



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia “E. Meneghetti”

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE FARMACOLOGICHE
INDIRIZZO: FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA
CICLO XXIII

**ESPRESSIONE DI iNOS E METABOLISMO DELL'ADENOSINA
IN CELLULE MUSCOLARI LISCE VASCOLARI DI RATTI
DIABETICI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini
Supervisore: Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

Dottorando: Francesca Malorgio

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
SUMMARY	pag. 3
ABBREVIAZIONI	pag. 5
INTRODUZIONE	pag. 7
IL SISTEMA PURINERGICO	pag. 7
METABOLISMO DELL'ADENOSINA	pag. 8
I TRASPORTATORI PER LE PURINE	pag. 9
ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO EXTRACELLULARE DELLE PURINE	pag. 10
ATPasi e ADPasi	pag. 11
Ecto-5'-nucleotidasi	pag. 11
Adenosina deaminasi	pag. 12
Purina nucleoside fosforilasi	pag. 12
EFFETTI DELL'ADENOSINA A LIVELLO CARDIOVASCOLARE E APPLICAZIONI TERAPEUTICHE	pag. 13
MONOSSIDO DI AZOTO NEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE	pag. 14
IL DIABETE	pag. 16
Adenosina, NO e diabete	pag. 18
SCOPO DELLA TESI	pag. 21
MATERIALI	pag. 23
METODI	pag. 25
ANIMALI ED INDUZIONE DEL DIABETE	pag. 25
COLTURE CELLULARI	pag. 25
Conta e trattamento delle cellule	pag. 26
ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA DELLE PURINE	pag. 27
DOSAGGIO DELLE PROTEINE	pag. 29
DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA iNOS MEDIANTE WESTERN BLOTTING	pag. 29
ANALISI STATISTICA	pag. 30
RISULTATI	pag. 31
INFLUENZA DELL'ADENOSINA ESOGENA SULL'ESPRESSIONE DI INOS IN CELLULE MUSCOLARI LISCE VASCOLARI DI RATTI DIABETICI IN CONFRONTO CON RATTI NORMOGLICEMICI	pag. 31
INFLUENZA DI AMP E INOSINA ESOGENI SULL'ESPRESSIONE DI INOS	pag. 32
EFFETTO DEGLI INIBITORI (NBTI, EHNA E AOPCP) SULL'ESPRESSIONE DI INOS IN ASSENZA DI PURINE	pag. 34

METABOLISMO DELL'ADENOSINA ESOGENA NEL MEDIUM DI INCUBAZIONE DELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE VASCOLARI: INFLUENZA DEL TRATTAMENTO CON NBTI ED EHNA	pag. 35
AMP ED INOSINA NEL MEDIUM DI INCUBAZIONE DELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE VASCOLARI	pag. 38
DISCUSSIONE	pag. 43
BIBLIOGRAFIA	pag. 47

RIASSUNTO

Il diabete è una malattia metabolica associata ad aumentato rischio cardiovascolare. Nel diabete inoltre, in seguito all'attivazione della proteina iNOS, si ha una notevole produzione di perossinitrito che è implicato in molti disordini vascolari.

A livello cardiovascolare l'adenosina manifesta diverse proprietà vasoprotettive: induce infatti vasodilatazione, inibisce l'aggregazione piastrinica e ne previene l'adesione, inibisce la crescita delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) (Ikeda *et al.*, 1997). Diverse evidenze suggeriscono che l'adenosina prodotta dalle VSMC può indurre i suoi effetti in parte attraverso la produzione di NO a livello della parete dei vasi: il nucleoside, per interazione con i recettori A₂, modula l'espressione della proteina iNOS indotta da citochine e di conseguenza il rilascio di NO dalle VSMC (Dubey *et al.*, 1998; St. Hilaire *et al.*, 2008). Dal momento che un'aumentata produzione di iNOS è coinvolta nella disfunzione vascolare diabetica, si è studiato il potenziale ruolo anti-infiammatorio dell'adenosina in tale processo, determinando l'effetto del nucleoside e dei composti ad esso correlati sull'espressione di iNOS in cellule muscolari lisce vascolari di ratti resi diabetici in confronto con ratti normoglicemici. A tale scopo ad una parte degli animali è stato indotto il diabete mediante iniezione nella vena caudale di streptozotocina. Il prelievo dell'aorta dei ratti per l'ottenimento delle colture cellulari è stato effettuato dopo quattro settimane dal trattamento, considerando diabetici solo gli animali con valore di glicemia superiore a 300 mg/dl.

Per indurre l'espressione della proteina iNOS le cellule muscolari lisce vascolari di ratti sani e diabetici sono state stimulate per 24 h con una miscela costituita da LPS più citochine (citomix) e queste cellule sono state trattate con adenosina esogena. Dall'analisi di Western blot emerge che la purina impiegata in concentrazione 1 mM causa un aumento significativo dei livelli di iNOS nelle cellule di ratti diabetici. Questo aumento non è influenzato dal trattamento con NBTI, inibitore dei trasportatori equilibrativi per l'adenosina, ma è potenziato in seguito all'aggiunta di EHNA, inibitore dell'adenosina deaminasi, enzima che converte l'adenosina in inosina. L'inosina esogena non influenza l'espressione di iNOS nelle VSMC controllo e diabetiche, mentre il precursore dell'adenosina, AMP, mima l'effetto dell'adenosina sulla produzione di iNOS nelle cellule diabetiche. L'AOPCP, inibitore dell'enzima CD73, che promuove la defosforilazione di AMP in adenosina, non provoca variazione dell'espressione di iNOS, rispetto al trattamento con solo AMP.

Stimolando le VSMC con citomix e NBTI, EHNA o AOPCP in assenza di purine esogene, si è dimostrato che solo il trattamento con EHNA causa, nelle cellule di ratti normoglicemici,

Riassunto

una diminuzione significativa della produzione di iNOS, indicando che l'adenosina deaminasi rappresenta la principale via di eliminazione del nucleoside in condizioni non patologiche.

Le quantità di adenosina rimasta nel medium di incubazione dopo 24 h e quella dei suoi metaboliti sono state monitorate con metodo HPLC. Al termine dell'incubazione l'adenosina scompare dal medium, mentre si accumulano inosina e ipoxantina. Nelle cellule controllo NBTI permette il recupero della metà dell'adenosina inizialmente aggiunta, mentre nelle cellule diabetiche il recupero è inferiore, indicando probabilmente un diverso contributo dei trasportatori equilibrativi alla rimozione del nucleoside nel diabete. Al contrario l'aggiunta di EHNA non causa variazioni nella quantità di adenosina recuperata nelle cellule controllo rispetto a quelle diabetiche.

Anche l'AMP scompare dal medium dopo 24 h con produzione di inosina e ipoxantina; l'aggiunta di AOPCP permette il recupero del 47% del nucleotide nel medium di incubazione delle cellule di ratti sani e solo il 5% nel medium delle cellule di ratti diabetiche, suggerendo un'alterazione dell'attività o dell'espressione dell'enzima CD73 associata al diabete.

Questi risultati dimostrano che alterazioni a livello delle vie di eliminazione e formazione dell'adenosina sono presenti nella disfunzione vascolare diabetica. Inoltre, a concentrazioni elevate l'adenosina sembra perdere il suo effetto protettivo, in quanto stimola la formazione di iNOS, con conseguenze che possono essere dannose per la cellula. Il diabete rende, pertanto, le VSMC più sensibili al potenziale effetto proinfiammatorio di elevate concentrazioni di adenosina in termini di espressione della proteina iNOS.

SUMMARY

Diabetes mellitus is a major risk factor for cardiovascular diseases. Stimulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) production by inflammatory cytokines causes a significant production of peroxynitrite that is involved in many vascular disorders. In the cardiovascular system, extracellular adenosine has several vasoprotective properties: e.g. it induces vasodilatation, inhibits platelet aggregation, prevents platelet adhesion, inhibits growth of vascular smooth muscle cells (VSMCs) (Ikeda *et al.*, 1997). Several studies demonstrate that in VSMCs adenosine modulates cytokine-induced iNOS expression and thus the release of NO from these cells via A₂ receptors (Dubey *et al.*, 1998; St. Hilaire *et al.*, 2008).

Since stimulation of iNOS production by inflammatory cytokines is involved in diabetic vascular dysfunction, we investigated the potential role of adenosine in this process by determining its influence on iNOS expression by VSMCs isolated from diabetic as compared to normoglycaemic rats. Diabetes was induced in Sprague-Dawley rats by intravenous injection of streptozotocin (STZ) and VSMCs were isolated from the aorta of control and STZ-diabetic rats 4 weeks after diabetes induction; only animals with blood glucose levels above 300 mg/dl on day 28 were considered diabetic.

VSMCs from normal and diabetic rat aortas were incubated for 24 hours in the presence of LPS combined with a cytokine mixture (cytomix) to mimic the in vivo environment of some vascular inflammatory events and were exposed to exogenous adenosine. Incubation of VSMCs with LPS plus cytokine mixture for 24 h induced iNOS expression, which was undetectable in unstimulated VSMCs.

Exogenous adenosine (1 mM) did not change iNOS levels in control VSMCs, but potentiated the response to cytokines in diabetic VSMCs. This response was unaffected by the equilibrative nucleoside transporter inhibitor, NBTI, but was further increased (+ 45%) by EHNA, an inhibitor of adenosine deaminase, the enzyme which deaminates adenosine to inosine. Exogenous inosine was ineffective in control and diabetic cells, but the adenosine precursor, AMP, mimicked the effect of adenosine on iNOS production in diabetic cells. Inhibition by AOPCP of ecto-5'-nucleotidase/CD73 (which dephosphorylates AMP in adenosine) did not significantly change iNOS protein levels. In the absence of exogenous adenosine, iNOS expression was reduced after treatment with EHNA in control but not in diabetic VSMCs, demonstrating that adenosine deaminase is responsible for adenosine elimination under non-pathological conditions.

An HPLC method was used to quantify AMP, adenosine and their metabolites in the culture medium of VSMCs. At the end of 24 h-incubation, exogenous adenosine was undetectable in the culture medium of control as well as diabetic VSMCs, being converted

Summary

into inosine and hypoxanthine. In control VSMCs NBTI allowed the recovery of half of added adenosine whereas the recovery was lower in diabetic cells, indicating a different contribution of equilibrative transporters to the removal of the nucleoside in diabetes. In contrast, the addition of EHNA did not cause variations in the amount of adenosine recovered in control as compared with diabetic cells. After incubation with AMP, the nucleotide was not detectable and was converted mainly into inosine and hypoxanthine. Treatment with AOPCP allowed 47% recovery of AMP in control, but only 5% recovery in the medium of diabetic VSMCs indicating that diabetes markedly reduced CD73 sensitivity to pharmacological inhibition by AOPCP.

These results show that alterations in adenosine-related inflammatory pathways may be present in diabetic vascular dysfunction; in addition, at high concentrations, adenosine seems to lose its protective effect as it stimulates the formation of iNOS, an effect that might be harmful to cells. Thus, diabetes would make VSMCs more sensitive to the potential proinflammatory effect of high concentrations of adenosine in terms of iNOS protein expression.

ABBREVIAZIONI

AC, Adenilato ciclasi;
ADA, Adenosina deaminasi;
ADO, Adenosina;
ADP, Adenosin di fosfato;
AK, Adenosina chinasi;
AMP, Adenosina monofosfato;
AOPCP, α , β -metilen ADP;
ATP, Adenosina trifosfato;
ATL146e, Agonista selettivo per i recettori A_{2a} ;
cAMP, Adenosina monofosfato ciclico;
CD26, Dipeptidil peptidasi IV o ADA binding protein;
CD39, Ecto-nucleoside difosfato difosfoidrolasi di tipo 1 (NTPDasi 1);
CD73, 5'-nucleotidasi extracellulare (ecto-5'-Nu);
CITOMIX, Miscela di citochine ed LPS;
cNOS, NO sintasi costitutiva;
CNT, Trasportatori nucleosidici concentrativi;
DDA, 2',5'-dideossiadenosina (inibitore adenilato ciclasi);
DPSPX, 1,3-dipropyl-8-sulphophenylxanthine (antagonista dei recettori A_1/A_2);
EDTA, Acido etilendiamminotetraacetico;
EGTA, Acido tetraacetico del glicol etilenico;
EHNA, Eritro-9-(2-idrossi-3nonil)adenina;
eNOS, NO sintasi endoteliale (NOS III);
ENT, Trasportatori nucleosidici equilibrativi;
FBS, Fetal Bovine Serum;
Gs, Proteina G stimolatoria;
 $HClO_4$, Acido perclorico;
hENT2, Trasportatori nucleosidici equilibrativi umani di tipo 2;
HPLC, High-performance liquid chromatography;
HUVEC, Cellule endoteliali della vena ombelicale umana;
IDDM, Diabete mellito insulino-dipendente;
IL-1 β , Interleuchina 1 β ;
IMP, Inosina monofosfato;
INF- γ , Interferone γ ;
INO, Inosina;

Abbreviazioni

iNOS, NO sintasi inducibile (NOS II);
IPOX, Ipoxantina;
KF17837, antagonista selettivo per i recettori A₂;
KH₂PO₄, Potassio idrogeno fosfato;
KOH, Idrossido di potassio;
LPS, Lipopolisaccaride;
NaCl, Cloruro di sodio;
NaF, Fluoruro di sodio;
NBTI, Nitrobenziltioinosina;
NECA, 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine;
NIDDM, Diabete mellito non insulino-dipendente;
NO, Ossido nitrico;
nNOS, NO sintasi neuronale (NOS I);
NP-40, nonyl phenoxyethoxyethanol;
PBS, Phosphate Buffered Saline;
PDE, Fosfodiesterasi;
PMSF, Fluoruro di fenilmetansulfonile;
PNP, Purina nucleoside fosforilasi;
PVDF, Polivinildenfluoruro;
Rp-cAMP, Inibitore della protein chinasi A;
SCID, Severe combined immunodeficient disease;
SDS, Sodio dodecil solfato;
STZ, Streptozotocina;
TBS-T, TBS contenente 0,1% Tween;
TNF- α , Tumor necrosis factor;
TRIS-HCl, Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato;
VSMC, Vascular Smooth Muscle Cells;

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, dal quale emergeva che AMP e adenosina, estratti dal muscolo cardiaco, inducevano bradicardia, caduta della pressione e vasodilatazione. Successivamente, nel 1972, Burnstock propose l'esistenza di un "sistema purinergico", proponendo l'ATP come neurotrasmettitore a livello delle sinapsi non adrenergiche e non colinergiche del sistema nervoso autonomo (Burnstock, 2007).

I nucleosidi e nucleotidi purinici sono ampiamente coinvolti nella regolazione delle funzioni cardiovascolari, respiratorie, renali ed immunitarie. È accertato inoltre il loro ruolo protettivo in condizioni di emergenza quali l'ischemia cerebrale e miocardica e l'attacco epilettico (Abbracchio e Burnstock, 1998; Haskò e Cronstein, 2004). Il segnale prodotto dalle purine extracellulari è anche implicato nel controllo di numerose altre funzioni biologiche: aggregazione piastrinica, tono del muscolo liscio, infiammazione, funzione delle cellule dendritiche, modulazione della motilità, secrezione ed assorbimento nel tratto gastrointestinale (Woods *et al.*, 2003). L'adenosina ha anche proprietà analgesiche, può influenzare la proliferazione, la sopravvivenza o l'apoptosi di molti tipi cellulari e funziona come un potente soppressore del sistema immunitario (Borowiec *et al.*, 2006).

L'azione autocrina e paracrina delle purine si esplica mediante legame con specifici recettori: P1 attivati dall'adenosina e P2 per l'ATP e altri nucleotidi. Sono stati clonati e caratterizzati farmacologicamente quattro sottotipi di recettori P1 (*Figura 1*): A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3 distinti sulla base della loro affinità per il nucleoside e del legame all'adenilato ciclasi. A_1 e A_3 mediano un'azione inibitoria sull'adenilato ciclasi, mentre A_{2a} e A_{2b} attivano l'adenilato ciclasi tramite G_s , con conseguente aumento del cAMP intracellulare. Gli A_{2a} sono recettori ad alta affinità per l'adenosina (EC50 compresa tra 10 nM e 1 μ M), al contrario gli A_{2b} sono recettori a bassa affinità per l'adenosina e richiedono livelli extracellulari di nucleoside riscontrabili in condizioni patologiche (superiore a 10 μ M con EC50 di 24 μ M).

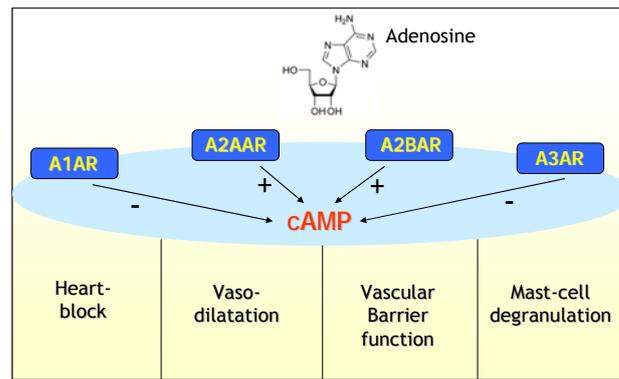


Figura 1. Recettori per l'adenosina

A livello cardiaco sono presenti recettori A_1 la cui attivazione porta ad un effetto cronotropo e inotropo negativo; recettori A_{2a} e A_{2b} che, attivati, inducono vasodilatazione e inibiscono l'aggregazione piastrinica, recettori A_3 coinvolti nella degranolazione delle mast-cellule (Haskò *et al.*, 2008; Eltzsichg, 2009).

I recettori P2 legano l'ATP e sono a loro volta suddivisi in P_{2X} , di tipo ionotropo, che mediano le risposte veloci e transienti all'ATP, e P_{2Y} , metabotropi e accoppiati a proteine G, che mediano risposte più lente. Questi ultimi sono recettori ubiquitari e particolarmente abbondanti in cervello, vasi, rene, pancreas endocrino e fegato. La loro presenza sulle cellule endoteliali li rende importanti protagonisti nella produzione di NO e conseguente vasodilatazione sia in condizioni fisiologiche che, soprattutto, nel corso di ischemia. Notevole interesse è rivolto al recettore P_{2Y} presente nelle cellule β del pancreas endocrino: la sua attivazione stimola il rilascio di insulina, migliorando la tolleranza al glucosio in pazienti diabetici.

La disponibilità dell'adenosina in prossimità dei recettori dipende dalla concentrazione extracellulare della stessa, che a sua volta dipende dal bilancio tra la sua formazione da un lato (rilascio dal compartimento intracellulare, degradazione di nucleotidi suoi precursori) e dall'altro la sua eliminazione (ricaptazione, degradazione enzimatica).

METABOLISMO DELL'ADENOSINA

L'adenosina può essere prodotta sia a livello intracellulare, sia a livello extracellulare. All'interno della cellula, il nucleoside si forma attraverso due vie principali: l'idrolisi di S-adenosilomocisteina per intervento di S-adenosilomocisteina idrolasi e la degradazione del nucleotide adeninico AMP, catalizzata da 5'nucleotidasi citosoliche. Una volta formata, l'adenosina può diffondere attraverso la membrana plasmatica con un meccanismo di diffusione facilitata che implica l'intervento di trasportatori equilibrativi bidirezionali (ENT) e che favorisce l'equilibrio tra le concentrazioni intra- ed extracellulari della purina. I livelli del nucleoside nello spazio interstiziale dipendono anche da

trasportatori concentrativi (CNT), un sistema energia-dipendente attraverso il quale il trasferimento della purina all'interno della cellula è associato al trasporto di ioni Na^+ .

A livello extracellulare l'ATP, una volta liberato, è substrato di ecto-apirasi che lo degradano ad ADP e poi ad AMP, che viene a sua volta defosforilato ad adenosina per opera della ecto-5'-nucleotidasi/CD73. In sede extracellulare un'altra fonte di adenosina è il cAMP, che viene metabolizzato ad AMP da un'ecto-fosfodiesterasi. L'adenosina può essere poi eliminata dallo spazio extracellulare per deaminazione ad opera di una ecto-adenosina deaminasi (ecto-ADA) con formazione di inosina; oppure può essere ricaptata per mezzo dei trasportatori per i nucleosidi. La purina ricaptata nel compartimento intracellulare viene rapidamente metabolizzata. Due vie metaboliche alternative competono per l'eliminazione dell'adenosina in sede intracellulare: deaminazione ad inosina per mezzo di una endo-ADA oppure fosforilazione ad AMP per opera di una adenosina chinasi intracellulare che ne consente il riciclo nel pool cellulare delle purine.

È importante sottolineare che il metabolismo dell'adenosina intracellulare rappresenta un meccanismo aggiuntivo per modulare i livelli extracellulari della purina (Eltzschig, 2009). Si ritiene che normalmente, quando la concentrazione fisiologica di adenosina è bassa ($< 1 \mu\text{M}$), la maggior parte del nucleoside ricaptato venga fosforilato con formazione di ATP, mentre in condizioni patologiche caratterizzate da massicci aumenti della concentrazione intracellulare di adenosina ($> 10 \mu\text{M}$), la deaminazione sia la reazione predominante (Borowiec *et al.*, 2006; Eltzschig, 2009).

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 ad un gradiente transmembrana del sodio diretto internamente (*Figura 2*). Gli ENT sono diversamente classificati, a seconda della loro sensibilità all'inibizione da nitrobenziltioinosina (NBTI), in *es* (molto sensibili, $K_i=0,1-10 \text{ nM}$) e *ei* (insensibili fino a concentrazioni superiori a $1 \mu\text{M}$) (Podgorska *et al.*, 2005; Deussen *et al.*, 2006). ENT1 e ENT3 sono trasportatori *es* e sono pertanto sensibili a basse concentrazioni di NBTI, mentre questo composto non influenza l'attività di ENT2.

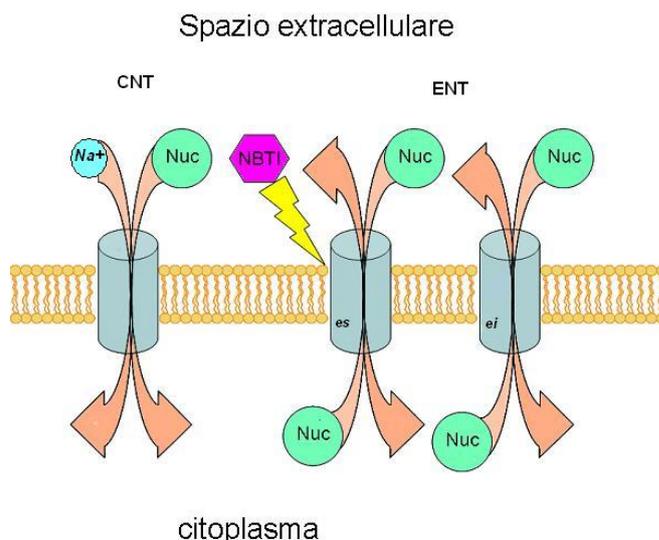


Figura 2. Modelli di trasportatori nucleosidici concentrativi (CNT) ed equilibrativi (ENT). (Immagine modificata da Podgorska et al., 2005)

Le isoforme ENT1 e ENT2 umane differiscono anche per la loro sensibilità all'inibizione da parte di vasodilatatori coronarici come dipiridamolo, dilazep e draflazina, con ENT1 che è da 100 a 1000 volte più sensibile di ENT2 (Löffler et al., 2007). Di recente, con studi su cardiomiociti resi ischemici (Rose et al., 2010), è stato dimostrato il ruolo essenziale degli ENT1 nella cardioprotezione mediata dall'adenosina.

I trasportatori concentrativi sono meno conosciuti, probabilmente per il fatto che non esistono inibitori selettivi. I trasportatori di entrambi i gruppi sono oggetto di molti studi, sia per il loro ruolo nel recupero di nucleosidi necessari per la sintesi di acidi nucleici, sia perché hanno un ruolo importante nel trasporto di molti analoghi nucleosidici utilizzati in terapia come agenti antitumorali e anti-AIDS (Calligaro, 2009; 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

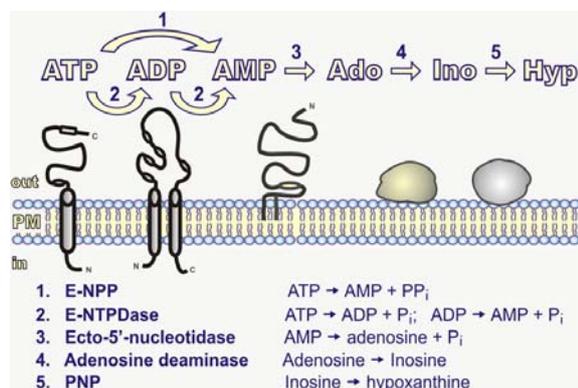


Figura 3. Sintesi e degradazione dell'adenosina a livello extracellulare. L'ATP nello spazio extracellulare è inattivato ad ADP, AMP e adenosina ad opera di ecto-enzimi. L'inattivazione di adenosina avviene per deaminazione ad inosina per opera della ecto-ADA e successiva degradazione di inosina in ipoxantina mediata dall'enzima purina nucleoside fosforilasi (Immagine tratta da Yegutkin, 2008).

ATPasi e ADPasi

Questi ecto-enzimi idrolizzano i nucleotidi ATP e ADP (*Figura 3*) e richiedono concentrazioni millimolari di ioni Ca^{2+} e Mg^{+} per la loro massima attività. Le ecto-ATPasi controllano la risposta infiammatoria, il reclutamento e l'aggregazione piastrinica durante l'emostasi e i processi di danno vascolare (Guckerberg *et al.*, 2004). La NTPDasi 1 è stata identificata con la CD39 che, descritta inizialmente come marker dell'attivazione dei linfociti B, è anche espressa in cellule natural killer, monociti, cellule dendritiche e cellule T. Ci sono evidenze che indicano come la CD39 espressa dalle cellule T sia la principale ectonucleotidasi responsabile della generazione di adenosina, e suggeriscono che un'azione cooperativa tra CD39 e CD73 possa contribuire alla funzione immunoregolatoria di queste cellule (Dwyer *et al.*, 2007). Nel sistema vascolare, l'enzima endoteliale gioca un ruolo critico nell'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, la protezione tissutale dei polmoni, dei reni e miocardio in seguito a danno da ischemia/riperfusion (Yegutkin, 2008), la soppressione di angiogenesi e metastasi tumorale. In questo ambito, diversi studi, indicano che nucleotidi e nucleosidi adeninici hanno un ruolo importante nella crescita tumorale, suggerendo che ectonucleotidasi sono implicate in processi proliferativi e metastatici. NTPDasi 2 è altamente espressa in diverse forme di tumore e proprio la sua elevata espressione potrebbe essere la causa dello sviluppo della malattia (Calligaro, 2009; Buffon *et al.*, 2007).

Ecto-5'-nucleotidasi

A livello extracellulare la formazione di adenosina a partire dagli adenin nucleotidi (ATP, ADP e AMP) è regolata dallo step finale della cascata, che promuove la degradazione dell'AMP ad adenosina per opera della ecto-5'-nucleotidasi (CD73; *Figura 3*) (Thompson *et al.*, 2004). Dallo studio della letteratura emerge come questa via enzimatica 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 *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2008). La Km per il 5'-AMP varia tra 3 e 50 μM e non mostra attività verso i nucleotidi 2' e 3' monofosfato. L'enzima è costituito da due subunità glicoproteiche con massa molecolare di 60-70 kDa, legate in modo non covalente con zinco e altri cationi bivalenti all'N terminale. Viene coespressa con la CD39 sulla superficie di linfociti T, rappresentandone un marker di maturazione. La sua presenza contribuisce ad un complesso meccanismo di controllo negativo sia della proliferazione delle cellule T che della secrezione di citochine. Anche l'attività antinfiammatoria di farmaci come metotressato e sulfasalazina è dovuta alla conversione di adenin nucleotidi in adenosina, mediata dalla CD73

(Yegutkin, 2008). È stato dimostrato che la CD73 rappresenta l'enzima chiave coinvolto nella regolazione e bilancio di meccanismi proinfiammatori ed antinfiammatori a livello macrovascolare (Zernecke *et al.*, 2006). In condizioni di stress, per esempio, questa via può temporaneamente incrementare il catabolismo dell'AMP così da ottenere una quantità elevata di adenosina necessaria alla cellula per i suoi processi vitali attraverso l'interazione con specifici recettori di membrana. Ciò suggerisce che la modulazione dell'attività enzimatica della CD73, allo scopo di aumentare la produzione extracellulare di adenosina, può rappresentare una strategia terapeutica nel trattamento del danno ischemico a livello cardiaco (Calligaro, 2009; Hart *et al.*, 2008).

Adenosina deaminasi

La conversione di adenosina ad inosina (*Figura 3*) è un passaggio molto rapido ed irreversibile, in quanto l'adenosina, agendo come autacoide, oltre a dover essere immediatamente disponibile per il legame con i recettori, deve essere anche rapidamente rimossa (Centelles e Franco, 1990). Inizialmente si supponeva 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 (eso-ADA) (Centelles e Franco, 1990). Vi è una larga distribuzione dell'enzima e questo suggerisce che esso giochi un ruolo predominante nel controllo dei livelli di adenosina extracellulare (Yegutkin, 2008). La Km per l'adenosina è di 45 μ M e il pH ottimale è intorno alla neutralità (Cristalli *et al.*, 2001); la sua attività, inoltre, è finemente regolata dalla CD26 (conosciuta anche come dipeptidil peptidasi IV o ADA binding protein). L'enzima è anche necessario per il corretto sviluppo dei linfociti T, tanto che la deficienza genetica di ADA è associata a una severa sindrome da immunodeficienza (severe combined immunodeficient disease, SCID). I potenziali utilizzi terapeutici degli inibitori dell'ADA riguardano: l'aumento della biodisponibilità orale degli analoghi nucleosidici (antileucemici e antivirali) (Singhal e Anderson, 1998; DeGraw e Anderson, 2001), la modulazione della risposta immunitaria in caso di malattie che coinvolgono le cellule B e T, e il trattamento del post-infarto (Cristalli *et al.*, 2001). Numerosi lavori propongono l'utilizzo di inibitori del metabolismo dell'adenosina come un'efficace terapia per prevenire i danni da ripercussione post trapianto (Calligaro, 2009; Peart *et al.*, 2001; Smolenski *et al.*, 2001).

Purina Nucleoside Fosforilasi

Tale enzima catalizza la conversione di inosina in ipoxantina (*Figura 3*) ed è principalmente presente nel citoplasma di organismi procarioti ed eucarioti come complesso

trimerico di circa 90-100 kDa. Espresso sulla superficie cellulare regola, in associazione con ADA, i livelli di nucleosidi. Mutazioni che interferiscano con la sintesi o funzionalità dell'enzima nell'uomo portano a disfunzioni immunologiche e neurologiche (Yegutkin, 2008).

EFFETTI DELL'ADENOSINA A LIVELLO CARDIOVASCOLARE E APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Il ruolo dell'adenosina nel sistema cardiovascolare fu descritto per la prima volta da Drury e Szent-Gyorgyi che nel 1929 dimostrarono le proprietà cardioprotettive del nucleoside.

A livello cardiovascolare i principali siti di formazione dell'adenosina sono rappresentati dai cardiomiociti, dall'endotelio vascolare cardiaco e dalle cellule muscolari lisce per mezzo dell'enzima 5'-nucleotidasi localizzato nel citosol; il nucleoside viene poi rilasciato nello spazio extracellulare dove produce potenti effetti di vasodilatazione mediante attivazione dei recettori A_2 (sia A_{2a} che A_{2b}) (Mubagwa *et al.*, 1996).

In condizioni di stress metabolico, quali ipossia e ischemia, l'adenosina aiuta a prevenire il danno non solo attraverso rilassamento del muscolo vascolare ma anche proteggendo l'endotelio e il muscolo liscio vascolare dall'effetto tossico dei radicali liberi dell'ossigeno (Mubagwa *et al.*, 1996). Burnstock e colleghi identificano l'adenosina come uno dei fattori che regolano lo sviluppo dell'aterosclerosi e il rilascio di agenti mitogeni dalle piastrine (Burnstock, 2008); essa inibisce l'aggregazione delle piastrine e ne previene l'adesione, inibisce anche la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari mediante attivazione dei recettori A_{2b} e conseguente aumento del cAMP e stimola il rilascio di ossido nitrico (NO) dalle stesse (Ikeda *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 2001).

A livello cardiaco l'adenosina è un potente agente cronotropo, dromotropo ed inotropo negativo. Tale attività è mediata dai recettori A_1 che mediano un antagonismo funzionale degli effetti positivi delle catecolamine. Proprio per l'ampio spettro di effetti protettivi, gioca un ruolo importante nella diagnosi e nel trattamento delle malattie cardiovascolari e nella protezione durante ischemia miocardica.

Oggi l'adenosina, somministrata per via endovenosa, è indicata nel controllo delle aritmie sopraventricolari. Essa, rispetto ai farmaci alternativi (es. verapamil), è piuttosto sicura perché la sua durata d'azione è relativamente breve (Cattabeni e Abbracchio, 1996; Rang *et al.*, 2005). Tuttavia la somministrazione di adenosina esogena nella terapia di malattie infiammatorie non risulta praticabile, perché i suoi recettori sono espressi su tutti i tipi di cellule. Pertanto, potrebbero essere utilizzati con successo agenti che incrementano i livelli di adenosina nel sito specifico dell'infiammazione o composti altamente selettivi per un singolo sottotipo recettoriale.

Una delle possibili applicazioni è rappresentata dall'utilizzo di inibitori del trasporto dell'adenosina come agenti cardioprotettivi, in quanto l'inibizione del trasporto potrebbe attenuare il catabolismo del nucleoside durante gli insulti ischemici e aumentare così l'effetto protettivo dell'adenosina endogena (Thorn e Jarvis, 1996; Mattig e Deussen, 2001).

L'adenosina esercita i suoi effetti di cardioprotezione attraverso un incremento locale del flusso sanguigno. Dipiridamolo e NBTI, inibitori degli ENT, proteggono il cuore dal danno indotto da ischemia/riperfusionem perché aumentano la concentrazione e l'efficacia dell'adenosina (Lu *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2004). Altri inibitori conosciuti e usati soprattutto per l'effetto vasodilatatore che deriva da un aumento dei livelli di adenosina extracellulare sono il dilazep, la draflazina e la lidoflazina (King *et al.*, 2006). Diversi studi sul cuore di cane hanno dimostrato che gli effetti cardioprotettivi sono espliciti anche dal carvedilolo, un antagonista dei recettori β -adrenergici e dal vesnarinone, un inibitore della fosfodiesterasi, i quali causano sempre un aumento dell'adenosina extracellulare, ma con un meccanismo d'azione diverso dall'inibizione degli ENT: essi infatti incrementano l'attività della ecto-5'-nucleotidasi, l'enzima che catalizza la defosforilazione dell'AMP extracellulare ad adenosina (Hunsucker *et al.*, 2005). Con lo stesso meccanismo d'azione, l'adenosina incrementa la conversione di AMP in adenosina solo nelle cellule colpite da ischemia e non nei tessuti sani (Thorn e Jarvis, 1996; Drew *et al.*, 2009).

Il fatto di utilizzare questi farmaci che non agiscono direttamente sui recettori adenosinici, ma sono in grado di modulare i livelli di adenosina endogena agendo sulle sue vie di metabolismo e di trasporto, rappresenta un'alternativa per evitare gli effetti collaterali degli agonisti o antagonisti recettoriali, data la loro scarsa selettività.

MONOSSIDO DI AZOTO NEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE

Il monossido d'azoto (NO) è implicato in molti processi biologici quali l'omeostasi vascolare, la neurotrasmissione e l'infiammazione. A concentrazioni elevate NO è in grado di distruggere batteri, parassiti e alcune cellule tumorali.

È sintetizzato a partire da un azoto guanidico della L-arginina, che si trasforma in citrullina. Questa reazione è catalizzata da una famiglia di enzimi chiamati NO sintasi (NOS), che presentano notevoli omologie di sequenza con la citocromo P450-reduttasi, enzima coinvolto nell'inattivazione ed eliminazione di sostanze tossiche.

Sono state caratterizzate, purificate e clonate tre isoforme di NOS: nNOS (o NOS I), iNOS (o NOS II) ed eNOS (o NOS III). Le isoforme I e III sono costitutivamente espresse nelle cellule, mentre il tipo II può essere indotto da citochine o altri fattori; questa importante differenza è alla base di una più generale distinzione delle varie forme di NOS in due grandi sottoclassi funzionali: NOS costitutiva (cNOS) e NOS inducibile (iNOS). La cNOS è un enzima Ca^{2+} e calmodulina-dipendente la cui attività è regolata da variazioni nella concentrazione

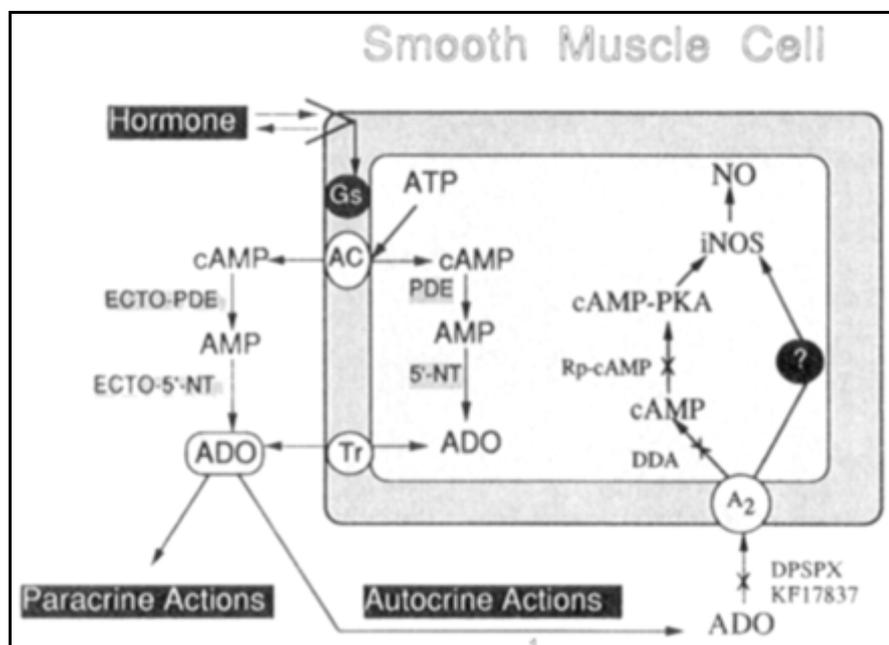
intracellulare di Ca^{2+} : il Ca^{2+} si lega alla calmodulina e il complesso Ca^{2+} /calmodulina interagisce con la NOS attivandola. L'enzima è in grado di rilasciare rapidamente piccole quantità di NO per brevi periodi di tempo ed è responsabile del mantenimento di adeguati livelli di mediatore a livello locale e dei rapidi adattamenti in risposta a minime variazioni distrettuali dell'equilibrio tra i vari messaggeri cellulari (Moncada e Higgs, 1993). L'attività enzimatica della iNOS invece non è regolata dal Ca^{2+} , tuttavia la sequenza aminoacidica dell'enzima presenta un sito di legame per la calmodulina. L'enzima iNOS lega stabilmente la calmodulina in maniera indipendente dal Ca^{2+} e non-covalente, risultando così permanentemente attivata (Cho *et al.*, 1992). La iNOS determina il rilascio lento e prolungato nel tempo di notevoli quantità di NO e risulta coinvolta in reazioni sistemiche patologiche sostenendo, se non adeguatamente modulata, effetti tossici e nocivi su cellule e tessuti distanti dal sito di produzione così come nelle stesse cellule nelle quali è stata indotta la sintesi dell'enzima (Knowles e Moncada, 1995; Lowenstein *et al.*, 1994).

In cellule a riposo, l'espressione della iNOS è usualmente molto bassa o assente. Costituenti batterici (LPS) o citochine (TNF- α , IL 1 β , INF- γ), da soli o in varia associazione tra loro, inducono la sintesi di NO nelle cellule endoteliali, in macrofagi, neutrofili, in cellule muscolari lisce vascolari.

È stato osservato che una deficienza nella produzione di NO contribuisce alla patogenesi dell'ipertensione negli animali (Vane *et al.*, 1990) e nell'uomo (Panza *et al.*, 1990). Al contrario, una iperproduzione di NO da parte di macrofagi e cellule muscolari lisce esposti a citochine ed LPS contribuisce alla vasodilatazione ed all'ipotensione associate a stati di shock circolatorio (Palmer, 1993).

Le cellule muscolari lisce vascolari, attraverso attivazione della iNOS, producono grandi quantità di NO. L'induzione di questa isoforma nelle VSMC stimulate con citochine più LPS può giocare un ruolo nell'infiammazione vascolare associata al diabete: l'NO rilasciato previene l'aggregazione e l'adesione piastrinica, induce vasodilatazione e limita la proliferazione delle VSMC. È stato dimostrato in diversi studi che la sintesi di NO nelle VSMC è regolata dalla via cAMP-adenosina; infatti il trattamento delle VSMC di ratto con cAMP (precursore dell'adenosina) o adenosina induce la sintesi di NO a livello locale (Figura 4). Si ipotizza che gli effetti inibitori del nucleoside sulla crescita delle VSMC siano mediati dai recettori di tipo A_{2b} (Dubey *et al.*, 1998 A; Mattig e Deussen, 2001), la cui attivazione stimola il rilascio di NO dalle cellule muscolari lisce di aorta di ratto. Una ridotta produzione di adenosina o un aumentato catabolismo della purina può contribuire ad una minore produzione di NO e questo può essere associato a fenomeni di rimodellamento vascolare osservati in caso di ipertensione e aterosclerosi (Ikeda *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1998 A; Dubey *et al.*, 1998 B). Tuttavia l'NO prodotto in grandi quantità è tossico per il sistema cardiovascolare, soprattutto se associato ad un incremento dei livelli di specie reattive

dell'ossigeno. Infatti sia NO che l'anione superossido sono specie altamente reattive che possono rapidamente formare perossinitriti soprattutto in condizioni di iperglicemia, in cui la produzione cellulare di NO e specie reattive dell'ossigeno è elevata. Ne consegue severa ipotensione, profonda vasodilatazione e depressione cardiaca (Nagareddy *et al.*, 2009).



da Dubey RK *et al.*, Hypertension 1998; 31:296-302

Figura 4. Via cAMP-adenosina nelle VSMC. Il cAMP viene convertito in AMP mediata dalle ecto-fosfodiesterasi (PDE) e l'AMP in adenosina per mezzo della 5'-nucleotidasi (5'-NT); l'adenosina legandosi al recettore A₂ porta all'attivazione della iNOS via adenilato ciclasi /protein chinasi A cAMP dipendente e/o indipendente. Gs, proteina G stimolatoria; Tr, trasportatore; DPSPX, antagonista dei recettori A₁/A₂; KF17837, antagonista selettivo per i recettori A₂; DDA, 2',5'-dideossiadenosina (inibitore adenilato ciclasi); Rp-cAMP, inibitore protein chinasi A.

Recenti studi hanno dimostrato un'aumentata espressione della iNOS a livello del tessuto cardiaco di ratti resi diabetici mediante iniezione di streptozotocina (Nagareddy *et al.*, 2009). Altri studi, invece, suggeriscono una diminuita produzione di NO associata al diabete. Poiché un'alterata espressione di iNOS nei tessuti cardiovascolari può avere diversi effetti, l'attività di tale enzima in tessuti di animali diabetici può essere di particolare importanza nello studio della disfunzione vascolare diabetica (Zakula *et al.*, 2007).

IL DIABETE

Il diabete è una malattia metabolica caratterizzata dalla presenza di elevati livelli di glucosio nel sangue (iperglicemia) e dovuta a insufficiente secrezione di insulina dalle cellule B del pancreas o a un'alterata sensibilità dei tessuti all'ormone (National Diabetes Data Group, 1979). I soggetti diabetici sono particolarmente sensibili a sviluppare danni a livello macrovascolare, come aterosclerosi, insufficienza cardiaca ed ipertensione, e microvascolare

come retinopatie e nefropatie. La patologia provoca elevati livelli di glucosio nel sangue, spesso accompagnati da sete, poliuria, polifagia, perdita di peso e torpore. L'eziologia e la patogenesi del diabete mellito coinvolgono fattori genetici, come la mutazione del gene dell'insulina (Tager, 1984), e fattori ambientali, come le infezioni virali (Barrett-Connor, 1985).

Esistono molte patologie associate all'iperglicemia, tuttavia le forme di diabete si classificano di solito in insulino-dipendente (IDDM) e non insulino-dipendente (NIDDM). Il diabete insulino-dipendente riguarda circa il 10% delle persone con diabete e in genere insorge nell'infanzia o nell'adolescenza. Nel diabete tipo 1, il pancreas non produce insulina a causa della distruzione delle cellule β : è quindi necessario che essa venga iniettata ogni giorno e per tutta la vita. La velocità di distruzione delle β -cellule è, comunque, piuttosto variabile, per cui l'insorgenza della malattia può avvenire rapidamente in alcuni soggetti, solitamente nei bambini e negli adolescenti, e più lentamente negli adulti. La causa del diabete tipo 1 è sconosciuta, ma caratteristica è la presenza nel sangue di anticorpi diretti contro antigeni presenti a livello delle cellule che producono insulina. Questo danno, indotto dal sistema immunitario nei confronti delle cellule che producono insulina, potrebbe essere legato a fattori ambientali (ad esempio alimentari) oppure a fattori genetici, individuati in una generica predisposizione a reagire contro agenti esterni, tra cui virus e batteri. Quest'ultima ipotesi si basa su studi condotti in gemelli monozigoti (identici) che hanno permesso di dimostrare che il rischio che entrambi sviluppino diabete tipo 1 è del 30-40%, mentre scende al 5-10% nei fratelli non gemelli e del 2-5% nei figli. Si potrebbe, quindi, trasmettere una "predisposizione alla malattia" attraverso la trasmissione di geni che interessano la risposta immunitaria e che, nel corso di una banale risposta del sistema immunitario a comuni agenti infettivi, causano una reazione anche verso le cellule β del pancreas, con la produzione di anticorpi diretti contro di esse (auto-anticorpi). Questa alterata risposta immunitaria causa una progressiva distruzione delle cellule β , per cui l'insulina non può più essere prodotta e si manifesta così la malattia diabetica. Per questo motivo, il diabete di tipo 1 viene classificato tra le malattie cosiddette "autoimmuni", cioè dovute a una reazione immunitaria diretta contro l'organismo stesso.

Il diabete non insulino-dipendente è la forma più comune di diabete e rappresenta circa il 90% dei casi di questa malattia. In questo caso il pancreas è in grado di produrre insulina, ma le cellule dell'organismo non riescono poi a utilizzarla. In genere, la malattia si manifesta dopo i 30-40 anni e sono stati riconosciuti numerosi fattori di rischio per la sua insorgenza, tra cui la familiarità, lo scarso esercizio fisico, il sovrappeso e l'appartenenza ad alcune etnie. Riguardo la familiarità, circa il 40% dei diabetici di tipo 2 ha parenti di primo grado (genitori, fratelli) affetti dalla stessa malattia, mentre nei gemelli monozigoti la concordanza della malattia si avvicina al 100%, suggerendo una forte componente ereditaria

per questo tipo di diabete. Il diabete tipo 2 in genere non viene diagnosticato per molti anni in quanto l'iperglicemia si sviluppa gradualmente e inizialmente non è di grado tale da dare i classici sintomi del diabete. Solitamente la diagnosi avviene casualmente o in concomitanza con una situazione di stress fisico, quale infezioni o interventi chirurgici. Il rischio di sviluppare la malattia aumenta con l'età, la presenza di obesità e la mancanza di attività fisica: questa osservazione consente di prevedere strategie di prevenzione "primaria", cioè interventi in grado di prevenire l'insorgenza della malattia e che hanno il loro cardine nell'applicazione di uno stile di vita adeguato, che comprenda aspetti nutrizionali e l'esercizio fisico.

Nel diabete di tipo 2 la sintomatologia è più sfumata e solitamente non consente una diagnosi rapida, per cui spesso la glicemia è elevata ma non presenta i segni clinici del diabete di tipo 1 (www.epicentro.iss.it).

Adenosina, NO e diabete

Il diabete causa anomalie funzionali, biochimiche e morfologiche nel cuore e molti di questi cambiamenti possono essere attribuiti ad un'alterata azione dell'adenosina. Diverse evidenze hanno dimostrato variazioni dell'espressione dei recettori per il nucleoside nel cuore di ratti resi diabetici mediante iniezione di streptozotocina. In particolare uno studio condotto da Grden e colleghi ha dimostrato una sovraespressione del recettore A_1 in cardiomiociti diabetici con un conseguente effetto di cardioprotezione durante l'ischemia e riperfusione; e un aumento del livello dei recettori A_{2a} che, attivati, proteggono le cellule cardiache da apoptosi. Per quanto riguarda i recettori A_3 , invece, la loro espressione aumenta nelle cellule diabetiche, la loro attivazione induce però apoptosi di diversi tipi cellulari tra cui i cardiomiociti, suggerendo quindi un effetto dannoso piuttosto che protettivo di questo tipo recettoriale nel cuore (Grdeń *et al.*, 2005).

In un recente lavoro è stato valutato il possibile utilizzo di agonisti dei recettori dell'adenosina come potenziali candidati per il trattamento del diabete di tipo 1: NECA, un agonista non selettivo, protegge infatti il pancreas dalla distruzione delle cellule β in modelli sperimentali di diabete, in quanto inibisce la produzione delle citochine proinfiammatorie TNF- α , MIP-1 α e INF- γ (Németh *et al.*, 2007). Agonisti selettivi per gli A_{2a} (come ATL146e) sono indicati per il trattamento della nefropatia diabetica in modelli animali di diabete (Haskó e Pacher, 2007), e nel trattamento delle ulcere tipiche del "piede diabetico", perché hanno azione antinfiammatoria e promuovono la guarigione delle ferite (Awad *et al.*, 2006). Gli agonisti dei recettori A_{2b} , invece, attenuano la gravità del diabete immunomediato di tipo I, contrastando infiammazione e danno vascolare (Nemeth *et al.*, 2007).

Anche l'inosina, prodotto della deaminazione dell'adenosina, e in particolare un suo analogo (INO-2002) meno soggetto alla degradazione in ipoxantina, protegge dal diabete di

tipo 1 in modelli animali, perché abbassa la produzione di citochine proinfiammatorie nelle cellule β aumentando invece il rilascio delle citochine antinfiammatorie (Mabley *et al.*, 2008).

Oltre ad un'alterata espressione dei recettori dell'adenosina, in letteratura ci sono numerosi lavori che indicano cambiamenti nell'espressione dei trasportatori per le purine associati al diabete. Il trasporto dell'adenosina mediato dagli hENT2 è responsabile degli effetti stimolatori dell'insulina sulla rimozione dell'adenosina, mentre elevate concentrazioni di glucosio mostrano effetti inibitori nella rimozione dell'adenosina nell'endotelio umano fetale. Questo meccanismo assume particolare importanza in malattie come il diabete, dove la produzione di insulina è alterata, o comunque in condizioni in cui la glicemia risulta elevata (Muñoz *et al.*, 2006). Da uno studio condotto da Leung nel 2005 emerge che, in contrasto a quanto osservato nel rene, fegato e cuore di ratti resi diabetici con streptozotocina, dove l'espressione degli ENT diminuisce, nelle cellule muscolari lisce delle arterie mesenteriche si osserva una sovraespressione dei trasportatori associata ad un' aumentata attività di CD73 rispetto ai ratti non diabetici, e questo è interpretato come un meccanismo protettivo per aumentare la produzione di adenosina in sede extracellulare (Leung *et al.*, 2005). In uno studio più recente è stata valutata l'attività degli ecto-enzimi coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi purinici nelle cellule ematiche di ratti resi diabetici mediante iniezione di streptozotocina. È stato dimostrato che gli animali diabetici presentano un metabolismo dell'ATP e dell'AMP extracellulari più rapido rispetto ai ratti controllo, con produzione di elevati livelli di adenosina. Altri lavori indicano un'alterata attività di ADA in diversi tessuti di animali diabetici (Kurtul *et al.*, 2004). Si comprende quindi che tali alterazioni enzimatiche sono importanti nel controllo del rapporto nucleotidi/nucleosidi in circolo e nel controllo dell'emostasi (Rücker *et al.*, 2010).

L'iperglicemia è anche associata ad alterazione dell'espressione della proteina iNOS, con conseguente variazione nella produzione di NO a livello cardiovascolare. Alcuni studi suggeriscono una ridotta produzione di NO associata al diabete (Zakula *et al.*, 2006); al contrario altri lavori in letteratura propongono una aumentata espressione di iNOS a livello renale in ratti resi diabetici (Nagareddy *et al.*, 2009). Si può concludere pertanto che studiare l'attività di iNOS e il ruolo dell'adenosina nella modulazione della sua espressione può essere di particolare importanza nella comprensione della disfunzione cardiovascolare associata al diabete mellito.

SCOPO DELLA TESI

Le complicanze cardiovascolari associate al diabete rappresentano una delle principali cause di morte nei paesi industrializzati. Il diabete è associato ad occlusione di arterie nelle estremità, infarto del miocardio ed ictus. La patologia, inoltre, è correlata ad accertata aterosclerosi e ad un aumentato livello dei marker dell'infiammazione (Pradhan *et al.*, 2001).

Nel sistema cardiovascolare l'adenosina manifesta diverse proprietà vasoprotettive: induce infatti vasodilatazione, inibisce l'aggregazione piastrinica e ne previene l'adesione, inibisce la crescita delle cellule muscolari lisce vascolari (Ikeda *et al.*, 1997). Diverse evidenze suggeriscono che l'adenosina prodotta dalle cellule muscolari induca i suoi effetti in parte regolando la produzione di NO a livello della parete dei vasi: per interazione con i recettori A₂ l'adenosina modula l'espressione della proteina iNOS e quindi il rilascio di NO nelle cellule muscolari (Dubey *et al.*, 1998; St. Hilaire *et al.*, 2008). La diminuita sintesi di adenosina o il suo aumentato catabolismo può contribuire ad una diminuzione della sintesi di NO con conseguente proliferazione delle VSMC, rimodellamento vascolare e disordini vasoocclusivi. Pertanto, agenti che aumentano i livelli di adenosina endogena sono importanti a livello clinico per prevenire i disordini vasoocclusivi associati ad ipertensione ed aterosclerosi (Dubey *et al.*, 1998 A). Tuttavia, un'eccessiva produzione di NO via iNOS, e soprattutto l'accumulo dei suoi prodotti di degradazione più stabili, può contribuire allo sviluppo di un ampio spettro di malattie come artrite reumatoide, ischemia cerebrale, sclerosi multipla e diabete (Galea e Feinstein, 1999).

Considerando quindi che l'attivazione di iNOS da parte delle citochine è coinvolta nella disfunzione vascolare diabetica, lo scopo della mia ricerca è stato quello di valutare il potenziale ruolo anti-infiammatorio dell'adenosina in tale processo determinando l'effetto della purina e dei composti ad essa correlati sull'espressione di iNOS in cellule muscolari lisce vascolari ottenute dall'aorta toracica di ratti sperimentalmente diabetici e, per confronto, di ratti sani. In parallelo sono state anche esaminate le diverse vie di eliminazione dell'adenosina extracellulare nelle stesse condizioni sperimentali, con lo scopo di individuare eventuali alterazioni associate alla patologia diabetica di enzimi e trasportatori coinvolti nel metabolismo del nucleoside.

Riuscire a comprendere i meccanismi grazie ai quali viene regolata la sintesi di iNOS e la concentrazione di adenosina, sia in condizioni fisiologiche sia in un modello sperimentale di diabete, può porre delle basi per mettere a punto nuove strategie terapeutiche. L'utilizzo, infatti, di farmaci in grado di modulare i livelli di adenosina endogena agendo sulle sue vie di

Scopo della tesi

metabolismo e di trasporto può portare al miglioramento delle complicanze cardiovascolari associate al diabete.

MATERIALI

Acido citrico	Carlo Erba, Italia
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
APS	Biorad, Italia
ATP	Sigma-Aldrich, Italia
Blu bromofenolo	Invitrogen, Italia
CaCl ₂ 2H ₂ O	Merck, Germania
Citochine (IL-1 β , TNF- α , INF- γ)	Tebu Bio, Italia
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck, Germania
D(+)-Glucosio Anidro	J.T. Baker, Olanda
Desossicolato di sodio	Merck, Germania
ECL 1 e 2	GE Healthcare, Gran Bretagna
EGTA	Sigma-Aldrich, Italia
EHNA	Sigma-Aldrich, Italia
Gentamicina	Invitrogen, Italia
Glicina	Sigma-Aldrich, Italia
Glutammina	Invitrogen, Italia
HCl	Vetrotecnica, Italia
HClO ₄	Prolabo, Italia
Inibitori delle proteasi Complete	Roche, Italia
Inosina	Sigma-Aldrich, Italia
Ipxantina	Sigma-Aldrich, Italia
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker, Olanda
KOH	Prolabo, Italia
Latte in polvere	Merck, Germania
LPS	Sigma-Aldrich, Italia
Medium 199	Celbio, Italia
β -mercaptoetanololo	Merk, Germania
Metanolo	J.T. Baker, Olanda
MgCl ₂	Merck, Germania

Materiali

NaCl	Sigma-Aldrich, Italia
Na citrato	Carlo Erba, Italia
Na ₂ CO ₃	Merck, Germania
Na deossicolato	Sigma-Aldrich, Italia
NaF	Sigma-Aldrich, Italia
NaHCO ₃	J.T. Baker, Olanda
NaOH	J.T. Baker, Olanda
Na ortovanadato	Sigma-Aldrich, Italia
Na pirofosfato	Sigma-Aldrich, Italia
NBTI	Sigma-Aldrich, Italia
NP-40	Sigma-Aldrich, Italia
PBS	Invitrogen, Italia
PMSF	Sigma-Aldrich, Italia
Reattivo di Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich, Italia
Rosso ponceau	Sigma-Aldrich, Italia
SDS	Sigma-Aldrich, Italia
Siero fetale bovino	Celbio, Italia
Streptozotocina	Tocris, Gran Bretagna
Tartrato sodico potassico	Merck, Germania
Temed	Amersham, Gran Bretagna
Teofillina	Sigma-Aldrich, Italia
n-Tetrabuttilammonio bromuro	Merck, Germania
Tripan blu	Invitrogen, Italia
Tripsina-EDTA	Invitrogen, Italia
Tris base	Sigma-Aldrich, Italia
Tween 20	Merck, Germania

METODI

ANIMALI ED INDUZIONE DEL DIABETE

In una parte degli animali è stato indotto il diabete mediante iniezione nella vena caudale di streptozotocina (65 mg/Kg) solubilizzata in tampone citrato 0,1 M immediatamente prima dell'uso. La streptozotocina è un antibiotico estratto da *Streptomyces achromogenes* e dopo 10 ore dall'iniezione induce degranolazione e necrosi delle cellule β pancreatiche (Junod *et al.*, 1967). Gli animali trattati con streptozotocina presentano molte caratteristiche osservate nei soggetti diabetici non trattati quali iperglicemia, polidipsia, poliuria e perdita di peso (Wei *et al.*, 2003). Nelle 24 ore successive al trattamento, al fine di evitare l'insorgenza di crisi ipoglicemiche, si lascia a disposizione degli animali una soluzione acquosa di glucosio al 5%. Dopo 4 giorni si misura la glicosuria, per confermare l'avvenuta induzione del diabete. Al momento del sacrificio viene misurata anche la glicemia. Il valore soglia di glicemia per l'inclusione nel gruppo degli animali diabetici è 300 mg/dl.

Il prelievo dell'aorta dei ratti per l'ottenimento delle cellule è stato effettuato dopo 4 settimane dal trattamento. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando l'aorta toracica di ratti maschi Sprague-Dawley del peso iniziale di 175-200 grammi.

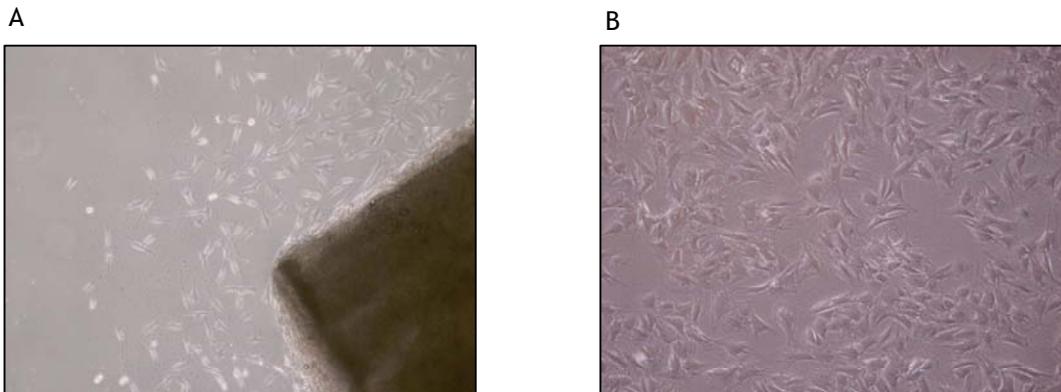
COLTURE CELLULARI

Le colture di cellule muscolari lisce vascolari (VSMC, Vascular Smooth Muscle Cells) di aorta di ratto sono state ottenute con la tecnica dell'espianto (Ross, 1971).

Dopo il sacrificio degli animali, le aorte sono state prelevate e poste in piastre di Petri contenenti *Phosphate Buffered Saline* (PBS) sterile freddo. In ambiente rigorosamente sterile, lavorando sotto cappa a flusso laminare, le aorte sono state pulite esternamente con una pinzetta, lavate ulteriormente con PBS, quindi aperte longitudinalmente con forbici e private meccanicamente dell'endotelio strisciando la lama di un bisturi sulla superficie interna del vaso. Il tessuto così preparato è stato finemente suddiviso con lo stesso bisturi in frammenti più piccoli che sono stati disposti omogeneamente su piastre Petri del diametro di 60 mm contenenti alcune gocce di PBS che ne facilitano la distensione e vengono aspirate una volta terminata l'operazione. Dopo 10 minuti necessari affinché i frammenti aderiscano al fondo della Petri è stato aggiunto il terreno di coltura (M 199 completato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di glutammina e 20 μ g/ml di gentamicina).

Le Petri sono state lasciate in incubatore in condizioni controllate di temperatura (37°C), atmosfera (CO₂ al 5%, O₂ al 95%) e umidità relativa del 90%. Le prime cellule migrano dai frammenti dopo circa 7 giorni dall'espianto. Da quel momento, il medium di crescita è stato sostituito ogni 3/4 giorni. In due settimane circa le cellule occupano parte della superficie a disposizione nella piastra

di coltura. Nonostante le cellule non siano a completa confluenza, i frammenti devono essere eliminati perchè nel tempo potrebbero rilasciare mediatori dannosi per la sopravvivenza. Osservate al microscopio ottico, le cellule a confluenza presentano il caratteristico aspetto “*hill and valley*”.



A) Migrazione delle VSMC da un frammento di aorta di ratto; B) Aspetto delle VSMC in coltura

Si procede quindi alla messa in linea: la subcoltura è stata eseguita staccando le cellule dal fondo della piastra mediante un processo enzimatico che utilizza tripsina (2,5 g/l) ed EDTA *4Na (0,38 g/l). Questo procedimento porta ad una coltura primaria che mantiene le caratteristiche delle cellule da cui deriva. Il procedimento di subcoltura prevede l'aspirazione del medium di crescita e successivamente il lavaggio del monostrato con PBS sterile per eliminare eventuali residui di terreno di coltura, FBS e ioni che inibirebbero l'azione della tripsina. Le cellule sono state incubate a 37°C per 1 minuto in una soluzione tampone contenente tripsina-EDTA, aggiunta in un volume tale da coprire il monostrato cellulare; l'incubazione a 37°C favorisce il distacco delle SMC, che assumono una forma tondeggiante.

Dopo aver verificato al microscopio che le cellule si fossero effettivamente staccate dal fondo della Petri, è stato aggiunto il terreno di coltura contenente il 10% di FBS per bloccare l'azione della tripsina e la sospensione cellulare così ottenuta è stata omogeneamente distribuita su nuove piastre. Una volta giunte a confluenza, le cellule vengono ulteriormente subcoltivate.

Conta e trattamento delle cellule

Le VSMC ad un grado di confluenza pari a circa il 90% sono state raccolte dalla Petri mediante il processo di tripsinizzazione descritto in precedenza.

La sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 g per 5 minuti. Una volta aspirato il surnatante, il precipitato è stato risospeso in 2 ml di terreno di coltura, da cui è stata prelevata un'aliquota per la conta cellulare effettuata con la camera di Bürker. A tal fine la sospensione è stata diluita 1:2 con Trypan blue, un colorante che penetra all'interno delle cellule lese e consente di discriminarle dalle cellule vitali. Al termine della colorazione, le cellule sono state inserite nella camera di Bürker, costituita da due griglie formate da 12 quadrati per lato (144 quadrati in totale). Il conteggio all'interno di un'area prescelta è stato effettuato al microscopio ottico. In base ai

risultati ottenuti, tenendo conto della camera di conta ($1/10^4$ ml) e della diluizione (1:2), si calcola il numero di cellule nella sospensione. Si preleva l'aliquota di sospensione per preparare la concentrazione desiderata e si distribuiscono le cellule in piastre da 35 mm per gli esperimenti. Le VSMC seminate (3×10^5 cellule per pozzetto) sono state incubate con terreno di coltura arricchito del 10% di FBS fino a raggiungere la subconfluenza. A questo punto, il medium è stato aspirato, le VSMC sono state lavate con PBS e incubate per 24 ore con terreno di coltura allo 0,4% di FBS, per arrestare la crescita delle cellule e sincronizzarle nella stessa fase del ciclo cellulare.

Dopo la fase di sincronizzazione, le cellule ottenute da ratti controllo e diabetici sono state lavate con PBS per eliminare ogni traccia di siero e trattate con adenosina o AMP (entrambi 1 mM) e, dove indicato, con EHNA 1 μ M, NBTI 10 μ M, o AOPCP 200 μ M in terreno di coltura arricchito con il 2% di FBS e con un cocktail di citochine costituito da IL-1B (10 ng/ml), TNF- α (25 ng/ml) ed INF- γ (10 ng/ml) più LPS (1 μ g/ml). Le cellule vengono così incubate per 24 ore. Nei pozzetti di controllo (basale) le VSMC non sono state esposte ad adenosina o AMP esogeni ma incubate con il solo terreno di coltura al 2% di FBS.

Negli esperimenti il cui protocollo prevede l'utilizzo di inibitori (es. EHNA, NBTI, AOPCP), le cellule vengono pre-incubate per 30 minuti con tali composti e poi trattate come sopra descritto. Al termine dell'incubazione, il surnatante è stato trasferito in provette Eppendorf contenenti HClO₄ (concentrazione finale 1 N) poste in ghiaccio, al fine di bloccare la degradazione enzimatica delle purine. I campioni sono stati filtrati con filtri PVDF (0,22 μ m, Sartorius) così da eliminare i residui cellulari e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi quali-quantitativa dell'adenosina, dell'AMP e dei metaboliti nel compartimento extracellulare. Le cellule invece vengono lavate due volte con PBS freddo e raccolte in 100 μ l di tampone di lisi composto da 50 mM TRIS HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 25 mM NaF, 0,5% Na deossicolato, 10% SDS, 1mM EGTA, 1 mM Na ortovanadato, 10 mM Na pirofosfato, 1 mM PMSF e gli inibitori delle proteasi Complete (Roche) (Idel *et al.*, 2002). I lisati cellulari così ottenuti vengono trasferiti in Eppendorf e conservati a -80°C fino al dosaggio delle proteine.

ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA DELLE PURINE

Il dosaggio delle purine è stato effettuato mediante analisi cromatografica a coppia ionica eseguita con HPLC Beckman. L'apparecchio è costituito da un sistema a due pompe (Beckman System Gold Programmable Solvent Module 125) con iniettore da 20 μ l (*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.

Aliquote di 167 µl della soluzione da esaminare sono stati addizionate 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 e colleghi (1996) per determinare e quantificare i nucleotidi e nucleosidi nel tessuto cardiaco. La fase mobile è costituita da una soluzione (A) di KH₂PO₄ 73.5 mM e tetrabuttilammonio bromuro 6 mM a pH 5.8 e metanolo (B); il flusso è di 1 ml/min a gradiente discontinuo, come riportato 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 stati analizzati in riferimento a curve di taratura. Tali curve sono state ottenute dopo analisi HPLC di soluzioni a concentrazione nota di ATP, ADP, cAMP, AMP, adenosina, IMP, 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 e 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 delle corse cromatografiche di soluzioni contenenti le purine d'interesse e la teofillina, alla concentrazione nota di 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 nelle soluzioni standard, legate a possibili variazioni giornaliere nel funzionamento dello strumento.

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

DOSAGGIO DELLE PROTEINE

La valutazione della quantità di proteine contenuta nei lisati cellulari è stata effettuata seguendo il metodo di Lowry (Lowry *et al.*, 1962), un dosaggio colorimetrico che prevede l'utilizzo di una soluzione alcalina di solfato di rame e il reagente di Folin-Ciocalteu: i residui di tirosina reagiscono con il reattivo di Folin che, in presenza di Cu^{2+} , viene ridotto producendo una colorazione blu, la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteine presenti. Dopo l'aggiunta dei reattivi i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 30 minuti, quindi è stata determinata la densità ottica alla lunghezza d'onda di 670 nm utilizzando uno spettrofotometro.

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA INOS MEDIANTE WESTERN BLOTTING

L'elettroforesi è stata condotta caricando per ciascun campione circa 40 μg di proteina su gel di poliaccrilamide al 10% in presenza di sodiododecilsolfato (SDS-PAGE). Al termine della corsa elettroforetica le proteine risolte in bande sono state trasferite su una membrana di PDVF utilizzando uno strumento per transblot ad amperaggio costante (400 mA). Il tampone utilizzato per il trasferimento contiene: Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanolo al 20%. Al termine del trasferimento le membrane sono state colorate con Rosso Ponceau per controllare la corsa elettroforetica e quindi incubate in TBS contenente 0,1% Tween (TBS-T) e 5% di latte in polvere, al fine di saturare i siti di legame aspecifici, tenendole in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari diretti contro le proteine in esame, diluiti in TBS-T e 5% di latte in polvere per una notte a 4 °C (vedi tabella). Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario, le membrane sono state lavate per 4 volte con TBS-T allo scopo di eliminare l'adsorbimento dell'anticorpo su siti aspecifici. Successivamente le membrane sono state incubate con gli opportuni anticorpi secondari diluiti in TBS-T e 5% di latte in polvere per 45 minuti a temperatura ambiente. Al termine del trattamento sono stati fatti 4 lavaggi in TBS-T in modo da eliminare i legami aspecifici dell'anticorpo secondario ed ottenere un segnale il più possibile pulito. Il segnale è stato rivelato su lastre fotografiche che vengono impressionate per chemiluminescenza con i reattivi ECL della GE/Amersham.

PROTEINA DA ANALIZZARE	Anticorpo primario		Lavaggi	Anticorpo secondario		Lavaggi
	Tipo	Diluizione		Tipo	Diluizione	
iNOS	rabbit	1:1000	4 x 10'	Anti-rabbit	1:5000	4 x 10'
β -actina	mouse	1:5000	4 x 10'	Anti-mouse	1:5000	4 x 10'

Elenco degli anticorpi usati e delle condizioni di utilizzo

ANALISI STATISTICA

I dati di Western blotting sono stati ottenuti da almeno 3 esperimenti indipendenti e ciascun valore rappresenta la media \pm errore standard della media (SEM), seppure con la limitazione che la tecnica per sua natura è semiquantitativa. Nel caso dei dosaggi dell'adenosina e dei suoi metaboliti nel terreno di coltura gli esperimenti sono stati condotti in duplicato o triplicato e i dati sono stati espressi come media \pm SEM di risultati ottenuti da un minimo di 3 esperimenti.

Il confronto tra gruppi è stato utilizzando il test t di Student. I valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

1. Influenza dell'adenosina esogena sull'espressione di iNOS in cellule muscolari lisce vascolari di ratti diabetici in confronto con ratti normoglicemici

L'enzima iNOS è una proteina inducibile che, in condizioni fisiologiche, non è espressa nelle cellule muscolari lisce vascolari. La sua produzione può essere però stimolata da citochine proinfiammatorie e dall'endotossina batterica (LPS; Cignarella *et al.*, 2006).

Utilizzando la tecnica del Western blotting è stata valutata l'induzione dell'enzima nelle cellule stimulate (per 24h) con una miscela costituita da IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (25 ng/ml), INF- γ (10 ng/ml) e LPS (1 μ g/ml). Come previsto, il trattamento delle cellule di ratti diabetici e normoglicemici con LPS più citochine (citomix) induce l'espressione della proteina che non è misurabile in condizioni basali. I livelli di espressione della proteina nelle cellule controllo e diabetiche esposte allo stimolo infiammatorio sono stati posti uguali a 100 e i risultati delle diverse incubazioni normalizzati a tale valore. È stato valutato l'effetto di concentrazioni crescenti di adenosina esogena sull'espressione di iNOS (Tabella 1): la purina aggiunta al medium delle cellule controllo e diabetiche in basse concentrazioni (10 μ M e 100 μ M) non causa modifiche statisticamente significative dell'espressione della proteina. Invece gli esperimenti in cui le cellule sono state incubate con adenosina 1 mM dimostrano che il nucleoside potenzia l'effetto del citomix sull'espressione di iNOS nelle cellule di ratti diabetici.

TRATTAMENTO (t=24h)	ESPRESSIONE DI iNOS (%)	
	CONTROLLO	DIABETE
CITOMIX	100	100
CITOMIX + ADO (0.01 mM)	95.2 \pm 11.8 (n=8)	76.2 \pm 11.2 (n=5)
CITOMIX + ADO (0.1 mM)	89.8 \pm 12.1 (n=8)	88.1 \pm 11.3 (n=5)
CITOMIX + ADO (1 mM)	115.4 \pm 14.3 (n=10)	133.5 \pm 8.3* (n=10)

Tabella 1. Influenza di concentrazioni crescenti di adenosina esogena sui livelli di espressione della proteina iNOS in VSMC controllo e diabetiche stimulate con citomix. Le cellule sono state trattate con adenosina (0.01 - 1 mM) per 24 h. * $p < 0.001$ vs citomix.

Gli esperimenti successivi sono stati condotti alla concentrazione di adenosina di 1 mM. Impiegata a tale concentrazione, l'adenosina non altera in modo significativo l'espressione della proteina iNOS nelle cellule controllo. Nelle cellule diabetiche, invece, il nucleoside causa un

aumento significativo della produzione di iNOS. Questo aumento non è influenzato dal trattamento con NBTI (10 μ M), inibitore degli ENT (Figura 5A), ma è potenziato (+45%) in seguito all'aggiunta di EHNA (1 μ M), inibitore dell'ADA (Figura 5B).

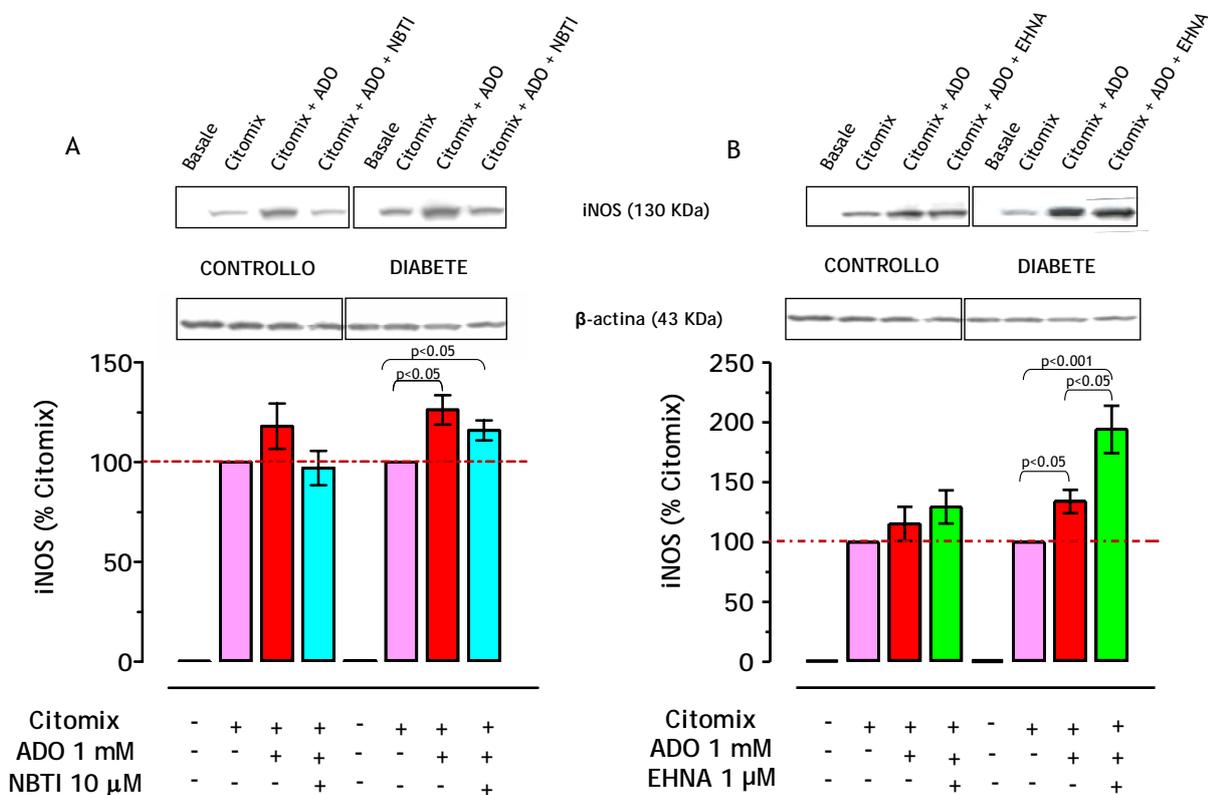


Figura 5. Influenza del trattamento con NBTI (A) o EHNA (B) sull'espressione della proteina iNOS in VSMC di ratti controllo e diabetici. Le cellule stimulate con citochine più LPS sono state esposte ad adenosina (1 mM) per 24 h in assenza o in presenza di NBTI (10 μ M) o EHNA (1 μ M) aggiunti al medium 30 minuti prima dell'adenosina. Per l'analisi del segnale densitometrico della proteina iNOS è stato utilizzato il segnale di riferimento della β -actina. L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica normalizzata (iNOS/ β -actina) dei segnali ottenuti dai diversi campioni. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 5 esperimenti.

2. Influenza di AMP e inosina esogeni sull'espressione di iNOS

AMP (1 mM), precursore dell'adenosina, è stato aggiunto al mezzo di incubazione di VSMC controllo e diabetiche. Dopo 24 h i livelli di iNOS non sono modificati nelle cellule di ratti sani, mentre sono risultati incrementati del 30% rispetto allo stimolo con citomix nelle cellule di ratti diabetici (Figura 6). In parallelo è stato studiato l'effetto di AOPCP (200 μ M), inibitore dell'enzima ecto-5'-nucleotidasi/CD73 che promuove la defosforilazione di AMP in adenosina. L'inibizione della CD73 con AOPCP non provoca variazione dell'espressione di iNOS nelle cellule controllo e diabetiche rispetto al trattamento con solo AMP (Figura 6).

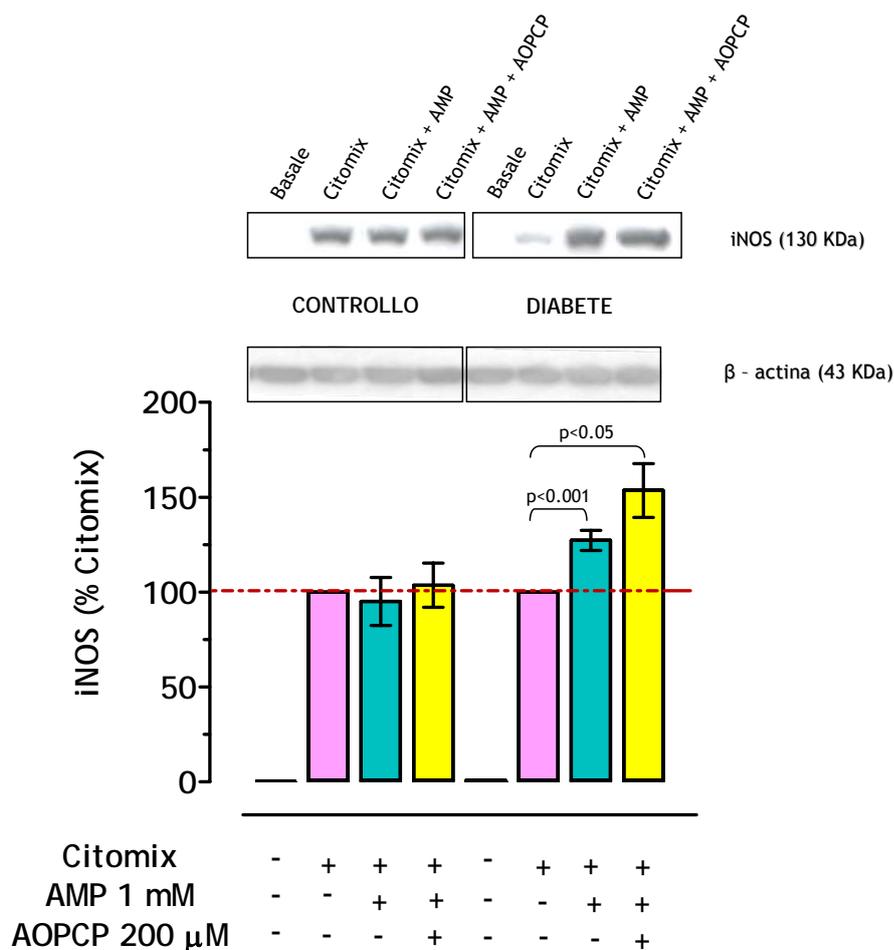


Figura 6. Effetto dell'AMP e influenza del trattamento con AOPCP sull'espressione della proteina iNOS in VSMC di ratti controllo e diabetici. Le cellule stimolate con citochine più LPS (citomix) sono state esposte ad AMP (1 mM) per 24 h in assenza o in presenza di AOPCP (200 μ M) aggiunto al medium 30 minuti prima dell'adenosina. Per la quantizzazione del segnale densitometrico della proteina iNOS è stato utilizzato il segnale di riferimento della β -actina. L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica normalizzata (iNOS/ β -actina) dei segnali ottenuti dai diversi campioni. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 6 esperimenti.

È stata anche valutata l'influenza dell'inosina esogena, prodotto della deaminazione dell'adenosina, sull'espressione della proteina iNOS nelle VSMC stimolate con LPS e citochine. Dopo incubazione di 24 h con inosina 1 mM non si evidenzia una variazione statisticamente significativa nell'espressione della proteina rispetto al trattamento con solo citomix (Tabella 2).

TRATTAMENTO (t=24h)	ESPRESSIONE DI iNOS (% Citomix)	
	CONTROLLO (n=6)	DIABETE (n=4)
CITOMIX	100	100
CITOMIX + INOSINA (1 mM)	105 ± 16	104 ± 7

Tabella 2. Influenza del trattamento con inosina sui livelli di espressione della proteina iNOS in VSMC controllo e diabetiche stimulate con citochine più LPS. Le cellule sono state esposte ad inosina (1 mM) per 24 h. I dati sono espressi come media±SEM.

3. Effetto degli inibitori (NBTI, EHNA e AOPCP) sull'espressione di iNOS in assenza di purine esogene

Una serie di esperimenti ha avuto lo scopo di valutare l'effetto dei soli inibitori (NBTI, EHNA e AOPCP) sull'espressione di iNOS indotta da LPS più citochine. In assenza di adenosina o AMP esogeni, né NBTI (10 µM) né AOPCP (200 µM) causano alcuna variazione significativa dei livelli di iNOS nelle cellule di ratti normoglicemici e diabetici. Il trattamento con EHNA (1 µM) non altera l'espressione di iNOS nelle cellule diabetiche, ma induce una diminuzione significativa dell'espressione della proteina nelle VSMC dei ratti controllo (Figura 7).

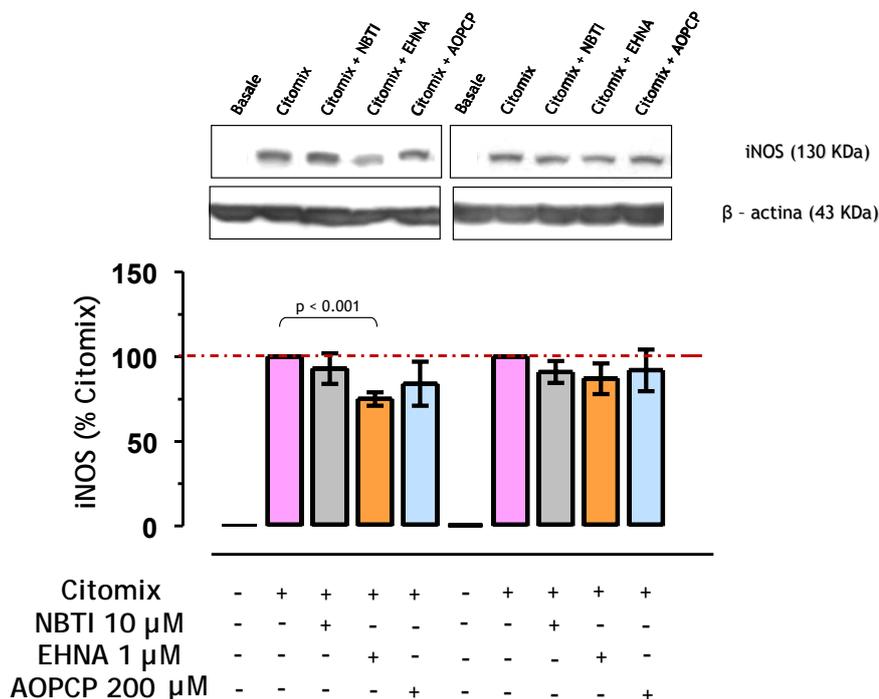


Figura 7. Influenza del trattamento con NBTI, EHNA e AOPCP sui livelli di espressione della proteina iNOS in VSMC stimulate con citochine più LPS. Le cellule stimulate con citochine più LPS (citomix) sono state esposte ad NBTI, EHNA o AOPCP per 24 h. Per la quantizzazione del segnale densitometrico della proteina iNOS è stato utilizzato il segnale di riferimento della β-actina. L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica normalizzata (iNOS/β-actina) dei segnali ottenuti dai diversi campioni. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 5/6 esperimenti.

4. Metabolismo dell'adenosina esogena nel medium di incubazione delle cellule muscolari lisce vascolari: influenza del trattamento con NBTI ed EHNA

Per verificare la quantità di adenosina residua nel medium di incubazione delle VSMC dopo le 24 h di trattamento e la formazione dei suoi metaboliti, è stata condotta un'analisi del medium con metodica HPLC.

Nelle cellule di ratti controllo e diabetici esposte ad adenosina 1 mM, la purina non è rilevabile nel medium al termine dell'incubazione. La scomparsa del nucleoside esogeno è accompagnata da un parallelo aumento delle concentrazioni dei suoi metaboliti, inosina ed ipoxantina, che si accumulano in misura simile sia nelle cellule di ratti normoglicemici che diabetici (Figura 8A). Anche il rapporto inosina/ipoxantina è paragonabile in entrambi i gruppi di cellule (Figura 8B).

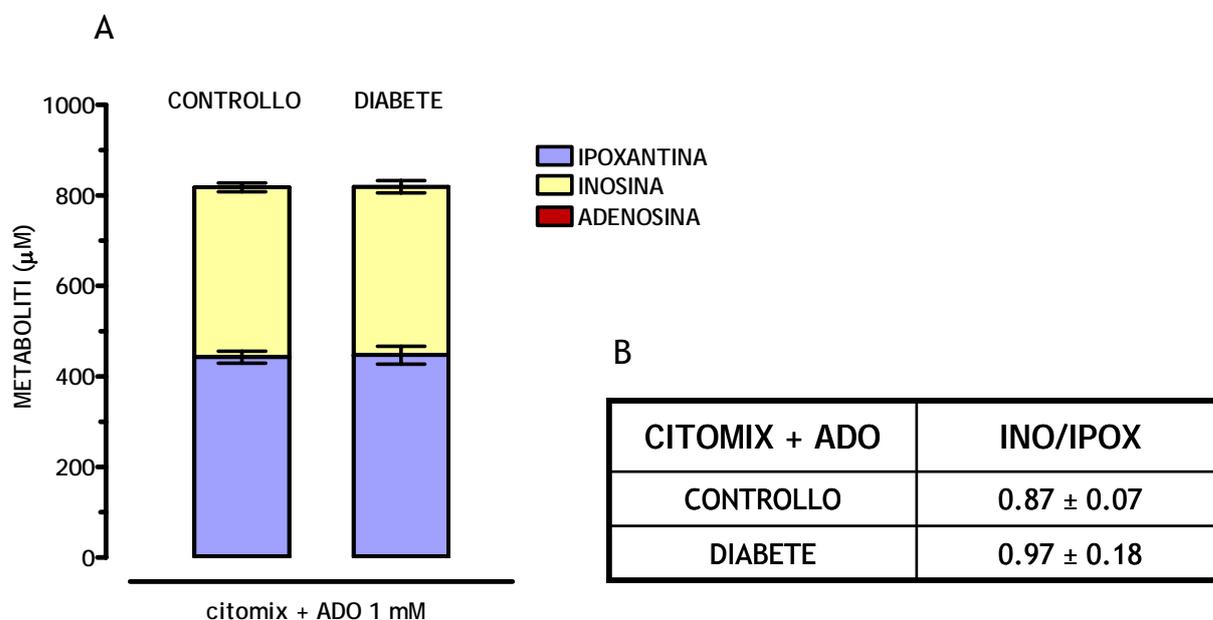


Figura 8. Eliminazione di adenosina esogena (1mM) dal medium di incubazione di VSMC di ratti controllo e diabetici (A) e rapporto tra i suoi prodotti di degradazione (B). I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 (cellule controllo) e 10 (cellule diabetiche) esperimenti.

Per determinare l'entità della degradazione spontanea dell'adenosina aggiunta, sono stati condotti esperimenti in assenza di cellule e si è dimostrato che in queste condizioni il 14% del nucleoside si degrada spontaneamente in inosina (Figura 9).

Lo scopo successivo è stato quello di valutare l'influenza dello stimolo infiammatorio sull'eliminazione dell'adenosina nel medium delle VSMC di ratti sani e diabetici. Per questa serie di esperimenti, una parte delle cellule è stata incubata con adenosina 1 mM da sola e una parte con adenosina in presenza di LPS più citochine (citomix). Dopo 24 h di incubazione il nucleoside scompare dal medium e la quantità dei suoi metaboliti recuperata nel medium delle cellule

controllo e diabetiche stimulate con le citochine, non è significativamente diversa da quella che si misura in assenza del citomix (Figura 9). Nella serie di esperimenti condotti in assenza di cellule il rapporto tra adenosina e il suo primo metabolita inosina è pari a 5.57: la purina rimane infatti nel medium e la quantità di inosina recuperata è solo del 14% (Figura 9 e Tabella 3). L'ipoxantina, prodotto di degradazione dell'inosina, non è rilevabile nel terreno di coltura dopo 24 h. Questo conferma che l'inosina recuperata non viene metabolizzata determinando così un elevato rapporto inosina/ipoxantina in assenza di cellule (Tabella 3). Al contrario negli esperimenti eseguiti in presenza di cellule di entrambi i gruppi, il rapporto tra adenosina e inosina è nullo, poiché il nucleoside non è rilevabile nel medium dopo 24 h.

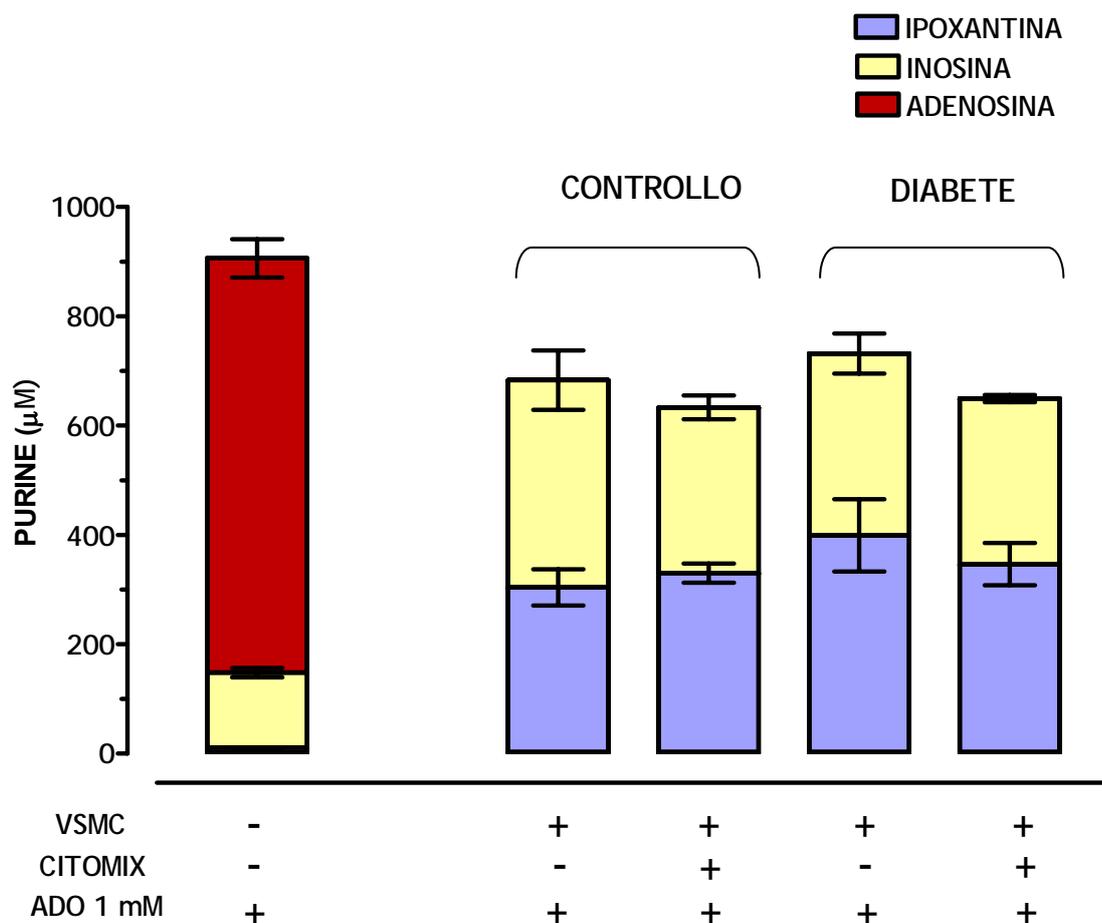


Figura 9. Livelli di adenosina nel terreno di coltura privo di cellule e influenza delle citochine sull'eliminazione di adenosina nel medium di VSMC controllo e diabetiche. Negli esperimenti condotti in assenza di cellule l'adenosina 1 mM è stata aggiunta al terreno per 24 h; in quelli condotti in presenza di cellule, la purina è stata introdotta nel medium di incubazione in assenza o in presenza di citochine. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 3-4 esperimenti.

CELLULE	TRATTAMENTO	INO/IPOX	ADO/INO
Senza cellule	ADO	12.41 ± 1.94	5.57 ± 0.22
Controllo	ADO	1.26 ± 0.19	0
Controllo	CITOMIX + ADO	0.93 ± 0.11	0
Diabetiche	ADO	0.96 ± 0.19	0
Diabetiche	CITOMIX + ADO	1.01 ± 0.26	0

Tabella 3. Rapporto tra adenosina e suoi metaboliti nel medium delle cellule muscolari lisce vascolari. I dati sono espressi come media ± SEM dei risultati ottenuti da 3-4 esperimenti.

Incubando le cellule muscolari lisce vascolari di ratti normoglicemici e diabetici con adenosina 1 mM e NBTI (10 µM), si è visto che dopo 24 h l'inibitore degli ENT permette il recupero di parte dell'adenosina inizialmente introdotta nel medium: la quantità recuperata è pari al 44% e 32%, rispettivamente nelle VSMC controllo e diabetiche. NBTI è in grado dunque di ridurre la conversione del nucleoside nei suoi metaboliti, riducendo significativamente le quantità di inosina ed ipoxantina recuperate nel medium (Figura 10A). Il rapporto inosina/ipoxantina nelle cellule diabetiche non varia significativamente in presenza di NBTI (Figura 10B).

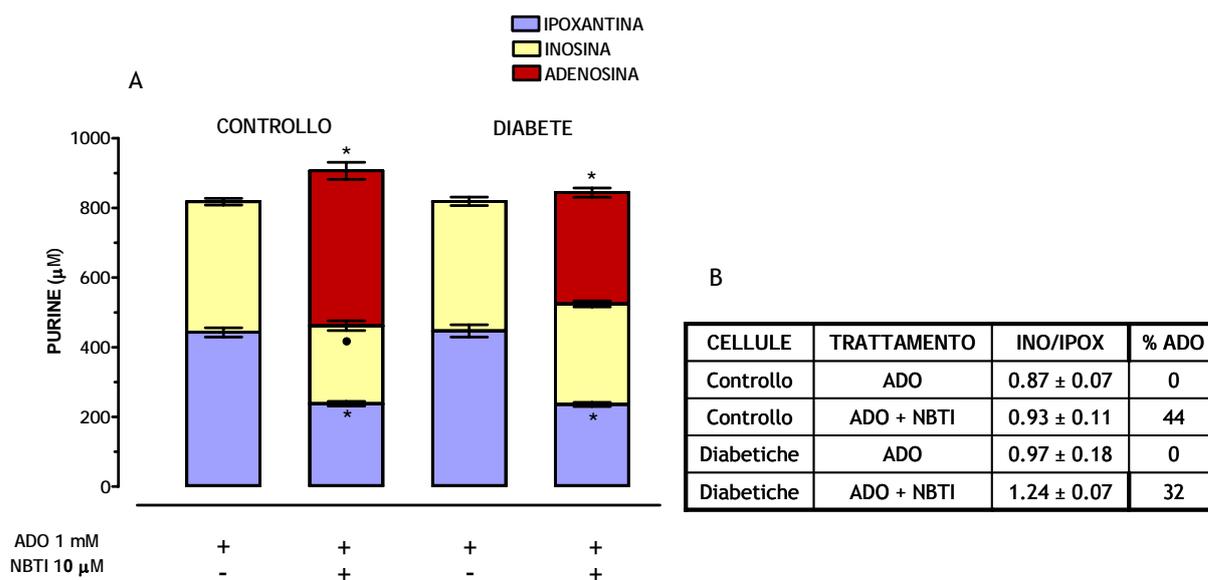


Figura 10. Influenza di NBTI sui livelli di adenosina e dei suoi metaboliti (inosina ed ipoxantina) nel medium di incubazione di VSMC di ratti controllo e diabetici (A) e rapporto tra i metaboliti (B). Le cellule sono state esposte ad adenosina (1 mM) per 24 h in assenza o in presenza di NBTI (10 µM) aggiunto al medium 30 minuti prima dell'adenosina. I dati sono espressi come media ± SEM dei risultati ottenuti da 6 (cellule controllo) e 10 (cellule diabetiche) esperimenti. * = p < 0.001 vs ADO; ● = p < 0.05 vs ADO.

È stata valutata successivamente l'influenza del trattamento con EHNA 1 μM sul recupero di adenosina nel medium di incubazione evidenziando che nelle cellule esposte ad adenosina più EHNA, l'inibitore dell'ADA permette il recupero del 26% della quantità di purina impiegata per l'esperimento nel medium delle cellule controllo e il 21% nel medium delle cellule diabetiche (Figura 11A).

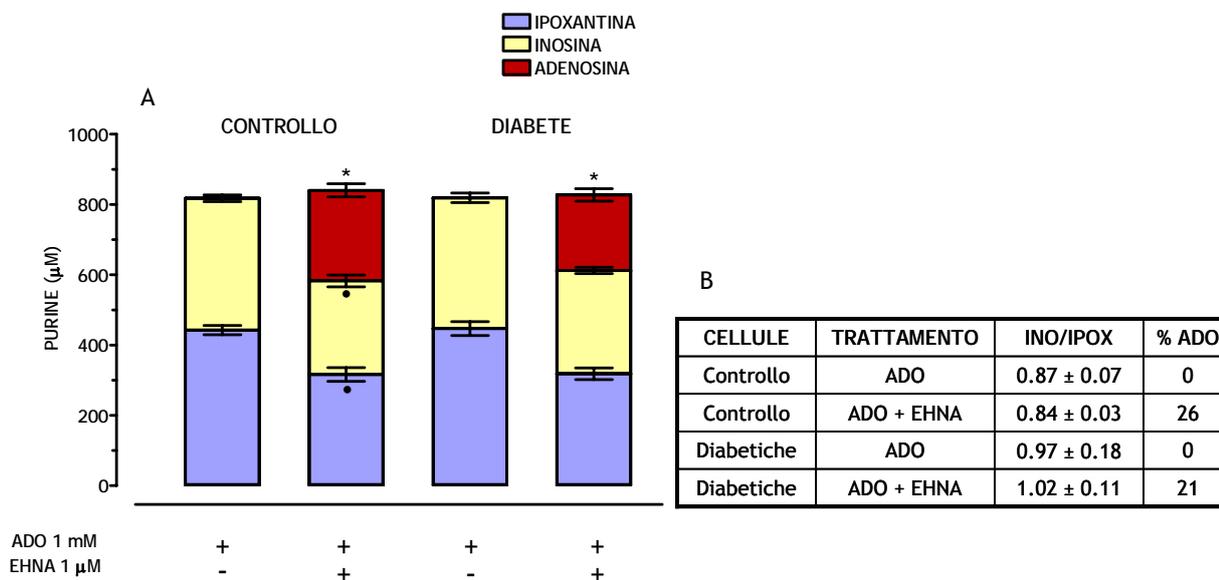


Figura 11. Influenza di EHNA sui livelli di adenosina e dei suoi metaboliti (inosina ed ipoxantina) nel medium di incubazione di VSMC di ratti controllo e diabetici (A) e rapporto inosina/ipoxantina (B). Le cellule sono state esposte ad adenosina (1 mM) per 24 h in assenza o in presenza di EHNA (1 μM) aggiunto al medium 30 minuti prima dell'adenosina. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 6 (cellule controllo) e 8 (cellule diabetiche) esperimenti. * = $p < 0.001$ vs ADO; • = $p < 0.05$ vs ADO.

Inosina e ipoxantina in presenza di EHNA vengono recuperate in quantità significativamente minore rispetto al trattamento con sola adenosina nel medium delle cellule di ratti normoglicemici, tuttavia non si evidenziano variazioni rilevanti nel rapporto tra i due metaboliti. Nel medium delle cellule diabetiche trattate con l'inibitore il recupero di inosina e ipoxantina non è significativamente diverso da quello ottenuto dall'incubazione in assenza dell'inibitore (Figura 11B).

5. AMP ed inosina nel medium di incubazione delle cellule muscolari lisce vascolari

Dopo 24 h di incubazione con AMP 1 mM, il composto non è rilevabile nel medium delle VSMC di ratti controllo e diabetici. Analogamente l'adenosina, prodotto di degradazione dell'AMP, non è rilevabile: il nucleoside viene convertito in inosina e successivamente in ipoxantina, che si accumulano in misura simile nel medium delle VSMC controllo e diabetiche (Figura 12).

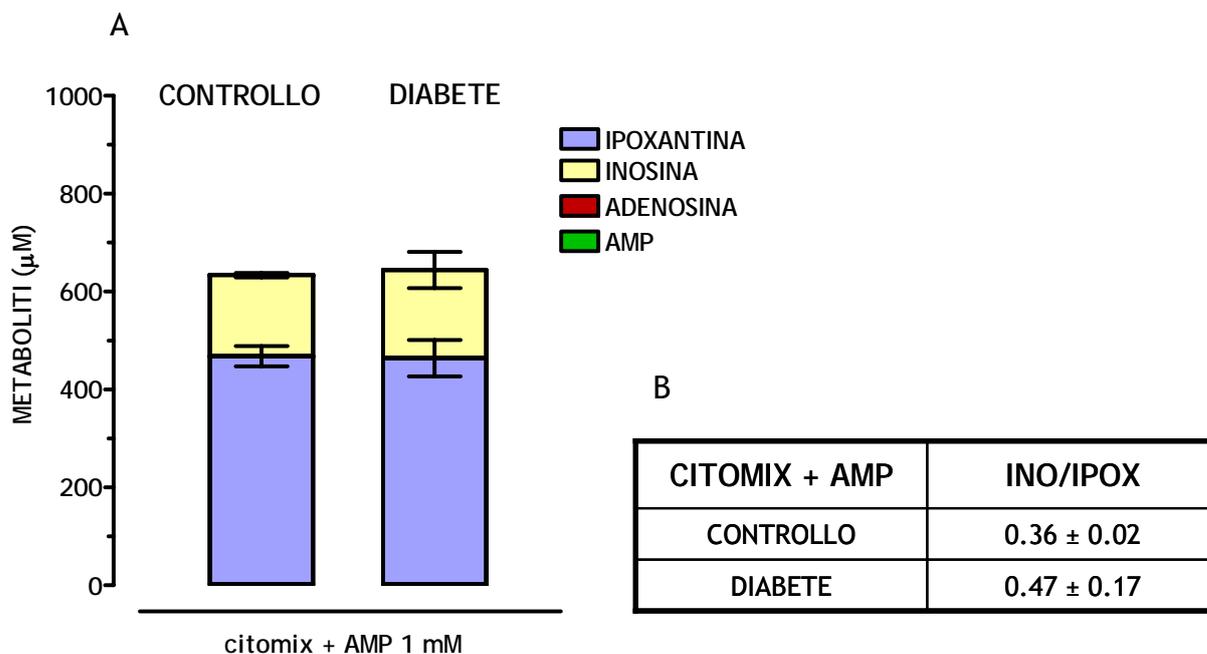


Figura 12. Eliminazione dell'AMP esogeno (1mM) nel medium di incubazione di VSMC di ratti controllo e diabetici (A) e rapporto inosina/ipoxantina (B). I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 4 (cellule controllo) e 7 (cellule diabetiche) esperimenti.

Come per l'adenosina, sono stati condotti esperimenti con AMP 1 mM aggiunto al terreno di coltura per 24 h, in assenza di cellule, in modo da valutare l'entità della degradazione spontanea del nucleotide (Figura 13). Al termine dell'incubazione la maggior parte dell'AMP è recuperato nel terreno di coltura, mentre adenosina e inosina si accumulano in minime quantità (per il 5 e 4% rispettivamente). Il rapporto AMP/ADO è pari a 22.5, indicando che dopo 24 h la maggior parte del nucleotide esogeno non subisce degradazione (Tabella 4).

È stata poi valutata l'influenza delle citochine sull'eliminazione di AMP esogeno da parte delle cellule muscolari lisce vascolari controllo e diabetiche. Per questo una parte delle cellule è stata stimolata con AMP da solo e una parte con citomix e AMP. Lo stimolo con LPS più citochine non causa variazioni significative nel recupero di inosina ed ipoxantina nel medium delle VSMC di ratti normoglicemici e diabetici, rispetto alle cellule esposte ad AMP da solo (Figura 13). Il rapporto tra le quantità di inosina ed ipoxantina recuperate è circa la metà nel medium delle cellule diabetiche stimolate con citomix e AMP rispetto a quello misurato nel medium delle cellule trattate con solo AMP (Tabella 4).

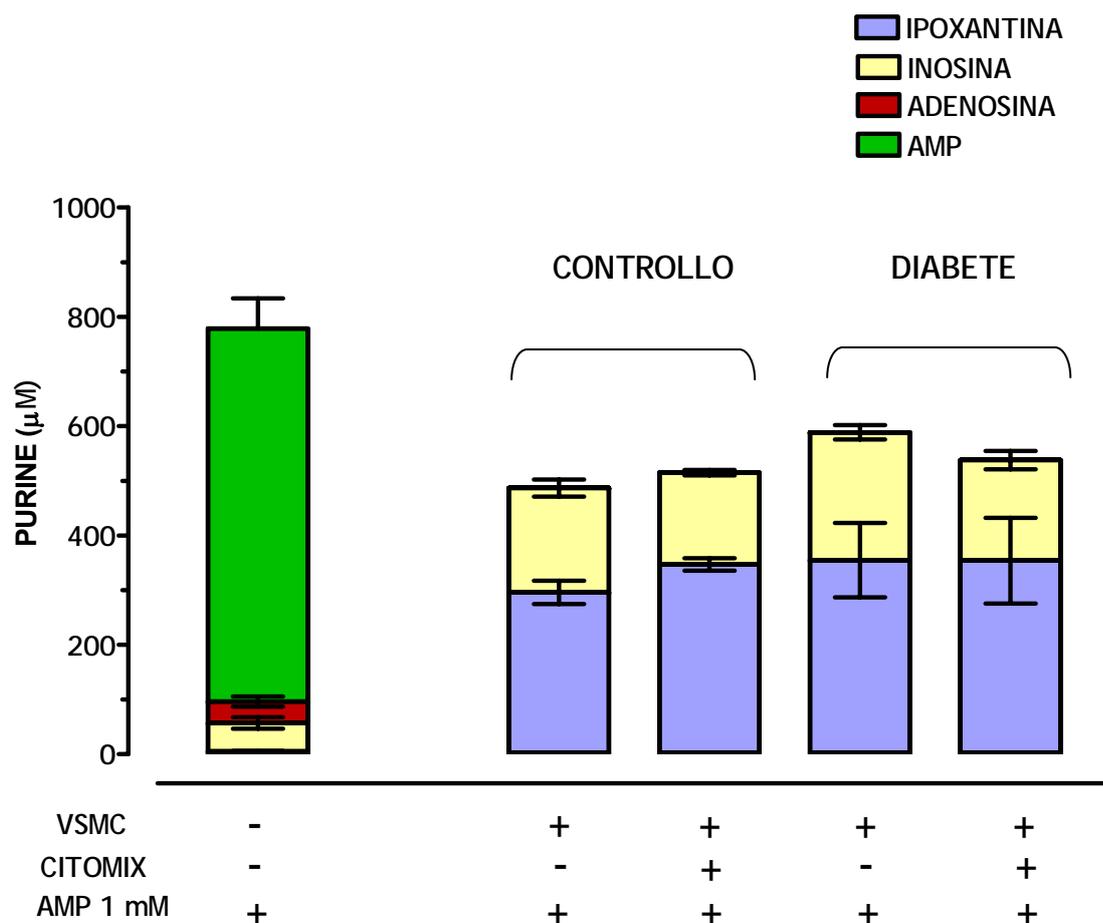


Figura 13. Livelli di AMP nel terreno di coltura privo di cellule e influenza delle citochine sull'eliminazione di AMP nel medium di VSMC controllo e diabetiche. L'AMP 1 mM è stato aggiunto al medium di coltura per 24 h di incubazione in assenza o in presenza di cellule e in quest'ultimo caso in assenza o in presenza di citomix. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 3-4 esperimenti.

CELLULE	TRATTAMENTO	INO/IPOX	ADO/INO	AMP/ADO
Senza cellule	AMP	17.53 \pm 8.97	0.72 \pm 0.09	22.48 \pm 6.33
Controllo	AMP	0.69 \pm 0.03	0	0
Controllo	CITOMIX + AMP	0.48 \pm 0.02	0	0
Diabetiche	AMP	0.89 \pm 0.29	0	0
Diabetiche	CITOMIX + AMP	0.45 \pm 0.07	0	0

Tabella 4. Rapporto tra AMP e suoi metaboliti nel medium delle cellule muscolari lisce vascolari. I dati sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da 3-4 esperimenti.

Inibendo l'enzima CD73 con AOPCP, la concentrazione di AMP recuperata nel medium di incubazione delle cellule di ratti normoglicemici è pari al 47% dell'AMP esogeno impiegato; le concentrazioni di inosina e di ipoxantina recuperate nel medium diminuiscono significativamente dopo trattamento con l'inibitore. Esponendo le cellule di ratti diabetici ad AOPCP, la concentrazione di AMP recuperata nel mezzo di incubazione è solo il 5% di quella introdotta, ad indicare una probabile variazione dell'attività dell'enzima CD73 associata al diabete (Figura 14A). Nel medium delle cellule di ratti normoglicemici trattate con AOPCP il rapporto tra inosina e ipoxantina tende a diminuire rispetto a quello misurato nel medium delle cellule trattate con solo AMP; tale rapporto risulta invece incrementato nel medium delle cellule diabetiche incubate con l'inibitore (Figura 14B).

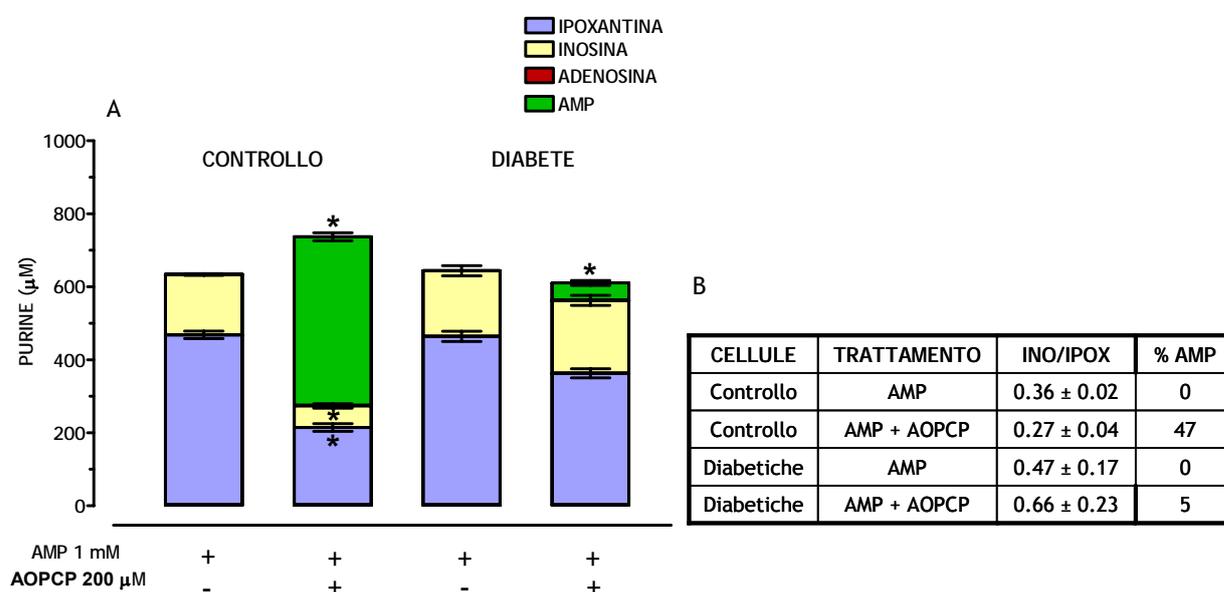


Figura 14. Influenza del trattamento con AOPCP sui livelli di AMP e dei suoi metaboliti (adenosina, inosina ed ipoxantina) nel medium di incubazione di VSMC di ratti controllo e diabetici (A) e rapporto inosina/ipoxantina (B). Le cellule sono state esposte ad AMP (1 mM) per 24h in assenza o in presenza di AOPCP (1 µM) aggiunto al medium 30 minuti prima dell'AMP. I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 4 (cellule controllo) e 7 (cellule diabetiche) esperimenti. * = $p < 0.001$ vs AMP.

È stata anche valutata l'eliminazione dell'inosina esogena: il nucleoside è stato aggiunto al medium delle cellule muscolari lisce vascolari controllo e diabetiche in concentrazione 1 mM. Dopo 24 h la quantità di purina recuperata nel medium, così come l'accumulo di ipoxantina, è quantitativamente paragonabile alle quantità ottenute esponendo le cellule ad adenosina esogena nella stessa concentrazione (1 mM) (Figura 15A).

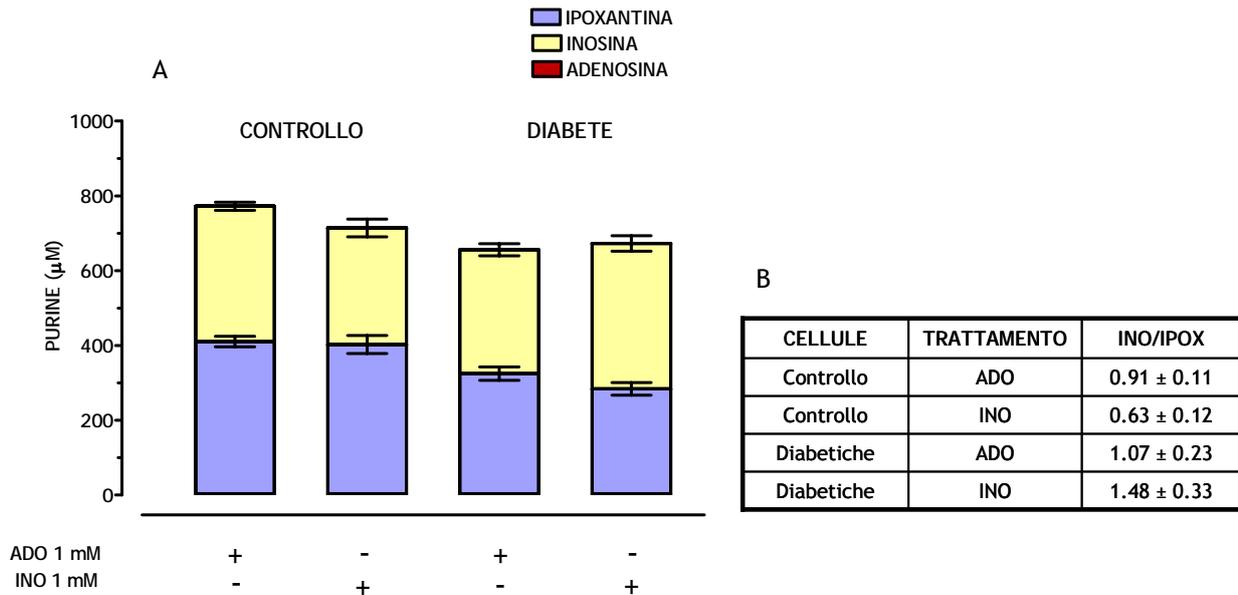


Figura 15. Eliminazione di adenosina esogena (1 mM) e di inosina esogena (1 mM) dal medium di incubazione di VSMC di ratti controllo e diabetici (A) e rapporto inosina/ipoxantina (B). I dati sono espressi come media±SEM dei risultati ottenuti da 6 (cellule controllo) e 4 (cellule diabetiche) esperimenti.

Nelle cellule di ratti diabetici trattate con adenosina ed inosina si evidenzia, rispetto alle cellule controllo, un recupero maggiore di inosina, con una contemporanea diminuzione della concentrazione di ipoxantina e un aumento del rapporto inosina/ipoxantina.

DISCUSSIONE

La patologia diabetica è associata allo sviluppo di danni a livello vascolare che portano ad infarto del miocardio, ictus, insufficienza cardiaca, ipertensione ed aterosclerosi.

I nucleotidi e nucleosidi purinici, una volta raggiunto lo spazio extracellulare, sono in grado di controllare diversi processi implicati nell'infiammazione vascolare. In particolare è noto che l'adenosina, interagendo con i recettori A_2 , inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari e attenua la risposta infiammatoria, manifestando così la sua funzione protettiva nei tessuti danneggiati (Dubey *et al.*, 1998 A; St. Hilaire *et al.*, 2008) in parte anche attraverso la produzione di NO a livello della parete dei vasi. Una ridotta produzione di adenosina o un aumentato catabolismo della purina può contribuire ad una minore produzione di NO e questo può essere associato a fenomeni di rimodellamento vascolare osservati in caso di ipertensione e aterosclerosi (Ikeda *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1998 A; Dubey *et al.*, 1998 B). Considerando quindi il ruolo dell'adenosina a livello vascolare e tenendo presente che l'attivazione di iNOS da parte delle citochine è coinvolta nella disfunzione vascolare diabetica, in questo lavoro ho indagato il potenziale ruolo dell'adenosina in tale processo. Le cellule di ratti normoglicemici e diabetici sono state incubate con LPS e una miscela di citochine (IL-1 β , TNF- α e INF- γ): gli agenti proinfiammatori utilizzati hanno il ruolo di mimare le condizioni che si riscontrano in vivo in stati di infiammazione, inducendo l'espressione della proteina iNOS che non è misurabile in condizioni basali (Hecker *et al.*, 1999; Cignarella *et al.*, 2006). La concentrazione di adenosina esogena utilizzata per condurre gli esperimenti è pari a 1 mM in quanto è stato dimostrato che concentrazioni minori del nucleoside (10 μ M e 100 μ M) sono inefficaci. In queste condizioni, l'adenosina esogena non modifica l'effetto delle citochine nelle VSMC controllo, mentre nelle cellule di ratti diabetici la purina induce un aumento significativo dei livelli di iNOS (Malorgio, 2010). Nagareddy *et al.* (2009) hanno dimostrato un incremento dell'espressione di iNOS nel tessuto cardiaco e muscolare di ratti resi diabetici con streptozotocina. Anche il trattamento delle VSMC con adenosina associata a NBTI, inibitore dei trasportatori equilibrativi, non modifica l'espressione della proteina nelle cellule controllo; anche nelle cellule di ratti diabetici l'inibitore non modifica l'effetto del nucleoside sulla iNOS, che è invece aumentato da EHNA, inibitore dell'ADA. Questo potrebbe indicare una diminuzione dell'attività dell'enzima ADA nelle cellule di ratti diabetici, con conseguente accumulo di adenosina e quindi aumentata espressione di iNOS nelle VSMC. Uno studio di Bottini *et al.* (2004) ha indicato una diminuzione generalizzata dell'attività dell'ADA nei soggetti diabetici. Anche i risultati ottenuti da Singh (1998) e Kurtul (2004) concordano sulla riduzione dell'attività dell'enzima. Uluoglu e colleghi (2008) hanno inoltre dimostrato che a livello epatico, nei soggetti diabetici, l'attività dell'ADA diminuisce in risposta ad elevate concentrazioni di adenosina. Nel medium delle VSMC controllo e diabetiche trattate con adenosina esogena per 24 h, il nucleoside non è più rilevabile, ma si evidenzia un aumento della concentrazione dei suoi prodotti di degradazione, inosina ed

ipoxantina e la quantità di questi metaboliti non è significativamente diversa da quella misurata in assenza del citomix. Inoltre, la scomparsa dell'adenosina dal medium di incubazione non è dovuta ad una degradazione spontanea del nucleoside: in assenza di cellule, infatti, dopo 24 h solo il 14% dell'adenosina aggiunta si degrada in inosina.

Con la scomparsa dell'adenosina non si evidenzia un incremento dei livelli di AMP e questo porta ad escludere un coinvolgimento dell'enzima adenosina chinasi (AK) nell'eliminazione dell'adenosina dal mezzo di incubazione delle VSMC. L'attività di questo gruppo di ecto-chinasi, deputato alla fosforilazione dell'adenosina fino a formare ATP, è stata invece dimostrata nelle HUVEC in uno studio condotto da Yegutkin e collaboratori (2001). Per di più non si sono ottenute variazioni significative dei livelli di IMP, suggerendo che l'ecto-AMP deaminasi non sia presente nelle VSMC, in accordo con i risultati ottenuti da Podgorska *et al.* (2006) in studi condotti su miociti cardiaci di ratto.

Hanskò e colleghi (2004) hanno dimostrato che l'inosina è un potente agente antinfiammatorio che agisce attenuando la produzione di mediatori pro-infiammatori. Il nucleoside, inoltre, è in grado di legarsi ai recettori A_3 per l'adenosina, manifestando così la sua azione cardioprotettiva (Hanskò *et al.*, 2004). Recenti lavori in letteratura propongono inoltre l'inosina e soprattutto i suoi analoghi resistenti al metabolismo in ipoxantina come agenti antinfiammatori con effetti protettivi in modelli animali trattati con streptozotocina, in quanto riducono la produzione di citochine proinfiammatorie (Mabley *et al.*, 2008; Kumar e Sharma, 2009). D'altra parte negli esperimenti qui riportati l'inosina esogena non ha nessun effetto sull'espressione di iNOS. Questo risultato porta a concludere che l'aumentata espressione della proteina nelle cellule di ratti diabetici è dovuta all'adenosina di per sé e non alla formazione del suo metabolita. Nel medium delle VSMC di ratti normoglicemici e diabetici esposte ad inosina esogena, la quantità di inosina recuperata, così come l'accumulo di ipoxantina, è quantitativamente paragonabile alle quantità ottenute esponendo le cellule ad adenosina.

Il trattamento delle VSMC con adenosina più NBTI, permette un recupero, nel medium di incubazione delle VSMC controllo, pari quasi alla metà dell'adenosina aggiunta. Diversi lavori presenti in letteratura dimostrano che l'adenosina viene trasportata all'interno delle cellule preferenzialmente mediante i trasportatori equilibrativi (Dunwiddie e Masino, 2001). In presenza di NBTI il recupero della purina risulta maggiore nel medium delle cellule controllo rispetto alle diabetiche, suggerendo delle differenze nel contributo dei trasportatori equilibrativi alla rimozione del nucleoside. La variazione dell'espressione degli ENT nelle VSMC diabetiche di aorta umana è stata documentata da Leung e colleghi (2005), i quali hanno dimostrato che l'iperglicemia, condizione che si riscontra nel diabete, causa una sovraespressione dei trasportatori (Leung *et al.*, 2005). D'altra parte Fariás e coll. (2006) hanno dimostrato che il trasporto dell'adenosina mediato dagli ENT nelle HUVEC di donne con diabete gestazionale è ridotto, e questo sembra essere collegato ad un aumento di NO a livello cellulare.

L'incubazione con NBTI ha causato una diminuzione nel recupero di inosina ed ipoxantina e il rapporto tra i due metaboliti è più elevato nel medium delle VSMC di ratti diabetici. Nel medium delle VSMC sia controllo che diabetiche EHNA permette il recupero di parte dell'adenosina, riducendo l'accumulo di inosina e di ipoxantina, senza variazioni nel rapporto tra i due metaboliti. Nonostante la concentrazione del nucleoside recuperata a livello extracellulare sia simile fra le VSMC controllo e diabetiche, l'espressione della proteina iNOS è aumentata solo nelle cellule diabetiche.

Il trattamento delle VSMC con AMP non determina variazioni dell'espressione della proteina iNOS nelle cellule controllo ma, in linea con i risultati ottenuti per l'adenosina, il nucleotide causa un aumento significativo dell'espressione della proteina nelle cellule diabetiche. Quindi, l'effetto dell'adenosina sembra essere mimato dal suo precursore AMP. Però l'aggiunta di AOPCP, inibitore della ecto-5'-nucleotidasi/CD73, nel medium delle cellule diabetiche esposte ad AMP non modifica significativamente l'espressione della proteina rispetto al trattamento con solo AMP. Uno studio condotto da Podgorska e colleghi (2006) ha dimostrato che nei miociti cardiaci l'attività della 5'-nucleotidasi si concentra per il 95% a livello della membrana plasmatica e aumenta nelle cellule diabetiche, mentre l'attività dell'enzima nel citosol non è modificata dopo induzione della malattia. Nel presente studio, dopo 24 h di incubazione il nucleotide non è rilevabile nel medium delle VSMC controllo e diabetiche, ad indicare l'esistenza di una eliminazione extracellulare per la purina, probabilmente mediata da enzimi degradativi di membrana. Numerosi studi dimostrano che nelle VSMC l'AMP presenta un metabolismo attivo e viene defosforilato ad adenosina dalla CD73 (Mattig e Deussen, 2001; Tamajusuku *et al.*, 2006). Tuttavia, l'adenosina non è presente nel medium, dato che il nucleoside viene convertito in inosina e successivamente in ipoxantina, che si accumulano in misura simile nelle VSMC controllo e diabetiche. Anche nella serie di esperimenti che non prevedono l'incubazione delle VSMC con la miscela di citochine, l'AMP scompare dal compartimento extracellulare dopo 24 h con l'accumulo di inosina ed ipoxantina, senza differenze significative nel loro recupero rispetto alle VSMC trattate con citomix e AMP. Questo esclude un coinvolgimento delle citochine nell'eliminazione dell'AMP esogeno. In contrasto con questo risultato, un recente studio evidenzia un'aumentata espressione di CD73 dopo incubazione delle cellule HUVEC con LPS e citochine; questo si traduce in una maggiore produzione di adenosina con effetto antinfiammatorio e di protezione verso i tessuti danneggiati (Li *et al.*, 2008). L'AOPCP permette il recupero di AMP nel medium delle cellule controllo, prevenendo l'accumulo di inosina e di ipoxantina nello spazio extracellulare. Gli stessi effetti si evidenziano anche nelle cellule diabetiche, ma in tal caso la concentrazione di AMP recuperata è enormemente minore rispetto alle VSMC controllo. Questo risultato indica un'alterata attività dell'enzima CD73 associata alla patologia diabetica, in accordo con studi precedenti (Leung *et al.*, 2005). Zerneck e colleghi (2006) hanno inoltre dimostrato che sia l'espressione, sia l'attività dell'enzima CD73 sono sovraregolati in caso di danni alle arterie, e questo è visto come un meccanismo protettivo per

aumentare la produzione di adenosina a livello extracellulare. Il diabete, pertanto, altera la sensibilità della CD73 all'inibizione farmacologica da parte di AOPCP.

Incubando le VSMC di ratti sani e diabetici con solo NBTI o solo AOPCP, non si riscontrano modificazioni nell'espressione di iNOS rispetto allo stimolo con citomix. Anche dopo esposizione ad EHNA l'espressione della proteina non è alterata nelle cellule diabetiche, ma nelle VSMC di ratti normoglicemici il trattamento causa una diminuzione significativa dell'espressione di iNOS. Si potrebbe concludere che l'adenosina deaminasi rappresenta la principale via di eliminazione del nucleoside nelle cellule controllo. Recentemente Assaife-Lopez e colleghi (2009) hanno dimostrato che la deaminazione dell'adenosina in inosina rappresenta la principale via di eliminazione per il nucleoside anche a livello della membrana basolaterale del tubulo prossimale. Si può concludere che a concentrazioni elevate l'adenosina non ha effetto protettivo, in quanto stimola la produzione di iNOS, con possibile formazione di NO in quantità dannose per la cellula (Loscalzo e Welsh, 1995; Nagarredy *et al.*, 2009). L'NO in eccesso è infatti tossico per il sistema cardiovascolare, causa ipotensione, vasodilatazione grave, depressione cardiaca e disfunzioni multiple agli organi (Nagarredy *et al.*, 2009).

I risultati ottenuti dimostrano quindi che il diabete rende le VSMC più sensibili al potenziale effetto proinfiammatorio di elevate concentrazioni di adenosina in termini di espressione della proteina iNOS, e che alterazioni a livello delle vie di eliminazione e formazione dell'adenosina sono una componente della disfunzione vascolare diabetica.

BIBLIOGRAFIA

- Abbracchio M.P., Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese Journal of Pharmacology*. 78: 113-145. (1998)
- Assaife-Lopes N., Wengert M., Pinheiro A.A., Landgraf S.S., Paes-de-Carvalho R., Leão-Ferreira L.R., Caruso-Neves C. Adenosine deamination to inosine in isolated basolateral membrane from kidney proximal tubule: implications for modulation of the membrane-associated protein kinase A. *Archives of biochemistry and biophysics*. 486: 44-50. (2009)
- Awad A.S., Huang L., Ye H., Duong E.T., Bolton W.K., Linden J., Okusa M.D. Adenosine A_{2A} receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*. 290: F828-37. (2006)
- 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)
- Barrett-Connor E. Is insulin-dependent diabetes mellitus caused by coxsackie virus B infection? A review of epidemiologic evidence. *Reviews of Infectious Diseases*. 7: 207-215. (1985)
- Borowiec A., Lechward K., Tkacz-Stachowska K. and Skladanowski A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica* 53: 269-278. (2006)
- Bottini N., Gloria-Bottini F., Borgiani P., Antonacci E., Lucarelli P., Bottini E. Type 2 diabetes and the genetics of signal transduction: a study of interaction between adenosine deaminase and acid phosphatase locus 1 polymorphisms. *Metabolism: clinical and experimental*. 53: 995-1001. (2004)
- Buffon A., Wink M.R., Ribeiro B.V., Casali E.A., Libermann T.A., Zerbini L.F., Robson S.C., Sarkis J.J. NTPDase and 5' ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1770:1259-1265. (2007)
- Burnstock G. Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells. *Pharmacological Reports*. 60: 12-20. (2008)
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*. 87: 659-797. (2007)
- Calligaro G. Metabolismo di nucleotidi e nucleosidi adeninici in vitro nell'ileo di ratto. *Tesi di dottorato*. (2009)
- Cattabeni F., Abbracchio M.P. Trasmissione purinergica, 293-302. Tratto da: *Farmacologia Generale e Molecolare*. Ed. UTET. (1996)
- Centelles J.J., Cascante M., Canela E.I., Franco R. A model for adenosine transport and metabolism. *The Biochemical Journal*. 15: 461-472. (1992)
- Centelles J.J., Franco R. Is adenosine deaminase involved in adenosine transport? *Medical Hypotheses*. 33: 245-250. (1990)

- Cerbone A.M., Macarone-Palmieri N., Saldalamacchia G., Di Minno G., Rivellesse A.A. Diabete e complicanze vascolari: dal rischio trombotico alla resistenza all'aspirina. *Giornale Italiano di Diabetologia e metabolismo*. 26: 78-86. (2006)
- Childs K.F., Ning X.H., Bolling F. Simultaneous detection of nucleotides, nucleosides and oxidative metabolites in myocardial biopsies. *Journal of Chromatography*. B 678: 181-186. (1996)
- Cho H.J., Xie Q.W., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 176: 599-604. (1992)
- Cignarella A., Minici C., Bolego C., Pinna C., Sanvito P., Gaion R.M., Puglisi L. Potential pro-inflammatory action of resveratrol in vascular smooth muscle cells from normal and diabetic rats. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*. 16: 322-329. (2006)
- 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)
- Deussen A., Weichsel J., Pexa A. Features of adenosine metabolism of mouse heart. *Purinergic Signalling*. 2:663-668. (2006)
- Drew B.G., Kingwell B.A. Acadesine, an adenosine-regulating agent with the potential for widespread indications. *European Journal of Pharmacology*. 611: 53-59. (2009)
- Dubey R.K., Gillespie D.G., Jackson E.K. Cyclic AMP-Adenosine pathway induces nitric oxide synthesis in aortic smooth muscle cells. *Hypertension*. 31: 296-302. (1998 A)
- Dubey R.K., Gillespie D.G., Mi Z., Jackson E.K. Adenosine inhibits growth of human aortic smooth muscle cells via A2b receptors. *Hypertension*. 31: 516-521. (1998 B)
- Dubey R.K., Gillespie D.G., Mi Z., Jackson E.K. Dysregulation of extracellular adenosine levels by vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 21: 249-254. (2001)
- Dunwiddie T.V., 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)
- Eltzschig H.K. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology*. 111:904-915. Review. (2009)
- Fariás M., San Martín R., Puebla C., Pearson J.D., Casado J.F., Pastor-Anglada M., Casanello P., Sobrevia L. Nitric oxide reduces adenosine transporter ENT1 gene (SLC29A1) promoter activity in human fetal endothelium from gestational diabetes. *Journal of cellular physiology*. 208: 451-460. (2006)

- 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)
- Galea E., Feinstein D.L. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *The FASEB Journal*. 13: 2125-2137. Review. (1999)
- Gray J.H., Owen R.P., Giacomini K.M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *European Journal of Physiology*. 447: 728-734. (2004)
- Grdeń M., Podgórska M., Szutowicz A., Pawelczyk T. Altered expression of adenosine receptors in heart of diabetic rat. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 56: 587-597. (2005)
- 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., Köhler D., Kloor D., Mittelbronn M., Gorzolla I.C., Stahl G.L., Eltzhig H.K. Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*. 22:2784-2797. (2008)
- Haskò G., Cronstein B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in immunology*. 25: 33-39. (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)
- Haskó G., Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of Leukocyte Biology*. 83: 447-455. (2008)
- Haskó G., Sitkovsky M.V., Szabó C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends in pharmacological sciences*. 25: 152-157. (2004)
- Hecker M., Cattaruzza M., Wagner A.H. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *General pharmacology*. 32: 9-16. (1999)
- Hunsucker S.A., Mitchell B.S., Spychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics*. 107: 1-30. (2005)
- Ikeda U., Kurosaki K., Ohya K., Shimada K. Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. 35: 168-174. (1997)
- Junod A., Lambert A.E., Orci L., Pictet R., Gonet A.E., Renold A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 126: 201-205. (1967)
- 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)
- Knowles R.G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*. 298: 249-258. (1995)
- Kumar V., Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European Journal of Pharmacology*. 616: 7-15. (2009)

- Kurtul N., Pence S., Akarsu E., Kocoglu H., Aksoy Y., Aksoy H. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 47: 33-35. (2004)
- Leung G.P., Man R.Y., Tse C.M. D-Glucose upregulates adenosine transport in cultured human aortic smooth muscle cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 288: 2756-2762. (2005)
- Li R.W.S., Man R.Y.K., Vanhoutte P.M., Leung G.P.H. Stimulation of ecto-5'-nucleotidase in human umbilical vein endothelial cells by lipopolysaccharide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 295: H1177-H1181. (2008)
- Löffler M., Morote-Garcia J.C., Eltzschig S.A., Coe I.R., Eltzschig H.K. Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27: 1004-1013. Review. (2007)
- Loscalzo J., Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progress in cardiovascular diseases*. 38: 87-104. (1995)
- Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*. 120: 227-37. (1994)
- 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. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 32: 1455-1461. (2004)
- Mabley J.G., Pacher P., Murthy K.G., Williams W., Southan G.J., Salzman A.L., Szabo C. The novel inosine analogue, INO-2002, protects against diabetes development in multiple low-dose streptozotocin and non-obese diabetic mouse models of type I diabetes. *The journal of Endocrinology*. 198: 581-589. (2008)
- Malorgio F. Alterations of iNOS expression and adenosine metabolism in vascular smooth muscle cells from diabetic rats. XIV SEMINARIO NAZIONALE PER DOTTORANDI IN FARMACOLOGIA E SCIENZE AFFINI. Siena, Certosa di Pontignano 20 - 23 settembre 2010.
- Mattig S., Deussen A. Significance of adenosine metabolism of coronary smooth muscle cells. *American Journal of Physiology, Heart and circulatory physiology*. 280: H117-H124. (2001)
- Moncada S. and Higgs A. The L-arginine/nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*. 329: 2002-2012. (1993)
- Mubagwa K., Mullane K., Flameng W. Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovascular Research*. 32:797-813. (1996)
- Muñoz G., San Martín R., Fariás M., Cea L., Vecchiola A., Casanello P., Sobrevia L. Insulin restores glucose inhibition of adenosine transport by increasing the expression and activity of the equilibrative nucleoside transporter 2 in human umbilical vein endothelium. *Journal of Cellular Physiology*. 209: 826-35. (2006)

- Nagareddy P.R., McNeill J.H., MacLeod K.M. Chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cardiovascular abnormalities in streptozotocin diabetic rats. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 9: 2137-2144. (2009)
- Németh Z.H., Bleich D., Csóka B., Pacher P., Mabley J.G., Himer L., Vizi E.S., Deitch E.A., Szabó C., Cronstein B.N., Haskó G. Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *The FASEB Journal*. 21: 2379-2388. (2007)
- Palmer R.M.J. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Archives of Surgery*. 128: 396-401. (1993)
- Panza J.A., Quyyumi A.A., Brush J.E., Epstein S.E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 323: 22-27. (1990)
- 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)
- Podgórska M., Kocbuch K., Grden M., Szutowicz A., Pawelczyk T. Prevalence of unidirectional Na⁺-dependent adenosine transport and altered potential for adenosine generation in diabetic cardiac myocytes. *Basic Research in Cardiology*. 101: 214-222. (2006)
- Podgórska 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)
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K. Altri mediatori periferici: 5-idrossitriptamina e purine. In: *Farmacologia*. Terza edizione, Casa Editrice Ambrosiana. (2005)
- Rose J.B., Naydenova Z., Bang A., Eguchi M., Sweeney G., Choi D.S., Hammond J.R., Coe I.R. Equilibrative nucleoside transporter 1 plays an essential role in cardioprotection. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 298:H771-H777. (2010)
- Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibres. *The Journal of Cell Biology*. 50: 172-188. (1971)
- Rücker B., Abreu-Vieira G., Bischoff L.B., Harthmann A.D., Sarkis J.J., Wink M.R., Casali E.A. The nucleotide hydrolysis is altered in blood serum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Archives of physiology and biochemistry*. 116: 79-87. (2010)
- Singh L.S., Sharma R. Alloxan diabetes regulates adenosine deaminase activity in mice: tissue- and age-specific correlation. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 46: 55-61. (1998)
- 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)
- 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)

- St-Hilaire C., Yang D., Schreiber B.M., Ravid K. B-Myb regulates the A_{2B} adenosine receptor in vascular smooth muscle cells. *Journal of cellular biochemistry*. 103: 1962-1974. (2008)
- Tager H. Abnormal products of the human insulin gene. *Diabetes*. 33: 893-899. (1984)
- Tamajusuku A.S., Carrillo-Sepúlveda M.A., Braganhol E., Wink M.R., Sarkis J.J., Barreto-Chaves M.L., Battastini A.M. Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 289: 65-72. (2006)
- Thompson L.F., Eltzschig H.K., Ibla J.C., Van De Wiele C.J., Resta R., Morote-Garcia J.C., Colgan S.P. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *The journal of Experimental Medicine*. 200:1395-1405. (2004)
- Thorn J.A., Jarvis S.M. Adenosine transporters. *General Pharmacology*. 27: 613-620. (1996)
- Uluoglu C., Cimen B., Ozbey G., Karasu C., Durakoglugil D.B., Gunes A., Turkozkan N., Zengil H. The effect of experimental diabetes on the circadian pattern of adenosine deaminase and myeloperoxidase activities in rat liver. *General Physiology and Biophysics*. 27: 25-31. (2008)
- Vane J., Änggård E.E., Botting R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England Journal of Medicine*. 323: 27-36. (1990)
- Wei M., Ong L., Smith M.T., Ross F.B., Schmid K., Hoey A.J., Burstow D., Brown L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung & Circulation*. 12: 44-50. (2003)
- Woods C.M., Toouli J., Saccone G.T.P. A_{2a} and A₃ receptors mediate the adenosine-induced relaxation in spontaneously active possum duodenum *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*. 138: 1333-1339. (2003)
- Yegutkin G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1783: 673-694. (2008)
- Yegutkin G.G., Henttinen T., Jalkanen S. Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *The FASEB Journal*. 15: 251-260. (2001)
- Zakula Z., Koricanac G., Putnikovic B., Markovic L., Isenovic E.R. Regulation of the inducible nitric oxide synthase and sodium pump in type 1 diabetes. *Medical Hypotheses*. 69: 302-306. (2007)
- Zernecke A., Bidzhekov K., Ozüyaman B., Fraemohs L., Liehn E.A., Lüscher-Firzlauff J.M., Lüscher B., Schrader J., Weber C. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation*. 113:2120-2127. (2006)
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 362: 299-309. (2000)

