



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia Egidio Meneghetti

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA

CICLO XXI

METABOLISMO DI NUCLEOSIDI E NUCLEOTIDI ADENINICI IN VITRO NELL'ILEO DI RATTO

Coordinatore: Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

Supervisore: Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

Dottorando: Giulia Calligaro

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
SUMMARY	pag. 3
ABBREVIAZIONI	pag. 5
INTRODUZIONE	pag. 7
IL SISTEMA PURINERGICO	pag. 7
METABOLISMO EXTRACELLULARE DELLE PURINE	pag. 8
I TRASPORTATORI PER LE PURINE	pag. 8
ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO EXTRACELLULARE DELLE PURINE	pag. 9
ATPasi	pag. 9
cAMP fosfodiesterasi	pag. 9
Ecto-5'-nucleotidasi	pag. 10
Adenosina deaminasi	pag. 11
Purina Nucleoside Fosforilasi	pag. 12
LE PURINE EXTRACELLULARI E IL SISTEMA GASTROINTESTINALE	pag. 13
SCOPO DELLA TESI	pag. 17
MATERIALI	pag. 19
METODI	pag. 21
Incubazione del tessuto	pag. 21
Dosaggio delle proteine	pag. 22
Quantificazione delle purine	pag. 23
Analisi statistica dei risultati	pag. 24
RISULTATI	pag. 25
1. Cinetica dell'adenosina esogena nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto.	pag. 25
2. Effetti dell'inibizione dei trasportatori equilibrativi per le purine e dell'enzima Adenosina Deaminasi.	pag. 26
3. Cinetica di degradazione dell'adenosina esogena nel mezzo condizionato di ileo di ratto.	pag. 29
4. Eliminazione metabolica di AMP, ATP e cAMP dal mezzo di incubazione dell'ileo di ratto in presenza e in assenza di tessuto.	pag. 31
5. Influenza della mucosa sull'eliminazione di AMP nel mezzo di incubazione di ileo di ratto.	pag. 33

6. Eliminazione di ATP esogeno dal mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale e condizionato.	pag. 37
DISCUSSIONE	pag. 39
BIBLIOGRAFIA	pag. 45

RIASSUNTO

I nucleosidi e i nucleotidi purinici sono ampiamente coinvolti nella regolazione delle funzioni intestinali. ATP e adenosina, rilasciati dalle terminazioni nervose enteriche o dal muscolo liscio, esercitano le loro azioni legandosi a specifici recettori di membrana. Pertanto le concentrazioni extracellulari delle purine, che dipendono dall'azione degli enzimi preposti alla loro formazione ed eliminazione, sono determinanti ai fini dell'effetto.

Vista l'importanza dell'azione regolatrice degli adenin nucleotidi e nucleosidi nei processi infiammatori, anche a carico dell'apparato gastrointestinale, si è voluto valutare quali siano i processi maggiormente coinvolti nella produzione e eliminazione di questi metaboliti. Inoltre, si è voluto verificare se produzione ed eliminazione dipendano anche dalla presenza di forme enzimatiche solubili rilasciate dal tessuto nel liquido di incubazione, viste le riconosciute azioni protettive degli enzimi stessi.

Il modello sperimentale utilizzato è stato l'ileo di ratto, di cui è stata presa la porzione distale e ne sono state ricavate delle strips. Gli esperimenti sono stati condotti in due condizioni differenti: in medium contenente strips di ileo (medium normale) e in medium dove il tessuto è stato incubato e successivamente rimosso (medium condizionato). In entrambi i casi il tessuto è stato utilizzato sia integro che privato dello strato epiteliale. Dopo l'aggiunta di adenosina o nucleotidi esogeni, le loro concentrazioni nel mezzo di incubazione sono state monitorate con metodo HPLC, assieme a quelle dei loro metaboliti. Inizialmente è stata studiata l'eliminazione dell'adenosina esogena, che è scomparsa molto rapidamente dal medium. NBTI, inibitore dei trasportatori di tipo equilibrativo per l'adenosina, non ha modificato tale scomparsa. Questo, assieme all'assenza di variazioni del nucleoside nel tessuto, porta ad escludere che l'adenosina venga captata dal tessuto stesso. Inoltre EHNA, inibitore dell'adenosina deaminasi, ha permesso un recupero totale dell'adenosina e una contemporanea abolizione della comparsa dei suoi prodotti di degradazione, dando prova del fatto che l'eliminazione avviene prevalentemente per via metabolica. In maniera analoga è stata monitorata la scomparsa di AMP, precursore diretto dell'adenosina, cAMP e ATP, entrambi fonte di AMP. In tutti i casi si è dimostrata una degradazione dei nucleotidi indice della presenza nell'ileo di ratto di ecto-enzimi: ecto-ADA, ecto-5'-Nu, ecto-cAMP-PDE ed ecto-ATPasi. Anche quando gli esperimenti sono stati condotti in medium condizionato si è osservata un'eliminazione metabolica dei nucleotidi, suggerendo la presenza di forme enzimatiche rilasciate dal tessuto nel liquido di incubazione (exo-enzimi), ma non si è ottenuta prova di una forma di una exo-PDE capace di degradare il cAMP. Infine si è valutato un eventuale coinvolgimento dello strato mucoso nell'eliminazione dell'AMP e si è approfondito lo studio della cinetica dell'ATP. La distribuzione degli enzimi degradativi e un loro eventuale rilascio nel medium sono influenzati dallo strato epiteliale. In particolare la ecto-5'-Nu è maggiormente presente negli strati muscolari e la mucosa costituisce un ostacolo al suo rilascio. Al contrario,

esaminando la scomparsa dei suoi prodotti di degradazione, si nota come l'ADA sia maggiormente presente sulla mucosa, che è anche la sede preferenziale di rilascio. Dagli studi sull'eliminazione dell'ATP emerge anche che gli ecto-enzimi responsabili della sua eliminazione non sono quelli inibiti dalla suramina.

L'aver caratterizzato le vie metaboliche responsabili dell'eliminazione e formazione extracellulare dell'adenosina e dei nucleotidi adeninici può contribuire allo sviluppo di terapie innovative in grado di modulare i livelli di questi autacoidi tramite un'azione sugli ecto- ed exo-enzimi coinvolti nel loro metabolismo. Questo permetterebbe di evitare l'uso di agonisti e antagonisti recettoriali, che spesso sono dotati di scarsa selettività e di elevata tossicità intrinseca.

SUMMARY

The present study was meant to evaluate the metabolism of adenine nucleotides and nucleosides *in vitro* by rat ileum.

Purine nucleosides and nucleotides are widely involved in the regulation of gut function. ATP and adenosine are released from enteric purinergic nerves or from smooth muscle cells, and they act by binding to specific receptors. The availability of purines at purine receptors depends on their extracellular concentration, which originates from the balance between extracellular formation and removal. Considering the role of adenine nucleosides and nucleotides in the pathophysiology of gastrointestinal tract, we investigated the role of ecto-enzymes and transporters involved in purine accumulation and removal. The present study was also meant to identify the possible existence of exo-enzymes released by rat ileum during *in vitro* incubation.

Longitudinally cut strips (with and without mucosal layer) of distal ileum from male Wistar rats were incubated in Tyrode solution. Conditioned medium was obtained by removing the tissue after a 30-minute incubation. After adding exogenous adenosine or adenine nucleotides, in the absence or in the presence of inhibitors, an HPLC method was used to quantify these purines and their metabolites in the incubation medium. The results obtained by using EHNA, an ADA inhibitor, showed that rapid extracellular deamination represents the most efficient mechanism regulating adenosine clearance by rat ileum. In contrast, the equilibrative transporter inhibitor NBTI did not affect adenosine levels, demonstrating that ENTs are not involved in the elimination of exogenous adenosine. This finding, together with the absence of significant changes in adenosine and its metabolites in the tissue, shows that adenosine is not taken up by the tissue. In order to identify possible exo-enzymes released by rat ileum that are involved in purine metabolism, a conditioned medium was used. Indeed the breakdown of extracellular ATP, AMP and adenosine was found to be mediated by ecto- and exo-nucleotidases including ATPase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase. By contrast, exogenously added cAMP was not affected by conditioned medium, suggesting that the release of soluble forms of cAMP-PDEs does not occur in the extracellular compartment of rat ileum. Finally, the role of mucosal layer in AMP elimination was evaluated. We found that the mucosa affects the release of enzymes into the incubation medium and their distribution. In particular, ecto-5'-nucleotidase is mostly present in the muscular layers, and the mucosa prevents its release. Conversely, the mucosal layer accounts for most of the adenosine deaminase activity and is the preferential site of release. While ecto- and exo-ADA are sensitive to inhibition by EHNA and ecto- and exo-5'-nucleotidases are inhibited by AOPCP, the ATPases involved in ATP elimination are not sensitive to inhibition by suramin, a partial inhibitor of this enzyme family.

These results will assist in the development of new approaches to the treatment of intestinal inflammation based on enzyme inhibitors capable of increasing purine concentrations in the local environment. This could be useful in order to avoid side effects caused by adenosine receptor agonists or antagonists.

ABBREVIAZIONI

ADA	Adenosina deaminasi
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AK	Adenosina Chinasi
AMP	Adenosina monofosfato
AOPCP	α , β -metileneadenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato ciclico
CD26	dipeptidil peptidasi IV
CD39	ecto-nucleoside di fosfato difosfoidrolasi di tipo 1
CD73	5'-nucleotidasi extracellulare (ecto-5'-Nu)
CNTs	Trasportatori nucleosidici concentrativi
Ecto-5'-Nu	ecto-5'-nucleotidasi
EHNA	Eritro-9-(2-idrossi-3nonil)adenina
ENTs	Trasportatori nucleosidici equilibrativi
HPLC	High-performance liquid chromatography
IBD	Inflammatory bowel disease (malattie infiammatorie croniche intestinali)
IBS	Irritable Bowel Syndrome (sindrome dell'intestino irritabile)
IMP	Inosina Monofosfato
Ino	Inosina
Ipox	Ipoxantina
NANC	Non-Adrenergic Non-Cholinergic (neuroni non adrenergici non colinergici)
NBTI	Nitrobenziltioinosina
NO	Ossido nitrico
NTPDasi	ecto-nucleoside di fosfato difosfoidrolasi
PDE	Fosfodiesterasi
PNP	purina nucleoside fosforilasi
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide

INTRODUZIONE

IL SISTEMA PURINERGICO

I processi fisiologici regolati da nucleotidi e nucleosidi purinici furono descritti per la prima volta da Drury e Szent-Györgyi nel 1929 con uno studio sul sistema cardiovascolare. Vennero quindi condotti studi analoghi che dimostrarono l'esistenza di simili processi anche nell'utero, nell'intestino e nel sistema nervoso. L'esistenza di un "sistema purinergico", con l'ATP neurotrasmettitore del sistema non adrenergico e non colinergico (NANC) nel muscolo liscio intestinale e nella vescica, fu proposta per la prima volta da Burnstock nel 1972 (Burnstock, 2007).

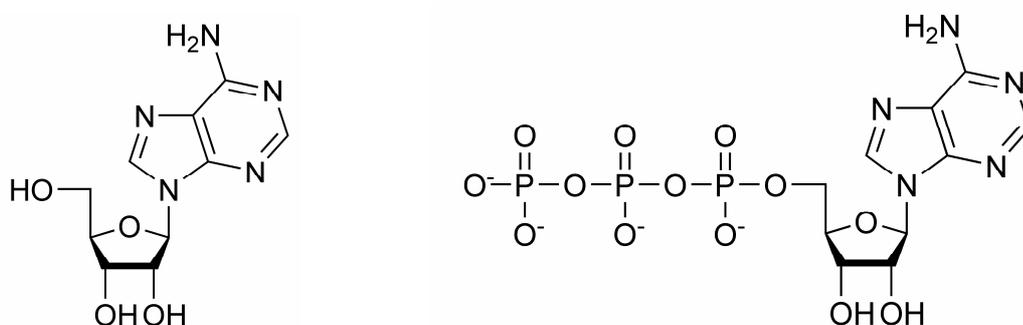


Figura 1. Adenosina e Adenosina Trifosfato (ATP)

L'azione autocrina e paracrina delle purine si esplica mediante legame con specifici recettori: P_1 per l'adenosina e P_2 per ATP e altri nucleotidi. I recettori P_1 vengono a loro volta suddivisi in 4 sottotipi denominati A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3 . A_1 e A_3 mediano un'azione inibitoria sull'adenilato ciclasi, mentre A_{2a} e A_{2b} mediano un'azione opposta, di stimolo dell'adenilato ciclasi e conseguente aumento di cAMP intracellulare. Gli A_{2a} sono recettori ad alta affinità per l'adenosina, mentre gli A_{2b} sono recettori a bassa affinità che richiedono concentrazioni extracellulari del nucleoside riscontrabili in condizioni patologiche (superiore a 10 μM , contro un normale range di 30-300 nM) (Haskò *et al.*, 2008). I recettori P_2 legano ATP e, con affinità minore, UTP, ADP e UDP. Sono a loro volta suddivisi in P_{2X} di tipo inotropico multimerico e P_{2Y} , costituiti da sette domini transmembrana e accoppiati a proteine G.

La disponibilità del ligando per i recettori dipende dalla concentrazione extracellulare dello stesso, che a sua volta dipende dal bilancio tra la sua formazione (trasporto dal compartimento intracellulare, degradazione di eventuali precursori) e la sua eliminazione (trasporto all'interno della cellula, degradazione, utilizzo per la sintesi di nuovi metaboliti).

METABOLISMO EXTRACELLULARE DELLE PURINE

L'ATP, una volta liberato dalla cellula, è substrato di ecto-ATPasi che lo degradano ad ADP e ad AMP, che viene a sua volta defosforilato ad adenosina per opera della ecto-5'-nucleotidasi. L'adenosina può essere così eliminata dallo spazio extracellulare per deaminazione ad opera di una ecto-adenosina deaminasi che porta alla formazione di inosina; oppure può venire ricaptata per mezzo dei trasportatori per i nucleosidi. L'AMP può anche derivare dal cAMP via fosfodiesterasi (Figura 2).

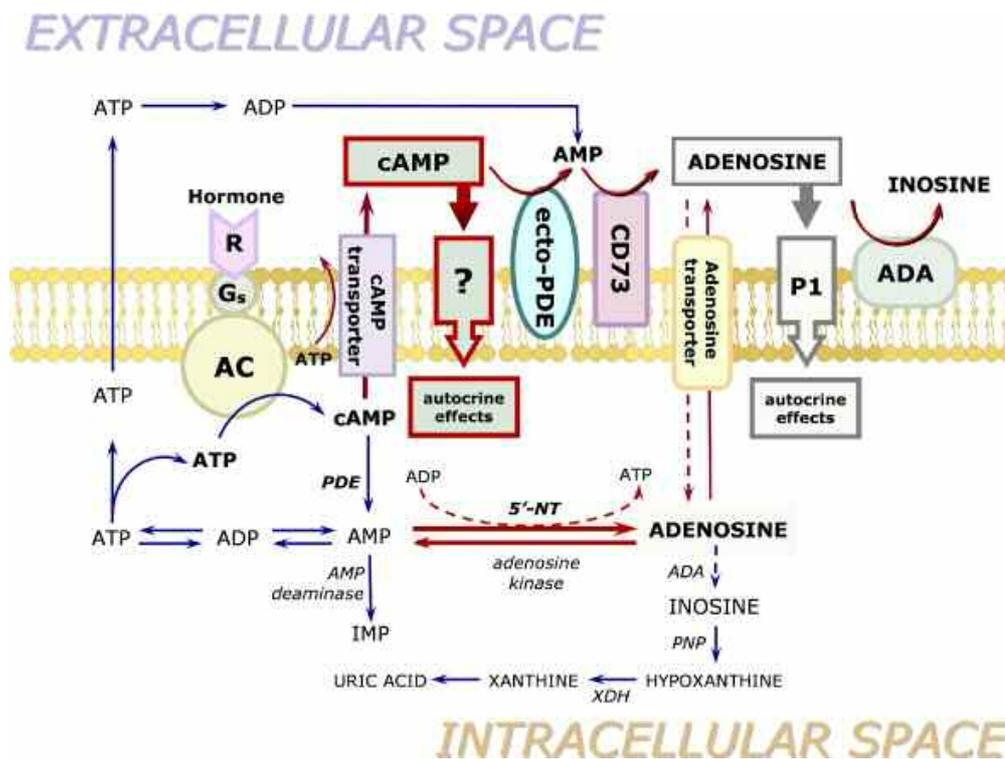


Figura 2. Sintesi e metabolismo delle purine. L'ATP rilasciato nello spazio extracellulare è inattivato a ADP, AMP e adenosina ad opera di ecto-enzimi. L'inattivazione di adenosina può avvenire o per deaminazione ad inosina per opera della ADA extracellulare o per ricaptazione all'interno della cellula tramite i trasportatori per i nucleosidi (Giron et al., 2008).

I TRASPORTATORI PER LE PURINE

Sono stati identificati e clonati due differenti sistemi di trasporto per le purine: trasportatori equilibrativi (Equilibrative Nucleoside Transporters, ENTs) che mediano un meccanismo di diffusione facilitata, e trasportatori concentrativi (Concentrative Nucleoside Transporters, CNTs) che funzionano grazie a un gradiente transmembrana del sodio diretto internamente. I trasportatori equilibrativi sono diversamente classificati, a seconda della loro sensibilità all'inibizione da nitrobenziltioinosina (NBTI), in *es* (molto sensibili, $K_i=0.1-10$ nM) e *ei* (insensibili fino a concentrazioni superiori a 1 μ M) (Podgorska et al., 2005). I trasportatori concentrativi sono meno conosciuti, probabilmente per il fatto

che non esistono inibitori selettivi. Sia i concentrativi che gli equilibrativi sono oggetto di molti studi, sia per il loro ruolo nel recupero di nucleosidi necessari per la sintesi di acidi nucleici, sia perchè hanno un ruolo importante nel trasporto di molti analoghi nucleosidici utilizzati in terapia come agenti antitumorali e anti-AIDS (King *et al.*, 2006; Podgorska *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2004; Gray, 2004).

ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO EXTRACELLULARE DELLE PURINE

ATPasi

Questi ecto-enzimi idrolizzano nucleosidi tri- e/o di-fosfato, ma non monofosfato, e richiedono concentrazioni millimolari di cationi calcio e magnesio per la loro massima attività. Le ecto-ATPasi controllano la risposta infiammatoria, il reclutamento e aggregazione piastrinica durante l'emostasi e i processi di danno vascolare (Guckerberg *et al.*, 2004). La famiglia denominata NTPDasi è costituita da 8 diverse proteine, di cui 4 (NTPDasi 1, 2, 3, e 8) espresse sulla superficie cellulare. La NTPDasi1 è stata identificata con la CD39, un marker dell'attivazione dei linfociti B, ed è importante per la coordinazione della risposta immunitaria. Uno studio recente ha dimostrato come topi privi del gene che codifica per questo enzima manifestino risposta infiammatoria più elevata dei controlli dopo l'esposizione ad apteni. Ci sono inoltre evidenze che indicano come la CD39 espressa dalle cellule T sia la principale ecto-nucleotidasi responsabile della generazione di adenosina, e suggeriscono che un'azione cooperativa tra CD39 e CD73 possa contribuire alla funzione immunoregolatrice di queste cellule (Dwyer *et al.*, 2007). Nel sistema vascolare, l'enzima endoteliale gioca un ruolo critico con l'interruzione dell'effetto protrombotico di ATP e ADP circolanti e la prevenzione dell'occlusione vascolare. Ulteriori ruoli sono stati dimostrati nella prevenzione dell'irritazione cutanea da agenti chimici, soppressione di angiogenesi e metastasi tumorale, protezione dei polmoni in seguito a insulto e di rene e miocardio in seguito a danno da ischemia/riperfusion (Yegutkin, 2008). Il rilascio di ATP nello spazio extracellulare è marcato in condizioni di ipossia e avviene inoltre ad opera di neutrofili attivati che esprimono la CD39 e contribuiscono al metabolismo extracellulare del nucleotide: questo permette all'adenosina prodotta di attenuare l'eccessivo accumulo dei polimorfonucleati nel tessuto (Colgan *et al.*, 2006).

cAMP fosfodiesterasi

A livello extracellulare, una delle fonti di adenosina è il cAMP che viene metabolizzato ad AMP da una ecto-PDE. L'attività fosfodiesterasica è stata descritta per la prima volta nel 1962 da Butcher e Sutherland; successivamente negli anni '80 la ricerca di base fu focalizzata sul ruolo funzionale e la caratterizzazione dell'enzima. La famiglia delle PDE comprende undici diversi enzimi (PDE1-PDE11) che, avendo una distribuzione ubiquitaria, rappresentano potenziali target terapeutici in diverse patologie. (Lugnier, 2006). La via extracellulare cAMP-adenosina nell'ileo di ratto è stata recentemente dimostrata dal nostro gruppo di ricerca (Giron *et al.*, 2008) ed è considerata una via che contribuisce in

modo importante alla sintesi di adenosina extracellulare anche nelle cellule muscolari lisce dei vasi e a livello renale, ed è importante per la regolazione della crescita dei fibroblasti cardiaci e il rilascio di renina. Inibitori selettivi della PDE IV esercitano attività antiinfiammatoria sia nella prevenzione che nella terapia delle coliti inibendo la produzione del Tumor Necrosis Factor in monociti e macrofagi (Hartmann *et al.*, 2000). Effetti benefici sono riportati anche in infiammazione della mucosa del colon, meningiti, artriti e pancreatiti (Sato *et al.*, 2006).

Ecto-5'-nucleotidasi

Dallo studio della letteratura emerge come la conversione dell'AMP in adenosina ad opera della ecto-5'-nucleotidasi (CD73) sia il passaggio più importante all'interno di tutto il processo che porta alla formazione dell'adenosina extracellulare a partire dai nucleotidi adeninici rilasciati (Centelles *et al.*, 1992; Zimmermann, 2000). Si tratta di una glicoproteina di membrana legata al fosfatidilinositolo (GPI), ed esiste anche in una forma sub-apicale situata in domini epiteliali ricchi di caveolina (Colgan *et al.*, 2006). È espressa nella mucosa intestinale (dove l'attività è particolarmente elevata), nell'endotelio, fegato e in diversi altri tessuti come linfociti, rene e alcuni tipi di cellule tumorali (Crane *et al.*, 2007). I tessuti provvisti di mucosa epiteliale, come ad esempio intestino e polmone, svolgono come funzione fisiologica primaria il trasporto di acqua, che avviene simultaneamente a vari ioni. La secrezione è influenzata dai metaboliti purinici, come l'adenosina, e in caso di infiammazione l'AMP è stato identificato come un mediatore solubile in grado di modulare questo tipo di processo. Di conseguenza, non conoscendo l'esistenza di recettori per l'AMP, è chiaro che la CD73 è l'enzima chiave di questa via biochimica. Un'altra funzione importante è la funzione di barriera, resa possibile dalla conversione in adenosina dell'AMP rilasciato dai neutrofili in condizioni di infiammazione, con legame ai recettori A_{2a} che mediano un effetto di interazione con le maglie del citoscheletro. L'enzima viene indotto in condizioni di ipossia ed ischemia (Figura 3).

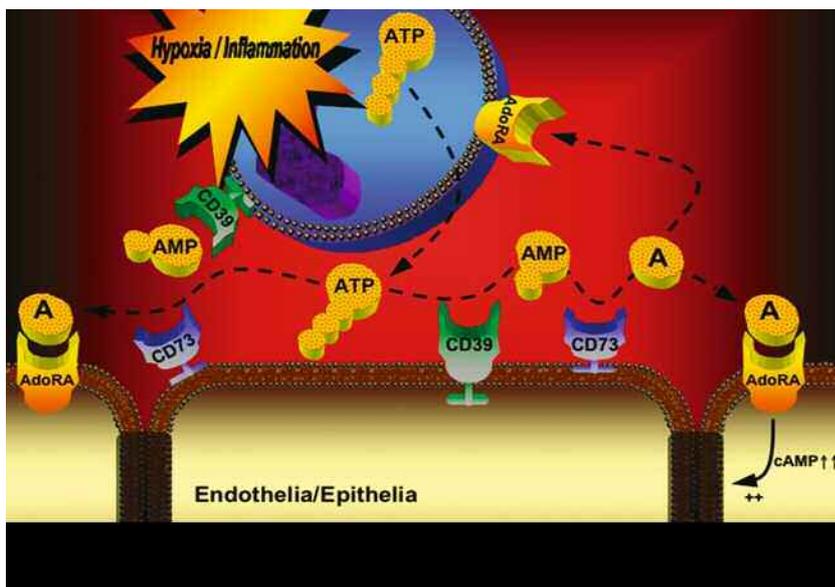


Figura 3. Meccanismi di coordinazione del metabolismo dei nucleotidi e attività dei nucleosidi e nucleotidi purinici in condizioni di ischemia ed infiammazione.

Nelle aree di insorgenza dello stato infiammatorio, la diminuzione di ossigeno coordina l'induzione di CD39 e CD73 e dei recettori A_{2a} .

I neutrofili attivati rilasciano ATP nello spazio extracellulare che attraverso due passaggi enzimatici è convertito ad adenosina (Colgan *et al.*, 2006).

Contribuisce inoltre alla regolazione della risposta dell'ospite all'attacco infettivo ed è implicato nella generazione di adenosina provocata da un evento trombotico *in vivo* (Colgan *et al.*, 2006). La K_m per il 5'-AMP varia tra 3 e 50 μM e non mostra attività verso i nucleotidi monofosfato in 2' e 3'. L'enzima è costituito da due subunità glicoproteiche di massa molecolare di 60-70 kDa, legate in modo non covalente con zinco e altri cationi divalenti all'N terminale. Viene co-espressa con la CD39 sulla superficie dei linfociti T regolatori, rappresentandone un marker di maturazione (Zimmermann, 2000). La sua presenza contribuisce ad un complesso meccanismo regolatorio che con la conversione dell'AMP derivato da ATP e ADP al mediatore antinfiammatorio adenosina permette di inibire la proliferazione di cellule T e la secrezione di citochine. Altri ruoli dell'enzima sembrano essere l'induzione di segnali intracellulari e la mediazione di segnali di adesione cellula-cellula e cellula matrice. Anche l'attività antinfiammatoria di farmaci come metotressato e sulfasalazina è dovuta alla conversione di adenin nucleotidi in adenosina, mediata dalla CD73 (Yegutkin, 2008). Synnestvedt e collaboratori hanno evidenziato un ruolo protettivo e di barriera della CD73 a livello intestinale: sembra infatti che la somministrazione di α,β -methylene-ADP (AOPCP), un inibitore dell'enzima, incrementi significativamente la permeabilità intestinale durante l'ipossia (Synnestvedt *et al.*, 2002). Nell'endotelio infiammato l'interferone α porta ad up-regulation della ecto-5'-nucleotidasi in modelli sia *in vitro* che *in vivo* (Niemelä *et al.*, 2004). L'importanza di questo enzima è stata recentemente riaffermata da Hart e collaboratori, i quali hanno dimostrato che la fosfoidrolisi dell'AMP mediata dalla CD73 rappresenta il passaggio più importante nel processo che porta alla generazione di adenosina endogena e conseguente modulazione dell'insulto in caso di danno da ischemia-riperfusion. Ciò suggerisce che la manipolazione dell'attività enzimatica della CD73, allo scopo di aumentare la produzione di adenosina extracellulare, può rappresentare una strategia terapeutica nel trattamento da danno ischemico acuto nell'intestino (Hart *et al.*, 2008).

Adenosina deaminasi

La conversione adenosina-inosina è un passaggio molto rapido in quanto l'adenosina, agendo come autacoido, oltre che a dover essere immediatamente disponibile per il legame con il recettore, deve essere anche rapidamente rimossa (Centelles and Franco, 1990). Fino a qualche decennio fa si supposeva che la deaminazione dell'adenosina fosse un processo esclusivamente intracellulare. Ora si sa che l'adenosina deaminasi esiste anche in una forma legata alla membrana plasmatica (ecto-ADA) vicino all'enzima ecto-5'-nucleotidasi (Franco *et al.*, 1998) e in una forma solubile nei fluidi interstiziali (exo-ADA) (Centelles and Franco, 1990). Vi è una larga distribuzione filogenetica dell'enzima e la sequenza aminoacidica è fortemente conservata dai batteri all'uomo. Questo già suggerisce che si tratta di un enzima chiave del metabolismo purinico. La K_m per l'adenosina è di 45 μM e il pH per un'attività ottimale è intorno alla neutralità (Cristalli *et al.*, 2001). L'attività dell'ADA è relativamente elevata nell'intestino, se paragonata a quella degli altri organi (Xu and Kellems, 2000; Franco *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 1980; Van der Weyden and Kelley, 1976). In questo distretto, e negli altri in cui l'enzima è molto espresso, è ragionevole supporre che esso giochi il ruolo predominante nel controllo dei

livelli di adenosina extracellulare: questa affermazione è supportata dal fatto che in molti tessuti, come ad esempio nel timo, la sua espressione è invertita rispetto a quella dell'altro enzima coinvolto in questo controllo, l'ecto-5'-Nu (Hashikawa *et al.*, 2004). L'ADA catalizza la deaminazione irreversibile ad inosina e viene finemente regolata dalla CD26 (conosciuta anche come dipeptidil peptidasi IV o ADA binding proein). Oltre al ruolo svolto nel catabolismo dell'adenosina, l'enzima stimola il rilascio di amminoacidi eccitatori attraverso un meccanismo che è indipendente dall'eliminazione del nucleoside; inoltre vi è un'interazione tra l'enzima e i recettori adenosinici A₁, a suggerire che esso è necessario per l'accoppiamento tra A₁R e le proteine G (Sun *et al.*, 2005). Nella mucosa del corpo dello stomaco l'attività dell'ADA è legata alla secrezione acida ed è più alta nei soggetti affetti da ipersecrezione (Namiot *et al.*, 2003).

L'enzima è anche necessario per il corretto sviluppo delle cellule T del sistema immunitario, tanto che la deficienza genetica di ADA è associata a una severa sindrome da immunodeficienza (severe combined immunodeficient disease, SCID) che costringe ad usare molta cautela nell'approccio terapeutico con inibitori dell'adenosina deaminasi. Inoltre gioca un ruolo nella differenziazione delle cellule epiteliali e dei monociti, nella neurotrasmissione e mantenimento della gravidanza (Moriwaki *et al.*, 1999). I potenziali utilizzi terapeutici degli inibitori dell'ADA riguardano: il tentativo di aumentare la biodisponibilità orale degli analoghi nucleosidici (antileucemici e antivirali) (Singhal *et al.*, 1988; DeGraw and Anderson, 2001) la modulazione della risposta immunitaria in caso di malattie che coinvolgono cellule B e T, il trattamento della condizione post-ischemica nell'infartuato (Cristalli *et al.*, 2001) e vi sono numerosi lavori che indicano l'utilizzo di inibitori del metabolismo dell'adenosina come un'efficace terapia verso i danni da ri-perfusione post trapianto (Peart *et al.*, 2001, Smolenski *et al.*, 2001). Un'ulteriore possibilità è rappresentata dall'utilizzo in alcuni disturbi del sonno (Okada *et al.*, 2003).

Purina Nucleoside Fosforilasi

La conversione inosina-ipoxantina avviene non solo a livello intracellulare ma anche extracellulare ad opera di un enzima denominato PNP, che agisce in associazione con l'ADA nella regolazione dei livelli delle purine. Mutazioni che interferiscano con la sintesi o funzionalità dell'enzima nell'uomo portano a disfunzioni immunologiche e neurologiche (Yegutkin, 2008).

LE PURINE EXTRACELLULARI E IL SISTEMA GASTROINTESTINALE

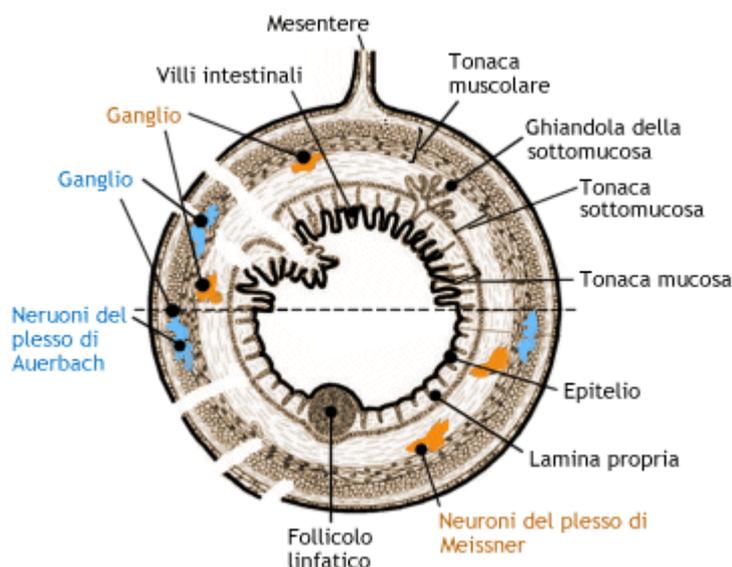


Figura 4. Schema di sezione intestinale. La metà superiore rappresenta il tenue, quella inferiore il colon. http://www.benessere.com/salute/atlanter/sistema_nervoso_periferico.htm

I nucleosidi e i nucleotidi purinici sono ampiamente coinvolti nella regolazione delle funzioni intestinali. ATP e adenosina vengono rilasciati dalle terminazioni nervose enteriche o dal muscolo liscio in seguito a depolarizzazione della membrana o in seguito all'azione di neurotrasmettitori e ormoni locali, ed esercitano le loro azioni attraverso il legame con recettori specifici: P1 per l'adenosina, e P2 per ATP e altri nucleotidi (Bornstein *et al.*, 2007). Costituiscono una fonte di energia nel normale metabolismo cellulare e sono intermedi di processi ossidativi. Effetti benefici di supplementi dietetici di nucleotidi sono stati documentati nella crescita e maturazione enzimatica dell'intestino e nel processo riparativo successivo a vari tipi di insulti. Inoltre, studi condotti su ratti con diarrea hanno mostrato che un supplemento nucleotidico dopo lo svezzamento porta a un più rapido ripristino dell'integrità della mucosa (Arnaud *et al.*, 2003). L'adenosina inoltre regola il trasporto di glucosio carrier-mediato (Kimura *et al.*, 2005). Nel sistema nervoso enterico partecipano alla trasmissione sinaptica come neurotrasmettitori o neuromodulatori e i neuroni che li utilizzano in questo modo sono denominati neuroni purinergici. L'attivazione dei recettori purinergici può regolare l'attività neuronale mediante depolarizzazione, regolazione del calcio intracellulare o modulazione delle vie dei secondi messaggeri. Questo porta a un importante ruolo regolatorio in riflessi enterici specifici e in tutte le funzioni gastrointestinali. L'adenosina può derivare dalla degradazione di nucleotidi adeninici o venire rilasciata dalle vescicole sinaptiche, e regola la secrezione e il rilascio intestinale. Il rilascio avviene normalmente in condizioni basali ma aumenta in condizioni di ischemia, infiammazione o danno cellulare: nel plesso mienterico si è visto come la concentrazione del nucleoside endogeno vari al variare della pressione parziale di ossigeno. Nel sistema nervoso enterico umano la distribuzione dei sottotipi recettoriali è stata ampiamente documentata. L'ATP è cotrasmettitore nei neuroni motori inibitori del muscolo circolare e nei neuroni secretomotori eccitatori nel plesso sottomucoso, insieme a VIP e NO. Media potenziali sinaptici veloci via P2X₂ e P2X₃, e

potenziali sinaptici lenti via P2Y₁ (Ren and Bertrand, 2008). L'adenosina è un nutriente essenziale per l'intestino ed è benefica nell'alleviare la diarrea nei bambini affetti da colera; inoltre come integratore dietetico potrebbe avere applicazioni nel trattamento del malassorbimento dovuto a malattie croniche infiammatorie intestinali (Christofi, 2008). Nel tratto gastrointestinale il processo infiammatorio è il fattore predominante nella difesa della mucosa contro insulti di origine sia endogena che esogena. Tuttavia una risposta sregolata può rappresentare essa stessa un danno e contribuire alla nascita di particolari disturbi: gli stessi mediatori rilasciati dall'epitelio e dalle cellule della lamina propria (neuroni, mast cellule, linfociti e fibroblasti) possono alterare l'integrità della mucosa. La parte più importante della difesa della mucosa è probabilmente la risposta microcircolatoria. L'aumento del flusso sanguigno diluisce e neutralizza le tossine e ne previene così l'accumulo a concentrazioni citotossiche (Martin and Wallace, 2006). Dal momento che il ruolo principale delle purine a livello intestinale consiste nell'aumento del flusso sanguigno, e che esse rappresentano uno dei componenti più importanti dei meccanismi regolatori locali della circolazione enterica (Obata and Yamanaka, 1998), si può affermare che esse rappresentano un fattore protettivo nei confronti di patologie infiammatorie dell'intestino. È stato inoltre ipotizzato che l'infiammazione cronica nelle IBD (Inflammatory Bowel Disease) sia dovuta a uno squilibrio tra citochine pro- e antinfiammatorie. L'adenosina inibisce la sintesi di citochine proinfiammatorie e causa down-regulation delle funzioni dei neutrofili come produzione di anione superossido, degranolazione, adesione, sia in vitro che in vivo (Siegmund *et al.*, 2001). Il coinvolgimento del sistema purinergico in vari disturbi dell'apparato gastrointestinale come IBS (Irritable Bowel Syndrome) e IBD, reflusso gastroesofageo, diabete, ileo postoperatorio, ischemia, malattia di Hirschsprung e malattia di Chaga (Burnstock, 2008), morbo di Crohn e colite ulcerosa (Haskò *et al.*, 2008). Anche l'inosina, prodotto di degradazione dell'adenosina, che fino a pochi anni fa si pensava non avesse effetti biologici, si lega ai recettori P₁ dando luogo a cascate di segnali intracellulari, e può anche venir trasportata all'interno della cellula per mezzo dei trasportatori per le purine. Inoltre alcune azioni modulatorie dell'adenosina extracellulare sono mediate dall'inosina in modo recettore-indipendente. L'inosina previene il danno intestinale indotto da somministrazione di endotossine nel topo ed è un potente agente antinfiammatorio su linfociti e macrofagi *in vitro* (Haskò *et al.*, 2004). L'adenosina modula negativamente il fattore di trascrizione NF-κB nelle cellule epiteliali intestinali umane, che è l'evento centrale della patogenesi di molti disordini infiammatori incluse le IBD (Jijon *et al.*, 2005). Anche dal punto di vista recettoriale numerosi studi indicano le purine in generale e l'adenosina in particolare come possibili nuovi farmaci antinfiammatori. Uno studio ha dimostrato un effetto benefico di agonisti dei recettori A₁ nel danno indotto da ischemia intestinale (Kolachala *et al.*, 2008). I recettori A_{2b} intervengono nella risposta infiammatoria in quanto la loro stimolazione causa l'aumento dell'efflusso di ione cloruro, di fibronectina e la secrezione di IL-6. Nel colon, l'aumento dell'efflusso di ione cloruro provoca un movimento di liquido isotonic nel lume, un processo che idrata naturalmente la superficie della mucosa proteggendo l'intestino dal passaggio di batteri, tossine batteriche e antigeni verso la lamina propria. Anche l'up-regulation di IL-6 e fibronectina mediate dall'attivazione dei A_{2b} giocano un ruolo

importante rispettivamente nelle interazioni neutrofili-epitelio e batteri-epitelio, (Kolachala *et al.*, 2008). Inoltre studi recenti indicano, come nuovo approccio terapeutico nei confronti delle IBD, l'utilizzo di agonisti selettivi per i recettori A_{2a} (Odashima *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2006), che vanno anch'essi incontro ad up-regulation in seguito a patologie infiammatorie (Antonioli *et al.*, 2007). Anche l'azione antinfiammatoria del metotressato è correlata all'azione dell'adenosina e uno studio di un modello di peritonite nel topo ha evidenziato come questa azione sia mediata dai recettori A_{2a} (Montesinos *et al.*, 2006). A riguardo dei recettori A_3 vi sono numerosi studi che evidenziano la loro implicazione nell'attività antinfiammatoria dell'adenosina (Lee *et al.*, 2006; Mabley *et al.*, 2003b). Essi potrebbero rappresentare un target terapeutico nella diarrea in quanto mediano un effetto distensivo evocato dal riflesso neurosecretorio (Christofi, 2008). Anche l'ATP esercita un'attività immunomodulatrice attraverso il legame con i suoi recettori (Coutinho-Silva *et al.*, 2007). Inoltre, insieme ai suoi prodotti di degradazione, influenza le funzioni dei linfociti e dei granulociti (Vuaden *et al.*, 2007) esercitando così un controllo dei segnali negli stati infiammatori (Bours *et al.*, 2006). L'aumento della permeabilità della mucosa nell'intestino in seguito alla somministrazione di farmaci antinfiammatori non steroidei viene attenuata dopo somministrazione topica di ATP: infatti questi farmaci con il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa negli enterociti causano una diminuzione delle riserve di energia rappresentate dall'ATP (Bours *et al.*, 2007).

SCOPO DELLA TESI

Sta emergendo con sempre maggiore chiarezza l'importanza delle azioni svolte dai nucleotidi e nucleosidi purinici nel controllo dei processi infiammatori, inclusi quelli a carico dell'apparato gastrointestinale. In più, in diverse situazioni patologiche quali ad esempio diarrea ed enterocolite (Arnaud *et al.*, 2003) sono stati dimostrati effetti benefici dei nucleotidi esogeni.

ATP e adenosina vengono rilasciati dalle terminazioni nervose enteriche o dal muscolo liscio in seguito a depolarizzazione della membrana o in risposta a neurotrasmettitori e ormoni locali, e modulano motilità, secrezione e assorbimento attraverso il legame con recettori specifici. La disponibilità al legame con i recettori dipende dalle concentrazioni extracellulari delle purine, che a loro volta dipendono dall'azione degli enzimi preposti alla loro formazione ed eliminazione.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di dimostrare quali siano i meccanismi coinvolti nella produzione ed eliminazione dell'adenosina e dei suoi precursori in sede extracellulare, in prossimità dei recettori di membrana che ne mediano la maggior parte degli effetti sull'apparato enterico. Come modello sperimentale è stato scelto l'ileo di ratto che veniva sezionato e incubato in presenza di adenosina esogena o dei suoi precursori, per poi monitorarne i metaboliti che si accumulano nel mezzo di incubazione. Si è voluto verificare se produzione ed eliminazione dell'adenosina dipendessero non solo dalla presenza di ectoenzimi ma anche da forme enzimatiche solubili rilasciate dal tessuto. Si è inoltre voluto analizzare l'importanza della mucosa intestinale rispetto al tessuto sottostante, ai fini del turnover dell'adenosina. A questo scopo sono stati condotti esperimenti in due condizioni differenti: in medium contenente strips di ileo (medium normale) e in medium da cui il tessuto è stato rimosso dopo un iniziale periodo di incubazione (medium condizionato); in entrambi i casi è stato utilizzato sia tessuto integro che privato dello strato epiteliale.

Riuscire a comprendere i meccanismi grazie ai quali viene regolata fisiologicamente la concentrazione dell'adenosina, significa avere a disposizione un'utile base per mettere a punto nuove strategie terapeutiche. In letteratura sono già presenti molti studi che dimostrano come l'azione di inibitori enzimatici che siano in grado di modulare la concentrazione extracellulare di adenosina possano portare al miglioramento di coliti sperimentali nell'animale (Antonioli *et al.*, 2007; Siegmund *et al.*, 2001). Farmaci di questo tipo, che agiscano localmente, possono rappresentare un approccio terapeutico utile per la cura di patologie intestinali infiammatorie e autoimmuni. L'azione locale permetterebbe inoltre di evitare gli effetti indesiderati dovuti alla distribuzione del farmaco nell'organismo.

MATERIALI

Adenosina	Sigma-Aldrich, Italia
ADP	Sigma-Aldrich, Italia
Albumina bovina	Sigma-Aldrich, Italia
AMP	Sigma-Aldrich, Italia
AMP ciclico	Sigma-Aldrich, Italia
AOPCP	Sigma-Aldrich, Italia
ATP	Sigma-Aldrich, Italia
CaCl ₂ 2H ₂ O	Merck, Germany
CuSO ₄ 5H ₂ O	Merck, Germany
D(+)-Glucosio Anidro	J.T. Baker, Holland
Desossicolato di sodio	Merck, Germany
DMSO	J.T. Baker, Holland
EHNA	Sigma-Aldrich, Italia
HClO ₄	Prolabo, Italia
IMP	Sigma-Aldrich, Italia
Inosina	Sigma-Aldrich, Italia
Ipoxantina	Sigma-Aldrich, Italia
KCl	J.T. Baker, Holland
KH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Riedel-Deheanag Seelze, Germany
KOH	Prolabo, Italia
Metanolo	J.T. Baker, Holland
MgCl ₂ 6H ₂ O	Merck, Germany
NaCl	J.T. Baker, Holland
Na ₂ CO ₃	Riedel-Deheanag Seelze, Germany
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	J.T. Baker, Holland
NaHCO ₃	Merck, Germany
NaOH	Sigma-Aldrich, Italia
NBTI	Sigma-Aldrich, Italia
Reagente di Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich, Italia
Suramina	Sigma-Aldrich, Italia
Tartrato sodico potassico	Merck, Germany
Teofillina	Sigma-Aldrich, Italia
n-Tetrabuttilammonio bromuro	Merck, Germany

METODI

1. Incubazione del tessuto

Per l'esecuzione degli esperimenti di questo studio sono stati utilizzati ratti maschi Wistar di 2-4 mesi, del peso medio di 300 ± 50 grammi. Dopo il sacrificio l'ileo distale (30 cm circa) è stato prelevato ed immerso in soluzione fisiologica di tipo Tyrode costantemente ossigenata da una miscela al 95% di O_2 e 5% di CO_2 .

La soluzione Tyrode presenta la seguente composizione: NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,4 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,46 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,32 mM, $NaHCO_3$ 12 mM, D(+)-glucosio anidro 5 mM.

Il tessuto è stato ripulito prima all'interno iniettando nel lume soluzione Tyrode con l'ausilio di una siringa da 10 ml, poi all'esterno, asportando i residui di tessuto adiposo dalla superficie per mezzo di forbici e pinzette.

Partendo dall'estremità terminale, i primi 4 cm di tessuto sono stati scartati; l'ileo ripulito è stato poi tagliato in segmenti di 2,5 cm di lunghezza e ogni segmento è stato ulteriormente suddiviso longitudinalmente in 4 strips. Coppie di strips sono state introdotte in vials contenenti uno specifico volume di soluzione Tyrode calcolato in modo che, dopo l'aggiunta delle sostanze da saggiare, il volume finale fosse pari a 2 ml. Le vials sono state poste in bagno termostato alla temperatura di $36,5^\circ C$ e mantenute sotto costante ossigenazione ed agitazione.

Dove previsto da protocollo, è stato asportato lo strato epiteliale mediante strisciatura.

Dopo 30 minuti di stabilizzazione, al mezzo di incubazione sono state aggiunte le sostanze da saggiare: Adenosina $50 \mu M$ o AMP $50 \mu M$ o cAMP $50 \mu M$ o ATP $50 \mu M$ e, dove previsto dall'esperimento, gli inibitori EHNA $1 \mu M$, NBTI $10 \mu M$, AOPCP $200 \mu M$, suramina $100 \mu M$. Gli inibitori sono stati aggiunti 15 minuti prima dei nucleotidi e nucleosidi.

Trascorso il tempo di incubazione previsto dall'esperimento, le strips di ileo contenute nelle vials sono state rapidamente trasferite in contenitori metallici contenenti azoto liquido per congelare il tessuto, e $500 \mu l$ di $HClO_4$ 1 M. per bloccare le reazioni metaboliche. Successivamente le strips sono state finemente omogenate con l'ausilio di un pestello, trasferite in provette e centrifugate. La centrifugazione è stata eseguita ad una temperatura di $0^\circ C$ a 13000 rpm per 30 minuti (Du Pont, Sorvall RC-5B). Il residuo ottenuto è stato impiegato per il dosaggio delle proteine mediante il saggio di Lowry (Lowry *et al.*, 1962). Da ciascuna vial è stato prelevato 1 ml di liquido di incubazione e introdotto in provette contenenti $110 \mu l$ di $HClO_4$ 10 M, che blocca l'ulteriore metabolismo enzimatico delle purine. I campioni ottenuti sono stati filtrati con filtri PVDF ($0,22 \mu m$, Sartorius), per eliminare i residui di materiale biologico e conservati a $-20^\circ C$ fino al momento dell'analisi HPLC per la determinazione qualitativa e quantitativa dei metaboliti purinici. Inoltre, sono stati condotti in parallelo esperimenti in assenza di

tessuto: dopo i primi 30 minuti di stabilizzazione, il tessuto è stato rimosso e il mezzo di incubazione (condizionato) è stato usato per gli esperimenti.

2. Dosaggio delle proteine

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato seguendo il metodo di Lowry (Lowry *et al.*, 1962), che si basa sulla reazione dei residui di tirosina con il reattivo di Folin-Ciocalteu; tale reattivo, in presenza di Cu^{2+} , viene ridotto producendo una colorazione blu, la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteine presenti.

Al residuo solido, ottenuto dalla centrifugazione dell'omogenato sono stati aggiunti 2 ml di NaOH 1 N; le provette sono state poste in bagnetto termostato a 65°C per circa 20 minuti, fino a completa solubilizzazione del residuo stesso; le soluzioni sono state poi centrifugate alla velocità di 15000 rpm per 10 minuti a $3-4^{\circ}\text{C}$ (Du Pont, Sorvall RC-5B).

Il surnatante ottenuto, conservato a -20°C , è stato usato per il dosaggio delle proteine e i campioni sono stati preparati utilizzando 10 μl di estratto che vengono addizionati di 790 μl di acqua bidistillata e 200 μl di una soluzione al 10% di desossicolato di sodio in NaOH 0,01 N; è stata condotta una doppia lettura di ogni campione. La prova in bianco è costituita da 800 μl di acqua bidistillata e 200 μl di desossicolato di sodio.

Al momento dell'uso, è stata preparata una soluzione costituita da 50 parti di una soluzione al 2% di Na_2CO_3 in NaOH 0,1 N e 1 parte di una soluzione allo 0,5% di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in tartrato di sodio e potassio all'1%: 5 ml di tale soluzione sono stati aggiunti ad ogni campione.

Dopo agitazione, le provette sono state poste in bagno alla temperatura di 25°C per 10 minuti; a questo punto sono stati addizionati 500 μl di reattivo di Folin-Ciocalteu diluito 1:1 con acqua bidistillata; le provette sono state mantenute in bagnetto per altri 30 minuti e già dopo 15 minuti si è potuta osservare una colorazione azzurro-blu.

La lettura dell'assorbanza è stata condotta con spettrofotometro (Perkin-Elmer, Coleman 55 munito di autosampler 055-0200), programmato ad una lunghezza d'onda di 750 nm. I valori di assorbanza dei campioni sono stati riferiti a valori ottenuti da una curva di taratura costruita utilizzando diverse soluzioni a concentrazione nota di albumina bovina.

Le soluzioni denominate C e D sono state preparate solubilizzando 20 mg di albumina bovina in 10 ml di acqua bidistillata; la soluzione B è stata ottenuta per diluizione 1:1 della soluzione di albumina madre con acqua bidistillata. La soluzione A è stata invece ottenuta a partire dalla soluzione B, sempre per diluizione 1:1 con acqua bidistillata. Quest'ultima soluzione è stata a sua volta diluita 1:1 con acqua bidistillata per preparare la soluzione E.

I campioni per la curva di taratura vengono preparati come segue:

60 µl della soluzione D (corrispondenti a 120 µg di proteine)	200 µl di DOC	740 µl di acqua
50 µl della soluzione C (corrispondenti a 100 µg di proteine)	200 µl di DOC	750 µl di acqua
50 µl della soluzione B (corrispondenti a 50 µg di proteine)	200 µl di DOC	750 µl di acqua
50 µl della soluzione A (corrispondenti a 25 µg di proteine)	200 µl di DOC	750 µl di acqua
50 µl della soluzione E (corrispondenti a 12,5 µg di proteine)	200 µl di DOC	750 µl di acqua

Le soluzioni così ottenute vengono sottoposte allo stesso trattamento descritto per il dosaggio delle proteine degli estratti.

3. Quantificazione delle purine

Il dosaggio delle purine è stato effettuato mediante analisi cromatografica a coppia ionica eseguita con HPLC Beckman, costituita da un sistema a due pompe (Beckman System Gold Programmable Solvent Module 125) con iniettore da 20 µl (injector loop Rheodyne 7725i) e da un rivelatore spettrofotometrico UV (Beckman System Gold Detector 166) impostato ad una lunghezza d'onda di 254 nm, collegato ad un computer SuntaQ 386, provvisto di software per la registrazione, l'identificazione e la calibrazione (Beckman System Gold V3.10). Per la separazione delle sostanze è stata utilizzata una colonna C-18 (Beckman C-18 Analytical P/N 243533, Ultrasphere ODS 4,6 mm-25cm) munita di precolonna C-18.

167 µl della soluzione da esaminare sono stati addizionati di 20 µl di una soluzione di teofillina 0,5 mM in acqua MilliQ (la concentrazione finale dello standard sarà 50 µM) e 13 µl di KOH 10 M, in modo da portare il pH ad un valore di 4-5 circa.

Per la determinazione e la quantificazione dei nucleotidi e nucleosidi purinici, è stata eseguita un'analisi cromatografica a coppia ionica. Il metodo di separazione utilizzato è un'eluizione a gradiente, risultato di una variazione della separazione isocratica proposta da Childs *et al.* (1996) per determinare e quantificare nucleotidi e nucleosidi nel tessuto cardiaco.

La fase mobile è costituita da una soluzione (A) di KH_2PO_4 73.5 mM e tetrabuttilammonio bromuro 6 mM a pH 5.8 e metanolo (B); il flusso è di 1 ml al minuto a gradiente discontinuo, come si può osservare nella tabella seguente:

TEMPO (min)	A (%)	B (%)
0-7	100	0
7-12	da 100 a 84	da 0 a 16
12-30	84	16
30-32	da 84 a 75	da 16 a 25
32-34	75	25
34-38	da 75 a 100	da 25 a 0
38-54	100	0

I picchi cromatografici delle sostanze presenti nei campioni sono state analizzate con l'ausilio di due curve di taratura per la determinazione delle purine nel mezzo di incubazione, una per le basse concentrazioni (0,5-5 μM) e una per le alte concentrazioni (5-75 μM).

Tali curve sono state ottenute dopo analisi HPLC di soluzioni a concentrazione nota di AMP, ATP, cAMP, adenosina, inosina e ipoxantina, sottoposte allo stesso trattamento descritto per l'allestimento dei campioni incogniti.

L'analisi quantitativa dei nucleotidi e nucleosidi d'interesse presenti in ciascun campione è stata effettuata confrontando i rapporti tra le singole aree dei picchi con l'area della teofillina di ogni cromatogramma, con gli stessi rapporti ricavati dalla retta di taratura.

Per agevolare il riconoscimento dei picchi cromatografici delle sostanze in esame, sono state eseguite giornalmente delle corse cromatografiche di soluzioni contenenti le purine d'interesse e la teofillina, in concentrazione nota e pari a 0,05 mM.

La sovrapposizione delle corse di riferimento con i cromatogrammi dei campioni iniettati lo stesso giorno, ha permesso di individuare i picchi delle sostanze in esame: tale procedura serve per evitare gli errori dovuti a differenze tra i tempi di ritenzione delle varie sostanze presenti nelle soluzioni incognite e di quelle nelle soluzioni standard causate da piccole variazioni giornaliere nel funzionamento dello strumento.

4. Analisi statistica dei risultati

I risultati sono stati espressi come la media \pm SEM dei dati ottenuti dal numero di esperimenti indicati.

Le medie sono state confrontate con il test t di Student per dati non accoppiati o mediante one-way ANOVA seguita da post-test Newman-Keuls. Come limite di significatività statistica è stato assunto un valore $p < 0,05$.

RISULTATI

1. Cinetica dell'adenosina esogena nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto.

Gli esperimenti in cui l'adenosina ($50 \mu\text{M}$) è stata aggiunta al mezzo di incubazione dell'ileo di ratto hanno dimostrato che il nucleoside viene eliminato rapidamente. I tempi di incubazione impiegati sono 0, 1, 2, 5 e 10 minuti e i risultati sono espressi in concentrazione micromolare per avere un diretto confronto tra la quantità di adenosina aggiunta e le concentrazioni di purine recuperate e accumulate. In 5 minuti il nucleoside ritorna ai livelli basali ($0,20 \pm 0,04 \mu\text{M}$) con un'emivita di circa 30 secondi (Figura 5).

La diminuzione dell'adenosina coincide con un parallelo aumento dei suoi metaboliti inosina ed ipoxantina (Figura 5). Per escludere che si tratti di una spontanea degradazione dell'adenosina aggiunta, sono stati condotti in parallelo anche esperimenti in assenza di tessuto, e si è visto come la sostanza si dimostri stabile nelle condizioni impiegate per tutti i tempi utilizzati. L'analisi a regressione lineare dimostra come la concentrazione di adenosina recuperata nel mezzo di incubazione sia strettamente correlata alla somma delle concentrazioni di inosina e ipoxantina rilevate nel mezzo stesso (Figura 6).

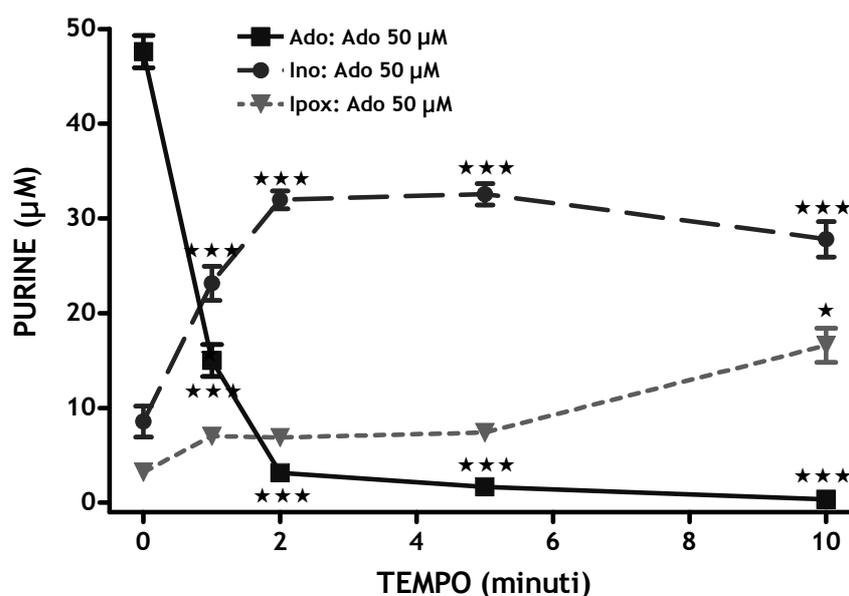


Figura 5. Metabolismo dell'adenosina esogena e accumulo dei suoi metaboliti (inosina ed ipoxantina) nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto. Strips di tessuto sono state esposte ad adenosina esogena ($50 \mu\text{M}$) per 0, 1, 2, 5 e 10 minuti. I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$ dei risultati ottenuti da un minimo di 4 ad un massimo di 8 esperimenti. * $P < 0.05$ paragonato a $t=0'$; *** $P < 0.001$ paragonato a $t=0'$.

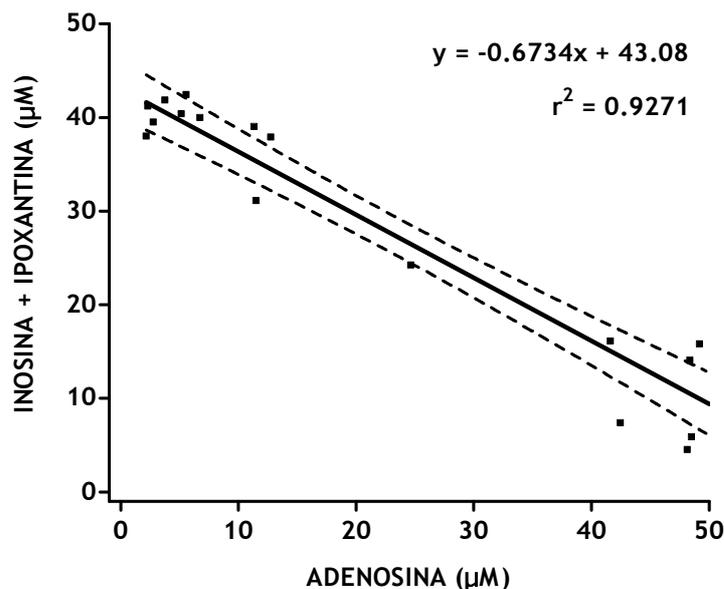


Figura 6. Regressione lineare tra la concentrazione di adenosina esogena recuperata e le somme delle concentrazioni dei suoi metaboliti (inosina e ipoxantina) nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto. Strips di tessuto sono state esposte ad adenosina esogena (50 µM) per 0, 1 e 2 minuti.

2. Effetti dell'inibizione dei trasportatori equilibrativi per le purine e dell'enzima adenosina deaminasi.

In questi esperimenti si è utilizzato un tempo di incubazione di un minuto, tempo necessario per un recupero del 30-40% di adenosina esogena dal mezzo e che quindi permette la rilevazione sia di aumenti che di diminuzioni del nucleoside.

Negli esperimenti condotti in assenza di adenosina esogena né EHNA (1 µM), inibitore dell'ADA né NBTI (10 µM), che blocca gli ENT, hanno causato alcuna significativa variazione della concentrazione di adenosina e del suo metabolita inosina rispetto ai valori basali (Figura 7A).

Con l'aggiunta di adenosina esogena 50 µM, EHNA (1 µM), ha causato un significativo aumento del nucleoside recuperato (da 16,28±0,97 µM a 43,96±0,79 µM) con contemporanea diminuzione del suo metabolita inosina, che si riduce a valori simili a quelli basali (da 20,48±1,46 a 1,44±0,37 µM).

L'adenosina esogena viene quasi totalmente recuperata in presenza di EHNA e la somma delle concentrazioni dei nucleosidi, adenosina e inosina, è superiore a quella che si rileva allo stesso tempo di incubazione in assenza di EHNA (da 45,40±1,10 µM a 36,76±2,18 µM). Al contrario NBTI (10 µM) non ha dimostrato alcun effetto sull'adenosina (Figura 7B).

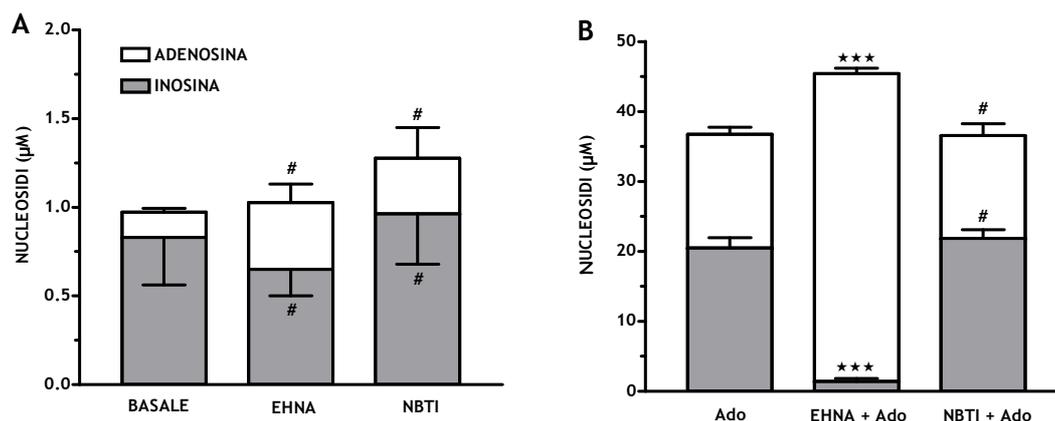


Figura 7. Influenza di EHNA o NBTI sui livelli di adenosina e inosina basali (A) e trattati con adenosina esogena 50 µM (B) nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto. Strips di tessuto sono state esposte ad adenosina (50 µM; ADO) per un minuto. EHNA (1 µM) o NBTI (10 µM) sono stati aggiunti 15 minuti prima del nucleoside. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. *** P<0,001 paragonato a Ado 50 µM; # N.S.S.

Incubando le strips di ileo per 10, 30 e 60 minuti in presenza di adenosina 50 µM con e senza EHNA 1 µM, si è visto come anche a tempi lunghi l'inibitore dell'adenosina deaminasi sia capace di ridurre la conversione di adenosina nei suoi metaboliti. In presenza di EHNA l'adenosina recuperata si riporta ai livelli basali solo a 60 minuti dall'aggiunta iniziale (Figura 8).

Contemporaneamente le concentrazioni di inosina e ipoxantina rilevate sono minori se l'esperimento è condotto in presenza di EHNA (Figure 9A e 9B).

L'inosina, in presenza di adenosina esogena, dopo 30 minuti si riporta ai valori basali ($0,22\pm 0,07$ µM). Se viene aggiunto anche EHNA il quantitativo di nucleoside recuperato è significativamente più basso a 1 e 10 minuti, mentre a 30 minuti i valori sono paragonabili a quelli riscontrati negli esperimenti condotti con sola adenosina (Figura 9A).

L'ipoxantina in presenza di adenosina ed EHNA viene recuperata in quantità significativamente minore a 10 minuti rispetto agli esperimenti condotti con sola adenosina; a 30 e 60 minuti i valori sono paragonabili nelle due tipologie di esperimenti (Figura 9B).

L'emivita dell'adenosina esogena, calcolata in presenza di EHNA è di 15 minuti, contro i 30 secondi calcolati in assenza dell'inibitore.

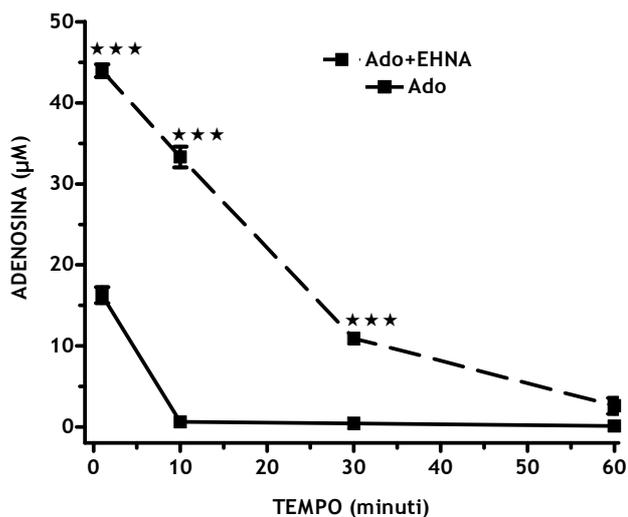


Figura 8. Metabolismo dell'adenosina esogena nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto in presenza e assenza di EHNA. Strips di tessuto sono state esposte ad adenosina esogena ($50 \mu\text{M}$) in presenza e assenza di EHNA ($1 \mu\text{M}$) per 1, 10, 30, e 60 minuti. L'inibitore è sempre stato aggiunto 15 minuti prima dell'adenosina. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da un minimo di 4 ad un massimo di 6 esperimenti. *** $P < 0,001$ paragonato ad Ado.

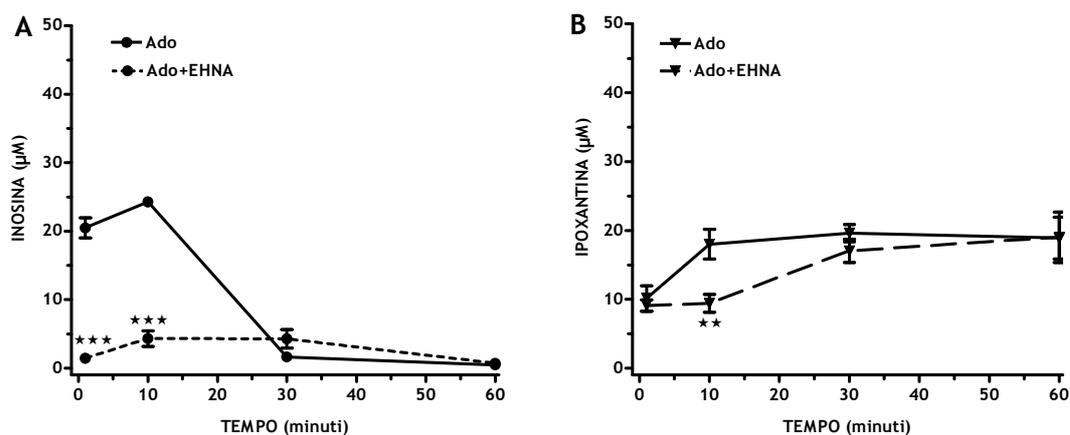


Figura 9A e 9B. Influenza dell'adenosina esogena sull'accumulo dei metaboliti inosina e ipoxantina nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto in presenza e assenza di EHNA. Strips di tessuto sono state esposte ad adenosina esogena ($50 \mu\text{M}$) in presenza e assenza di EHNA ($1 \mu\text{M}$) per 1, 10, 30, e 60 minuti. L'inibitore è sempre stato aggiunto 15 minuti prima dell'adenosina. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da un minimo di 4 ad un massimo di 6 esperimenti. *** $P < 0,001$ paragonato ad Ado; ** $P < 0,01$ paragonato ad Ado.

Anche in questo caso è stata condotta un'analisi a regressione lineare che mostra una correlazione tra la diminuzione di adenosina recuperata nel mezzo di incubazione e l'aumento delle concentrazioni dei metaboliti inosina e ipoxantina (Figura 10).

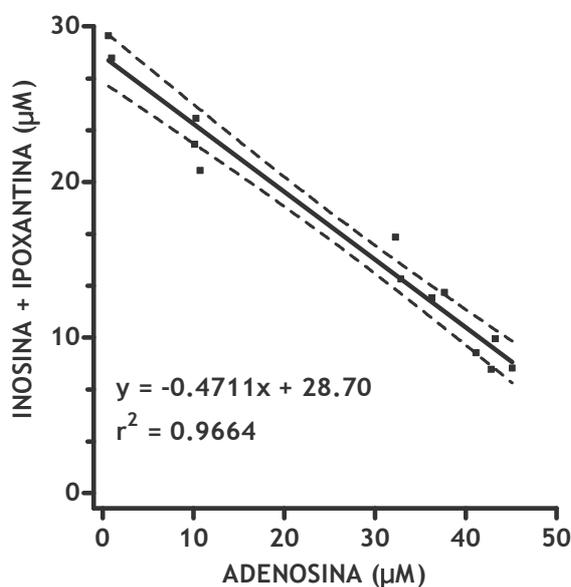


Figura 10. Regressione lineare tra la concentrazione di adenosina recuperata e le somme delle concentrazioni dei suoi metaboliti (inosina e ipoxantina) nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto in presenza o assenza di EHNA. Strips di ileo di ratto sono state esposte ad adenosina esogena (50 µM) in presenza o assenza di EHNA (1 µM) per 1, 10, 30, e 60 minuti.

3. Cinetica di degradazione dell'adenosina esogena nel mezzo condizionato di ileo di ratto.

È stata seguita anche la cinetica di eliminazione dell'adenosina esogena 50 µM in mezzo di incubazione condizionato dell'ileo di ratto, evidenziando anche in questo caso un'eliminazione rapida del nucleoside che ritorna ai livelli basali in 10 minuti. Tuttavia la velocità di eliminazione è minore di quella ottenuta in presenza di tessuto (Figura 11).

Si è poi voluto valutare se anche nel mezzo condizionato fosse presente l'adenosina deaminasi e a questo scopo sono stati condotti degli esperimenti in presenza e in assenza dell'inibitore (EHNA). Anche nel mezzo condizionato EHNA ha permesso il recupero totale dell'adenosina aggiunta, con la contemporanea abolizione della comparsa del suo metabolita inosina (Figura 12).

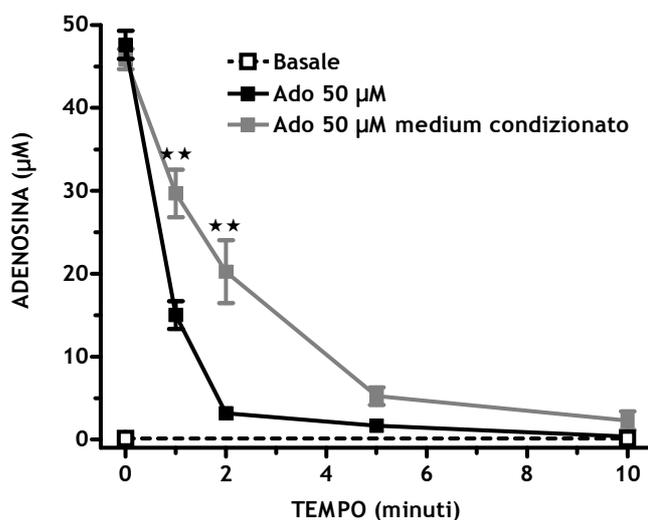


Figura 11. Eliminazione metabolica dell'adenosina esogena nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale e condizionato. Il mezzo contenente strips di tessuto e il mezzo condizionato sono stati esposti ad adenosina esogena (50 µM) per 0, 1, 2, 5 e 10 minuti. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da un minimo di 4 ad un massimo di 8 esperimenti. ** P<0,01 paragonato ad Ado.

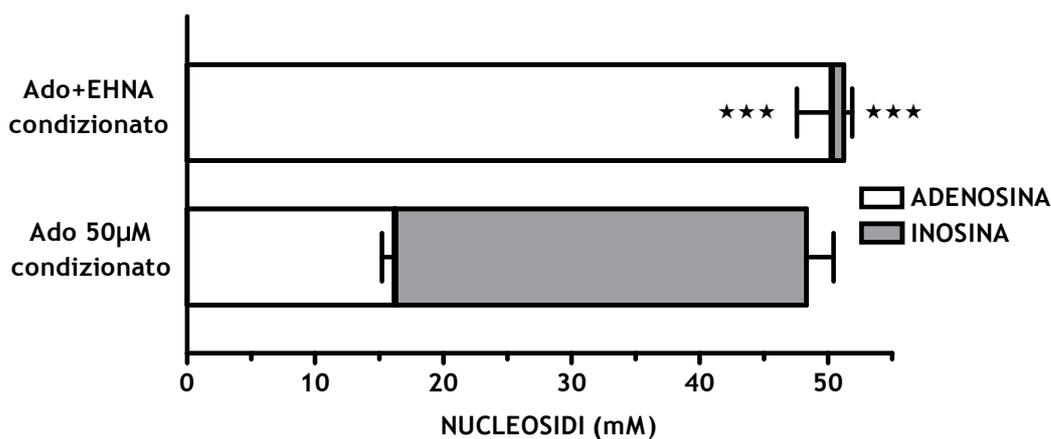


Figura 12. Influenza di EHNA sui livelli di adenosina esogena e del suo metabolita inosina nel mezzo di incubazione normale e condizionato dell'ileo di ratto. Il mezzo contenente strips di tessuto e il mezzo condizionato sono stati esposti ad adenosina (50 µM) per un minuto. EHNA (1 µM) è stato aggiunto 15 minuti prima del nucleoside. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. *** P<0,001 paragonato ad Ado.

4. Eliminazione metabolica di AMP, ATP e cAMP dal mezzo di incubazione dell'ileo di ratto in presenza e in assenza di tessuto.

ATP e AMP (50 μM) sono stati aggiunti al mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale e condizionato. Dopo 60 minuti le concentrazioni dei nucleotidi sono paragonabili a quelle basali in entrambe le condizioni sperimentali (Figure 13A e 13B).

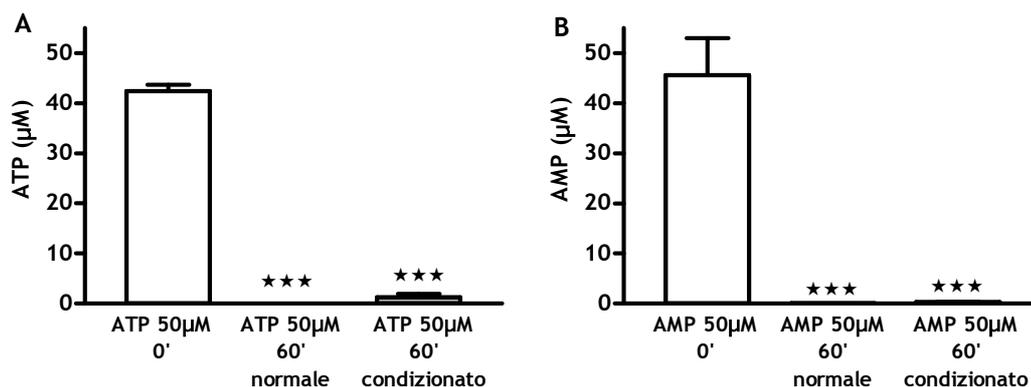


Figura 13. Eliminazione metabolica dell'ATP (A) e dell'AMP (B) esogeni nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale e condizionato. Il mezzo contenente strips di tessuto e il mezzo condizionato sono stati esposti ai nucleotidi esogeni (50 μM) per 60 minuti. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. *** $P < 0,001$ paragonato a $t=0'$

Sono stati condotti esperimenti analoghi utilizzando cAMP esogeno alla stessa concentrazione. Al termine dell'incubazione, mentre nel medium normale vi è una significativa diminuzione del nucleotide recuperato rispetto al tempo 0, nel medium condizionato la concentrazione di cAMP rilevata è paragonabile a quella aggiunta inizialmente (Figura 14).

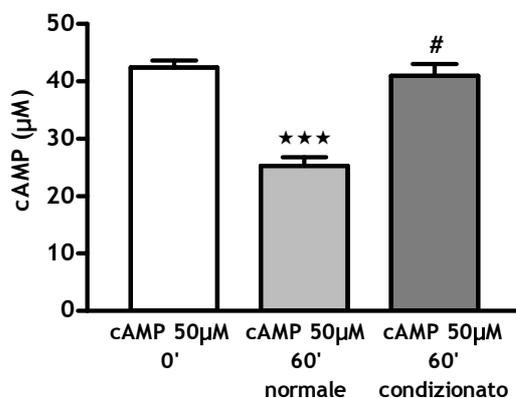


Figura 14. Eliminazione metabolica del cAMP esogeno nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale e condizionato. Il mezzo contenente strips di tessuto e il mezzo condizionato sono stati esposti al nucleotide esogeno (50 μM) per 60 minuti. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. $P < 0,001$ paragonato a $t=0'$; # N.S.S. paragonato a $t=0'$.

È stata poi confrontata la cinetica di eliminazione dell'AMP nelle due condizioni sperimentali (0, 5, 15 e 30 minuti). Mentre in presenza del tessuto l'AMP scompare dal mezzo in 15 minuti, in assenza di tessuto dopo 30 minuti è ancora rilevabile nel medium a una concentrazione di $18,95 \pm 2,84 \mu\text{M}$ (Figura 15).

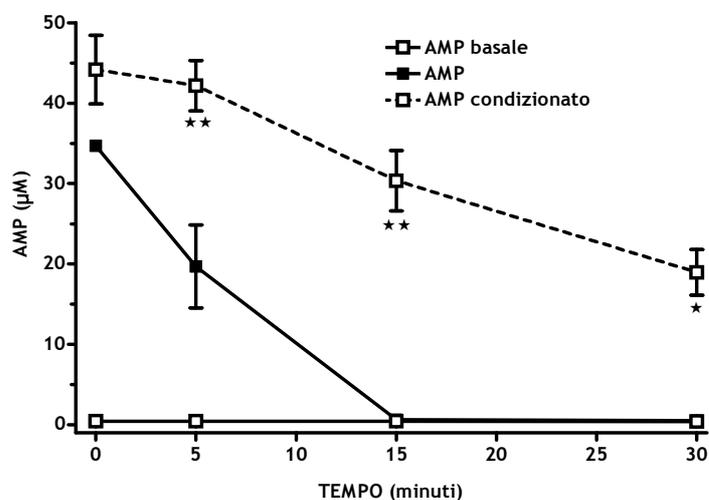


Figura 15. Eliminazione metabolica dell'AMP esogeno nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale e condizionato. Strips di tessuto e il mezzo condizionato sono stati esposti ad AMP esogeno ($50 \mu\text{M}$) per 0, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$ dei risultati ottenuti da un minimo di 4 ad un massimo di 8 esperimenti. ** $P < 0,01$ paragonato ad AMP. * $P < 0,05$ paragonato ad AMP.

In entrambi i casi la diminuzione dell'AMP è accompagnata da un contemporaneo aumento dei suoi prodotti di degradazione, adenosina, inosina e ipoxantina, significativo rispetto ai valori basali (Figure 16A e 16B).

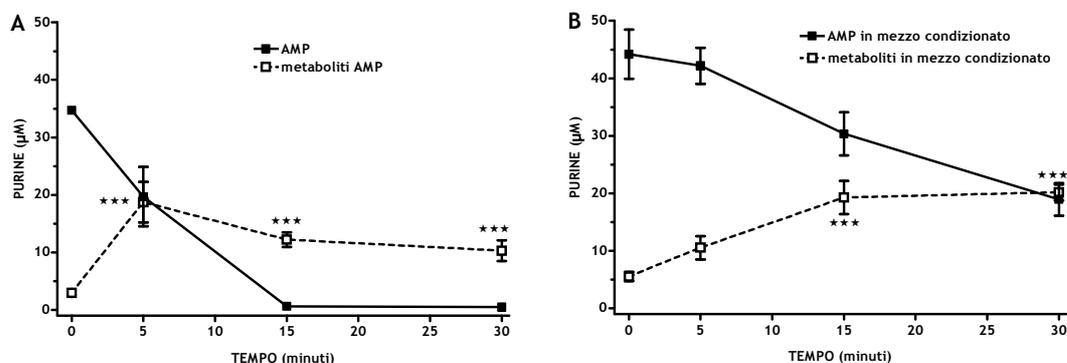


Figura 16. Influenza dell'AMP esogeno sull'accumulo dei metaboliti adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale (A) e condizionato (B). Strips di ileo di ratto e il medium condizionato sono stati esposti ad AMP esogeno ($50 \mu\text{M}$) per 0, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$ dei risultati ottenuti da un minimo di 4 ad un massimo di 8 esperimenti. A: *** $P < 0,001$ paragonato a $t=0'$; B: *** $P < 0,001$ paragonato a $t=0'$.

Usando un tempo di incubazione di 5 minuti, che permette di rilevare l'AMP esogeno sia nel medium normale che condizionato, si è voluto valutare il grado di coinvolgimento dell'enzima ecto-5'-nucleotidasi nella degradazione del nucleotide esogeno ($50 \mu\text{M}$) e nella comparsa dei suoi metaboliti utilizzando un inibitore selettivo dell'enzima, AOPCP ($200 \mu\text{M}$).

In assenza di inibitore la somma delle concentrazioni di AMP e dei suoi prodotti di degradazione è paragonabile alla quantità iniziale di nucleoside aggiunto. Sia nel medium normale che in quello condizionato AOPCP permette un recupero totale del nucleotide, con contemporanea abolizione della comparsa dei prodotti di degradazione (Figura 17).

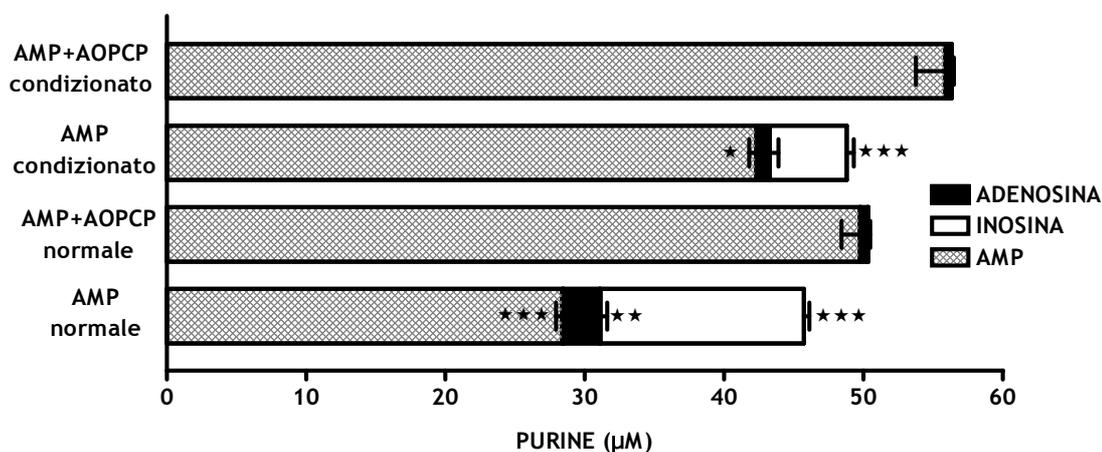


Figura 17. Influenza di AOPCP sui livelli di AMP esogeno e dei suoi metaboliti adenosina ed inosina nel mezzo di incubazione normale e condizionato dell'ileo di ratto. Strips di ileo di ratto e il mezzo condizionato sono stati esposti ad AMP (50 μM) per 5 minuti. AOPCP (200 μM) è stato aggiunto 15 minuti prima del nucleotide. * $P < 0,05$ paragonato a AMP+AOPCP condizionato; ** $P < 0,01$ paragonato a AMP+AOPCP normale; *** $P < 0,001$ paragonato ad AMP+AOPCP.

5. Influenza della mucosa sull'eliminazione di AMP nel mezzo di incubazione di ileo di ratto.

Una serie di prove ha avuto lo scopo di valutare l'influenza della mucosa intestinale sulla cinetica di degradazione di AMP esogeno da parte delle strips di ileo. Per questo una parte degli esperimenti è stata condotta utilizzando strips di tessuto integro mentre in altri è stato asportato dal tessuto lo strato epiteliale.

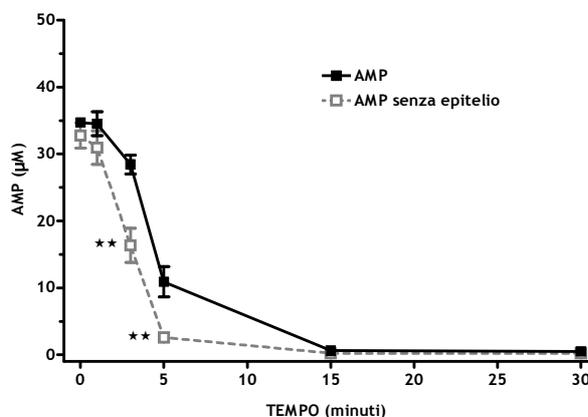


Figura 18. Cinetica di eliminazione di AMP esogeno nel mezzo di incubazione di ileo di ratto con e senza epitelio. Le strips di ileo sono state esposte ad AMP esogeno (50 μM) per 0, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da un minimo di 2 ad un massimo di 6 esperimenti. ** $P < 0,01$ paragonato a AMP.

A 5 minuti di incubazione si evidenzia una differenza significativa nelle quantità di AMP recuperato negli esperimenti con e senza epitelio: se il tessuto viene privato della mucosa il recupero del nucleotide è minore rispetto al caso in cui venga lasciato integro lo strato epiteliale. In entrambe le condizioni sperimentali i valori di AMP ritornano ai livelli basali in 15 minuti (Figura 18).

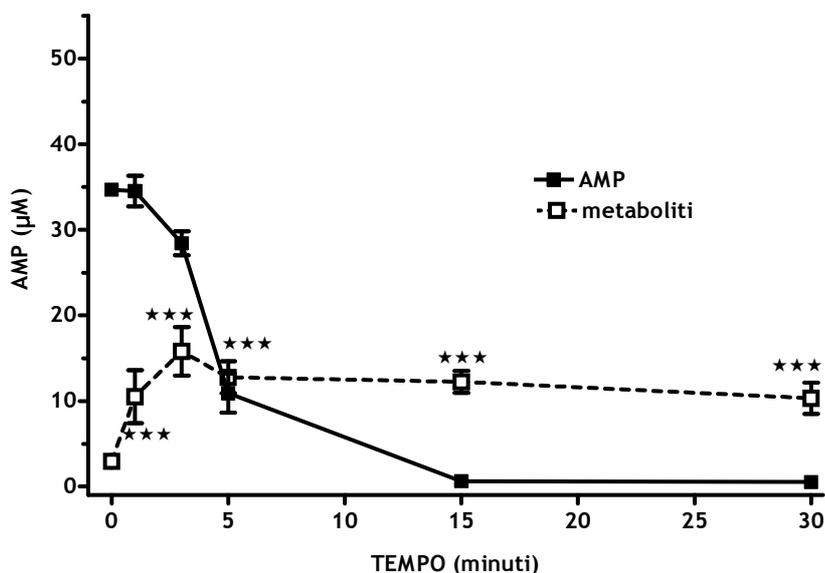


Figura 19 Cinetica di eliminazione di AMP esogeno e accumulo dei suoi metaboliti (adenosina, inosina, ipoxantina) nel mezzo di incubazione di ileo di ratto. Le strips di tessuto sono state esposte ad AMP esogeno (50 μM) per 0, 1, 3, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. *** P<0,01 paragonato a t=0'.

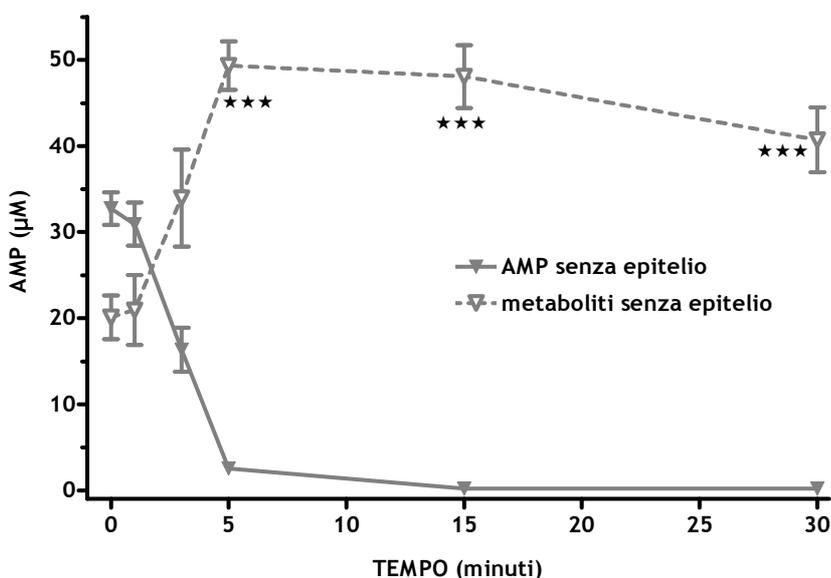


Figura 20. Cinetica di eliminazione di AMP esogeno e accumulo dei suoi metaboliti (adenosina, inosina, ipoxantina) nel mezzo di incubazione di ileo di ratto senza epitelio. Le strips di tessuto sono state esposte ad AMP esogeno (50 μM) per 0, 1, 3, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. P<0,001 paragonato a t=0'.

Alla diminuzione della concentrazione di AMP recuperato nel medium corrisponde un aumento dei suoi metaboliti (adenosina ed inosina) con marcate differenze quantitative (Figure 19 e 20). Negli esperimenti condotti su strips integre, ad un iniziale aumento delle concentrazioni dei metaboliti dell'AMP segue una fase di plateau a partire da 5 minuti di incubazione (Figura 19). In assenza di epitelio l'accumulo dei metaboliti è molto più marcato e aumenta fino a 5 minuti. Inoltre la somma delle concentrazioni dei metaboliti accumulati e di AMP recuperato corrisponde circa alla quantità iniziale di nucleotide aggiunto (Figura 20).

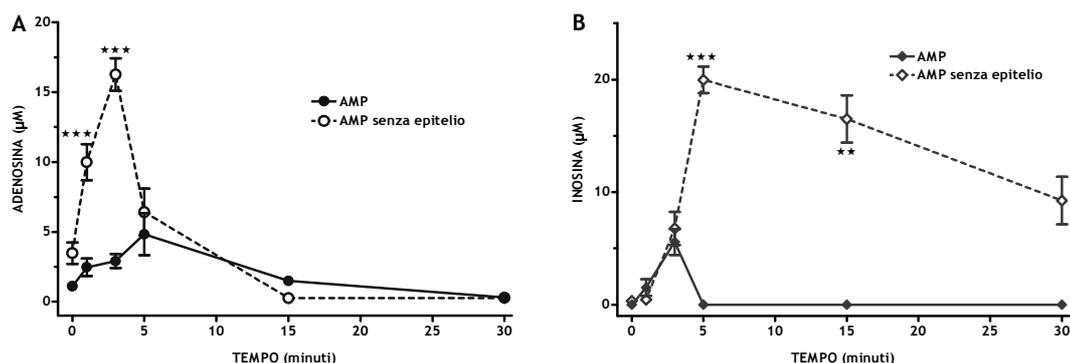


Figura 21. Accumulo di adenosina (A) ed inosina (B) dopo aggiunta di AMP esogeno nel mezzo di incubazione di ileo di ratto con e senza epitelio. Strips di tessuto sono state esposte ad AMP esogeno (50 µM) per 0, 1, 3, 5, 15, 30 minuti. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. A: *** $P < 0,001$ paragonato a $t=0'$; B: *** $P < 0,001$ paragonato a $t=0'$, ** $P < 0,01$ paragonato a $t=0'$.

Considerando separatamente i due metaboliti dell'AMP, negli esperimenti condotti rimuovendo la mucosa si nota un significativo aumento della concentrazione di adenosina rispetto ai livelli basali fino a 3 minuti. Tale aumento si protrae fino a 5 minuti se il tessuto è integro. In entrambi i casi il nucleoside scompare dal mezzo di incubazione in 15 minuti. Se lo strato epiteliale viene rimosso si recupera una concentrazione di adenosina 3 volte superiore a quella misurata negli esperimenti condotti su tessuto integro (Figura 21A).

In entrambe le condizioni vi è un significativo accumulo di inosina. In presenza dello strato epiteliale il nucleoside ritorna ai livelli basali in 5 minuti, mentre in assenza di mucosa si accumula nel medium in concentrazioni rilevabili fino a 30 minuti (Figura 21B).

Avendo già verificato che esiste un'eliminazione metabolica dell'AMP nel mezzo condizionato, si è valutato un eventuale coinvolgimento dello strato epiteliale effettuando una serie di esperimenti su mezzo condizionato da strips di tessuto prive di mucosa.

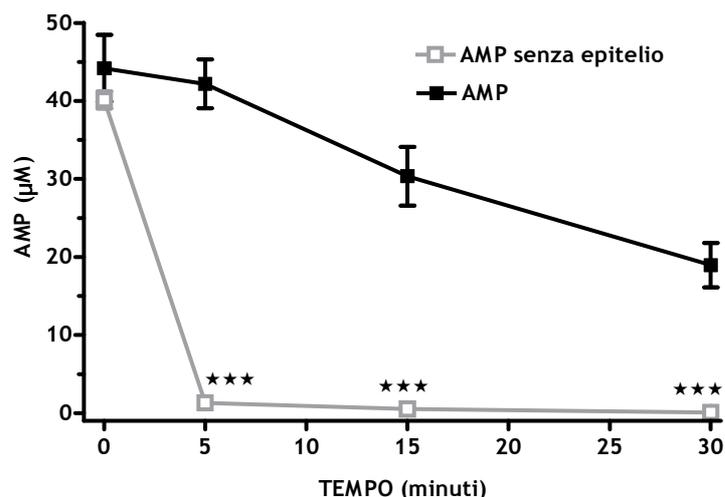


Figura 22. Cinetica di eliminazione di AMP esogeno nel mezzo di incubazione condizionato di ileo di ratto in presenza ed in assenza dello strato epiteliale. Il mezzo condizionato è stato esposto ad AMP esogeno ($50 \mu\text{M}$) per 0, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$ dei risultati ottenuti da un minimo di 6 ad un massimo di 10 esperimenti. *** $P < 0,001$ paragonato ad AMP.

La rimozione dello strato epiteliale causa un'eliminazione molto rapida di AMP dal mezzo condizionato e a 5 minuti il nucleotide ritorna a livelli basali, mentre in presenza della mucosa esso viene recuperato in concentrazioni rilevabili anche dopo 30 minuti di incubazione (Figura 22).

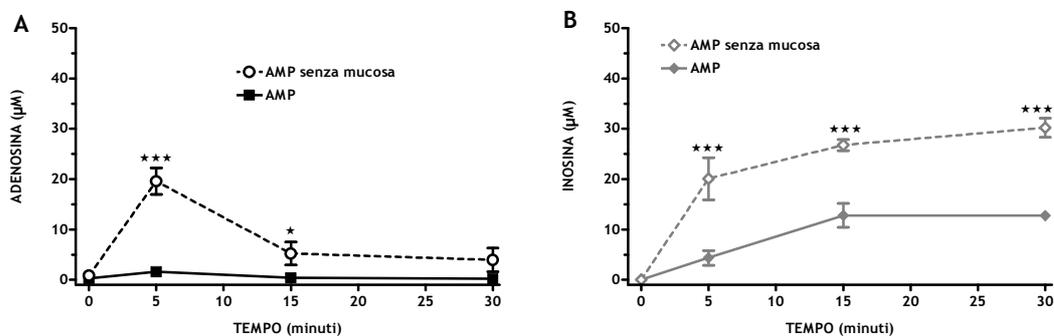


Figura 23. Accumulo di adenosina (A) e di inosina (B) derivante dall'eliminazione metabolica di AMP esogeno nel mezzo di incubazione condizionato di ileo di ratto. Strips di tessuto, in presenza ed assenza dello strato epiteliale, sono state esposte ad AMP esogeno ($50 \mu\text{M}$) per 0, 5, 15, 30 minuti. I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$ dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. A: *** $P < 0,001$ paragonato a AMP; * $P < 0,05$ paragonato a AMP. B: *** $P < 0,001$ paragonato a AMP.

Usando strips prive della mucosa, alla scomparsa del nucleotide aggiunto al mezzo condizionato corrisponde un aumento significativo di adenosina (Figura 9) e inosina (Figura 23) dopo 5 minuti di incubazione. A 15 minuti l'adenosina ritorna a livelli basali (Figura 23A) mentre l'inosina mantiene costante la sua concentrazione (Figura 23B).

In entrambi i casi, confrontando con gli esperimenti condotti utilizzando strips integre, si nota un accumulo significativamente maggiore dei metaboliti dell'AMP.

6. Eliminazione di ATP esogeno dal mezzo di incubazione dell'ileo di ratto normale e condizionato.

Abbiamo voluto a questo punto valutare se ATP, precursore di AMP, venga eliminato dal mezzo di incubazione dell'ileo di ratto e se questa eliminazione sia di tipo metabolico.

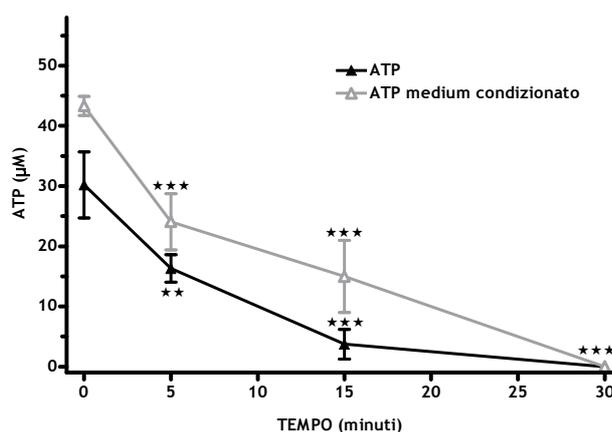


Figura 24. Eliminazione metabolica dell'ATP esogeno nel mezzo di incubazione di ileo di ratto normale e condizionato. Il mezzo contenente strips di ileo di ratto e il mezzo condizionato sono stati esposti ad ATP esogeno ($50 \mu\text{M}$) per 0, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. ** $P < 0,01$ paragonato a $t=0'$; *** $P < 0,001$ paragonato a $t=0'$.

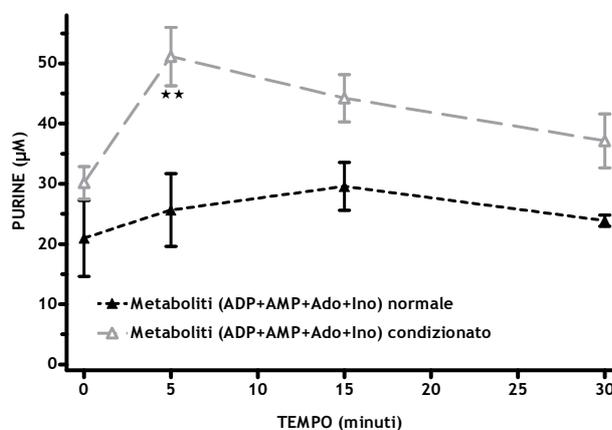


Figura 25. Accumulo dei metaboliti dell'ATP esogeno nel mezzo di incubazione di ileo di ratto normale e condizionato. Il mezzo contenente strips di ileo di ratto e il mezzo condizionato sono stati esposti ad ATP esogeno ($50 \mu\text{M}$) per 0, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti. ** $P < 0,01$ paragonato a $t=0'$.

In 30 minuti l'ATP esogeno scompare dal mezzo di incubazione normale e condizionato riportandosi ai livelli basali. In presenza di tessuto l'eliminazione è più rapida: ad esempio a 15 minuti viene recuperato in concentrazione $3,7 \pm 2,5 \mu\text{M}$ contro una concentrazione di $15,0 \pm 6,0 \mu\text{M}$ nel medium condizionato (Figura 24).

Parallelamente si nota un accumulo dei suoi metaboliti nel mezzo di incubazione. In assenza di tessuto si accumula una quantità più elevata di metaboliti dell'ATP ($51,1 \pm 4,4 \mu\text{M}$ contro $25,6 \pm 6,0 \mu\text{M}$ a 5 minuti) (Figura 25).

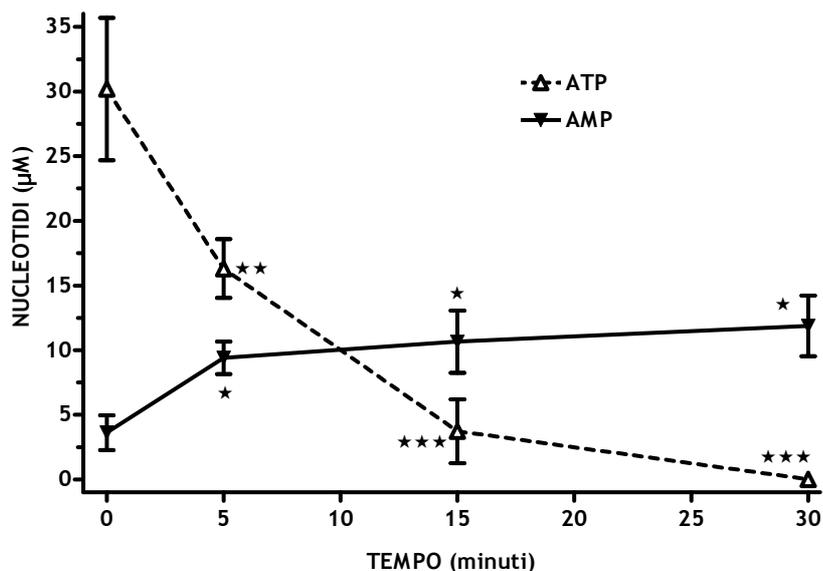


Figura 26. Cinetica di eliminazione di ATP esogeno e accumulo di AMP nel mezzo di incubazione di ileo di ratto. Le strips di tessuto sono state esposte ad ATP esogeno (50 µM) per 0, 5, 15 e 30 minuti. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti.

Esaminando separatamente dagli altri metaboliti l'accumulo di AMP, si può notare come a 30 minuti di incubazione il nucleotide sia ancora rilevabile nel medium, contrariamente a quanto visto negli esperimenti di cinetica con AMP esogeno, in cui ritornava ai livelli basali dopo 15 minuti (Figura 26).

La suramina, un inibitore parziale delle ATPasi, non causa variazioni significative nel recupero dell'ATP esogeno e nemmeno nell'accumulo dei suoi metaboliti.

	ATP	ADP	AMP	adenosina	inosina	ipoxantina
ATP + suramina	26,50±2,64	38,35±6,51	6,76±0,60	0,33±0,02	1,48±0,30	8,65±0,39
ATP	29,18±3,29	34,14±2,65	6,09±0,88	0,48±0,15	0,67±0,39	3,39±0,57

Tabella 1. Influenza della suramina sui livelli di ATP esogeno e dei suoi metaboliti adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo di incubazione di ileo di ratto. Strips di ileo di ratto sono state esposte ad ATP esogeno (50 µM) per 5 minuti. La suramina (100 µM) è stata aggiunta 15 minuti prima del nucleotide. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti.

DISCUSSIONE

L'ileo di ratto incubato in vitro si è dimostrato in grado di metabolizzare l'adenosina in tempi molto brevi. Infatti nei nostri esperimenti dopo 5 minuti la concentrazione del nucleoside esogeno nel mezzo di incubazione è ritornata ai livelli basali. Contemporaneamente si è ottenuto un aumento delle concentrazioni dei suoi prodotti di degradazione: inosina e ipoxantina. Si è potuto anche dimostrare che l'aumento delle concentrazioni dei metaboliti è linearmente correlato alla diminuzione della concentrazione dell'adenosina. Questo dimostra che la sua via di eliminazione principale è quella metabolica e che l'ingresso nelle cellule per mezzo dei trasportatori per le purine è da considerarsi trascurabile. Infatti NBTI, inibitore dei trasportatori di tipo equilibrativo, a un minuto di incubazione non ha causato alcuna variazione significativa nelle concentrazioni di adenosina e inosina e studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno escluso un coinvolgimento di questa via anche a tempi più lunghi (60 minuti), in accordo con i risultati di Tennant e collaboratori (Tennant *et al.*, 1999). Ciò porta a concludere che, anche se è stato dimostrato in un lavoro sul sistema nervoso centrale che l'adenosina viene trasportata all'interno delle cellule e preferenzialmente per questa via (Dunwiddie and Masino, 2001), non si tratta però della via che più efficacemente elimina il nucleoside dal compartimento extracellulare dell'ileo di ratto, almeno fino a 60 minuti. L'adenosina dunque in questo tessuto va incontro a metabolismo extracellulare. Infatti l'EHNA, inibitore dell'ADA, ha causato un significativo aumento della concentrazione di adenosina con una contemporanea e significativa diminuzione della concentrazione dei suoi metaboliti. Si può concludere che a tempi brevi l'adenosina viene eliminata esclusivamente per questa via. Dunque l'enzima che catalizza la conversione adenosina-inosina nel compartimento extracellulare è la ecto-ADA e numerosi lavori presenti in letteratura indicano l'ADA come un enzima molto attivo a livello intestinale (Giron *et al.*, 2008; Correia-de-Sá *et al.*, 2006; Duarte-Araújo *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 1998). È già noto da tempo che l'ADA assume un ruolo nella regolazione delle concentrazioni extracellulari di adenosina in condizioni di ipossia e ischemia, condizioni in cui i trasportatori per l'adenosina sono poco attivi (Dunwiddie and Masino, 2001) e i nostri esperimenti indicano che nell'intestino ciò avviene anche in condizioni fisiologiche.

È importante notare che, in assenza di EHNA, la somma delle concentrazioni di adenosina e inosina recuperate nel mezzo di incubazione è risultata inferiore alla concentrazione di adenosina esogena aggiunta all'inizio dell'incubazione, ad indicare che anche la via di eliminazione dell'inosina è molto efficiente. Il metabolita può essere anch'esso trasportato all'interno delle cellule o venire metabolizzato a ipoxantina, xantina e successivamente ad acido urico ad opera dell'enzima PNP.

In questi esperimenti l'adenosina e i suoi metaboliti (inosina, ipoxantina e AMP) sono stati misurati anche nel tessuto. L'assenza di variazioni dovute all'incubazione con adenosina

esogena, così come all'aggiunta di NBTI o di EHNA, ha confermato che il nucleoside non viene captato dalle cellule.

In presenza di EHNA l'adenosina esogena viene recuperata in concentrazioni rilevabili fino ai 30 minuti di incubazione, ritornando poi ai livelli basali. Questo dimostra che l'inibizione della via di deaminazione non è sufficiente a conservare il nucleoside a tempi lunghi, ai quali si ha l'intervento di altri sistemi di eliminazione. Avendo escluso la via dei trasportatori equilibrativi, resta da studiare la via dei trasportatori concentrativi per le purine. Del resto anche in letteratura vi sono numerosi dati che indicano nei CNT i migliori candidati per un efficiente uptake di adenosina extracellulare nelle cellule dei mammiferi (Dufлот *et al.*, 2004).

L'inosina, prodotto di deaminazione dell'adenosina, si è accumulata nel mezzo di incubazione in quantità significativamente maggiore rispetto ai livelli basali. Tuttavia anch'essa è successivamente scomparsa dal medium, indice che nell'ileo di ratto esiste una via di eliminazione anche per l'inosina. EHNA previene la comparsa dell'inosina, che quindi derivava completamente dalla deaminazione dell'adenosina esogena.

Anche per l'ipoxantina si ha un significativo accumulo in presenza di adenosina esogena, evidentemente perché è derivata dal catabolismo dell'inosina. Tale accumulo è stato inizialmente inibito da EHNA, indicando che l'ipoxantina deriva dal metabolismo dell'adenosina esogena.

Resta ancora molto da capire sul destino dei metaboliti dell'adenosina: inosina e ipoxantina in primo luogo, ma anche xantina e acido urico. Questo è di particolare interesse considerando che anche l'inosina è riconosciuta come un fattore protettivo nei confronti dell'infiammazione (Haskó *et al.*, 2004, Mabley *et al.*, 2003a; Liudet *et al.*, 2001).

Un'altra possibilità a riguardo del destino dell'adenosina extracellulare è la sua fosforilazione ad AMP ad opera di una chinasi, ma i nostri risultati non hanno evidenziato variazioni significative nelle concentrazioni di AMP e ciò ci porta ad escludere questa via, in accordo con i risultati di Duarte-Araújo e colleghi (Duarte-Araújo *et al.*, 2004).

In maniera analoga non si sono ottenute variazioni significative dei livelli di IMP e questo porta a concludere che l'ecto-AMP deaminasi non è presente nell'ileo di ratto, in accordo con i risultati ottenuti da Cunha nel 2001 con studi condotti sull'ippocampo di ratto (Cunha *et al.*, 2001).

Una serie di esperimenti in cui l'adenosina è stata aggiunta al medium condizionato, allo scopo di verificare la presenza di forme enzimatiche rilasciate dal tessuto, ha dimostrato come anche dopo rimozione del tessuto essa scompare rapidamente dal mezzo di incubazione. Dal confronto con i dati ottenuti in medium normale si evidenzia come il destino del nucleoside sia molto simile se gli esperimenti vengono condotti in assenza del tessuto, anche se la cinetica di eliminazione è più lenta. Anche in queste condizioni l'EHNA ha causato un significativo recupero dell'adenosina esogena e la scomparsa dell'inosina. Questo porta ad affermare che esiste una forma di exo-ADA liberata dall'ileo di ratto, come già è stato verificato in altri distretti dell'organismo (Centelles and Franco, 1990; Correia-de-Sá *et al.*, 2006). Anche per la PNP vi sono numerosi lavori in letteratura che indicano l'esistenza di una forma solubile nei fluidi interstiziali (Silva *et al.*, 2004). In

accordo con questi dati, la comparsa di ipoxantina, prodotto di degradazione dell'inosina, da noi dimostrata suggerisce l'esistenza di una forma di questo enzima che viene rilasciata dal tessuto.

Per quanto concerne i precursori dell'adenosina, mentre in presenza di tessuto esiste una eliminazione metabolica del cAMP, a conferma dell'esistenza di una ecto-cAMP-PDE implicata nella via metabolica cAMP-adenosina extracellulare nell'ileo di ratto (Giron *et al.*, 2008), nel medium condizionato si è ottenuto un recupero totale del nucleotide ciclico. Questo porta a concludere che non esiste una exo-cAMP-PDE nell'ileo di ratto. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Mihaylova-Todorova e collaboratori, con uno studio condotto su vasi deferenti di cavia (Mihaylova-Todorova *et al.*, 2002). Al contrario, l'esistenza di una forma enzimatica rilasciata in sede extracellulare è stata dimostrata da Stracke e colleghi utilizzando un medium condizionato di una linea cellulare di melanoma umano (Stracke *et al.*, 1997).

Diversamente dal cAMP, ATP e AMP sono stati completamente eliminati anche dal medium condizionato. Quindi è possibile affermare l'esistenza sia di una exo-5'-nucleotidasi che di exo-ATPasi. In maniera analoga Mihaylova-Todorova e colleghi hanno dimostrato che la degradazione dell'ATP extracellulare e conseguentemente i livelli extracellulari di adenosina sono regolati da ATPasi e da 5'-nucleotidasi solubili, rilasciate sotto stimolazione dei nervi simpatici dai vasi deferenti di cavia (Mihaylova-Todorova *et al.*, 2002). Il concomitante rilascio di ATP endogeno e forme solubili di ATPasi e 5'-nucleotidasi è stato verificato anche da Yegutkin e collaboratori su cellule endoteliali in condizioni sperimentali di stress. Questi autori hanno dimostrato che queste forme enzimatiche solubili non vengono rilasciate da compartimenti intracellulari insieme all'ATP in seguito a lisi cellulare o a perdita di integrità di membrana (Yegutkin *et al.*, 2000). Tuttavia i meccanismi attraverso i quali si ha il rilascio di exo-enzimi nello spazio extracellulare non sono ancora chiari: la 5'-nucleotidasi rilasciata potrebbe derivare dalla membrana cellulare mediante il distacco della CD73 ad opera della fosfolipasi C. Gli enzimi potrebbero anche derivare da microvescicole poste in invaginazioni della membrana plasmatica: questa ipotesi è stata avanzata per la CD39 (Yegutkin 2008).

La diminuzione di AMP esogeno è accompagnata da un aumento dei suoi prodotti di degradazione, ed esiste una proporzionalità diretta tra aumento dei metaboliti e diminuzione del nucleotide, a ulteriore conferma dell'attività della 5'-nucleotidasi sia in forma di exo- che di ecto-enzima. L'ecto-5'-nucleotidasi o CD73 è infatti presente a livello intestinale. In particolare, nella porzione prossimale dell'intestino tenue è abbondante sia nelle cripte che nei villi, mentre nell'ileo e nel colon è limitata alle cripte (Strohmeier *et al.*, 1997), e svolge un ruolo protettivo e di barriera (Synnestvedt *et al.*, 2002). La forma solubile rilasciata dal tessuto nei fluidi interstiziali è stata dimostrata anche nei lavori di Mihaylova-Todorova e colleghi e di Yegutkin e colleghi (Mihaylova-Todorova *et al.*, 2002; Yegutkin *et al.*, 2000). Quindi, la produzione fisiologica di adenosina in sede extracellulare è un complesso meccanismo regolato dalla ecto-5'-nucleotidasi legata alle membrane e dalle nucleotidasi rilasciate, confermando che la ecto-5'-nucleotidasi legata alle membrane cellulari non è l'unico enzima che può degradare l'AMP ad adenosina (Yegutkin *et al.*, 2003).

L'AOPCP, inibitore competitivo di CD73, ha consentito il recupero totale dell'AMP esogeno. Questo porta ad escludere l'intervento di altre vie metaboliche per l'AMP, come la defosforilazione ad opera della fosfatasi alcalina, almeno fino al tempo di incubazione considerato. La defosforilazione ad adenosina rappresenta pertanto la principale via metabolica nella produzione di adenosina extracellulare, in accordo con Synnestvedt e collaboratori e Colgan e collaboratori (Synnestvedt *et al.*, 2002; Colgan *et al.*, 2006).

Nel medium condizionato da strips prive di mucosa la cinetica di eliminazione di AMP è risultata molto più rapida rispetto al medium condizionato da strips integre, a indicare che lo strato epiteliale rappresenta una barriera al rilascio di CD73. Anche il pool dei metaboliti del nucleotide ha raggiunto concentrazioni più elevate in assenza che in presenza di mucosa. Questi risultati indicano una maggiore presenza di CD73 negli strati più profondi piuttosto che non nello strato epiteliale. Ciò è confermato da studi di immunistochemica condotti dal nostro gruppo di ricerca, che hanno evidenziato una marcata presenza dell'enzima nelle cellule muscolari lisce nell'ileo di ratto, in particolare a livello delle giunzioni intercellulari (Giron *et al.*, 2008). È interessante notare come, in presenza di tessuto, la somma delle concentrazioni dei metaboliti accumulati e di AMP recuperato corrispondesse alla quantità iniziale di nucleotide aggiunto, ma solo dopo l'asportazione dello strato mucoso. Questo è giustificato sia dal fatto che la mucosa è ricca in enzimi che degradano l'ipoxantina in xantina e quindi acido urico, sia dal fatto che è uno strato molto ricco di trasportatori per le purine (Lu *et al.*, 2004; Aymerich *et al.*, 2004).

L'importanza dello strato epiteliale nell'azione dell'ADA è già stata documentata in numerosi lavori presenti in letteratura (Bin *et al.*, 2008; Moriwaki *et al.*, 2004; Chinsky *et al.*, 1990). Se si considera l'accumulo dei metaboliti dell'AMP, si nota come l'assenza dello strato epiteliale permetta un maggior accumulo di adenosina e inosina, che quindi vengono metabolizzati più facilmente in presenza della mucosa. Questo porta a ipotizzare che, al contrario di quanto visto per l'AMP, la mucosa sia il sito preferenziale di attività enzimatica e/o trasporto per la rimozione di adenosina e inosina.

L'AMP può derivare, oltre che dal cAMP, anche dall'ATP attraverso una sequenza di defosforilazioni. Nel medium condizionato il nucleotide è ritornato ai livelli basali in 30 minuti, evidenziando la presenza di una forma di ATPasi rilasciata dal tessuto, in accordo con quanto riportato da Mihaylova-Todorova e colleghi per esperimenti sui vasi deferenti di cavia e con Yegutkin e colleghi su cellule endoteliali umane (Mihaylova-Todorova *et al.*, 2002; Yegutkin *et al.*, 2000). La diminuzione di ATP era associata ad un aumento dei suoi prodotti di degradazione, soprattutto ADP e AMP. Tuttavia la successiva degradazione dell'AMP è avvenuta molto più lentamente di quanto visto negli studi con AMP esogeno, in accordo con il fatto che ATP e ADP inibiscono la ecto-5'-nucleotidasi e quindi ostacolano la defosforilazione dell'AMP (Salmi and Jalkanen, 2005). Negli esperimenti in cui l'ATP è stato aggiunto dopo aver rimosso il tessuto si è evidenziato che la somma dei metaboliti dell'ATP recuperati nel mezzo condizionato è paragonabile alla concentrazione iniziale del nucleotide aggiunto. Negli esperimenti condotti in presenza del tessuto, invece, tale somma è risultata inferiore, probabilmente per la maggiore quantità di enzimi coinvolti nella degradazione dell'ipoxantina ai suoi metaboliti, xantina e l'acido urico. Non è da

escludere inoltre il contributo dei trasportatori che potrebbero trasportare nel tessuto adenosina, inosina e ipoxantina (King *et al.*, 2006).

Nel nostro modello sperimentale la suramina, che in numerosi lavori è indicato come un inibitore non competitivo delle ATPasi (Rücker *et al.*, 2008; Munkonda *et al.*, 2007), non ha causato variazioni significative né nel recupero di ATP né nell'accumulo dei suoi metaboliti. Pertanto, gli enzimi coinvolti nell'eliminazione dell'ATP nel compartimento extracellulare dell'ileo di ratto non sono quelli sensibili all'inibizione della suramina. L'effetto inibente di questa sostanza sull'idrolisi dell'ATP da parte di ecto-nucleotidasi è stato accertato in vari tipi di cellule. Tuttavia in questi studi non vengono identificate le isoforme di NTPDasi espresse, e non viene nemmeno escluso un contributo di altri tipi di ecto-nucleotidasi all'idrolisi di ATP (Iqbal *et al.*, 2005).

L'adenosina deaminasi, specialmente la ecto-ADA, inattivando l'adenosina extracellulare prolunga lo stato infiammatorio (Kuno *et al.*, 2006). Un uso razionale degli inibitori dell'enzima potrebbe quindi fornire un approccio terapeutico nei confronti delle malattie infiammatorie dell'intestino. Resta comunque da valutare se ciò sia possibile, per i rischi che possono derivare da una quantità troppo elevata di adenosina, soprattutto in certi organi e apparati. Un'azione locale deve inoltre tenere conto che un eccesso di adenosina nel tratto intestinale può avere un'azione diarroica.

Conoscere le vie metaboliche di eliminazione e formazione extracellulare dell'adenosina è importante per lo studio di terapie innovative che intervengano sugli enzimi. Questo tipo di approccio è risultato importante in vari distretti dell'organismo e per varie situazioni patologiche. Nel trattamento della leucemia a cellule capellute viene utilizzata la pentostatina, l'unico inibitore attualmente approvato per uso clinico (Kuno *et al.*, 2006). Altri esempi sono rappresentati dall'ischemia del miocardio e la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (Adanin *et al.*, 2002). Inoltre, la somministrazione di apirasi ha manifestato effetti benefici in trapianti sperimentali di cuore e rene e in modelli murini di danno da ischemia-riperfusion (Guckelberger *et al.*, 2004). Questo tipo di approccio permetterebbe di evitare l'uso di agonisti recettoriali che, oltre ad avere una breve emivita e indurre effetti avversi quali ipotensione e bradicardia (Siegmund *et al.*, 2001), spesso sono dotati di scarsa selettività e elevata tossicità intrinseca (Jacobson and Gao, 2006). Il fine ultimo della ricerca sviluppata nel corso di questa tesi è dunque quello di ottenere le conoscenze di base che potranno poi essere utilizzate per sviluppare delle terapie farmacologiche a base di inibitori enzimatici e/o precursori dell'adenosina. Inibitori enzimatici somministrati oralmente, alle dosi in cui esplicano azioni antinfiammatorie, non causano effetti indesiderati a livello cardiovascolare, suggerendo che l'up-regulation dell'adenosina nel tessuto infiammato non causa un aumento rilevante della sua concentrazione sistemica (Siegmund *et al.*, 2001). Dal momento che l'azione si esplica a livello extracellulare, la ricerca si potrà pensare alla sintesi di composti a bassa lipofilia che possano essere somministrati per via orale, permettendo così di evitare gli effetti indesiderati dovuti a un'azione sistemica dei farmaci, vista l'ubiquitariet  dei recettori per l'adenosina e la molteplicit  di processi fisiologici che vengono regolati da questo nucleoside.

BIBLIOGRAFIA

- Adanin S., Yalovetskiy I.V., Nardulli B.A., Sam A.D. 2nd, Jonjev Z.S., Law W.R. Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *American Journal of Physiology* 282: 1324-1332. (2002)
- Arnaud A., Lopez- Pedrosa Maria J., Torres I.M. and Gil A. Dietary nucleotides modulate mitochondrial function of intestinal mucosa in weanling rats with chronic diarrhea *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 37: 124-131. (2003)
- Antonoli L., Fornai M., Colucci R., Ghisu N., Da Settimo F., Natale G., Kastsichenka O., Duranti E., Viridis A., Vassalle C., La Motta C., Mugnaini L., Breschi M. C., Blandizzi C. and Del Tacca M. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322: 435-442. (2007)
- Aymerich I., Pastor-Anglada M., Casado F.J. Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *Journal of General Physiology* 124: 505-512. (2004)
- 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. *European Journal of Physiology* 447: 735-743. (2004)
- Bin A., Calligaro G., Brun P., Zoppellaro C., Castagliuolo I., Gaion R.M., Giron M.C. Functional distribution of ecto-enzymes involved in extracellular adenosine generation in rat intestinal smooth muscle cells. *Purinergic Signalling* 4 (Suppl 1); S103. (2008)
- Bornstein J.C. Purinergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility. *Purinergic Signalling* 4: 197-212. (2008)
- Bours M.J., Bos H.J., Meddings J.B., Brummer R.J., van den Brandt P.A., Dagnelie P.C. Effects of oral adenosine 5'-triphosphate and adenosine in enteric-coated capsules on indomethacin-induced permeability changes in the human small intestine: a randomized cross-over study. *BMC Gastroenterology* 19, 7: 23. (2007)
- Bours M.J., Swennen E.L., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. 112: 358-404. (2006)
- Burnstock G. Purinergic receptors as future targets for treatment of functional GI disorders. *Gut*. 57: 1193-1194. (2008)
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews* 87: 659-797. (2007)
- Centelles J.J., Franco R. Is adenosine deaminase involved in adenosine transport? *Medical Hypotheses*. 33: 245-250. (1990)
- Centelles J.J., Cascante M., Canela E.I., Franco R. A model for adenosine transport and metabolism. *The Biochemical Journal*. 15: 461-472. (1992)

- Childs K.F., Ning X.H., Bolling S.F. Simultaneous detection of nucleotides, nucleosides and oxidative metabolites in myocardial biopsies *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications* 668: 181-186. (1996)
- Chinsky J.M., Ramamurthy V., Fanslow W.C., Ingolia D.E., Blackburn M.R., Shaffer K.T., Higley H.R., Trentin J.J., Rudolph F.B., Knudsen T.B., et al. Developmental expression of adenosine deaminase in the upper alimentary tract of mice. *Differentiation* 42: 172-183. (1990)
- Christofi F.L. Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signalling*. 4: 213-236. (2008)
- Colgan S.P., Eltzhig H.K., Eckle T., and Thompson L.F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling* 2: 351-360. (2006)
- Correia-de-Sá P., Adães S., Timóteo M.A., Vieira C., Magalhães-Cardoso T., Nascimento C., Duarte-Araújo M. Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: on the role of secreted adenosine deaminase *Autonomic Neuroscience: basic and clinical* 126-127: 211-224. (2006)
- Coutinho-Silva R., Monteiro da Cruz C., Persechini P.M., Ojcius D.M. The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. *Purinergic Signalling* 3: 83-90. (2007)
- Cunha RA. Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochemical Research*. 26: 979-991. (2001)
- Crane J.K., Shulgina I., Naeher T.M.: Ecto-5'-nucleotidase and intestinal ion secretion by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Purinergic Signalling*. 3: 233-246. (2007)
- Cristalli G., Costanzi S., Lambertucci C., Lupidi G., Vittori S., Volpini R., Camaioni E. Adenosine Deaminase: Functional implications and Different Classes of Inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 21: 105-128. (2001)
- DeGraw R.T., Anderson B.D. Enhanced oral bioavailability of 2'-beta-fluoro-2',3'-dideoxyadenosine (F-ddA) through local inhibition of intestinal adenosine deaminase. *Pharmaceutical Research*. 18: 1270-1276. (2001)
- Duarte-Araújo M., Nascimento C., Timóteo M.A., Magalhães-Cardoso T., Correia-de-Sá P. Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A2A and extrajunctional inhibitory A1 receptors. *British journal of Pharmacology* 141: 925-934. (2004)
- Duflot S., Riera B., Fernández-Veledo S., Casadó V., Norman R.I., Casado F.J., Lluís C., Franco R., Pastor-Anglada M. ATP-Sensitive K⁺ Channels regulate the Concentrative Adenosine Transporter CNT2 following Activation by A1 Adenosine Receptors. *Molecular and Cellular biology* 24: 2710-2719. (2004)
- Dunwiddie T.V and Masino S.A. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience* 24: 31-55. (2001)
- Dwyer K.M., Deraglio S., Gao W., Friedman D., Strom T.B., Robson S.R. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signalling*. 3: 171-180. (2007)
- Franco R., Hoyle C.H.V., Centelles J.J., Burnstock G. Degradation of adenosine by extracellular adenosine deaminase in rat duodenum *General Pharmacology*. 19: 679-681. (1998)

- Giron M.C., Bin A., Brun P., Etteri S., Bolego C. e Gaion R.M. Cyclic AMP in rat ileum: evidence for the presence of an extracellular cyclic AMP adenosine pathway. *Gastroenterology* 134: 1116-1126. (2008)
- Gray J.H., Owen R.P., Giacomini K.M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *European Journal of Physiology* 447: 728-734. (2004)
- Guckelberger O., Sun X.F., Sévigny J., Imai M., Kaczmarek E., Enjyoji K., Kruskal J.B., Robson S.C. Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-I in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Thrombosis and Haemostasis*. 91: 576-586. (2004)
- Hart M.L., Henn M., Kohler D., Kloor D., Mittelbronn M. Gorzolla I.C., Stahl G.L. and Eltzsching H.K. Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal* 22: 2784-2797. (2008)
- Hartmann G., Bidlingmaier C., Siegmund B., Albrich S., Schulze J., Tschoep K., Eigler A., Lehr H.A. and Endres S. Specific Type IV Phosphodiesterase Inhibitor Rolipram Mitigates Experimental Colitis in Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 292: 22-30. (2000)
- Hashikawa T., Hooker S.W., Maj J.G., Knott-Craig C.J., Takedachi M., Murakami S., Thompson L.F. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *The FASEB Journal* 18: 131-133. (2004)
- Haskò G., Linden J., Cronstein B., Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 759-770. (2008)
- Haskò G. and Cronstein B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *TRENDS in Immunology*. 25: 33-39. (2004)
- Ho D.H.W., Pincus C., Carter C.J., Benjamin R.S., Freireich E.J., Bodey G.P. Distribution and Inhibition of Adenosine Deaminase in Tissues of Man, Rat and Mouse *Cancer Treatment Reports* 64: 629-633. (1980)
- Iqbal J., Vollmayer P., Braun N., Zimmermann H., Müller C.E. A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction. *Purinergic Signalling*. 1: 349-358. (2005)
- Jackson E.K., Ren J., Zacharia L.C., Mi Z. Characterization of renal ecto-phosphodiesterase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321: 810-815. (2007)
- Jacobson K.A. and Gao Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5: 247-264. (2006)
- Jijon H.B., Walker J., Hoentjen F., Diaz H., Ewaschuk J., Jobin C., Madsen K.L. Adenosine is a negative regulator of NF-kappaB and MAPK signaling in human intestinal epithelial cells. *Cellular Immunology*. 237: 86-95. (2005)
- Kimura Y., Turner J.R., Braasch D.A., Buddington R.K. Lumenal adenosine and AMP rapidly increase glucose transport by intact small intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 289: 1007-1014. (2005)

- King A.E., Ackley M.A., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30: 1-10. (2006)
- Kolachala V.L., Bajaj C., Rahul M. and Shanthi S.V. Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 294: 401-410. (2008)
- Kong T., Westerman K.A., Faigle M., Eltzschig H.K., Colgan S.P. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *The FASEB Journal* 13: 2242-2250. (2006)
- Kuno M., Seki N., Tsujimoto S., Nakanishi I., Kinoshita T., Nakamura K., Terasaka T., Nishio N., Sato A., Fujii T. Anti-inflammatory activity of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor FR234938. *European Journal of Pharmacology* 534: 241-249. (2006)
- Lee H.T., Kim M., Joo J.D., Gallos G., Chen J.F., Emala C.W. A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291: 959-969. (2006)
- Liaudet L., Mabley J.G., Soriano F.G., Pacher P., Marton A., Haskó G., Szabó C. Inosine Reduces Systemic Inflammation and Improves Survival in Septic Shock Induced by Cecal Ligation and Puncture. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164: 1213-1220. (2001)
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275. (1962)
- Lu H., Chen C., Klaassen C. Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition* 32: 1455-1461. (2004)
- Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*. 109: 366-398. (2006)
- Mabley J.G., Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W., Hasko G., Pacher P., Power R., Southan G., Salzman A., Szabo C. Inosine protects against the development of diabetes in multiple-low-dose streptozotocin and nonobese diabetic mouse models of type 1 diabetes. *Molecular Medicine* 9: 96-104. (2003a)
- Mabley J.G., Soriano F., Pacher P., Hasko G., Marton A., Wallace R., Salzman A., Szabo C. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis *European Journal of Pharmacology* 466: 323-329. (2003b)
- Martin G.R. and Wallace J.L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 231: 130-137. (2006)

- Mihaylova-Todorova S.T., Todorov L.D., Westfall D.P. Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 302: 992-1001. (2002)
- Montesinos M.C., Desai A., Cronstein B.N. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthritis Research & Therapy*. 8: R53. (2006)
- Moriwaki Y., Takahashi S, Tsutsumi Z., Ka T., Hada T., Yamamoto T. Immunohistochemical demonstration of adenosine deaminase (ADA1) in human tissues. *Acta Histochemical Cytochemical* 37: 173-182. (2004)
- Moriwaki Y., Yamamoto T., Higashino K. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histology and Histopathology* 14: 1321-1340. (1999)
- Munkonda M.N., Kauffenstein G., Kukulski F., Lévesque S.A., Legendre C., Pelletier J., Lavoie E.G., Lecka J., Sévigny J. Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists *Biochemical Pharmacology*. 74: 1524-1534. (2007)
- Namiot A., Namiot Z., Stasiewicz J., Kemon A., Górski J. Mucosal adenosine deaminase activity and gastritis histology: a comparative study of partially resected and intact stomachs. *Medical Science Monitor* 9: 24-28 (2003)
- Niemelä J., Henttinen T., Yegutkin G.G., Airas L., Kujari A.M., Rajala P., Jalkanen S. IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *Journal of Immunology*. 172: 1646-1653. (2004)
- Obata T., Yamanaka Y. Adenosine Deaminase Activity in Rat Intestine: Assay with a Microdialysis Technique. *Comparative biochemistry and physiology* 119: 309-313 (1998)
- Odashima M., Bamias G., Rivera-Nieves J., Linden J., Nast C.C., Moskaluk C.A., Marini M., Sugawara K., Kozaiwa K., Otaka M., Watanabe S., Cominelli F. Activation of A2A adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 129: 26-33 (2005).
- Okada T, Mochizuki T, Huang Z.L, Eguchi N, Sugita Y, Urade Y, Hayaishi O. Dominant localization of adenosine deaminase in leptomeninges and involvement of the enzyme in sleep. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312: 29-34. (2003)
- Peart J., Matherne G.P., Cerniway R.J., Headrick J.P. Cardioprotection with adenosine metabolism inhibitors in ischemic-reperfused mouse heart. *Cardiovascular Research*. 52: 120-129. (2001)
- Podgorska M., Kocbuch K., Pawelczyk T. Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochimica Polonica* 52: 749-758. (2005)

- Plunkett W., Alexander L., Chubb S., Loo T.L. Comparison of the activity of 2'-deoxycoformycin and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine in vivo. *Biochemical Pharmacology* 28: 201-206. (1978)
- Ren J., Bertrand PP. Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic Signalling*. 4: 255-266. (2008)
- Rücker B., Almeida M.E., Libermann T.A., Zerbini L.F., Wink M.R., Sarkis J.J. E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. *Life Sciences*. 82: 477-486. (2008)
- Salmi M. and Jalkanen S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature Reviews. Immunology*. 5: 760-771. (2005)
- Sato T., Otaka M., Odashima M., Kato S., Jin M., Konishi N., Matsushashi T., Watanabe S. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 346: 339-344. (2006)
- Singhal D., Anderson B.D. Optimization of the local inhibition of intestinal adenosine deaminase (ADA) by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine: enhanced oral delivery of an ADA-activated prodrug for anti-HIV therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 87: 578-585. (1998)
- Siegmund B., Rieder F., Albrich S., Wolf K., Bidlingmaier C., Firestein G.S., Boyle D., Lehr H.A., Loher F., Hartmann G., Endres S., Eigler A. Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 296: 99-105. (2001)
- Silva R.G., Santos D.S., Basso L.A., Oses J.P., Wofchuk S., Portela L.V., Souza D.O. Purine nucleoside phosphorylase activity in rat cerebrospinal fluid. *Neurochemical Research* 29: 1831-1835. (2004)
- Smolenski R.T., Raisky O., Zych M., Kochan Z., Kalsi K.K., Abunasra H., Jayakumar J., Suzuki K., Yacoub M.H. Enhanced endogenous adenosine protects from reperfusion injury after heart transplantation. *Transplantation Proceedings*. 33: 924-925. (2001)
- Stracke M.L., Clair T., Liotta L.A. Autotaxin, tumor motility-stimulating exophosphodiesterase. *Advances in Enzyme Regulation* 37: 135-144. (1997)
- Strohmeier G.R., Lencer W.I., Patapoff T.W., Thompson L.F., Carlson S.L., Moe S.J., Carnes D.K., Mrsny R.J., and Madara J.L. Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *The American Society for Clinical Investigation* 99: 2588-2601. (1997)
- Sun W.C., Cao Y., Jin L., Wang L.Z., Meng F., Zhu X.Z. Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A1 receptors. *Acta Pharmacologica Sinica* 26: 160-165. (2005)
- Synnestvedt K., Furuta G.T., Comerford K.M., Louis N., Karhausen J., Eltzschig H.K., Hansen K.R., Thompson L.F., Colgan S.P. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of Clinical Investigation*. 110: 993-1002. (2002)

- Tennant J.P., Callaghan F., Turner C., Hourani S.M. Effects of allopurinol, erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine and S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine on the degradation of adenosine 5'-triphosphate in the rat colon muscularis mucosae. *Journal of Autonomic Pharmacology* 19: 229-232. (1999)
- Van der Weyden M.B., Kelley W.N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. *The Journal of Biological Chemistry* 251: 5448-5456. (1976)
- Vuaden F.C., de Paula Cognato G., Bonorino C., Bogo M.R., de Freitas Sarkis J.J., Bonan C.D. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. *Life Sciences*. 80: 1784-1791. (2007)
- Xu P.A. and Kellems R.E. Function of Murine Adenosine Deaminase in the Gastrointestinal Tract *Biochemical and Biophysical Research communications* 269: 749-757. (2000)
- Yegutkin G.G., Bodin P., Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ectoenzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*. 129: 921-926. (2000)
- Yegutkin G.G., Samburski S.S., and Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *The FASEB Journal Express* 17: 1328-1330. (2003)
- Yegutkin G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783: 673-694. (2008)
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 299-309. (2000)

