelli L., Borea P.A.: Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A_{2A} receptors : functional and biochemical aspects. *Circulation* 2000; 102: 285-289
- 359.** Villarreal F., Zimmermann S., Makhsudova L., Montag A.C., Erion M.D., Bullough D.A., Ito B.R.: Modulation of cardiac remodeling by adenosine: in vitro and in vivo effects. *Mol. Cell. Biochem.* 2003; 251(1-2): 17-26

- 360.** Virkamäki A., Ueki K., Kahn C.R.: Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanism of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 931-943
- 361.** Vitzthum H., Weiss B., Bachleitner W., Kramer B.K., Kurtz A.: Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int.* 2004; 65: 1180-1190
- 362.** Vlassara H., Brownlee M., Cerami A.: Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. *J. Exp. Med.* 1986; 164: 1301-1309
- 363.** Vliegen H.W., van der Laarse A., Cornelisse C. J., Eulderink F.: Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur. Heart. J.* 1991; 12: 488-494
- 364.** Wang J., Drake L., Sajjadi F., Firestein G.S., Mullane K.M., Bollough D.A.: Dual activation of adenosine A1 and A3 receptors mediates preconditioning of isolated cardiac myocytes. *Eur. J. Pharm.* 1997; 320: 241-248
- 365.** White M.F., Kahn C.R.: The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 1-5
- 366.** Whitehead J.P., Clark S.F., Urse B., James D.E.: Signalling through the insulin receptor. *TiPS.* 1998; 19: 222-228
- 367.** Wyatt D.A., Edmunds M.C., Rubio R., Berne R.M., Lasley R.D., Mentzer R.M. Jr: Adenosine stimulates glycolytic flux in isolated perfused rat hearts by A1-adenosine receptors. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: H1952-H1957
- 368.** Xaus J., Mirabet M., Lloberas J., Soler C., Lluís C., Franco R., Celada A.: IFN- γ up-regulates the A_{2B} adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol.* 1999; 162: 3607-3614
- 369.** Xia P., Inoguchi T., Kern T.S., Engerman R.L., Oates P.J., King G.L.: Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 1994; 43: 1122-1129
- 370.** Xia P., Kramer R.M., King G.L.: Identification of the mechanism for the inhibition of Na, K-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 733-740
- 371.** Xiao S.: Syt (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor stimulated mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 21244-21248
- 372.** Yaar R., Jones M.R., Chen J.F., Ravid K.: Animal models for the study of adenosine receptor function. *J. Cell. Physiol.* 2005; 202(1): 9-20
- 373.** Yakel J.L., Warren R.A., Reppert S.M., North R.A.: Functional expression of adenosine A_{2b} receptor in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 1993; 43: 277-280
- 374.** Yamaguchi S., Umemura S., Tamura K., Iwamoto T., Nyui N., Ishigami T., Ishii M.: Adenosine receptor mRNA in microdissected rat nephron segments. *Hypertension* 1995, 26: 1181-1185

- 375.** Yamagishi S., Nakamura K., Imaizumi: Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic vascular complications. *Cur. Diab. Rev.* 2005; 1: 93-106
- 376.** Yasuda N., Inoue T., Horizoe T., Nagata K., Minami H., Kawata T., Hoshino Y., Harada H., Yoshikawa S., Asano O., Nagaoka J., Murakami M., Abe S., Kobayashi S., Tanaka I.: Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 459: 159-166
- 377.** Ye G., Metreveli N.S., Ren P., Epstein P.N.: Metallothionein prevents diabetes-induced deficits in cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species production. *Diabetes* 2003; 52: 777-783
- 378.** Zak R.: Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ. Res.* 1974; 35(2): suppl II: 17-26
- 379.** Zarich S.W., Nesto R.W.: Diabetic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 1989; 118: 1000-1006
- 380.** Zentella de Pina M., Diaz-Cruz A., Guinzberg R., Pina E.: "Hormone-like" effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. *Life Sci.* 1989; 45(23): 2269-2274
- 381.** Zhang Y., Wells J.N.: The effects of chronic caffeine administration on peripheral adenosine receptors. Corrected and republished article originally printed in *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 254: 757-763
- 382.** Zhou Q., Li C., Olah M.E., Johnson R.A., Stiles G.L., Civelli O.: Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 7432-7436
- 383.** Zhao Z.Q., McGee S., Nakanishi K., Toombs W.E., Johnston C.F., Ashar M.S., Vinten-Johansen J.: Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit. *Circulation* 1993; 88: 709-719
- 384.** Zhao Z., Francis C.E., Ravid R.: An A₃ - subtype adenosine receptor is highly expressed in rat vascular smooth muscle cells: its role in attenuating adenosine-induced increase in cAMP. *Microvasc. Res.* 1997; 54: 243-252
- 385.** Zhao Z., Francis C., Ravid K.: Characterization of the mouse A₃ adenosine receptor gene: exon/intron organization and promoter activity. *Genomics* 1999; 57(1): 152-155
- 386.** Zhao Z., Makaritsis K., Francis C.E., Gavras H., Ravid K.: A role for the A₃ adenosine receptor in determining tissue levels of cAMP and blood pressure: studies in knock-out mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1500: 280-290
- 387.** Zhao Z.Q., Budde J.B., Morris C., Wang N.P., Velez D.A., Muraki S., Guyton R.A., Vinten-Johansen J.: Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by

modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2001; 33(1): 57-68

388. Zhao Z., Yaar R., Ladd D., Cataldo L.M., Ravid K.: Overexpression of A3 adenosine receptors in smooth, cardiac, and skeletal muscle is lethal to embryos. *Microvasc. Res.* 2002; 63: 61-69

389. Consensus Statement. Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1989; 12: 573-582