

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Maciej Jankowski

**PURYNERGICZNA REGULACJA HEMODYNAMIKI
KŁĘBUSZKÓW NERKOWYCH ORAZ TRANSPORTU
JONÓW SODU W CEWKACH NERKOWYCH**

Rozprawa habilitacyjna

Katedra Analityki Klinicznej
Zakład Terapii Monitorowanej i Farmakogenetyki
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. Mirosława Szczepańska-Konkel

Gdańsk 2008

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
Zlecenie KW/153/08

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....	5
WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP.....	7
2. CEL PRACY.....	16
4. WYNIKI I DYSKUSJA	17
4.1. PURYNERGICZNA REGULACJA HEMODYNAMIKI I FILTRACJI KŁĘBUSZKOWEJ	17
4.2. PURYNERGICZNA REGULACJA TRANSPORTU JONÓW SODU W CEWKACH NERKOWYCH ...	23
5. PODSUMOWANIE	26
6. PIŚMIENNICTWO.....	27

WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

1. **Jankowski M**, Szczepańska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S.: cGMP-dependent relaxation of isolated rat renal glomeruli induced by extracellular ATP. *J Physiol* 2001, 530.1: 123-130.
(IF: 4,552; KBN: 16,0)
2. **Jankowski M**, Szczepańska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S.: Involvement of Rho-kinase in P2Y-receptor-mediated contraction of renal glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 302: 855-859.
(IF:2,935; KBN: 12,0)
3. Szczepańska-Konkel M, **Jankowski M**, Stiepanow-Trzeciak A, Angielski S.: Effects of diadenosine polyphosphates on glomerular volume. *Br J Pharmacol* 2005, 114: 1109-1117.
(IF: 3,325; MNiSW: 24,0)
4. Stiepanow-Trzeciak A, **Jankowski M**, Angielski S, Szczepańska-Konkel M.: P¹,P⁴-diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) inhibits proximal tubular reabsorption of sodium in rats. *Nephron Physiol* 2007, 106: 79-84.
5. **Jankowski M**, Angielski S, Szczepańska-Konkel M.: The dissociation the effects of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) on renal haemodynamics and tubular function in rats. *J Physiol Pharmacol* 2008, 58: 129-137.
(IF: 2,974; MNiSW: 20,0)

IF: 13,786; KBN/MNiSW: 72,0

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

ADP	adenozyno-5'-difosforan
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
AMP	adenozyno-5'-monofosforan
cAMP	adenozyno-3',5'-monofosforan
Ap ₃ A	P ¹ ,P ³ -di(adenozyno-5')-trifosforan
Ap ₄ A	P ¹ ,P ⁴ -di(adenozyno-5')-tetrafosforan
Ap ₅ A	P ¹ ,P ⁵ -di(adenozyno-5')-pentaforan
DPCPX	8-cyklopentyl-1,3-dipropylksantyna
DMPX	3,7-dimetylo-1-propargylksantyna
GFR	wskaźnik filtracji kłębuszkowej
GIS	przestrzeń inulinowa kłębuszków nerkowych
NAD	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
P1	receptory purynowe 1
P2	receptory purynowe 2
P2X	receptory purynowe 2X
P2Y	receptory purynowe 2Y
Y-27632	dichlorek (R)-(+)-trans-N-(4-pirydył)-4-(1-aminoetyl) cykloheksakarboksyamidu,
RB-2	błękit reaktywny 2
ODQ	1H-[1,2,4]-oksadiazolo-[4,3a]-quinoksalin-1
UTP	urydyno-5'-trifosforan
UDP	urydyno-5'-difosforan
2-MeSATP	2-metylotio-ATP
MRS 2179	2'-deoksy-N ⁶ -metyladenozyno-3',5'-difosforan
β,γ-meATP	β,γ-metylene-ATP
C _{Na}	klirens sodu
C _{Li}	klirens litu

AUTOREFERAT ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

1. WSTĘP

Wewnątrzkomórkowe stężenie ATP determinuje stan energetyczny komórki, dlatego też przez długie lata nie brano pod uwagę możliwości wyjścia, w warunkach fizjologicznych, tego nukleotydu z komórki do przestrzeni pozakomórkowej i pełnienie w niej określonej roli. Pierwsze doniesienie, wskazujące na potencjalną rolę pozakomórkowych związków purynowych w regulacji funkcji narządów, zostało opublikowane w 1929 roku przez A. N. Drury i A. Szent-Györgyi. Wykazali oni, że adenozyne zmniejsza przepływ krwi przez nerki przy niezmiennym ciśnieniu tętniczym krwi, co wskazywało, iż związek ten może, lokalnie w nerkach, obkurczać łożysko naczyniowe [32]. Późniejsze badania, prowadzone między innymi w naszym laboratorium pod kierunkiem prof. S. Angielskiego, poszerzyły wiedzę na temat metabolizmu adenozyne i jej roli w regulacji funkcji nerek w stanach (pato)fizjologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy i hiperangiotensynemii [4,12]. Badania podjęte przez J.H. Gillespie udokumentowały odmienne biologiczne efekty działania adenozyne i ATP, a tym samym były pierwszą sugestią, iż związki te mogą oddziaływać z biologicznymi efektorami za pomocą różnych systemów przekazu sygnału biologicznego [41]. Jednakże dopiero badania podjęte przez G. Burnstock w latach 70 ubiegłego stulecia pozwoliły na wysunięcie hipotezy, która zakładała istnienie błonowych receptorów purynowych dla adenozyne tzw. receptorów P1 oraz dla ATP i ADP tzw. receptory P2 [21]. Te obserwacje poparte wynikami późniejszych badań, prowadzonych przez różne zespoły badawcze, otworzyły nowe spojrzenie na cząsteczkę ATP, już nie tylko jak na wewnątrzkomórkowy magazyn energii, ale też jako zewnątrzkomórkowy związek sygnałowy umożliwiający komunikację pomiędzy komórkami za pomocą specyficznych receptorów [17,19,25,42,73].

Do grupy cząsteczek sygnałowych oprócz adenozyne, ATP, ADP, UTP oraz UDP w późniejszym czasie zaliczono również dinukleotydy np. diadenozynopolifosforany (Ap_nA), adenzynoguanozynopolifosforany (Ap_nG), adenzynourydynopolifosforany (Ap_nU) oraz dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD) [64,89,94]. Uważa się, że związki te mogą bezpośrednio pobudzać receptory P2, będąc jednocześnie źródłem pozakomórkowych mononukleotydów i nukleozydów [147,151]. Należy jednak podkreślić, że głównym źródłem ATP w płynie pozakomórkowym są komórki uwalniające ten nukleotyd z cytoplazmy w sposób

konstytutywny. Szacuje się, że w ten sposób uwolnieniu może ulec około 0,1-1,0% wewnątrzkomórkowej puli ATP [75]. Badania przeprowadzone w naszym laboratorium wykazały, że izolowane kłębuszki nerkowe uwalniają ATP w tempie 0,3 pmol/min/1000 kłębuszków, a tempo to, pod wpływem drażnienia mechanicznego, ulega zwiększeniu o około 35% [68]. Uwalnianie ATP z komórek jest również stymulowane przez hipotonię płynu pozakomórkowego, hipoksję oraz przez związki auto/parakryne (np. trombina, bradykinina, serotoninina) oddziałujące na komórki za pośrednictwem swoistych receptorów [74]. Należy zaznaczyć, że bodźce te prowadzą głównie do lokalnego wzrostu stężenia ATP w płynie pozakomórkowym, co może prowadzić do inicjacji sygnałowania na drodze auto- lub parakrynej. Na przykład w wyniku hipotonii płynu pozakomórkowego wydzielanie ATP przez komórki nabłonkowe mierzone w odległości 1 μ m od błony komórkowej wzrasta około 1000-krotnie [101]. Do wzrostu stężenia nukleotydów w płynie pozakomórkowym dochodzi również w wyniku ich wydzielania z niektórych wewnątrzkomórkowych struktur, takich jak pęcherzyki synaptyczne zakończeń nerwowych lub ziarnistości gęste trombocytów [14]. W miejscach tych nukleotydy ulegają akumulacji, osiągając stężenie rzędu molarnego, a zaburzenia w ich akumulacji mogą wpływać na ich stężenia w płynie pozakomórkowym. Na przykład stwierdzono zwiększoną akumulację $A_{p_n}A$ lub $G_{p_n}A$ w płytkach krwi u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek oraz pierwotnym nadciśnieniem tętniczym a zmianom tym towarzyszyło podwyższone stężenie tych związków we krwi [58,130]. Z kolei u chorych na cukrzycę wykazano zwiększoną akumulację ATP/ADP w płytkach krwi [88]. Wydaje się, że zwiększone uwalnianie nukleotydów do przestrzeni pozakomórkowej, prowadzące do lokalnego wzrostu ich stężenia, sprzyja u tych pacjentów, ze względu na prozapalne właściwości nukleotydów, rozwojowi zmian miażdżycowych [29,30,118]. Kolejnym źródłem pozakomórkowych nukleotydów są komórki ulegające lizie, co może mieć niebagatelne znaczenie u chorych z ostrym zespołem rozpadu guza, kiedy to w wyniku interwencji terapeutycznej dochodzi do nagłego rozpadu komórek nowotworowych i do masowego uwalniania związków wewnątrzkomórkowych, w tym nukleotydów, do płynu pozakomórkowego [91].

Transport nukleotydów przez błonę komórkową do płynu pozakomórkowego odbywa się w wyniku egzocytozy pęcherzyków wydzielniczych lub przez kanały jonowe [14,22]. Droga egzocytarna jest charakterystyczna dla komórek pobudliwych, ale badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują na możliwość uwalniania ATP na drodze egzocytarnej również przez komórki niepobudliwe, np. komórki śródbłonna czy komórki nabłonkowe cewki bliższej nefronu [13,117,139]. Jednak dominującą drogą uwalniania nukleotydów przez

komórki niebudliwie są kanały jonowe. Postuluje się, że transport nukleotydów odbywa się z wykorzystaniem struktur utworzonych przez białka błonowe, tj. koneksyny i paneksyny [106]. Wśród innych białek błonowych zaangażowanych w transport nukleotydów wymienia się kanały jonowe aktywowane przez rozciąganie (*ang. stretch-activated cation channel*; SAC), błonowe kanały anionowe zależne od napięcia (*ang. plasmalemmal voltage-dependent anion channel*; pl-VDAC), kanały anionowe o wysokiej przewodności 300-400 pS, zwane kanałami „maxi”, oraz białka transportowe ABC [111,116]. Uważa się, że bodźce mechaniczne i biochemiczne poprzez wpływ na wydzielanie ATP mogą prowadzić do zmiany wrażliwości wewnątrzkomórkowych efektorów dla hormonów i neurotransmiterów. Postuluje się, że u podstaw zmiany wrażliwości leży autokrynnie oddziaływanie ATP z komórką i modyfikacja wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. W efekcie może to prowadzić do uwrażliwienia lub powstania oporności komórki na inne bodźce doń docierające [103].

Stężenie ATP i innych nukleotydów w płynie pozakomórkowym uwarunkowane jest, z jednej strony, tempem ich uwalniania z komórek, a z drugiej, aktywnością ekto-enzymów, należących głównie do grupy hydrolaz [146]. Nukleotydy ulegają hydrolizie pod wpływem ekto-pyrofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydowej (NPP), ekto-hydrolazy trifosfodifosfonukleozydowej (E-NTPDazy, CD 93), ekto-5'-nukleotydazy oraz fosfatazy alkalicznej [151]. Ekto-enzymy z grupy NPP (NPP1-3) hydrolizują, między innymi, ATP do AMP i PP_i, ADP do AMP i P_i oraz diadenozynopolifosforany (Ap_nA) do AMP i Ap_{n-1}. W nerkach, przy użyciu metod immunohistochemicznych, wykazano ekspresję NPP3 w kłębuszkach nerkowych oraz w cewce bliższej [121]. Enzymy z grupy E-NTPDazy (NTPDaza1-3) hydrolizują ATP i ADP do AMP oraz UTP i UDP do UMP. Obecność enzymów z grupy E-NTPDazy wykazano przede wszystkim w kłębuszkach nerkowych – na komórkach śródbłonna i mezangium, przestrzeni okołocewkowej (NTPDaza1) oraz w cewce dalszej (NTPDaza2, NTPDaza3) [69,138]. Ekto-5'-nukleotydaza (CD 73) hydrolizuje AMP do adenozy, a wysoką ekspresję tego enzymu stwierdza się w cewce bliższej oraz fibroblastach okołocewkowych [27]. Natomiast fosfataza alkaliczna, charakterystyczna dla cewki bliższej, jest niespecyficzną ekto-fosfomonoesterazą. Współczesne badania biochemiczne dostarczyły także dowodów wskazujących na możliwość powstawania nukleotydów w płynie pozakomórkowym w reakcji katalizowanej przez ekto-kinazę adenylanową i/lub ekto-kinazę difosfonukleozydową [146,147]. Aktywność ekto-kinazy adenylanowej stwierdzono między innymi w kłębuszkach nerkowych [68]. Obecność w nerkach tak wielu różnorodnych ekto-enzymów odpowiedzialnych za przemianę pozakomórkowych nukleotydów, jak i ich powstawanie wskazuje, że aktywność

odpowiednich ekto-enzymów może być czynnikiem ograniczającym lub stymulującym procesy zachodzące w nefronie przy współdziale pozakomórkowych nukleotydów. Wsparciem tej tezy są wyniki doświadczeń przeprowadzonych w różnych stanach patofizjologicznych, w których zmianom aktywności enzymów hydrolizujących nukleotydy towarzyszyły zaburzenia funkcji nerek. Stwierdzono np., że stres oksydacyjny, towarzyszący krótkotrwałemu niedokrwieniu nerki z następczą reperfuzją, obniża w kłębuszkach nerkowych aktywność NTPD-azy [43]. Konsekwencją biochemiczną tych zmian może być lokalny wzrost stężenia nukleotydów przy jednoczesnym spadku stężenia adenozyiny, co prowadzi do zwiększonej agregacji płytek krwi oraz zapoczątkowania lokalnej reakcji zapalnej w mikrokrażeniu kłębuszkowym. Ponadto przejściowe zmniejszenie aktywności E- NTPD-azy stwierdzono podczas xenotransplantacji nerek, a przeciwdziałanie tym zmianom wydłużało czas przeżycia przeszczepu [54]. Również obniżoną aktywność ekto-ATPazy obserwowano w kłębuszkach nerkowych u tych pacjentów, u których po przeszczepie nerki występowało opóźnienie w podjęciu funkcji przez przeszczepiony narząd [135]. Badania dotyczące E-NTPD-azy oraz E-NPP wykazały, że enzymy te odgrywają również rolę w rozwoju nefropatii cukrzycowej. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że E-NPP-1 obniża stopień autofosforylacji receptora insulinowego, prowadząc do zmniejszenia przekazywania sygnału do wnętrza komórki, a nadekspresja tego białka prowadzi do insulinooporności [5]. Ponadto w genie kodujący E-NPP1 stwierdzono zmiany polimorficzne, których występowanie wiąże się z wcześniejszym rozwojem nefropatii cukrzycowej [24]. Z kolei u zwierząt z doświadczalnie wywołaną cukrzycą przez podanie streptozotocyny wykazano, że zablokowanie ekspresji genu dla E-NTPD1 nasila albuminurię oraz szklwienie kłębuszków nerkowych [38], co sugeruje, że zaburzenia metabolizmu pozakomórkowych nukleotydów mogą przyczyniać się do rozwoju nefropatii cukrzycowej.

Liczne badania biochemiczne dostarczyły dowodów, które wskazują na funkcjonalne powiązanie ekto-enzymów metabolizujących pozakomórkowe nukleotydy z ich receptorami. Stwierdzono bowiem, iż centra katalityczne enzymów hydrolizujących nukleotydy zlokalizowane są w pobliżu receptorów purynowych P2 i z tego też względu dostępność nukleotydów do poszczególnych receptorów P2 może ulegać ciągłej zmianie, a aktywność enzymów może być czynnikiem determinującym aktywność receptorów P2 [66,77]. Również wykazano odwrotną zależność – aktywacja receptorów P2 modyfikuje aktywność enzymów hydrolizujących nukleotydy [3,83]. Podobnie jak ma to miejsce w przypadku układu cholinergicznego

i acetylocholiny [150], można założyć, iż istnieje zależność pomiędzy aktywnością enzymów degradujących pozakomórkowe nukleotydy a sygnałowaniem wewnątrzkomórkowym.

Pośród receptorów P2 wyodrębniono dwie grupy: jonotropową – P2X oraz metabotropową – P2Y [20]. Jak do tej pory sklonowano cDNA dla siedmiu receptorów P2X, tj. P2X₁₋₇ oraz dla ośmiu receptorów P2Y tj. P2Y_{1,2,4,6,11-14} [141]. Receptory P2X są kanałami dla Ca²⁺, Na⁺, K⁺ bramkowanymi przez zewnątrzkomórkowy ATP, a ich aktywacja prowadzi do przemieszczenia tych kationów zgodnie z gradientem elektrochemicznym. Powoduje to zmianę potencjału błony komórkowej i otwarcie kanałów wapniowych zależnych od napięcia (*ang. voltage-operated calcium channel*; VOCC), w konsekwencji czego dochodzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [Ca²⁺]_i. Ponadto w przypadku receptorów P2X₇ długotrwała ich ekspozycja na wysokie stężenie ATP prowadzi również do nieselektywnego zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej dla związków chemicznych o masie cząsteczkowej < 900 Da [40]. Badania molekularno-stechiometryczne wykazały, że utworzony przez receptory P2X kanał jonowy jest trimerym lub heksametrem [71]. Receptory P2X₁₋₆ stwierdzono przede wszystkim na komórkach centralnego i obwodowego układu nerwowego oraz na komórkach mięśniówki gładkiej, natomiast receptory P2X₇ głównie na komórkach biorących udział w odpowiedzi immunologicznej [16].

Obecność receptorów P2X₁₋₇ wykazano również w nerkach. Badania czynnościowe, wsparte badaniami immunohistologicznymi oraz autoradiograficznymi dostarczyły dowodów wskazujących na obecność receptorów P2X₁ na tętniczkach doprowadzających [26,44,131]. Stan ich obkurczenia determinuje w 80-90% całkowitą oporność naczyń nerkowych, która z kolei warunkuje przepływ krwi, ciśnienie filtracyjne i filtrację kłębuszkową. W wyniku wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, w zakresie wartości 80-170 mmHg, dochodzi w nerkach do zwiększonego uwalniania ATP, który poprzez receptory P2X₁ zlokalizowane na tętniczkach doprowadzających, prowadzi do ich skurczu utrzymując tempo filtracji kłębuszkowej na stałym poziomie – tzw. zjawisko autoregulacji [81]. Wykazano, że w proces skurczu tętniczki doprowadzającej pośredniczony przez receptory P2X₁ zaangażowane są metabolity kwasu arachidonowego [143,149]. Udział receptorów P2X₁ w autoregulacji został również udokumentowany w doświadczeniach, przeprowadzonych w obecności antagonisty receptorów P2X₁ oraz na tętniczkach doprowadzających wyizolowanych od zwierząt, u których zablokowano ekspresję genu dla receptorów P2X₁ [56,57]. Na rolę układu purynergicznego w autoregulacji wskazują także doświadczenia, w których – stosując technikę mikrodializy narządowej – wykazano, że zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi prowadzi do

wzrostu stężenia ATP w płynie śródmiąższowym nerek [98,99]. Obecność receptorów P2X, poza tętniczką doprowadzającą, wykazano również na naczyniach tętniczych nerek o różnej średnicy, a ich aktywacja prowadzi do skurczu tych naczyń [45]. W obrębie komórek kłębuszka nerkowego stwierdzono w komórkach mezangialnych oraz podocytach białko lub mRNA dla poszczególnych receptorów P2X, co ze względu na zdolność tych komórek do skurczu, wskazuje na możliwość udziału tychże receptorów w regulacji filtracji kłębuszkowej [36,49,110,142].

Również na komórkach nabłonkowych cewek bliższych i dalszych nefronu wykazano obecność receptorów P2X, spośród których receptory P2X₄ i P2X₆ są najbardziej rozpowszechnione [131,148]. Dodatkowo na modelach komórek cewek zbiorczych wykazano obecność również receptorów P2X₅ [45]. Zarówno lokalizacja receptorów P2X na komórkach nabłonkowych cewek na błonie podstawno-bocznej oraz szczytowej oraz to, że zarówno w płynie śródmiąższowym nerek, jak i cewkowym stwierdzono obecność ATP w stężeniu wystarczającym do pobudzenia receptorów P2 wskazuje, że pozakomórkowe nukleotydy, aktywując receptory P2X, mogą wpływać na transport jonów zachodzący w poszczególnych odcinkach nefronu [119,132,144]. Hipotezę tą wspierają wyniki doświadczeń, w których wykazano, że aktywacja receptorów P2X zwiększa metabolizm kwasu arachidonowego, czego efektem jest zwiększona synteza 20-HETE [149]. Związek ten wpływa na reabsorpcję jonów sodu poprzez hamowanie aktywności Na⁺-K⁺-ATPazy w cewce bliższej oraz kotransportera sodowo-potasowo-chlorkowego (NKCC2) w grubościennym odcinku części wstępującej pętli nefronu [86].

Drugą grupę receptorów P2, zwaną P2Y, tworzą receptory sprzężone z białkami G. Receptory te są aktywowane przez nukleotydy adeninowe (ATP, ADP), urydynowe (UTP, UDP), diadenozynopolifosforany (Ap_nA) lub nukleozydodifosfopochodne cukrów (UDP-glukoza, UDP-galaktoza) [1,76]. Do wewnątrzkomórkowych efektorów receptorów P2Y należą: fosfolipaza C β, cyklaza adenylanowa, kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (*ang. mitogen-activated protein kinase*; MAPK), kinazy Rho oraz błonowe kanały jonowe bramkowane napięciem (kanały wapniowe i potasowe) lub białkami G (kanały potasowe) [72]. Z uwagi na zróżnicowane powinowactwo do agonistów w obrębie receptorów P2Y wyróżnia się następujące grupy: 1) aktywowane przez ATP (P2Y₁₁); 2) aktywowane przez ADP (P2Y₁, P2Y₁₂, ₁₃); 3) aktywowane przez UTP (P2Y₂, P2Y₄); 4) aktywowane przez UDP (P2Y₆) oraz 5) aktywowane przez UDP-glukozę i UDP-galaktozę (P2Y₁₄). Wykazano, że receptory P2Y mogą ulegać oligomeryzacji tworząc homodimery (np. P2Y₁, P2Y₂) oraz

heterodimery (np. P2Y₁ i A₁) [95]. Zjawisko oligomeryzacji może odgrywać rolę w obniżeniu wrażliwości komórek na agonistę, bowiem wykazano, że ilość homodimerów w błonie komórkowej wzrasta pod wpływem agonisty, a proces ten poprzedza zjawisko internalizacji receptora [1]. Receptory P2Y są szeroko rozpowszechnione na komórkach różnych narządów [16]. Obecność receptorów P2Y wykazano na naczyniach krwionośnych: tętnicze doprowadzającej – P2Y₁; odprowadzającej – P2Y_{1,2,4,6} oraz na tętnicach i żyłach wewnątrznerkowych – P2Y₁ [45]. Na materiale biologicznym pochodzącym od szczura i myszy, wykazano białko lub mRNA dla receptorów P2Y w kłębuszkach nerkowych (P2Y_{1,2,6}), na komórkach mezangialnych (P2Y_{2,4,6,11,12}) na podocytach (P2Y_{1,2,6}) oraz komórkach nabłonkowych cewek [6,7,8,49,142]. Ponadto doświadczenia przeprowadzone na komórkach śródbłonna, izolowanych z kłębuszków nerkowych, przy użyciu swoistych agonistów receptorów P2 wykazały obecność na tych komórkach receptorów P2Y₂ [105]. Biorąc pod uwagę występowanie receptorów P2Y na komórkach naczyń krwionośnych nerek oraz komórkach kurczliwych kłębuszka nerkowego wydaje się, iż receptory te mogą odgrywać istotną rolę w regulacji hemodynamiki nerek. Ponadto występowanie receptorów należących do grupy P2Y, dla których naturalnymi agonistami są inne nukleotydy, takie jak ADP, UTP sugeruje, że również i te nukleotydy mogą modyfikować przepływ krwi w nerkach oraz filtrację kłębuszkową. Liczne doświadczenia przeprowadzone na hodowanych komórkach będących modelami komórkami cewek bliższych oraz dalszych, jak i te doświadczenia, w których zastosowano perfundowane wybrane fragmenty cewek dostarczyły informacji wskazujących na występowanie receptorów P2Y na komórkach cewek oraz ich zaangażowanie w procesy reabsorpcji jonów sodu i wody. Na przykład wykazano, że analogi ATP za pośrednictwem receptorów P2Y zmniejszają aktywność Na⁺-K⁺-ATPazy w cewkach bliższych, a efekt ten nie jest związany ze zmianą [Ca²⁺]_i [65]. Ponadto, aktywacja receptorów P2Y₂ zwiększa syntezę i wydzielanie prostaglandyny E przez komórki cewki dalszej, a przez to modyfikują przepuszczalność tego odcinka nefronu dla wody [124].

Analizując rozmieszczenie poszczególnych receptorów P2 należących do grupy P2X i P2Y w nerkach uwagę zwraca obecność ich na tych samych strukturach anatomicznych a nawet na tych samych komórkach. Taka lokalizacja receptorów może prowadzić do wzajemnego oddziaływania receptorów P2X oraz P2Y na poziomie zarówno receptorem, jak i postreceptorowym. Zjawisko oddziaływania pomiędzy receptorami P2X i P2Y opisano między innymi, w trombocytach, gdzie wykazano synergistyczny wpływ pobudzenia receptorów P2 na [Ca²⁺]_i [140]. Z kolei na komórkach glejaka C6, zbliżonych fenotypowo do astrocytów,

wykazano, że oddziaływanie pomiędzy receptorami P2Y₁ i P2Y₁₂ może modyfikować aktywność wewnątrzkomórkowych kinaz warunkujących proliferację i różnicowanie komórek [10].

Wyniki licznych badań wskazują na to, że pozakomórkowe nukleotydy mogą modyfikować filtrację kłębuszkową, której zmiany tempa należy rozważać w powiązaniu ze zmianami aktywności cewkowych systemów transportowych, przede wszystkim dla jonów sodu. Wzrost tempa filtracji kłębuszkowej zwiększa zdolność komórek cewki bliższej do reabsorpcji elektrolitów i wody (tzw. równowaga kłębuszkowo-cewkowa), ale jednocześnie prowadzi do sytuacji, w której do cewki dalszej dociera zwiększona ilość jonów sodu, co w konsekwencji pociąga za sobą zmiany w hemodynamice nerek. Komórki nabłonkowe cewki dalszej w odcinku wstępującym pętli Henlego bezpośrednio kontaktujące się z tętniczką doprowadzającą oraz pośrednio z naczyniami kapilarnymi kłębuszka nerkowego tworzą tzw. plamkę gęstą. Charakteryzują się one wysoką aktywnością kotransportera sodowo-potasowo-chlorkowego (*ang.* Na-K-Cl *cotransporter*; NKCC) zlokalizowanego w błonie luminalnej, wysoką przepuszczalnością dla wody, dużą ilością mitochondriów oraz niską aktywnością Na-K-ATPazy w błonie podstawno-bocznej [11]. Właściwości te umożliwiają komórkom plamki gęstej dostosowywanie tempa reabsorpcji jonów sodu do ich stężenia w płynie cewkowym, a co więcej, leżą u podstaw powstania i przekazania sygnału do efektorów regulujących hemodynamikę kłębuszków nerkowych. W konsekwencji dochodzi do zmniejszenia tempa filtracji kłębuszkowej oraz ilości przefiltrowanych jonów sodowych. Proces ten nosi nazwę sprzężenia cewkowo-kłębuszkowego (*ang.* *tubuloglomerular feedback*, TGF). Spośród proponowanych substancji sygnałowych, wykazujących właściwości naczynioruchowe, istotne znaczenie wydaje się, że pełni ATP oraz adenozyne [25,80,100]. Szczególne zainteresowanie budzi ATP, którego stężenie w płynie śródmiąższowym nerek ulega zmianom zależnym od aktywności TGF [98]. Inną konsekwencją wynikającą ze zwiększonej ilości jonów sodu docierających do cewki dalszej jest ich zwiększona reabsorpcja przez komórki nabłonkowe cewek łączących z wykorzystaniem kanałów sodowych (*ang.* *epithelial Na channel*; ENaC). Informacja ta jest przekazywana do tętniczki doprowadzającej, powodując jej rozkurcz, a w konsekwencji dochodzi do zwiększenia tempa filtracji kłębuszkowej. Jak do tej pory nie została zidentyfikowana substancja sygnałowa dla tego procesu, nazwanego – sprzężeniem cewka dystalna-kłębuszek (*ang.* *connecting tubule glomerular feedback*; CTGF), ale pod uwagę bierze się również związki purynowe [108]. Analizując rolę układu purynergicznego w regulacji funkcji nefronu, należy również mieć na uwadze to, iż pozakomórkowe nukleotydy mogą być zaangażowane w TGF i CTGF na etapie sygnałowania, ale również mogą bezpośrednio oddziaływać

na komórki płamki gęstej oraz cewek łączących modyfikując aktywność NKCC oraz ENaC [15,79,134]. Tak więc prawdopodobnie TGF oraz CTGF, *in vivo*, w sposób ciągły i przeciwny dostosowują tempo filtracji kłębuszkowej do aktywności systemów transportowych cewek nerkowych.

Reasumując szerokie rozpowszechnienie receptorów P2 w nerkach, których aktywacja może zmieniać hemodynamikę nerek i filtrację kłębuszkową, a także aktywność systemów transportowych w cewkach bliższych i dalszych sugeruje, iż układ purynergiczny wydaje się być istotnym ogniwem w regulacji funkcji nerek. Tezę tę wzmacniają wyniki badań *in vivo* i *in vitro* przeprowadzonych w naszym laboratorium.

2. CEL PRACY

Z wcześniej przeprowadzonych przez mnie badań wynika, że pozakomórkowy ATP jest potencjalnym czynnikiem wpływającym na motorykę naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego. Za pośrednictwem receptorów P2X i P2Y wywołuje on skurcz bądź rozkurcz kłębuszków, przez co zmienia wielkość powierzchni filtracyjnej – czynnika warunkującego tempo filtracji kłębuszkowej.

Celem obecnej pracy było wyjaśnienie czy inne pozakomórkowe mononukleotydy i dinukleotydy, podobnie jak ATP, pobudzają motorykę naczyń kapilarnych kłębuszków nerkowych oraz czy znajduje to swój wyraz w zmianach hemodynamiki nerek w doświadczeniach *in vivo*. Podjęto również próbę scharakteryzowanie wewnątrzkomórkowych dróg sygnałowania leżących u podstaw zmian w dynamice kłębuszków nerkowych, wynikających z aktywacji receptorów purynowych P2. Ponadto przeprowadzono doświadczenia na znieczulanych zwierzętach, których celem było zbadanie *in vivo* potencjalnych właściwości natriuretycznych pozakomórkowych nukleotydów.

Szczegółowe cele poszczególnych etapów pracy badawczej:

1. Ocena reaktywności izolowanych kłębuszków nerkowych, mierzona ich zdolnością do skurczu lub rozkurczu, w stosunku do: mononukleotydów (ADP, AMP, UTP) oraz dinukleotydów (diadenozynopolifosforany; Ap₃A, Ap₄A, Ap₅A), będących agonistami receptorów P2 i potencjalnymi prekursorami mononukleotydów.
2. Ocena zaangażowania izoenzymów syntazy tlenu azotu, cytoplazmatycznej cykazy guanylanowej w rozkurcz kłębuszków oraz kinaz Rho w skurcz kłębuszków pośredniczony przez receptory P2.
3. Ocena *in vivo* potencjalnej roli układu purynergicznego w regulacji tempa filtracji kłębuszkowej oraz wydalania jonów sodu wraz z identyfikacją miejsc transportu jonów sodu w nefronie, podlegających regulacji przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

4.1. Purynergiczna regulacja hemodynamiki i filtracji kłębuszkowej

Filtracja kłębuszkowa jest procesem zachodzącym w kłębuszkach nerkowych, utworzonych przez sieć naczyń kapilarnych otoczonych torebką Bowmana. Zewnętrzna strona naczyń kapilarnych opleciona jest przez podocyty oraz ich wypustki stopowate. Natomiast pomiędzy pętlami naczyń kapilarnych znajdują się komórki mezangialne, tworzące wraz z macierzą pozakomórkową – mezangium. Zasadniczym elementem filtru kłębuszkowego jest błona podstawna, w której zakotwiczone są komórki mezangialne, oraz błona szczelinowa rozpięta pomiędzy wypustkami stopowatymi podocytów. Błona podstawna, od strony światła naczynia, pokryta jest nieciągłą warstwą komórek śródbłonna. Komórki te charakteryzują się zdolnością do produkcji i wydzielania związków o działaniu naczynioruchowym, m.in. tlenek azotu, prostaglandyny, kininy. Z kolei mezangiocyty i podocyty, dzięki ich zdolności do skurczu i rozkurczu, zmieniają powierzchnię filtracyjną oraz jej przepuszczalność i w ten sposób tworzą wewnątrz-kłębuszkowy system regulujący hemodynamikę i filtrację kłębuszkową [85,92]. W komórkach tych wykazano obecność szeregu receptorów wrażliwych na działanie substancji o działaniu naczynioruchowym, takich jak angiotensyna II, wazopresyna, adenozyne, ANF – indukujących skurcz bądź relaksację kłębuszków nerkowych [123]. W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono roli receptorów purynowych w regulacji hemodynamiki kłębuszków nerkowych, ze szczególnym uwzględnieniem ATP i innych agonistów receptorów P2, których obecność wykazano na wszystkich trzech typach komórek kłębuszka nerkowego [8,36,49,110,142].

Właściwości naczynioruchowe ATP w odniesieniu do naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego zostały po raz pierwszy wykazane w naszym laboratorium [60]. Na modelu izolowanych, szczurzych kłębuszków nerkowych, pozbawionych torebki Bowmana oraz tętniczki doprowadzającej i odprowadzającej, wykazaliśmy, że ATP dodany do zawiesiny kłębuszków obkurcza je, a kłębuszki uprzednio obkurczone angiotensyną II – rozkurcza. Stosowanym przez nas wyznacznikiem skurczu i rozkurczu kłębuszka jest jego objętość inulinowa (ang. *glomerular inulin space, GIS*), której zmiany są odzwierciedleniem zmian przestrzeni wewnątrzkapilarnej. Wcześniejsze badania dowiodły, że aparat kurczliwy izolowanych kłębuszków nerkowych jest wrażliwy na działanie znanych czynników naczynioaktywnych, takich jak angiotensyna II, adenozyne, ANF, co znalazło swój wyraz w odpowiednich zmianach wartości GIS [39,113,114,126,128].

Stosując powyższy model doświadczalny, po raz pierwszy wykazaliśmy, że nie tylko ATP, ale również inne nukleotydy, jak ADP i UTP, posiadają właściwości naczynioruchowe w odniesieniu do izolowanych kłębuszków nerkowych. Z kolei AMP takiego działania na kłębuszki nie wykazywał. Działanie ADP i UTP na kłębuszki nerkowe, podobnie jak działanie ATP, jest krótkotrwałe i dwukierunkowe – bowiem nukleotydy te wywołują skurcz kłębuszków rozkurczonych i odwrotnie, rozkurczają kłębuszki uprzednio obkurczone angiotensyną II [61,63]. Również diadenozynopolifosforany (Ap_nA), takie jak: Ap_3A , Ap_4A i Ap_5A , zmieniają napięcie naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego. Badania wykazały, że Ap_3A indukuje rozkurcz a Ap_4A i Ap_5A skurcz izolowanych kłębuszków nerkowych [125]. Zmiany wywołane przez dinukleotydy, przeciwnie do zmian wywołanych przez mononukleotydy, są długotrwałe, co można tłumaczyć, przynajmniej częściowo, zwiększoną opornością diadenozynopolifosforanów na działanie ekto-hydrolaz [84,151].

Rozważając zaangażowanie receptorów purynowych w dynamice naczyń kapilarnych kłębuszka, można przyjąć, że receptory P2 – zarówno typu P2X, będące kanałami jonowymi, jak i typu P2Y, związane z białkami G – obecne na wszystkich trzech rodzajach komórek kłębuszka, pośredniczą w skurczu lub rozkurczu, indukowanym przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy. Pośrednich dowodów wskazujących na udział receptorów P2Y w mediowaniu rozkurczu izolowanych kłębuszków dostarczyły doświadczenia, które wykazały, że antagonisty receptorów P2 o wysokim powinowactwie do receptorów P2Y – błękit reaktywny 2 – hamuje rozkurczające działanie ATP/ADP oraz Ap_3A [63,125]. Z kolei doświadczenia z użyciem analogów ATP jednoznacznie potwierdziły zaangażowanie receptorów P2Y w mediowaniu rozkurczu kłębuszków, uprzednio obkurczonych angiotensyną II. 2-Metylotio-ATP (2-MeSATP), agonista szerokiego spektrum receptorów P2Y ($P2Y_{1,6,11-13}$), dodany do zawiesiny kłębuszków obkurczonych angiotensyną II rozkurczał je, podczas gdy inny analog, β,γ -metyleno-ATP (β,γ -meATP) – agonista receptorów P2X ($P2X_{1,3}$), takiego działania nie wykazywał [1,61,62]. Użycie wysoce specyficznego antagonisty receptorów P2Y₁, tj. MRS 2179, umożliwiło zidentyfikowanie typu receptora, za pośrednictwem którego Ap_3A indukuje rozkurcz izolowanych kłębuszków nerkowych [125].

Z prowadzonych przez nas badań nad mechanizmem obkurczania izolowanych kłębuszków wynika, że mediatorami skurczu mogą być receptory należące do typu P2X, jak również pośredniczące w rozkurczu receptory typu P2Y. Okazało się bowiem, że czynnikami obkurczającymi izolowane kłębuszki, oprócz naturalnych mononukleotydów (ATP, ADP, UTP) i dinukleotydów (Ap_4A i Ap_5A) są również wyżej wspomniane analogi ATP, tj. β,γ -meATP –

agonista receptorów P2X oraz 2-MeSATP – agonista receptorów P2Y. Ponadto obkurczające działanie ATP można było całkowicie zahamować, gdy do środowiska kłębuszków dodano inhibitor receptorów P2 – suraminę lub inhibitor receptorów typu P2Y – błękit reaktywny 2 [62].

Analizując wywołany przez nukleotydy adeninowe skurcz oraz rozkurcz kłębuszków, konieczne było uwzględnienie możliwości interakcji adenozyiny z receptorami P1 (A_1 , A_2 i A_3). Mono- i dinukleotydy adeninowe są potencjalnymi prekursorami adenozyiny w płynie pozakomórkowym. Związki te w przestrzeni pozakomórkowej ulegają hydrolizie w obecności ekto-hydrolaz, między innymi do adenozyiny [133]. Wielokrotnie udokumentowano, że adenozyina indukuje skurcz izolowanych kłębuszków lub mezangiocyty, poprzez aktywację receptorów A_1 , oraz rozkurcza naczynia krwionośne, poprzez aktywację receptorów typu A_{2A} i A_{2B} [33,37,46,47,102]. Aby określić możliwy udział receptorów P1 w indukowanym przez di- i mononukleotydy skurczu i rozkurczu kłębuszków, działanie tych związków badano w obecności inhibitorów receptorów adenozyiny, tj. teofiliny i syntetycznych pochodnych ksantyny (DPCPX, DMPX). Okazało się jednak, że zablokowanie receptorów adenozyinowych nie zmienia, w zauważalny sposób, działania badanych przez nas mono- i dinukleotydów.

Biorąc pod uwagę profil receptorowy agonistów indukujących rozkurcz naczyń krwionośnych, można wnioskować, że w proces rozkurczu kłębuszków nerkowych zaangażowane są receptory typu: $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$ [1]. Hipotezę tę wzmacniają doniesienia na temat obecności tych receptorów na komórkach kłębuszka nerkowego, m.in. na komórkach śródbłonna [45,105]. Jednakże doniesienia z ostatnich lat wskazują, że komórki śródbłonna naczyń posiadają również receptory P2X, które mediują rozkurcz naczyń krwionośnych [50,51,145]. Z naszych obserwacji nie wynika, aby receptory P2X, przynajmniej $P2X_1$ i $P2X_3$, uczestniczyły w rozkurczu izolowanych kłębuszków nerkowych. Natomiast receptory P2X, a także receptory typu P2Y pośredniczą w skurczu kłębuszka wywołanym obecnością nukleotydów w środowisku pozakomórkowym, i prawdopodobnie jest to efektem aktywacji puli receptorów zlokalizowanych na komórkach kurczliwych, czyli mezangiocytych i podocytach. Nie można też wykluczyć wzajemnego oddziaływania receptorów P2X i P2Y, polegającego na częściowym buforowaniu efektu aktywacji receptorów zlokalizowanych na komórkach kurczliwych kłębuszka przez receptory zlokalizowane na komórkach śródbłonna. Taki mechanizm buforowania, polegający na zaangażowaniu różnych typów receptorów adenozyinowych (A_1 i A_{2A}), których aktywacja prowadzi do przeciwnych efektów, opisano dla tętniczek kłębuszka nerkowego [97].

Liczne doniesienia z różnych ośrodków badawczych oraz obserwacje własne skłaniają do postawienia tezy, że przeciwny kierunek działania zewnątrzkomórkowych nukleotydów, wyrażający się skurczem i rozkurczem kłębuszków nerkowych, wynika z pobudzenia obu typów receptorów P2, zlokalizowanych na mezagiocytach i podocytach (skurcz) lub na komórkach śródbłónka (rozkurcz). Tym samym wydaje się, że o kierunku zmian objętości kłębuszka decyduje głównie typ komórek receptorowych kłębuszka, ekspozycyjnych na działanie pozakomórkowych nukleotydów. Rola odpowiedniego typu komórek receptorowych w procesie skurczu i relaksacji została dobrze udokumentowana, m.in. dla tętnicy nerkowej. Wykazano bowiem, że aktywacja receptorów purynowych P2X₁ czy P2Y₂ zlokalizowanych na mięśniówce tętnicy nerkowej prowadzi do skurczu, natomiast zlokalizowanych na komórkach śródbłónka tętnicy nerkowej prowadzi do zależnego od NO rozkurczu [44,45].

Jest więc prawdopodobne, że o kierunku zmian objętości kłębuszka, i tym samym o wielkości powierzchni filtracyjnej, decydować będzie dostępność agonisty znajdującego się w płynie pozakomórkowym do odpowiedniego typu komórek receptorowych, tj. komórek śródbłónka lub mezagiocytów i podocytów.

Unikatowe, dwukierunkowe działanie pozakomórkowych mononukleotydów, w tym głównie ATP i ADP ze względu na ich uwalnianie na drodze auto- i parakrynej przez komórki kłębuszka, pozwala sytuować te związki pośród szczególnych czynników regulujących filtrację kłębuszkową. Zważywszy na strukturę kłębuszka nerkowego, a szczególnie na występowanie tzw. pętli mezangialnych, oplatające naczynia kapilarne [55], naprzemienny skurcz i rozkurcz kłębuszka nerkowego może, w warunkach fizjologicznych, ułatwiać przepływ krwi przez naczynia kapilarne kłębuszka nerkowego. Z drugiej strony, długotrwała ekspozycja receptorów purynowych na nukleotydy, w sytuacji zwiększonego ich uwalniania (np. z komórek układu immunologicznego w przebiegu kłębuszkowego zapalenia nerek) może przyczynić się do zaburzenia funkcji kłębuszków, a w konsekwencji do upośledzenia funkcji nerek [34,53].

Przedmiotem naszych dociekań był również wewnątrzkomórkowy mechanizm sygnałowania, prowadzący do rozkurczu oraz skurczu izolowanych kłębuszków nerkowych pod wpływem ATP. Jednym z klasycznych mediatorów rozkurczu naczyń jest NO, powstający w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (*ang. nitric oxide synthase*; NOS), enzymem konstytutywnym, występującym w kłębuszkach nerkowych w dwóch izoformach – endotelialnej i neuronalnej. W oparciu o pomiar akumulacji L-cytruliny wykazaliśmy, że ATP zwiększa aktywność NOS w kłębuszkach nerkowych, a efekt ten całkowicie znosi niespecyficzny

inhibitor enzymu – N^ω-nitro-L-arginina. Z kolei specyficzny inhibitor izoformy neuronalnej NOS, 7-nitroindazol, nie zmieniał działania ATP na kłębuszki. Powyższe wyniki wskazują na zaangażowanie tlenku azotu powstałego w reakcji katalizowanej przez endotelialną izoformę NOS w indukowanym przez ATP rozkurczu kłębuszków nerkowych. Rola NO powstającego w wyniku aktywacji receptorów, w tym receptorów P2Y, zlokalizowanych na komórkach śródbłonna naczyń, w rozkurczającym działaniu na naczynia krwionośne jest dobrze udokumentowana w światowym piśmiennictwie [23,31,70]. Wieloletnie badania biochemiczne prowadzone w licznych laboratoriach dostarczyły dowodów na to, że NO prowadzi do rozkurczu mięśniówki gładkiej na drodze zależnej od kinazy białkowej G oraz niezależnej od tego enzymu [93]. Rozkurcz na drodze zależnej od kinazy białkowej G jest wynikiem aktywacji, za pośrednictwem NO, cytoplazmatycznej cyklazy guanylanowej i wzrostu syntezy cGMP. Wykazaliśmy, że inhibitory cytoplazmatycznej cyklazy guanylanowej (niespecyficzny – błękit metylenowy oraz specyficzny – ODQ) znoszą stymulowany przez ATP rozkurcz kłębuszków oraz akumulację cGMP. Tak więc rozkurcz kłębuszków nerkowych, indukowany przez ATP, jest zależny od cGMP i najprawdopodobniej od kinazy białkowej G. Reasumując, wyniki doświadczeń pozwoliły na ustalenie purynergicznego szlaku sygnałowego wiodącego do rozkurczu kłębuszków nerkowych oraz prawdopodobnych zmian w filtracji kłębuszkowej, co można opisać w następujący sposób:

*Pozakomórkowy nukleotyd → receptor P2Y₁/P2Y₂/P2Y₄ → ↑[Ca²⁺]_i → NO → cGMP →
→ rozkurcz kłębuszków → ↑ powierzchnia filtracyjna → ↑ filtracja kłębuszkowa*

Nie wydaje się, aby zwiększenie powierzchni filtracyjnej, było jedynym mechanizmem, przez który zewnątrzkomórkowe nukleotydy modyfikują filtrację kłębuszkową. Wykazano bowiem, że stymulacja receptorów P2 zwiększa przepuszczalność komórek śródbłonna drobnych naczyń krwionośnych [129]. Tym samym jest prawdopodobne, że badane nukleotydy mogą wpływać również na „szczelność” filtru kłębuszkowego. Taki mechanizm działania zaobserwowano dla estrogenu, który – nie zmieniając ciśnienia tętniczego krwi – zwiększał współczynnik przepuszczalności filtru kłębuszkowego i w konsekwencji prowadził do wzrostu filtracji kłębuszkowej [107].

Kolejne badania dostarczyły przesłanek, wskazujących, iż opisany purynergiczny szlak sygnałowania może zachodzić podczas stosowania leków modyfikujących aktywność układu sercowo-naczyniowego. Wykazaliśmy bowiem, że selektywny antagonist receptorów

β_1 -adrenergicznych, jakim jest nebiwolol, zwiększa uwalnianie ATP z izolowanych kłębuszków nerkowych, prowadząc jednocześnie do ich rozkurczu, a proces ten zachodzi z zaangażowaniem NOS i cytoplazmatycznej cyklazy guanylanowej [67].

Innym mechanizmem prowadzącym do rozkurczu kłębuszków nerkowych w obecności ATP mogą być procesy zależne od cyklooksygenazy 1 (COX-1), enzymu katalizującego przemianę kwasu arachidonowego w nietrwałą prostaglandynę H_2 (PGH_2), będącą prekursorem prostaglandyny E_2 (PGE_2) oraz prostacykliny I_2 (PGI_2). Prostanoidy te poprzez aktywację receptorów EP4 oraz IP zwiększają syntezę cAMP, a ten z kolei aktywuje kinazę białkową A (PKA), doprowadzając do rozkurczu naczyń krwionośnych. Przesłanką wskazującą na zaangażowanie takiego mechanizmu jest obecność COX-1, EP4 oraz IP w kłębuszkach nerkowych [48,87], a także wyniki doświadczeń, w których analog PGI_2 , iloprost, zapobiegał obkurczeniu izolowanych kłębuszków nerkowych pod wpływem cyklosporyny A [78]. Ponadto stwierdzono, że aktywność COX ulega zwiększeniu pod wpływem NO, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia syntezy prostanoidów [28,90]. Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz to, że zewnątrzkomórkowy ATP zwiększa uwalnianie NO w izolowanych kłębuszkach nerkowych, można wnioskować, że ATP za pośrednictwem receptorów P2Y uruchamia wzajemnie oddziaływujące szlaki metaboliczne, zależne od cGMP i cAMP. Z przeprowadzonych przez nasz zespół badań wynika, że aktywacja obu szlaków, zależnych od cAMP i cGMP, jest konieczna do wystąpienia stymulowanego przez ATP rozkurczu izolowanych kłębuszków nerkowych, bowiem zablokowanie jednego z nich znosi rozkurczające działanie ATP (*dane nie publikowane*). Jak wynika z licznych doniesień, stymulacja aktywności PKA prowadzi do rozkurczu mięśniówki naczyń krwionośnych. Jednakże kilka ostatnich doniesień wskazuje na udział tego enzymu również w obkurczaniu naczyń krwionośnych [52,137]. Badania przeprowadzone w naszym laboratorium ujawniły między innymi obkurczające działanie niektórych pochodnych cAMP w odniesieniu do izolowanych kłębuszków nerkowych [136]. Podsumowując, rola PKA oraz wzajemna relacja szlaków zależnych od cAMP i cGMP w stymulowanym przez ATP rozkurczu kłębuszków nerkowych wymaga dalszych, pogłębionych badań.

Liczne dowody doświadczalne wskazują, że aktywacja receptorów P2 prowadzi do wzrostu $[Ca^{2+}]_i$, co z kolei w mezangiocytach oraz podocytach prowadzi do, zależnej od kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina, aktywacji kinazy lekkich łańcuchów miozyny i fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny. W efekcie dochodzi do oddziaływania miozyny z aktyną, czego rezultatem jest skurcz mezangiocytów i podocytów [92,123]. Badania nad mechanizmem

skurczu miocytów dostarczyły dowodów na istnienie alternatywnego mechanizmu skurczu, z udziałem kinaz Rho [112]. W celu weryfikacji hipotezy zakładającej udział kinaz Rho w stymulowanym przez zewnątrzkomórkowym ATP skurcz izolowanych kłębuszków, wykonana została seria doświadczeń z użyciem specyficznego inhibitora kinaz Rho (Y27632). Wyniki przeprowadzonych przez nas badań wykazały zaangażowanie kinaz Rho w wywołany przez ATP, ADP, UTP i mediowany przez receptory P2 skurcz izolowanych kłębuszków nerkowych. Wydaje się, że ewentualne zmiany w wewnątrzkomórkowym sygnałowaniu na poziomie kinaz Rho mogą przyczyniać się do zaburzeń w dynamice naczyń np. u pacjentów z cukrzycą typu 1 czy też w nadciśnieniu tętniczym [18,130].

Aby ocenić, czy obserwowane zmiany objętości izolowanych kłębuszków nerkowych znajdują odzwierciedlenie w zmianach hemodynamiki i filtracji kłębuszkowej, przeprowadziliśmy serię doświadczeń na znieczulonych szczurach, którym do krążenia ogólnego podawano dinukleotyd – Ap_4A . Nukleotyd ten użyto ze względu na dłuższy czas trwania we krwi krążącej ($T_{1/2}$: ~ 3 min [84]) niż testowane w doświadczeniach *in vitro* mononukleotydy ($T_{1/2}$ dla ATP <0,2 s [96]). W zastosowanych warunkach doświadczalnych Ap_4A zmieniał hemodynamikę nerek, co znajdowało swój wyraz w spadku filtracji kłębuszkowej i przepływu krwi przez nerki. Zważywszy, iż produktem hydrolizy Ap_4A jest adenozyne, nukleozyd o potwierdzonym działaniu obniżającym hemodynamikę nerek, zastosowano teofilinę, która nie zmieniała działania Ap_4A . Z kolei suramina, antagonistą receptorów P2, całkowicie zahamowała działanie Ap_4A na nerki. Wyniki tych doświadczeń potwierdziły udział receptorów P2 w regulacji hemodynamiki kłębuszków nerkowych, jednak nie pozwoliły ustalić, czy czynnikiem indukującym receptory P2 jest Ap_4A *per se* czy też jego metabolit ATP.

4.2. Purynergiczna regulacja transportu jonów sodu w cewkach nerkowych

W doświadczeniach *in vivo* wykazaliśmy, że zewnątrzkomórkowe nukleotydy mogą odgrywać istotną rolę w regulacji nie tylko tempa filtracji kłębuszkowej, ale i reabsorpcji jonów sodu i wody. Badania wykazały, że Ap_4A zwiększa wydalanie jonów sodu z moczem, pomimo że obniża ładunek filtrowanego sodu [122]. Należy podkreślić, że cewkowe systemy transportu jonów sodu okazały się bardziej wrażliwe na Ap_4A niż mechanizmy regulujące hemodynamikę, bowiem dziesięciokrotnie mniejsza dawka Ap_4A hamowała reabsorpcję sodu w nerkach [59]. Suramina zahamowała działanie natriuretyczne i diuretyczne Ap_4A , podczas gdy teofilina była bez wpływu, co potwierdza, że również transport jonów sodu może podlegać purynergicznej regulacji z zaangażowaniem receptorów P2 [127].

W oparciu o badania klirensowe litu i sodu określono, że miejscem działania Ap_4A w nefronie jest głównie cewka bliższa [122]. Głównym mechanizmem transportu jonów w cewkach bliższych jest $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$, która jest punktem uchwytu działania wielu hormonów na reabsorpcję jonów sodu w cewce bliższej. Istnieją doniesienia, iż miejscem regulacji natriurezy może być również wymiennicz jonów sodu na proton (NHE) [35]. Z badań prowadzonych na hodowli komórek wynika, że analogi ATP za pośrednictwem receptorów P2Y zmniejszają aktywność $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$ [65]. Z kolei na izolowanych cewkach bliższych wykazano, że aktywacja receptorów P2Y_1 prowadzi do zahamowania aktywności NHE-3 [9]. Wykazano również, że aktywacja receptorów P2X zwiększa metabolizm kwasu arachidonowego, w efekcie czego dochodzi do zwiększenia syntezy 20-HETE, czynnika hamującego aktywność $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$ [86,149]. Biorąc pod uwagę badania własne *in vivo* oraz innych autorów *in vitro*, a także fakt występowania w cewce bliższej receptorów purynowych P2 , można wnioskować, że Ap_4A i/lub jego metabolit ATP są naturalnie występującymi czynnikami regulującymi reabsorpcję jonów sodu w nerkach.

Posługując się parametrami opisującymi frakcyjne wydalanie jonów sodu i wody, wyliczono, że frakcja sodu wydalanego z moczem w stosunku do napływającej do cewki dalszej nie zmienia się pod wpływem Ap_4A , pomimo że doszło do zwiększenia ładunku sodu docierającego do cewki dalszej. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że Ap_4A stymuluje reabsorpcję jonów sodu w cewce dalszej. Kwestią pozostającą przedmiotem dalszych badań jest próba odpowiedzi na pytanie, czy zwiększona reabsorpcja jonów sodu w cewce dalszej jest efektem kompensacji dystalnej czy wynikiem oddziaływania receptorów P2 z białkami transportującymi jony sodu? Wydaje się, że zmiany te mogą mieć charakter kompensacyjny, jako że w większości prac autorzy wskazują raczej na hamowanie niż aktywację reabsorpcji jonów sodu w cewce dystalnej w wyniku aktywacji receptorów P2 [109,134,144].

Jak wynika z przeprowadzonych badań, Ap_4A zwiększał ładunek jonów sodu docierających do cewki dystalnej, co w świetle współczesnego stanu wiedzy powinno prowadzić do zwiększonej sekrecji i wydalania jonów potasu z moczem [115]. Brak efektu kaliuretycznego sugeruje, że Ap_4A , bądź jego metabolity (ATP i adenozyne), za pośrednictwem receptorów purynowych zlokalizowanych w cewce dalszej hamują sekrecję jonów potasu. Takie działanie zostało wcześniej opisane dla adenozyne i ATP [82,133].

Reasumując, wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że układ purynergiczny może być istotnym ogniwem w regulacji gospodarki wodno-sodowej organizmu, a Ap_4A przez zdolność do stymulacji natriurezy przy jednoczesnym braku efektu na wydalanie potasu może być

wykorzystywany w stanach przebiegających z retencją sodu w organizmie. Ze względu na to, że zaburzenia równowagi pomiędzy reabsorpcją a wydalaniem jonów sodu leżą u podstaw rozwoju pierwotnego nadciśnienia tętniczego, głównej przyczyny chorób układu krążenia prowadzącej do zgonu, modyfikacja aktywności układu purynergicznego może stać istotnym elementem farmakoterapii nadciśnienia tętniczego [2,120].

5. PODSUMOWANIE

1. Obecność na komórkach nefronu receptorów purynowych P2 oraz ekto-enzymów uczestniczących w metabolizmie nukleotydów wskazuje na potencjalną rolę pozakomórkowych nukleotydów w regulacji mikrokrażenia kłębuszkowego oraz aktywności cewkowych systemów transportowych.
2. Zewnątrzkomórkowe nukleotydy, oddziałując poprzez receptory P2 na komórki kłębuszka nerkowego, zmniejszają lub zwiększają powierzchnię filtracyjną i w ten sposób mogą uczestniczyć w regulacji tempa filtracji kłębuszkowej.
3. Wydaje się, że o kierunku zmian w filtracji kłębuszkowej decyduje dostępność nukleotydów do receptorów P2 zlokalizowanych czy to na komórkach śródbłonna, czy na mezagiocytach i/lub podocytach, natomiast w mniejszym stopniu kierunek tych zmian zależy od rodzaju receptorów.
4. Analiza biochemiczna dynamiki kłębuszków nerkowych wskazuje, że proces rozkurczu jest zależny od aktywności endotelialnej izoformy syntazy tlenku azotu oraz cytoplazmatycznej cyklazy guanylanowej, natomiast w procesie skurczu uczestniczą kinazy Rho.
5. Pozakomórkowe nukleotydy biorą udział w regulacji metabolizmu jonów sodu, prowadząc do zwiększenia ich wydalania z moczem na drodze hamowania systemów transportowych sodu zlokalizowanych w cewce bliższej nefronu. Dlatego też można przyjąć, że układ purynergiczny w nerkach jest zaangażowany w regulację gospodarki wodno-sodowej organizmu, a farmakologiczna modyfikacja aktywności tego układu może być wykorzystana w stanach patologicznych przebiegających z retencją sodu w organizmie np.: niewydolność krążenia, marskość wątroby.

6. PIŚMIENNICTWO

1. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynames JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanism and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006, 58: 281-341.
2. Adrogué HJ, Madias NE. Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med* 2007, 356: 1966-1978.
3. Alvarado-Castillo C, Harden TK, Boyer JL. Regulation of P2Y₁ receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol* 2005, 67: 114-122.
4. Angielski S, Jakubowski Z, Pawelczyk T, Piec G, Redlak M. Renal handling and metabolism of adenosine in diabetic rats. *Contrib Nephrol* 1989, 73: 52-57.
5. Bacci S, De Cosmo S, Prudente S, Trischitta V. ENPP1 gene, insulin resistance and related clinical outcomes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007, 10: 403-409.
6. Bailey MA, Imbert-Teboul M, Turner C, Marsy S, Srail K, Burnstock G, Unwin RJ. Axial distribution and characterization of basolateral P2Y receptors along the rat renal tubule. *Kidney Int* 2000, 58: 1893-1901.
7. Bailey MA, Imbert-Teboul M, Turner C, Srail SK, Burnstock G, Unwin RJ. Evidence for basolateral P2Y₆ receptors along the rat proximal tubule: functional and molecular characterization. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12: 1640-1647.
8. Bailey MA, Turner CM, Hus-Citharel A, Marchetti J, Imbert-Teboul M, Milner P, Burnstock G, Unwin RJ. P2Y receptors present in the native and isolated rat glomerulus. *Nephron Physiol* 2004, 96: 79-90.
9. Bailey MA. Inhibition of bicarbonate reabsorption in the rat proximal tubule by activation of luminal P2Y₁ receptors. *Am J Physiol* 2004, 287: F789-F796.
10. Barańska J, Czajkowski R, Sabała P. Cross-talks between nucleotide receptor-induced signaling pathways in serum-deprived and non-starved glioma C6 cells. *Adv Enzyme Regul* 2004, 44: 219-232.
11. Bell PD, Lapointe JY, Peti-Peterdi J. Macula densa cell signaling. *Annu Rev Physiol* 2003, 65: 481-500.
12. Bizon D, Kalinowski L, Angielski S. Adenosine deaminase restores the ability of atrial natriuretic peptide to induce glomerular hyperfiltration in low-sodium rats. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992, 30: 647-649.
13. Bodin P, Burnstock G. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovascular Pharmacol* 2001, 38: 900-908.

14. Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 2001, 26: 959-969.
15. Bucheimer RE, Linden J. Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol* 2004, 552.2: 311-321.
16. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 2004, 240: 31-304.
17. Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 2004, 4: 47-52.
18. Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 2006, 58: 58-86.
19. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007, 87: 659-797.
20. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64: 1471-1483.
21. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 1976, 62: 491-503.
22. Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 2006, 147, Suppl 1: S172-181.
23. Burnstock G. Vessel tone and remodeling. *Nat Med* 2006, 12: 16-17.
24. Canani LH, Ng DP, Smiles A, Rogus JJ, Warram JH, Krolewski AS. Polymorphism in ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 gene (ENPP1/PC-1) and early development of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002, 51: 1188-1193.
25. Castrop H. Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 2007, 189: 3-14.
26. Chan CM, Unwin RJ, Bardini M, Oglesby IB, Ford AP, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. Localization of P2X₁ purinoceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys. *Am J Physiol* 1998, 274: F799-F804.
27. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson L. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006, 2: 351-360.
28. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int* 2007, 71: 290-297.
29. Di Virgilio F, Solini A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2002, 135: 831-842.
30. Di Virgilio F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal* 2007, 3: 1-3.

31. Dobrowolski L, Walkowska A, Kompanowska-Jezierska E, Kuczeriszka M, Sadowski J. Effects of ATP on rat renal haemodynamics and excretion: role of sodium intake, nitric oxide and cytochrome P450. *Acta Physiol (Oxf)* 2007, 189: 77-85.
32. Druty AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 1929, 28: 213-237.
33. Erga KS, Seubert CN, Liang HX, Wu L, Shryock JC, Belardinelli L. Role of A_{2A}-adenosine receptor activation for ATP-mediated coronary vasodilation in guinea-pig isolated heart. *Br J Pharmacol* 2000, 130: 1065-1075.
34. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 2008, 4: 1-20.
35. Feraille E, Doucet A: Sodium-potassium adenosine triphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* 2001, 81: 345–418.
36. Fischer KG, Saueressig U, Jacobshagen C, Wichelmann A, Pavenstädt H. Extracellular nucleotides regulate cellular functions of podocytes in culture. *Am J Physiol* 2001, 281: F1075-F1081.
37. Freissmuth M, Hausleithner V, Tüisl E, Nanoff C, Schütz W. Glomeruli and microvessels of the rabbit kidney contain both A₁- and A₂-adenosine receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1987, 335: 438-444.
38. Friedman DJ, Rennke HG, Csizmadia E, Enjyoji K, Robson SC. The vascular ectonucleotidase ENTPD 1 is a novel renoprotective factor in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2007, 56: 2371-2371.
39. Fujiwara Y, Kitamura E, Ueda N, Fukunaga M, Orita Y, Kamada T. Mechanism of action of angiotensin II on isolated rat glomeruli. *Kidney Int* 1989, 36: 985-991.
40. Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford APDW. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 2006, 452: 513-537.
41. Gillespie JH. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 1934, 80: 345-359.
42. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 1986, 233: 309-319.
43. Grenz A, Zhang H, Hermes M, Eckle T, Klingel K, Huang DY, Muller CE, Robson SC, Osswald H, Eltzschig HK. Contribution of E-NTPDase1 (CD 39) to renal protection from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2007, 21: 2863-2873.
44. Guan Z, Osmond DA, Inscho EW. P2X receptors as regulators of the renal microvasculature. *Trends Pharmacol Sci* 2007, 12: 646-652.
45. Guan Z, Osmond DA, Inscho EW. Purinoceptors in the kidney. *Exp Biol Med* 2007, 232: 715-726.

46. Hansen PB, Hashimoto S, Oppermann M, Huang Y, Briggs JP, Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the mouse kidney due to preferential activation of A₁ or A₂ adenosine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 315: 1150-1157.
47. Hansen PB, Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol* 2003, 285: F590-F599.
48. Hao CM, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol* 2008, 70: 357-377.
49. Harada H, Chan CM, Loesch A, Unwin R, Burnstock G. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 2000, 57: 949-958.
50. Harrington LS, Evans RJ, Wray J, Norling L, Swales KE, Vial C, Ali F, Carrier MJ, Mitchell JA. Purinergic 2X₁ receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP. *Mol Pharmacol* 2007, 72: 1132-1136.
51. Harrington LS, Mitchell JA. Novel role for P2X receptor activation in endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol* 2004, 143: 611-617.
52. Hei YJ, MacDonell KL, McNeill JH, Diamond J. Lack of correlation between activation of cyclic AMP-dependent protein kinase and inhibition of contraction of rat vas deferens by cyclic AMP analogs. *Mol Pharmacol* 1991, 39: 233-238.
53. Hohenstein B, Renk S, Lang K, Daniel C, Freund M, Léon C, Amann KU, Gachet C, Hugo CP. P2Y₁ gene deficiency protects from renal disease progression and capillary rarefaction during passive crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2007, 18: 494-505.
54. Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Lin Y, Seigny J, Kaczmarek E, Goepfert C, Enjyoji K, Bach FH, Rosenberg RD, Robson SC. CD39/vascular ATP diphosphohydrolase modulates xenograft survival. *Transplant Proc* 2000; 32: 969.
55. Inkyo-Hayasaka K, Sakai T, Kobayashi N, Shirato I, Tomino Y. Three-dimensional analysis of the whole mesangium in the rat. *Kidney Int* 1996, 50:672-683.
56. Inscho EW, Cook AK, Imig JD, Vial C, Evans RJ. Physiological role for P2X₁ receptors in renal microvascular autoregulatory behavior. *J Clin Invest* 2003, 112: 1895-1905.
57. Inscho EW, Cook AK, Imig JD, Vial C, Evans RJ. Renal autoregulation in P2X₁ knockout mice. *Acta Physiol Scand* 2004, 181: 445-453.
58. Jankowski J, Hagemann J, Yoon MS, van der Giet M, Stephan N, Zidek W, Schlüter H, Tepel M. Increased vascular growth in hemodialysis patients induced by platelet-derived diadenosine polyphosphates. *Kidney Int* 2001, 59: 1134-1141.
59. Jankowski M, Angielski S, Szczepańska-Konkel M. The dissociation the effects of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) on renal haemodynamics and tubular function in rats. *J Physiol Pharmacol* 2008, 58: 129-137.

60. Jankowski M, Szczepańska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S. Bidirectional action of extracellular ATP on intracapillary volume of isolated rat renal glomeruli. *J Physiol Pharmacol* 2000, 51: 491-496.
61. Jankowski M, Szczepańska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S. cGMP-dependent relaxation of isolated rat renal glomeruli induced by extracellular ATP. *J Physiol* 2001, 530.1: 123-130.
62. Jankowski M, Szczepańska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S. Involvement of Rho-kinase in P2Y-receptor-mediated contraction of renal glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 302: 855-859.
63. Jankowski M, Szczepańska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S. The role of P2Y-receptors in the regulation of glomerular volume. *Med Sci Monit* 2001, 7: 635-640.
64. Jankowski V, Tölle M, Vanholder R, Schönfelder G, van der Giet M, Henning L, Schlüter H, Paul M, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* 2005, 11: 223-227.
65. Jin W, Hopfer U. Purinergic-mediated inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase in proximal tubule cells: elevated cytosolic Ca²⁺ is not required. *Am J Physiol* 1997, 272: C1169–C1177.
66. Joseph SM, Buchakjian MR, Dubyak GR. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* 2003, 278: 23331-23342.
67. Kalinowski L, Dobrucki LW, Szczepańska-Konkel M, Jankowski M, Martyniec L, Angielski S, Maliński T. Third-generation β -blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux. A novel mechanism for antihypertensive action. *Circulation* 2003, 107: 2747-2752.
68. Karczewska J, Martyniec L, Dzierzko G, Stepinski J, Angielski S. The relationship between constitutive ATP release and its extracellular metabolism in isolated rat kidney glomeruli. *J Physiol Pharmacol* 2007, 58: 321-333.
69. Kishore BK, Isaac J, Fausther M, Tripp SR, Shi H, Gill PS, Braun N, Zimmermann H, Sévigny J, Robson SC. Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney: relevance to regulation of P2 receptor signaling. *Am J Physiol* 2005, 288: F1032-F1043.
70. Knight GE, Oliver-Redgate R, Burnstock G. Unusual absence of endothelium-dependent or -independent vasodilatation to purines or pyrimidines in the rat renal artery. *Kidney Int* 2003, 64: 1389-1397.
71. Köles L, Furst S, Illes P. Purine ionotropic (P2X) receptors. *Curr Pharmaceutical Design* 2007, 13: 2368-2384.
72. Köles L, Gerevich Z, Oliveira JF, Zadori ZS, Wirkner K, Illes P. Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008, 377: 1-33.

73. Komlosi P, Fintha A, Bell PD. Renal cell-to-cell communication via extracellular ATP. *Physiology* 2005, 20: 86-90.
74. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003, 64: 785-795.
75. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 2000, 275: 31061-31068.
76. Lazarowski ER, Boucher RC. UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol* 2003, 16: 1-5.
77. Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Harden TK. Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. *J Biol Chem* 1997, 272: 20402-20407.
78. Le Guen E, Morel D, L'Azou B, Cambar J, Potaux L. Effect of cyclosporin and the prostacyclin analogue iloprost on human glomerular vasoreactivity. *Nephrol Dial Transplant* 1994, 9: 413-415.
79. Leipziger J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol* 2003, 284: F419-F432.
80. Liu R, Bell PD, Peti-Peterdi J, Kovacs G, Johansson A, Persson E. Purinergic receptor signaling at the basolateral membrane of macula densa cells. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13: 1145-1151.
81. Loutzenhiser R, Griffin K, Williamson G, Bidani A. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am J Physiol* 2006, 290: R1153-R1167.
82. Lu M, MacGregor GG, Wang W, Geibisch G. Extracellular ATP inhibits the small-conductance K channel on the apical membrane of the cortical collecting duct from mouse kidney. *J Gen Physiol* 2000, 116: 299-310.
83. Lu W, Reigada D, Sévigny J, Mitchell CH. Stimulation of the P2Y₁ receptor up-regulates nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase-1 in human retinal pigment epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007, 323: 157-164.
84. L  thje J, Ogilvie A. Catabolism of Ap₄A and Ap₃A in whole blood. The dinucleotides are long-lived signal molecules in the blood ending up as intracellular ATP in the erythrocytes. *Eur J Biochem* 1988, 173: 241-245.
85. Ma R, Pluznick JL, Sansom SC. Ion channels in mesangial cells: function, malfunction, or fiction. *Physiology (Bethesda)* 2005, 20: 102-111.
86. McGiff JC, Quilley J. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol* 1999, 277: R607-R623.

87. Mene P, Simonson MS, Dunn MJ. Eicosanoids, mesangial contraction, and intracellular signal transduction. *Tohoku J Exp Med* 1992, 166: 57-73.
88. Michno A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska J, Szutowicz A. Alternations of adenine nucleotide metabolism and function of blood platelets in patients with diabetes. *Diabetes* 2007, 56: 462-467.
89. Miras-Portugal MT, Pintor J, Gualix J. Ca^{2+} signalling in brain synaptosomes activated by dinucleotides. *J Membrane Biol* 2003, 194: 1-10.
90. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 2005, 57: 217-252.
91. Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G, Battastini AM. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol* 2005, 71: 135-140.
92. Morton MJ, Hutchinson K, Mathieson PW, Witherden IR, Saleem MA, Hunter M. Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca^{2+} -activated K^{+} channel: Potential implications for the control of glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15: 2981-2987.
93. Murthy KS. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* 2006, 68: 345-374.
94. Mutafova-Yambolieva VN, Hwang SJ, Hao X, Chen H, Zhu MX, Wood JD, Ward SM, Sanders KM. Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 16359-16364.
95. Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H, Oyanagi K. Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *J Mol Neurosci* 2005, 26: 233-238.
96. Nalos M, Asfar P, Ichai C, Radermacher P, Leverve XM, Fröba G. Adenosine triphosphate-magnesium chloride: relevance for intensive care. *Intensive Care Med* 2003, 29: 10-18.
97. Nishiyama A, Inscho EW, Navar LG. Interactions of adenosine A_1 and A_{2a} receptors on renal microvascular reactivity. *Am J Physiol* 2001, 280: F406-F414.
98. Nishiyama A, Jackson KE, Majid DS, Rahman M, Navar LG. Renal interstitial fluid ATP responses to arterial pressure and tubuloglomerular feedback activation during calcium channel blockade. *Am J Physiol* 2006, 290: H772-H777.
99. Nishiyama A, Majid DS, Taher KA, Miyatake A, Navar LG. Relation between renal interstitial ATP concentrations and autoregulation-mediated changes in renal vascular resistance. *Circ Res* 2000, 86: 656-662.
100. Nishiyama A, Navar LG. ATP mediates tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 2002, 283: R273-R275.

101. Okada SF, Nicholas RA, Kreda SM, Lazarowski ER, Boucher RC. Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* 2006, 281: 22992-223002.
102. Olivera A, Lamas S, Rodriguez-Puyol D, López-Novoa JM. Adenosine induces mesangial cell contraction by an A₁-type receptor. *Kidney Int* 1989, 35:1300-1305.
103. Ostrom RS, Gregorian C, Insel PA. Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2000, 275: 11735-11739.
104. Pavenstädt H, Henger A, Briner V, Fischer KG, Huber-Lang M, Schollmeyer P, Greger R. Agonist-induced activation of a non-selective ion current in glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1997, 52: 157-164.
105. Pavenstädt H, Henger A, Briner V, Greger R, Schollmeyer P. Extracellular ATP regulates glomerular endothelial cell function. *J Auton Pharmacol* 1996, 16: 389-391.
106. Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P. ATP release *via* gap junction hemichannels from eye pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 2005, 46: 731-744.
107. Pechère-Bertschi A, Maillard M, Stalder H, Bischof P, Fathi M, Brunner HR, Burnier M. Renal hemodynamic and tubular responses to salt in women using oral contraceptives. *Kidney Int* 2003, 64: 1374-1380.
108. Ren Y, Garvin JL, Liu R, Carretero OA. Crosstalk between the connecting tubule and the afferent arteriole regulates renal microcirculation. *Kidney Int* 2007, 71: 1116-1121.
109. Rieg T, Bunday RA, Chen Y, Deschenes G, Junger W, Insel PA, Vallon V. Mice lacking P2Y₂ receptors have salt-resistant hypertension and facilitated renal Na⁺ and water reabsorption. *FASEB J* 2007, 21: 3717-3726.
110. Rivera I, Zhang S, Fuller BS, Edwards B, Seki T, Wang MH, Marrero MB, Inscho EW. P2 receptor regulation of [Ca²⁺]_i in cultured mouse mesangial cells. *Am J Physiol* 2007, 292: F380-F389.
111. Sabirov R, Okada Y. ATP release via anion channels. *Purinergic Signalling* 2005, 1: 311-328.
112. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Vaillant N, Gadeau AP, Desgranges C, Scalbert E, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₆ receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes. *Am J Physiol* 2000 278: H1751-H761.
113. Savin VJ, Terreros DA. Filtration in single isolated mammalian glomeruli. *Kidney Int* 1981, 20: 189-197.
114. Savin VJ. In vitro effects of angiotensin II on glomerular function. *Am J Physiol* 1986, 251: F627-F634.

115. Schafer JA, Troutman SL, Schlatter E. Vasopressin and mineralocorticoid increase apical membrane driving force for K⁺ secretion in rat CCD. *Am J Physiol* 1990; 258: F199-F210.
116. Schwiebert EM. ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am J Physiol* 1999, 276: C1-C8.
117. Schwiebert EM. ATP release mechanism, ATP receptors and purinergic signalling along the nephron. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001, 28: 340-350.
118. Seye CI, Kong Q, Yu N, Gonzalez FA, Erb L, Weisman GA. P2 receptors in atherosclerosis and postangioplasty restenosis. *Purinergic Signal* 2007, 3: 153-162.
119. Shirley DG, Bailey MA, Unwin RJ. In vivo stimulation of apical P2 receptors in collecting ducts: evidence for inhibition of sodium reabsorption. *Am J Physiol* 2005, 288: F1243-F1248.
120. Skøtt O. Body sodium and volume homeostasis. *Am J Physiol* 2003, 285: R14-R18.
121. Stefan C, Jansen S, Bollen M: Modulation of purinergic signaling by NPP-type ect-phosphodiesterase. *Purinergic Signal* 2006, 2: 361-370.
122. Stiepanow-Trzeciak A, Jankowski M, Angielski S, Szczepańska-Konkel M. P¹,P⁴-diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) inhibits proximal tubular reabsorption of sodium in rats. *Nephron Physiol* 2007, 106: 79-84.
123. Stockand JD, Sansom SC. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol Rev* 1998, 78: 723-744.
124. Sun R, Carlson NG, Hemmert AC, Kishore BK. P2Y₂ receptor-mediated release of prostaglandin E₂ by IMCD is altered in hydrated and dehydrated rats: relevance to AVP-independent regulation of IMCD function. *Am J Physiol* 2005, 289: F585-F592.
125. Szczepańska-Konkel M, Jankowski M, Stiepanow-Trzeciak A, Angielski S. Effects of diadenosine polyphosphates on glomerular volume. *Br J Pharmacol* 2005, 114: 1109-1117.
126. Szczepańska-Konkel M, Jankowski M, Stiepanow-Trzeciak A, Rudzik A, Pawełczyk T, Angielski S. Responsiveness of renal glomeruli to adenosine in streptozotocin-induced diabetic rat dependent on hyperglycaemia level. *J Physiol Pharmacol* 2003, 54: 109-120.
127. Szczepańska-Konkel M, Langner G, Bednarczuk G, Stiepanow-Trzeciak A, Jankowski M, Angielski S. Renal haemodynamics and natriuretic responses to intravenous administration of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and nicotinamide dinucleotide (NAD) in rat. *J Physiol Pharmacol* 2003, 54: 163-173.
128. Szczepańska-Konkel M, Redlak M, Angielski S. Glibenclamid-sensitive K⁺ channels are responsible for angiotensin II hypersensitive contraction and atrial natriuretic factor refractoriness of glomeruli in low-sodium rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 181: 871-876.

129. Tanaka N, Nejime N, Kagota S, Kubota Y, Yudo K, Nakamura K, Kunitomo M, Takahashi K, Hashimoto M, Shinozuka K. ATP participates in the regulation of microvessel permeability. *J Pharm Pharmacol* 2006, 58: 481-487.
130. Tolle M, Giebing G, Tietge UJW, Jankowski J, Jankowski V, Henning L, Horl MP, Meiss W, Zidek W, van der Giet M. Diguanosine pentaphosphate: an endogenous activator of Rho-kinase possibly involved in blood pressure regulation. *J Hypertens* 2006, 24: 1991-2000.
131. Turner CM, Vonend O, Chan C, Burnstock G, Unwin RJ. The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. *Cells Tissues Organs* 2003, 175: 105-117.
132. Unwin RJ, Bailey MA, Burnstock G. Purinergic signaling along the renal tubule: the current state of play. *News Physiol Sci* 2003, 18: 237-241.
133. Vallon V, Mühlbauer B, Osswald H. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev* 2006, 86: 901-940.
134. Vallon V. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. *Am J Physiol* 2008, 294: F10-F27.
135. van Son WJ, Wit F, van Balen OL, Tegzess AM, Ploeg RJ, Bakker WW. Decreased expression of glomerular ecto-ATPase in kidney grafts with delayed graft function. *Transplant Proc* 1997, 29: 352-354.
136. van Bemmelen M, Szczepańska-Konkel M, Jastorff B, Jankowski M, Angielski S. Effect of cAMP analogues on glomerular inulin space of isolated rats renal glomeruli. *J Physiol Pharmacol* 2005, 56: 112-120.
137. Vegesna RVK, Diamond J. Activation of cyclic AMP dependent kinase in rabbit aortic rings by prostaglandin E1 and forskolin is accompanied by contraction and relaxation, respectively. *Proc West Pharmacol Soc* 1986, 29: 39-43.
138. Vekaria RM, Shirley DG, Sévigny J, Unwin RJ. Immunolocalization of ectonucleotidases along the rat nephron. *Am J Physiol* 2006, 290: F550-F560.
139. Vekaria RM, Unwin RJ, Shirley DG. Intraluminal ATP concentrations in rat renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 2006, 17: 1841-1847.
140. Vial C, Rolf MG, Mahaut-Smith MP, Evans RJ. A study of P2X₁ receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br J Pharmacol* 2002, 135: 363-372.
141. Volonté C, Amadio S, D'Ambrosi N, Colpi M, Burnstock G. P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther* 2006, 112: 264-280.
142. Vonend O, Turner CM, Chan CM, Loesch A, Dell'Anna GC, Srail KS, Burnstock G, Unwin RJ. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int* 2004, 66: 157-166.

143. Wang H, Garvin JL, Falck JR, Ren Y, Sankey SS, Carretero OA. Glomerular cytochrome P-450 and cyclooxygenase metabolites regulate efferent arteriole resistance. *Hypertension* 2005, 46: 1175-1179.
144. Wildman SS, King BF. P2X receptors: epithelial ion channels and regulators of salt and water transport. *Nephron Physiol* 2008, 108: 60-67.
145. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X₄-deficient mice. *Nat Med* 2006, 12: 133-137.
146. Yegutkin GG, Henttinen T, Samburski SS, Spychala J, Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J* 2002, 367: 121-118.
147. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008, 178: 673-694.
148. Zhang Y, Sanchez D, Gorelik J, Klenerman D, Lab M, Edwards C, Korchev Y. Basolateral P2X₄-like receptors regulate the extracellular ATP-stimulated epithelial Na⁺ channel activity in renal epithelia. *Am J Physiol* 2007, 292: F1734-F1740.
149. Zhao X, Falck JR, Gopal VR, Inscho EW, Imig JD. P2X receptor-stimulated calcium responses in preglomerular vascular smooth muscle cells involves 20-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2004, 311: 1211-1217.
150. Zimmermann H. ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochem Int* 2008, 52: 634-648.
151. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000, 362: 299-309.