

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Adenozin receptorok szerepe a légúti simaizom és a mononukleáris sejtek funkcionális válaszaiban

Dr. Brugós László

Témavezető:

Dr. Szentmiklósi József András



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2013**

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. Adenozin receptor altípusok	7
2.1.1. A ₁ adenozin receptorok	7
2.1.2. A _{2A} adenozin receptorok	9
2.1.3. A _{2B} adenozin receptorok	11
2.1.4. A ₃ adenozin receptorok	12
3. AZ ADENOZIN BRONCHIÁLIS HATÁSAI	13
4. AZ ADENOZIN ÉS AZ ADENOZIN RECEPTOROK SZEREPE A GYULLADÁSOS FOLYAMATOKBAN, A GYULLADÁSBAN RÉSZTVEVŐ SEJTEK MŰKÖDÉSÉBEN ÉS AZ ARACHIDONSAV FELSZABADULÁSBAN	15
5. CÉLKITŰZÉSEK	27
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
6.1. Anyagok	28
6.2. Kísérleti állatok és kezelésük	28
6.3. Koffein meghatározás a szérumban	29
6.4. A szövetek előkészítése	29
6.5. Kísérletes protokoll	30
6.6. Perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) preparálása humán vérből	31
6.7. A perifériás vér mononukleáris sejtek stimulációja	31
6.8. Az IL-1 β felszabadulás mérése a perifériás mononukleáris sejtek stimulált szuszpenziójából	31
6.9. A perifériás mononukleáris sejtek kezelése adenozinnal illetve altípus-szelektív adenozin analógokkal	31
6.10. A sejtek életképességének vizsgálata	32
6.11. Az arachidonsav felszabadulás mérése nem-stimulált és stimulált perifériás mononukleáris sejtek szuszpenziókból	32
6.12. Statisztikai értékelés	34

7. EREDMÉNYEK	35
7.1. A krónikus koffeinkezelés hatása az adenosin bronchiális hatásaira	35
7.1.1. A krónikus koffeinkezelés hatása a testsúlyra, a koffein-felvételre és a mortalitásra	35
7.1.2. Szérum koffein koncentrációk	35
7.1.3. Az adenosin által létrehozott mechanikai válaszok változása ép epitéliummal rendelkező trachea preparátumokon tartós koffeinkezelés alatt	35
7.1.4. Az adenosin által létrehozott mechanikai válaszok változása epitélium-fosztott trachea preparátumokon tartós koffein-kezelés során	36
7.1.5. Az epitélium szerepének vizsgálata co-axiális bioassay rendszer segítségével az adenosin-indukálta válasz csökkenésében	40
7.1.6. Leukotrién és prosztanoid szintézis-gátlás hatása az adenosin epitélium-függő relaxáns válaszára	43
7.1.7. Kromolin és capsaicin kezelés hatása a tartósan koffein-kezelt tengerimalacok trachea preparátumainak adenosin által létrehozott relaxációjában	43
7.1.8. A NOS gátlásának hatása az adenosin-indukált relaxációra.	44
7.2. Xantin-rezisztens adenosin kötőhelyek szerepének elemzése tengerimalac trachea simaizomzaton	47
7.2.1. Xantin-érzékeny hatások vizsgálata tengerimalac tracheán	47
7.3. Adenosin hatása az interleukin-1 β felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken	56
7.3.1. Adenosin és altípus-szelektív adenosin receptor aktivátorok hatása az IL-1 β felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken	56
7.3.2. A különböző adenosin altípus-szelektív antagonisták hatása a specifikus adenosin receptor agonisták IL-1 β felszabadulást gátló hatásának befolyásolása aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken	57
7.4. Adenosin hatása az arachidonsav felszabadulásra aktivált humán mononukleáris sejteken	61

7.4.1. Az adenosin és az altípus-szelektív adenosin receptor aktivátorok hatása az arachidonsav felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken	61
8. MEGBESZÉLÉS	65
8.1. Krónikus koffeinkezelés hatása az adenosin bronchiális hatására	65
8.2. Xanthin-rezisztens adenosin kötőhelyek szerepének elemzése tengerimalac trachea simaizomzaton	68
8.3. Adenosin hatása az interleukin-1 β felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken	72
8.4. Adenosin hatása az arachidonsav felszabadulásra aktivált humán mononukleáris sejteken	74
9. KÖVETKEZTETÉSEK	76
9.1. Tartós koffeinkezelés hatásai	76
9.2. A xantin-inszenzitív adenosin kötőhelyek és receptorok szerepe	76
9.3. Az aktivált perifériás mononukleáris sejtekre gyakorolt gyulladáscsökkentő adenosin hatások.	77
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	77
11. IRODALOM	79
12. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények	107
13. További közlemények	108
14. RÖVIDÍTÉSEK	112

1. BEVEZETÉS

A kísérletes gyógyszerfejlesztés során az egyik legfontosabb tényező az a folyamat, amikor egy adott betegség gyógyításához újabb és újabb molekuláris célpontokra (targetekre) ható vegyületeket állítanak elő. Az utóbbi évtizedekben ilyen célpont – többek között – az adenosin receptor, amely gyakorlatilag minden sejtfeleségben megtalálható, tehát a legkülönbözőbb sejtszintű zavarok esetén hatékony lehet a receptor aktiváció módosítása. Csaknem egy évszázada annak, hogy Drury és Szent-Györgyi (Drury és Szent-Györgyi, 1929) megalkották azt az alapvető művet, amelyben az adenosin kardiovaszkuláris hatásait írták le alapos részletességgel, és amely komoly mérföldkő volt az adenosin receptorkutatás történetében. Ezt követően – jó néhány évtizeddel később – újabb teóriák jelentek meg, mint pl. Robert Berne (1963) a koronáriakeringés regulációjának – adenosin teóriáján alapuló – metabolikus elmélete, valamint nem sokkal később Geoffrey Burnstocknak a purin és a purinerg receptorokra vonatkozó – mind a mai napig meghatározó jellegű – elmélete (Burnstock, 1976). A kardiovaszkuláris adenosin receptor regulációra vonatkozó elméleteket ezt követően egy erős respiratórikus vonal követte, élén Barnes és munkatársaival (Barnes és mtsai, 1998). Egyre több bizonyíték halmozódott fel, hogy a tüdőben lévő sejtes elemek (epitélium, bronchiális simaizom, mononukleáris sejtek) működésében az adenosin receptor mechanizmusoknak döntő jelentőségük van. Megállapították, hogy e receptorok állapotának befolyásolása komoly farmakológiai jelentőséggel bírhat az asthma bronchiale és a COPD gyógyszeres terápiájában. Jelenleg az adenosinra és az adenosin receptorokra vonatkozó publikációk száma több mint 210.000. Meg kívánom jegyezni, hogy ebből mintegy 25.000 közlemény foglalkozik az adenosin kardiovaszkuláris és 4.700 közlemény az adenosinnak a légzőrendszerre kifejtett hatásaival. Ezek az adatok már számszerűen jelzik e fontos purin nukleozid élettani, kórélettani, farmakológiai és klinikai jelentőségét. Kétségtelen, hogy az adenosin receptorok bármiféle funkcionális vagy morfológiai károsodása komoly problémákat okozhat az illető szerv vagy szervrendszer működésében. A gyógyszerkutatás előtt óriási perspektívák állnak, hogy ezt a farmakológiai célpontot kellőképpen kihasználva újabb – adenosin receptor mechanizmusokon alapuló – vegyületeket állítsanak elő akár a kardiovaszkuláris, akár a respiratórikus alapokon nyugvó kórképek gyógyítására. Ha csak a kardiovaszkuláris vonalra koncentrálunk, akkor megállapítható, hogy jelenleg

több mint 70 – adenzinerg vegyülettel kapcsolatos – klinikai tanulmány fejeződött be vagy folyamatban van (pl. AMISTAD I, AMISTAD II, ADVICE, ADSPECT, ADELIN, PROTECT, TEMPEST). Hasonló a helyzet az asthma bronchiale és a COPD kezelés vonatkozásában is. Itt a jelenleg futó, vagy befejezett klinikai tanulmányok száma mintegy 40. Értekezésem fő célja, hogy adatokat szolgáltatson az adenzin receptor funkciók jelentőségére, azok plaszticitására a bronchiális rendszerben, valamint a respiratórikus rendszer gyulladásában résztvevő polimorfonukleáris sejtekben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A purinvegyületek fő fiziológiai hatásainak felismerését követően Burnstock volt az első, aki az adenzin és adenin nukleotidek receptorait P_1 és P_2 purin-receptorokra osztotta fel (Burnstock, 1980). A P_1 receptorokat az adenzin aktiválja, míg a P_2 receptorokat az ATP és ADP hozhatja működésbe. Nemrég négy adenzin receptor altípust különítettek el strukturális, funkcionális és farmakológiai szempontokból, ezeket A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 receptoroknak nevezték el. Az adenzin receptorok altípusának jellemzése több szempontot vesz figyelembe, mint például a speciális farmakológiai profilt (az agonisták és antagonisták hatékonysági potenciáljának sorrendje), a G-proteinhez történő kötődést, valamint az altípus-specifikus adenzin receptor aktivációjának a jelátviteli mechanizmusát. Ez a megközelítés szigorúan követi az International Union of Pharmacology (IUPHAR) követelményeit, amit a Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification ír elő (Fredholm és mtsai, 2001). Minden egyes receptor altípust már klónozással is előállítottak emlőszállat és emberi adenzin receptorok alapján. Kémiai szempontból ezek a receptorok aszparagin kötődésű glikoproteinek, melyeknek a palmitoilációra alkalmas kötőhelye a terminális karboxil közelségében van (kivétel ez alól az A_{2A} receptor) (Fredholm és mtsai, 2001). A receptorok a membránproteinek részei és megfelelnek a G proteinhez kötődő receptorok strukturájának (Jacobson és mtsai, 1992; Palmer és Stiles, 1995; Olah és Stiles, 1995). A nemrég elfogadott IUPHAR besorolás alapján és filogenetikai elemzés szerint az adenzin receptorok a G proteinekhez kötődő receptorok I. osztályába a „rhodopsin alosztályhoz” tartoznak (Poulsen és Quinn, 1998).

2.1. Adenozin receptor altípusok

2.1.1. A₁ adenozin receptorok

Ma már kiváló farmakológiai módszerek állnak rendelkezésre, hogy felmérjük a különböző típusú adenozin receptorok sűrűségét és elhelyezkedését a test különböző részeiben. A következő alfejezetekben megpróbálom jellemezni a különböző adenozin receptor altípusokat, különös tekintettel a kardiorespiratórikus rendszerre és a gyulladásos folyamatokban résztvevő sejtekre. Ami az A₁ adenozin receptorokat illeti, megállapították, hogy az A₁ adenozin receptorok nagy sűrűségben helyezkednek el a cortexben, a kisagyban, a hippocampusban, a gerincvelőben, a szemben, a mellékvesében és a pitvari miokardiumban. Az egyéb agyi régiókban az A₁ receptorok sűrűsége átlagos. Hasonló a helyzet a vázizomban, a májban, a vesében, a gyomor-bélrendszerben és a szívben. Az A₁ receptorok denzitása relatíve alacsony a tüdőben és a bronchusokban, de ez nem azonos ezen receptorok funkcionális szerepének jelentőségével (Fredholm és mtsai, 2001A). Ma már ismert, hogy a klónozott A₁ receptor olyan glikoprotein, amely 326-328 aminosavból áll és molekulatömege kb. 36,600 dalton (Fredholm és mtsai, 2001; Stiles, 1992, Shryock és Belardinelli, 1997). A humán A₁ receptor az I. kromoszóma hosszú karjára (1q31-32.1) lokalizálódik (Deckert, 1995). Az A₁ receptor az intracelluláris másodlagos messengerekhez gátló jellegű G_{i/o} ill. G_{q/11} típusú proteineken keresztül kapcsolódik (Klotz, 2000). Az A₁ receptor aktiváció fő hatása az adenilcikláz aktivitás gátlása, ezáltal az intracelluláris ciklikus adenozin monofoszfát (cAMP) tartalom csökkenése. Mindemellett az említett receptornak specifikus agonistával történő stimulációja aktiválja a fordítottan egyenirányító kálium áramokat (inwardly rectifying potassium currents: I_{Kado}), módosítja a foszfolipáz C (PLC), a proteinkináz C (PKC), valamint a szarkolemmális és mitochondriális ATP-szenzitív kálium csatornák aktivitását (Klinger és mtsai, 2002; Lee és mtsai, 2001; Henry és mtsai, 1996; Hu és mtsai, 1996). Figyelemre méltó, hogy az A₁ receptor adenilcikláz aktivitást gátló effektusa jelentősen függ az enzim aktiváltsági fokától (pl. catecholamin stimuláció), azaz minél aktívabb az adenilcikláz, annál erősebb az enzimgátlás mértéke (Böhm és mtsai, 1984). Ami a fordítottan egyenirányító kálium csatornák aktivációját illeti, az adenozin ezt a hatást elsősorban a pitvari miokardiumon fejti ki. A kamrai munkaizomzat esetén ilyen effektusról nem

beszélhetünk, ugyanis ezek a rostok gyakorlatilag nem tartalmaznak I_{Kado} csatornákat. Az adenilcikláz gátlása, ill. az I_{Kado} csatornák aktivációja szorosan összefügg az adenzinnak a sinuatriális pacemaker, AV junkcionális aktivitás, ill. a Purkinje rostok elektromos tevékenységének, valamint a pitvari miokardium mechanikai aktivitásának gátlásával (Belardinelli és mtsai, 1995). A PLC-re és a K_{ATP} csatornákra kifejtett hatás szoros kapcsolatban áll az adenzinnak az ischemiás prekondicionálásban kifejtett szerepével (Hu és mtsai, 1996; Auchamp és Gross, 1993). Az adenzinnak az A_1 receptorokra gyakorolt hatása fokozza a nitrogén monoxid szintetáz (NOS) aktivitást és a nitrogén monoxid (NO) termelődést. (Huszár és mtsai, 2002). Ez a folyamat feltehetően szerepet játszik az adenzinnak a befelé irányuló lassú kalcium áram (slow inward calcium current) gátlásában mind a sinuatriális csomóban (Shimoni és mtsai, 1996), mind az AV junkcióban (Martynyuk és mtsai, 1996).

Az A_1 receptorok nagy valószínűséggel részt vesznek az adenzin indukált bronchus összehúzóásban és a különböző gyulladásos válaszokban. Az egér tüdejében pl. mind a négy adenzin receptor megtalálható, de ezek közül is az A_1 receptor dominál (Fredholm és mtsai, 2001). Azok az állatok, amelyeket születésük időpontjában allergénnel immunizáltak, légúti hiperreaktivitást mutattak az adenzinnal szemben az A_1 -receptor stimuláció révén. Azok az állatok viszont, amelyekből hiányzik ez a receptor, allergén expozícióra csökkent bronchoconstrictióval válaszolnak (Polosa, 2002).

Meg kell említenünk, hogy az A_1 receptor jelenléte és szerepe a légutakban még eléggé ellentmondásos. Joad és Kott (1993) vizsgálatai szerint nem asztmás egyének esetében az A_1 adenzin receptor hiányzik. Asztmás betegekből izolált bronchusok esetén a bronchusconstrictio leukotrién és hisztamin antagonisták által létrejövő gátlásában az A_1 adenzin receptoroknak jelentős szerepük van (Sun és mtsai, 2005).

A fenti szerzők mutatták ki azt is, hogy adenzin dezamináz hiányos egerekben az A_1 receptor szint megemelkedett, főként az alveolaris makrofágokban. Az A_1 receptorok genetikai hiánya esetén nagyon gyakori volt a tüdőgyulladás, a nyálkahártya metaplázia és az alveoláris károsodás előfordulása, valamint a Th_2 citokinek mennyiségének növekedése (Sun és mtsai, 2005). Ezen eredményekből következtetni lehet, hogy az A_1 receptorok befolyásolják a légúti gyulladás súlyosságát, valamint a krónikus tüdőbetegségben előforduló remodelinget, szöveti átépülést.

Az A_1 receptor szelektív antagonistájával, az L-97-1-el végzett kísérletek azt mutatták, hogy az A_1 adenosin receptor gátlása jelentős mértékben csökkenti a hisztamin- és az adenosin által kiváltott légúti túlérzékenységi reakciót nyulakban, előzetes házi poratkával történő szenzitizálás után (Obiefuna és mtsai, 2005). Ekkor derült fény arra, hogy az A_1 receptor gátlása a késői bronchiális választ is megakadályozza. Némileg ellentmond ezeknek a kísérleteknek az a klinikai vizsgálat, amelyet antiszenz oligonukleotid alkalmazásával (EPI-2010) végeztek asztmás betegekben relatíve szerény eredménnyel (Ball és mtsai, 2004). Az A_1 adenosin receptorok tüdőbeli szerepére vonatkozó vizsgálatok kissé ellentmondásosak, de úgy tűnik, hogy az eredmények többsége az adott receptor élettani és kórélettani jelentőségét támasztja alá.

2.1.2. A_{2A} adenosin receptorok

Az A_{2A} adenosin receptorok az emlős szövetekben nagy denzitással megtalálható adenosin receptorok. Nagy sűrűségben találhatók a lépben, a timuszban, a leukocitákban, a vérlemezkékben, a corpus striatumban, a nucleus accumbensben és a bulbus olfactoriusban. Az A_{2A} receptorok denzitása közepes mértékű a szívben, a tüdőben és a vérerekben (Fredholm és mtsai, 2007). Az A_{2A} receptorokat már sikerült klónozni különböző specieszekből származó cDNS könyvtárakból, beleértve a humán cDNS könyvtárat is (Olah és Stiles, 1995). Az A_{2A} receptor nagyobb fehérje, mint az A_1 receptor: 410-412 aminosavból áll, a molekulatömege mintegy 45.000 dalton (Olah és Stiles, 1995). A receptor protein nagy mennyiségben tartalmaz szerin és treonin reziduumokat, amelyek a G protein-receptor kinázok lehetséges foszforilálási helyei. Feltételezik, hogy ezek a reziduumok fontos szerepet játszanak a deszenzitizációs folyamatokban is. Ismeretes, hogy az A_{2A} receptor sokkal gyorsabban képes a deszenzitizálódásra mint az A_1 adenosin receptor (Palmer és mtsai, 1994). Az A_{2A} receptort kódoló humán gén a 22. kromoszómára (22q11.23) lokalizálódik. Az A_{2A} adenosin receptor különböző G-proteinekhez kapcsolódik, így G_s proteinekhez vagy $G_{q/G11}$ proteinekhez, amelyeken keresztül az adenilcikláz ill. a foszfolipáz C aktiválódása valósul meg.

Számos bizonyíték támasztja alá, hogy a tüdőben ezek a receptorok protektív szerepet töltenek be és alapvető szerepük van a gyulladás és a szöveti károsodások

kivédésében (Thiel és mtsai, 2005). Az A_{2A} receptor knock-out egerekben azokra a hatásokra, amelyek a vad típusú egereken csak minimális gyulladást vagy szöveti károsodást idéznek elő, nagymértékű destrukciós folyamatok lépnek fel. Ilyen esetekben a gyulladáshoz vezető citokinek oly mértékben felhalmozódhatnak, hogy akár az állat halálát is okozhatják (Ohta és Sitkovsky, 2001).

Tüdő transzplantáció *in vivo* modelljén az adenosin A_{2A} receptor aktivációja után a gyulladás csökkenését figyelték meg a pulmonális funkció megtartása mellett (Reece és mtsai, 2005). A limfoid sejteken expresszálandó A_{2A} receptorok aktivációja gátolja a gyulladáshoz vezető folyamatokat az intracelluláris cAMP szint emelése révén (Cronstein és mtsai, 1994). A neutrofil sejtek esetében a gyulladáscsökkentő hatást szintén a magas A_{2A} receptor expresszió hatásának tulajdonítják (Lappas és mtsai, 2005). Megfigyelték, hogy az A_{2A} receptorok stimulációja csökkenti a neutrofilek endotéliumhoz történő tapadását anélkül, hogy a degranulációs folyamatot befolyásolná. Felvetődött, hogy a neutrofileken található A_{2A} receptorok stimulációja szétválasztja a kemoattraktáns receptorokat a stimulus-transzdukciós proteinektől (Cronstein és mtsai, 1994). Azt is megállapították, hogy az A_{2A} receptor aktiválás nemcsak a neutrofilek „toborzását” és letapadását gátolja, hanem az aktivált neutrofilek és monociták degranulációját is (Fredholm és mtsai, 1996). A human neutrofilek elasztáz és szuperoxid termelése dózis függően gátlódik CGS21680 hatására, amely szelektív adenosin A_{2A} receptor agonista. Ez valószínűleg a citoszolban levő Ca^{2+} cAMP-mediált szekvesztrációjának köszönhető (Visser és mtsai, 2000).

Az adenosin az A_{2A} receptorok aktivációja révén human makrofágokban és monocitákban képes modulálni a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α), az IL-10 és az IL-12 termelődését is. A purin nukleozid csökkenti a pro-inflammációs IL-12 szintjét, míg a protektív hatású IL-10 mennyiségét növeli (Haskó és mtsai, 2000). A bronchoalveoláris mosófolyadékban található hízósejteken A_{2A} receptorok koexpresszálandók az A_{2B} receptorokkal (Feoktistov és Biaggioni, 1998; Suzuki és mtsai, 1998). Az A_{2B} receptor stimulációval ellentétben az A_{2A} stimulálása csökkenti a hisztamin és triptáz felszabadulását a hízósejtekből (Suzuki és mtsai, 1998). Mindebből jól érzékelhető, hogy az A_{2A} adenosin receptor aktiváció sokrétű hatást fejt ki a gyulladásban résztvevő sejtekre, így befolyásolja a neutrofilek aktivációját és degranulációját, a reaktív szabad gyökök felszabadulását, az adhéziónak molekulák expresszióját, a hízósejt degranulációját és a citokin termelést. (Lappas és mtsai, 2005).

2.1.3. A_{2B} adenosin receptorok

Az A_{2B} adenosin receptorok nagy mennyiségben találhatók a coecumban, a vastagbélben és a húgyhólyagban, míg az erek, a tüdő, a szem, a monociták és a hízósejtek közepes denzitással rendelkeznek. (Fredholm és mtsai, 2001) Az A_{2B} receptor alacsony affinitással rendelkezik az adenosin receptorokhoz képest, így ennek a típusú receptornak az aktiválásához több mint 10 µM adenosin koncentráció szükséges (Daly és mtsai, 1983, Bruns és mtsai, 1986). Az A_{2B} receptor génje emberen a 17. kromoszómára lokalizálódik. (Fredholm és mtsai, 2001)

Az egérből, patkányból és a humán szövetekből izolált A_{2B} receptor 332 aminosavat tartalmaz (Marquardt és mtsai, 1994; Stehle és mtsai, 1992; Rivkees és Reppert, 1992; Pierce és mtsai, 1992). A receptor G_s proteinen keresztül kapcsolódik az adenilcikláshoz, amelynek aktivációját segíti elő. Az A_{2B} receptorok esetében a funkcionális vizsgálatok fő hátrányát az jelentette, hogy sem altípus szelektív aktivátor, sem szelektív antagonistá nem állt rendelkezésre. A hagyományos agonista a NECA volt, amely nem specifikus agonista, hiszen mind az A_{2A}, mind az A_{2B} receptorokat egyaránt stimulálja. Újabban sikerült már szintetizálni néhány relatíve altípus-szelektív A_{2B} agonistát és antagonistát, amelyek remélhetően hatékonyan segítik majd az A_{2B} receptorok fiziológias szerepének funkcionális farmakológiai módszerekkel történő megközelítését (Varani és mtsai, 2005; Ji és mtsai, 2001; Auchampach és mtsai, 2009; Baraldi és mtsai, 2009). Egyre több bizonyíték ismert, hogy rácsálókban és emberekben az A_{2B} receptor modulálja a hízósejtek működést. Korábbi, egér csontvelőből származó hízósejteken végzett tanulmányok kimutatták, hogy az A_{2A} és A_{2B} koexpressziója ellenére az adenosin hízósejt degranulációt eredményező hatását nem befolyásolja a szelektív A_{2A} receptor agonista CGS21680 (Marquardt és mtsai, 1994). Human hízósejt vonalban az A_{2B} receptorok HMC-1-el való aktiválása az IL-8 szintjének emelkedését eredményezi (Feoktistov és mtsai, 2001). Humán tüdő fibroblasztokban az A_{2B} aktiválása az IL-6 szintjét emeli és miofibroblasztokká történő differenciálódást hoz létre, amely arra enged következtetni, hogy ezek a receptorok a krónikus gyulladásos tüdőbetegség kapcsán létrejövő szöveti átalakulás folyamatában is központi szerepet játszanak (Zhong és mtsai, 2005).

Az A_{2B} receptorok pro-inflammatorikus hatását megerősítették azok a kutatások, melyek eredményei szerint ezek a receptorok erőteljesen fokozzák a Th₂ citokinek

termelődését, így a hízósejtekben az IL-3, IL-4, IL-8 és IL-13 produkciót, de elősegítik a B limfociták IgE termelését is (Ryzhov és mtsai, 2004). Mindent összevetve feltételezhető, hogy az A_{2B} receptoroknak komoly szerepe van a hízósejt eredetű mediátorok felszabadításban és mindazokban a folyamatokban, melynek során az adenzin bronchoconstrictiót és légúti gyulladást okoz asthma bronchialisban. Ezek alapján a nagy szelektivitású A_{2B} antagonisták kifejlesztése értékes terápiás lehetőségeket rejt magában. Jelenleg a CVT-5440 tűnik annak a vegyületnek, amely nagy affinitást és magas szelektivitást mutat az A_{2B} receptorokkal szemben (Zablocki és mtsai, 2005).

2.1.4. A_3 adenzin receptorok

Az A_3 adenzin receptorok jelegzetessége, hogy megoszlásus erősen specieszfűggő. Az A_3 receptor megoszlása patkányon a következő: here >> tüdő, vese, szív > agy, míg emberen: tüdő, máj, placenta >> agy, aorta, vese > here > szív. A patkányból, juhból és humán sejtekből izolált receptorok 317-320 aminosavat tartalmaznak. (Salvatore és mtsai, 1993; Linden és mtsai, 1993; Zhou és mtsai, 1992) A humán A_3 receptor gén az 1. kromoszómára lokalizálódik (p13,3) (Murrison és mtsai, 1996). Az A_3 receptorok az adenilciklázhoz a $G_{i2,3}$ fehérjén keresztül kapcsolódnak. Ezek a receptorok $G_{q/11}$ proteinekhez is kötődhetnek, miáltal aktiválják a foszfolipáz C-t és fokozzák az inozitol 1,4,5-triszfoszfát termelődését és a Ca^{2+} felszabadulást a szarkoplazmatikus retikulumból. Foszfolipáz D-hez történő kötődést is sikerült kimutatni (Parsons és mtsai, 2000). Az A_3 receptorok extrém módon hajlamosak a deszenzitizációra az agonistával történő expozíció után ($t_{1/2} \sim 10$ perc). Ennek a rendkívül gyors deszenzitizációnak az alapja a G-proteinhez kötődő receptor kinázok foszforilációja és a receptor internalizációja (Trincavelli és mtsai, 2002).

Patkányokban és tengerimalacban az A_3 receptorok aktivációja a hízósejtek degranulációját váltja ki az allergénnel történő stimuláció után. Egerekben az inhalált adenzin a hízósejtek és neutrofilek érzékenységeinek fokozódását váltja ki a vad típusú állatokban, de A_3 receptor hiányos állatokon nem figyelhető meg ez a jelenség (Tilley és mtsai, 2003). Emberben még nem találtak A_3 receptor proteint hízósejteken, ugyanakkor nagy sűrűségben sikerült kimutatni eozinofilejteken és a légutakban (Walker és mtsai, 1997). Az A_3 receptor aktivációja esetén az eozinofilek degranulációjának gátlása és a

szuperoxid anion felszabadulásának csökkenése következik be. Ezek a receptorok neutrofileken is expresszálnak és aktivációjuk esetén a neutrofilek endotoxin-indukált degranulációja is gátlódik (Gessi, és mtsai 2002). Asztmások tüdejében az A₃ adenosin receptor mRNS szinten fokozott koncentrációt mutat (Walker és mtsai, 1997), bár nem teljesen egyértelmű, hogy az asztmás betegek tüdejében e receptorok milyen szerepet töltenek be.

3. AZ ADENOSIN BRONCHIÁLIS HATÁSAI

Cushley és mtsai (1983) voltak az elsők, akik megfigyelték, hogy asztmás egyéneknél az inhalált 5'-AMP (adenosin receptor agonista) dózisfüggő bronchoconstrictiót eredményez, míg egészségeseknél ez nem tapasztalható. A bronchoconstrictió fellépését az adenosin intravénás adása után is megfigyelték (Drake és mtsai, 1994). COPD-s egyéneken is leírtak hörgőgörcsöt belégzett 5'-AMP hatására, főleg dohányosoknál. Az adenosin gyulladásos légúti betegséget szimuláló állatmodellekben és bronchitiszes humán anyagon is bronchoconstrictiót indukál. Az adenosin és a gyulladásos folyamatok kapcsolatát mutatja az, hogy az adenosin koncentráció emelkedett az asztmás betegek különböző biológiai folyadéktartéiban, így a bronchoalveoláris mosófolyadékban vagy a kilégzett levegő kondenzátumban (Polosa és mtsai, 2002).

Állatokon és embereken végzett kísérletek kimutatták, hogy a bronchusconstrictio a különböző gyulladásos mediátorok felszabadulására vezethető vissza, amelyek a hízósejtekből szabadulnak fel, de az adenosin más, légúti gyulladásban résztvevő sejtek működését is befolyásolja, így hatással van a neutrofilekre, eozinofilekre, limfocitákra és makrofágokra is (Spicuzza és mtsai, 2006).

Mivel a human tüdő hízósejteken található A_{2B} receptorok stimulációja elsődlegesnek tűnik bronchospazmus kiváltásában, ezért szelektív A_{2B} receptor antagonisták kifejlesztése nagyon jó terápiás megközelítés lehet. A rendelkezésre álló adatok és eredmények klinikai gyakorlatba történő átültetésének egyik fő problémáját az adja, hogy az adenosin receptorok az emberi szervezetben minden sejtben magas denzitással fordulnak elő, különösen a központi idegrendszerben és az érrendszeren belül, így nagy szelektivitásra van szükség a nem kívánatos mellékhatások elkerülése érdekében.

Mindemellett ezeknek a vegyületeknek lipofóbnak kell lenniük, hogy ne hatoljanak át a vér-agy gáton és kardiovaszkularis mellékhatásuk ne legyen.

Izolált, prekontrahált bronchus preparátumokban az adenzin dózis-függő relaxációt hoz létre (Brown és Collis, 1982). Ami a tengerimalac trachea adenzin receptorait illeti, elfogadott, hogy a tengerimalac trachea A_2 típusú adenzin receptorokat tartalmaz (Brown és Collis, 1982), de a tengerimalac tracheán található A_2 receptorok nem felelnek meg sem az A_{2A} , sem az A_{2B} adenzin receptorok kritériumainak (Losinski és Alexander, 1995). Megállapították, hogy ez a szövet agonista hatásprofil szempontjából az A_{2B} kategóriába sorolható, míg az antagonistá profil alapján az A_{2A} adenzin receptort hordozó szövetek közé. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a tengerimalac trachea atípusos A_2 adenzin receptorokat tartalmazó szövet, vagy egy teljesen újszerű A_2 receptort expresszáló szövet. Vannak irodalmi adatok, melyek szerint a fenti szövet tartalmaz xanthin-inszenzitív receptorokat is (Brown és Collis, 1982; Brackett és mtsai, 1991), amelyek intracelluláris lokalizációjának bizonyultak. Szorosabb értelemben ezek nem receptorok, hanem a sejtmembrán belső felszínéhez asszociált adenzin kötőhelyek, az ún. P-site-ok. Adenzinnal való kapcsolódásuk az adenil cikláz gátlásában nyilvánul meg.

A P-site szelektív aktiválása bizonyos agonistákkal lehetséges, mint amilyen a 2'-deoxiadenozin és a 9-beta-D-arabinofuranozid. Ez az A_1 és A_3 receptorok stimulációjához hasonló, de annál gyengébb hatásokat vált ki. Az intra- és extracelluláris hatások elkülönítésében intracelluláris P-site aktivátorok, az adenzin dezamináz gátlószerei és a membrán nukleozid transzport specifikus gátlószerei lehetnek segítségünkre.

4. AZ ADENOZIN ÉS AZ ADENOZIN RECEPTOROK SZEREPE A GYULLADÁSOS FOLYAMATOKBAN, A GYULLADÁSBAN RÉSZTVEVŐ SEJTEK MŰKÖDÉSÉBEN ÉS AZ ARACHIDONSAV FELSZABADULÁSBAN

Az adenzin a gyulladáos sejtekre és ezek számtalan összetevőire hatást gyakorol, így vesz részt a tüdő védekezési mechanizmusában. Ezeket a hatásokat, az adenzin receptorok közvetítik, ezért receptor mediált hatásoknak is nevezzük. Az adenzin receptorok szinte az összes szövetekben kimutathatók. Az eddig ismert tevékenységüket a következő formában lehetne összegezni:

- neurotranszmisszió (A_1 és A_{2A} receptorok által; úgy tűnik, hogy a koffein központi idegrendszeri hatása az adenzin receptorok antagonizálásának a következménye)
- a szívizomzat vezetésének a modulációja (A_1 receptorok)
- koronaria erek vazodilatációja (A_{2A} receptorok)
- a **légutak regulációja**, a bronchomotor tónus indirekt szabályozása (A_{2B} receptorok)
- a **gyulladás gátlása** (az adenzin az A_1 és A_2 receptorokon keresztül a neutrofilek funkcióját modulálja; ha az adenzin extracellulárisan nagyobb mennyiségben van jelen, akkor gátolja a gyulladást (Cronstein, 2006; Fredholm és mtsai, 2000; Montesinos és Cronstein, 2001).

Több szövetben és sejttípusban az A_1 és A_2 receptoroknak ellenkező hatásuk van, nemcsak a cAMP szint szabályozásában, hanem a funkciók irányításában is (Salmon és Cronstein, 1990; Londos és mtsai, 1980).

A pro-inflammációs stimulusok, különböző citokinek és kemotaktikus faktorok ATP-t szabadítanak fel a légúti epitél- és gyulladáos sejtekből (Ahmad és mtsai, 2005; Kunzelmann és mtsai, 2006).

Főleg a stimulált neutrofilek képesek ATP kibocsátására, mely aztán extracelluláris ATP és AMP formájában halmozódik fel. A gyulladás a légutak luminális részének extracelluláris purin metabolizmusát érinti és megváltoztatja az ectonukleotidáz aktivitását az epitelsejtek felszínén. Az ectonukleotidáz hatásához a felgyülemlett gyulladáos sejtek hatása is hozzáadódik. Az ATP-ből keletkezett adenzin jelátviteli molekulaként, kettős hatást fejt ki, pro- és anti-inflammációs folyamatokat indítva be.

A purinerg jelátvitel szerepét a tüdőben zajló gyulladásokban, *in vivo* is kimutatták. Például ATP receptor deficiens egereken a gyulladásos válasz gátolt, ezért a *Pseudomonas* eradikációja nehézségekbe ütközik. Egér modelleken, a tüdőben közepesen emelkedett adenosin szint elősegíti az IL-4 mediálta gyulladásos folyamatot, míg ennél magasabb adenosin szint légúti gyulladást és pulmonális fibrozist válthat ki. *In vivo* tanulmányok eredményei korlátozottan állnak rendelkezésre, viszont cisztás fibrózisban magasabb mennyiségű ATP-t találtak a nazális mosófolyadékban és a vérben egyaránt.

Hasonlóan emelkedett adenosin mennyiséget mutattak ki kezeletlen asztmások légúti váladékából is. A purinok jelenléte alkalmassá teszi őket, hogy gyulladásos folyamatokban markerként használjuk fel és mérésükkel követhessük a folyamat dinamikáját. (Huszár és mtsai, 2002; Vizi és mtsai, 2002)

Hipoxémia során - mely tüdőbetegségekben elég gyakori - adenosin szabadul fel a tüdőszövetekből, ami (Mann és Holgate, 1985) a normális szint háromszorosát is elérheti. Ebben a helyzetben az adenosin nagy valószínűséggel a hízósejtekből szabadul fel, mert ez a sejt képes IgE aktiváció során adenosint felszabadítani (Marquardt és mtsai, 1986).

Az A_{2A} receptor jelen van a gyulladásban résztvevő szinte összes sejten, a neutrofilek, hízósejtek, monociták, makrofágok, eozinofilek, trombociták és T-sejteken.

Az adenosin és adrenerg agonisták csökkentik a neutrofil sejtek aktivációját közvetlenül az A_{2A} és β -adrenerg receptorokra hatva, gátolva a kemotaktikus hatást a G_i 2 proteineken keresztül (Cronstein és mtsai, 1992). Az adenosin nukleotidek, főleg az extracelluláris ATP, egy specifikus helyhez kötődnek és transzdukciós jelátvitelt aktiválnak, amely független az ATP hidrolázoktól (Balazovich és Boxer, 1990).

Az A_{2A} receptor aktivációját követően a gyulladásos sejtekben megnő a cAMP koncentrációja, melyet a PDE4 izoenzim gátló szerek alkalmazása tovább növel. Az A_{2A} receptor agonisták csökkentik a neutrofilejtek szuperoxid termelését, degranulációját, a monociták és makrofágok által termelt TNF- α mennyiségét és a neutrofil-endotélsejtek adherenciáját. (Moore és mtsai, 2008). A TNF- α expressziójának csökkentésével az A_{2A} agonisták gátolják a neutrofilejtek toborzását és csökkentik az endotélium gyulladásos károsodását (Blackburn, 2003).

Az A_{2A} receptorok izgatásának hasonló hatása: a neutrophil sejtek extravazálásának csökkentése, valamint az oxidatív és non-oxidatív tartalmuk kibocsátásának mérséklése.

Főleg asztmában, az adenosin vazodilatátor hatása szinergistaként működik néhány gyulladásos mediátorral, ezért fokozott érpermeabilitást okoz. Ha az adenosin magas koncentrációban van jelen a degranuláló hízósejt közelében, akkor a szinergista hatás fokozza az allergiás reakció okozta légúti ödémát.

Az adenosin erős hízósejt degranulátor és hozzájárul asthma bronchiáléban tapasztalható légúti gyulladás kialakulásához. Az adenosin ellentétes hatást is kifejt, ugyanis gátolja az eozinofil sejtek degranulációját az A_3 receptoron keresztül (Walker és mtsai, 1997). Az A_3 receptor aktivációja gátolja az eozinofil sejtek migrációját és fokozza az intracelluláris Ca ionok koncentrációját (Kohno és mtsai, 1991). Az A_3 receptorok főleg az eozinofil sejteken expresszálódnak és ezért asztmában számuk megnövekedett, egészséges egyénnel összehasonlítva (Walker és mtsai, 1997).

Az adenosinnak jelentős szerepe van az asztmában zajló krónikus gyulladás kialakulásában is. Ezt egér modellen igazolták mikor deletio útján az adenosin dezamináz enzim génjét eltávolították: ez adenosin felhalmozásához vezetett és fokozott IL-13 citokinválaszt hozott létre. Ebben a kísérletben erős gyulladásos folyamatokat észleltek a tüdőben, légúti átépüléssel, szöveti fibrózissal és emfizémához hasonló elváltozásokkal.

A légúti gyulladás viszont, ha az adenosin nagyobb mennyiségben termelődik, akkor képes up-regulálódni és elősegíti azoknak a molekuláknak az expresszióját, melyek aztán elhúzódoó hatással vannak a gyulladásos folyamatra és bizonyítékkul szolgálnak a légúti gyulladás és szöveti átépülés folyamatára (Blackburn és mtsai, 2003).

Az adenosin központi szerepet játszik a gyulladás szabályozásában, gátolva a szöveti gyulladást és a destrukciót. Newby 1984-ben összefoglalva az adenosin hatásait, azt „retaliatory metabolite” vagy „megtorló metabolitnak” nevezte el, mert szerinte az adenosin egy szabályozó autocoid, mely a sejtek károsodásának helyszínén termelődik, kapcsolatba lép specifikus G proteinekhez kötődő receptorokkal, melyek a gyulladást és az immunreakciót kiváltó sejteken helyezkednek el és szabályozzák ezeket (Haskó és Cronstein, 2004). Az adenosin az extracelluláris térben alacsony koncentrációban van jelen, de metabolikus stresszhelyzetekben mennyisége drámai módon megnő. Bizonyítékok vannak arra, hogy az extracelluláris adenosinnak protektív hatása van az agyra, vesékre, vázizomzatra és a zsírszövetekre.

Az adenosin több módon fejti ki védőhatását. Csökkenti a szövetek energia igényét és a sejtfunkciókat, melyet közvetlen gátló hatással fejt ki (szívizom negatív inotrop hatás),

vagy indirekt módon védi a szöveteket, kedvezőbb környezetet biztosítva a működő sejteknek (adenozin okozta vazodilatáció, fokozott táplálék ellátás), vagy segíti a szöveti integritást, szintén indirekt módon, az immunválaszt modulálva.(Haskó és Cronstein, 2004)

Úgy tűnik, hogy a felszabadult adenzin az immunsejteken levő adenzin-receptorokhoz kötődve igen erős és hatékony endogén immunsuppressziót okoz, ami a „túlbuzgó immunválaszt” szabályozza a veszélyes külső hatásokkal szemben.

In vitro és *in vivo* vizsgálatok igazolták, hogy az adenzin jótékony hatást fejt ki, mint immunmodulátor, mivel az immunsejtek közelében szabadul fel, ahol az ischaemia és a gyulladás szöveti károsodást okozhat. A legtöbb kísérletes modellben az adenzinnak immunsuppresszív hatása van, ami a különböző immunsejteken levő adenzin-receptor stimulációja révén jön létre. Az endogén adenzin jelátviteli rendszer kiiktatása fokozza az immunaktivációt és következésképpen fokozza a sejtek és szövetek károsodását, akut esetekben.

Az adenzin élettani hatásai főleg abból állnak, hogy elfoglalják a sejtfelületén lévő adenzin-receptorokat és ezzel megváltoztatják az intracelluláris folyamatokat. Az adenzin biohasznosulásának fontos részei a termelődés, kibocsátás, és a sejtek adenzin felvétele és metabolizmusa egyaránt. Ezen folyamatok mind hozzájárulnak ahhoz, hogy az adenzin a receptor közelében jelen legyen és hatásukat szorosan, egymástól függően, finom szabályozás mellett fejtsék ki.(Haskó és Cronstein, 2004)

Nem teljesen ismert, hogy melyek a legfontosabb extracelluláris adenzin termelő sejtek, de az endotélialis- és a neutrofilsejtek nagy mennyiségű adenzint bocsátanak ki, a metabolikus stressz, a gyulladás vagy infekció hatására és azon a helyen, ahol a folyamatok zajlanak (Cronstein és mtsai, 1994). Az idegvégződéseknél is nagyobb mennyiségű adenzin termelődik, főleg, ha ischaemia áll fenn (Sperlagh és mtsai, 2000). A trombocitákból felszabaduló ADP a károsodás helyén adenzinná defoszforilálódhat (Ralevic és Burnstock, 1998). Általában, ha az adenzin szintje <1 μ M, akkor hatása csekély az immunválaszra, ilyenkor az ischaemia és a gyulladás váltja ki az endogén adenzin termelést, ennek mennyiségét, és ha ez elég magas, akkor immunsuppresszív hatást fejt ki. Meg kell jegyezni, hogy az adenzin jelátviteli rendszer az adenzin lebomlási termékek hatására, mint például az inozin és a húgysav, az innate immunválasz számtalan oldalát befolyásolja. Ezért a purinerg rendszer az

immunrendszer „ideális szenzora” és nagyon fontos információkkal szolgál, ami a szöveti integritást és működést illeti.

A szövetek közötti immunsejtek mozgását az endotélsejteken levő adenosin receptorok szabályozzák.

Az endotélsejteknek is fontos szerepük van a gyulladásban és az innate immunitásban. Az első ingerek, melyek gyulladásra utalnak az endotél sejtektől erednek. A gyulladás során számtalan mediátor szabadul fel, mint a komplement kaskád elemei, immunkomplexek, TNF- α vagy IL-1 és ezek hatására az endotélsejtek adhéziós molekulákat expresszálnak, melyek meghatározzák a leukociták toborzását, vándorlását a gyulladás helyére. Az endotélsejtek ezen felül más mediátorokat is termelnek és bocsátanak ki, mint a PAF, IL-8 és IL-6, ezeknek már közvetlen hatásuk van arra, hogy a leukociták az érintett szövetek melyik részébe jussanak el. Bizonyítható, hogy a különböző vaszkuláris endotélsejteken adenosin A_{2A} és A_{2B} típusú receptorok expresszálódnak, az A_1 és A_3 receptorok jelenlétét csak a receptorok mRNS kimutatásával tudták bizonyítani (Montesinos és mtsai, 1997; Feoktistov és mtsai, 2002; Lennon és mtsai, 1998). Az endotélsejteknek defoszforiláló képessége teszi lehetővé, hogy jelentős mennyiségű adenosint termeljenek, főleg adenin nukleotidekből és a létrehozott energiát a neutrofilek toborzására használják fel. A neutrofilek az endotélsejteken történő transzmigrációjuk során AMP bocsátanak ki. Itt endotéliális defoszforilációnak vannak alávetve az ecto-5'-nukleotidáz hatására és AMP-ből adenosin szintetizálódik, mely az A_{2A} receptorra hatva, az endotél barrier funkcióját erősíti. Más vizsgálatok alapján az adenosin gátolja az IL-6 és IL-8 termelését és az adhéziós molekulák (E-selectin, VCAM-1) expresszióját immunstimulált endotélsejteken, amit szintén az A_{2A} receptorok közvetítenek. Úgy tűnik, hogy a humán mikrovaskuláris sejtek az A_{2B} receptor stimulációján át növelik az IL-8 termelését, amit nem a PLC Gq protein aktivációja vált ki, inkább a klasszikus Gs-cAMP folyamata (Bouma és mtsai, 1996). Ezek alapján elmondható, hogy úgy az A_{2A} , mint az A_{2B} receptorok szabályozzák az endotélsejtek gyulladásos funkcióit, attól függően, hogy honnan származnak az endotélsejtek.

A neutrofilek fontos szereplői az adenosin korai protektív hatásának az ischaemia és a gyulladásos szövetek károsodása ellen.

A gyulladás helyszínére először a neutrofilejtek toborzódnak, szerepük fontos, hogy meggátolják az infekció továbbterjedését, de ha nem szabályozzák hatásukat, jelentős szöveti károsodást képesek okozni.

Az adenosin gátolja a létrejött szuperoxid anionok termelését, amit a sejtfelszínen levő receptorokon keresztül visz végbe (Cronstein és mtsai, 1983). További tanulmányok támasztották alá, hogy az adenosin az A_{2A} receptorra hatva gátolja a gyulladás által stimulált neutrofilejt adhéziót, az ölé képességet, az endotélsejtek és más sejtek baktericid aktivitását, az apoptózist, az adheziós molekulák expresszióját, a citokinek termelését, a growth (növekedési) faktorok és LTB_4 szintézisét (Cronstein és mtsai, 1994; Flamand és mtsai, 2000). Összességében az A_{2A} receptorok hatását azzal magyarázzák, hogy képesek jelátvitelt létesíteni a cAMP-dependens útvonalakon. Úgy tűnik az összes A_{2A} receptoron ható adenosin jelátvitel befolyásolja a neutrofilek összes funkcióját szintén cAMP-n keresztül (Sullivan és mtsai, 1999; Thibault és mtsai, 2002). Mások szerint az adenosin receptorok lefoglalása gátolja a neutrofilejtek szuperoxid anion termelését cAMP-től independens mechanizmusokon, amihez a membránasszociált foszfataz és a kemoattraktív receptorok deszenzitizációja is tartozik. Úgy tűnik a neutrofileknek lehet több adenosin receptora is. Ha A_1 receptort expresszálnak és ezeket elfoglalják, akkor fokozzák a neutrofilek kemotaxisát és a fagocitózist. Általában az adenosin gyulladásgátló hatását az A_{2A} receptoron keresztül fejt ki, ami dominálja az A_1 receptorokat. A neutrofilek A_{2B} receptorokat is expresszálnak. Ha ezek el vannak foglalva, akkor gátolják a vaszkuláris endotélsejtek növekedési faktor kibocsátását és a neutrofilek transzmigrációját az endotélsejteken keresztül. (Wakai és mtsai, 2001). Az A_3 receptorok jelenlétét vitatják a neutrofileken. Nemrég megjelent tanulmányok kimutatták, hogy az A_3 receptorok expresszálódnak humán neutrofileken, de nem sikerült kimutatni a receptorok pontos szerepét.

Az adenosin ellentétes módon szabályozza a neutrofilejtek működését. Az A_1 receptoron át immunstimulációs hatást fejt ki, míg az A_{2A} -n immunszuppresszív hatásokat. Ez az ellensúlyozó hatás abban nyilvánul meg, hogy az adenosin elősegíti a gyulladásos válaszokat ott, ahol alacsony koncentrációban van jelen, mint például a sejtekben szegény dermisben, vagy olyan helyeken, ahol nettó felvétele és metabolizmusa nagyobb, mint termelése, mint például a bakteriális infekció helyén. Ha egyszer a neutrofilek eljutottak oda, ahol a szöveti károsodás már kifejezett, és az

adenozint nagy mennyiségben termelik, akkor feed-back-ként gátolja a gyulladásos neutrofilek működését. (Haskó és Cronstein, 2004)

A hízósejteket az IgE mediálta immunválasz során ismertük meg, ennek ellenére lényeges szerepük van a baktériumok elleni felismerés és a gyulladás folyamatában is (Feger és mtsai, 2002). A hízósejtek kivételt képezhetnek a szabály alól, hogy az adenzin egy szöveti protektor és immunszuppresszív hatású molekula, mivel ebben az esetben egy erős hízósejtfunkció stimulátor. (Haskó és Cronstein, 2004) Az adenzin főleg az A_{2A} és A₃ receptorok elfoglalásával hízósejt degranulációt okoz, ami hisztamin, szerotonin, kemokinek és a gazdaszervezetre káros proteázok felszabadulását eredményezi (Ramkumar és mtsai, 1993; Hannon és mtsai, 1995; Jin és mtsai, 1997; Feoktistov és mtsai, 2003; Salvatore és mtsai, 2000). A hízósejt adenzin receptorainak stimulálása a hisztamin kibocsátást követően csökkentheti a makrofágok TNF- α termelését, negatív feed-back hatással, és ezzel a gyulladást is, amit a makrofágokon jelenlevő H₂ hisztamin receptorokon keresztül szabályoz (Smith és mtsai, 2002). A hízósejtek adenzin- receptorainak stimulálása során kialakult gyulladásos hatás, ami főleg hosszan tartó, magas adenzin koncentrációk miatt alakulhat ki, úgy tűnik, felülmúlja a gyulladásgátló potenciált. (Blackburn és mtsai, 2000; Chunn és mtsai, 2001; Blackburn, 2003). Ez a megfigyelés alátámasztja azt a tényt, hogy asztmában miért emelkedett a pulmonális adenzin szint és az adenzin receptorok expressziója, valamint, hogy a fokozott adenzin jelátvitel egy fontos jellegzetessége az asztmának és a COPD-nek. (Huszár és mtsai, 2002; Vizi és mtsai, 2002; Blackburn, 2003). Ebből következik, hogy egyes betegségekben, mint például az asztma, COPD és szepszis, ahol hosszú távon emelkedett az endogén adenzinszint, hatékony megoldás lehet az adenzinerg jelátvitel csökkentése (Haskó és mtsai, 2002).

Adenzin receptorok a perifériás mononukleáris sejtekben

A perifériás mononukleáris sejtek a keringésben teljesítenek védekezési szerepet. Monociták, limfociták és makrofágok vesznek részt és közvetítik az immunrendszer számára az információkat és effektorsejtként a gyulladást szabályozzák és alakítják.

Az IL-1 az egyik legfontosabb pro-inflammációs citokin, termelése főleg a monocitákban és makrofágokban történik. A gyulladás akut fázisában az IL-1 a limfociták proliferációját indítja be, az antitestek és IL-6 termelését, a fagociták és

endotéliális sejtek aktivációját, valamint lázat okoz (Dinarello, 1991; Colotta és mtsai, 1998). A monocitákban és makrofágokban, főleg a bakteriális lipopoliszacharidok (LPS) és TNF- α stimulációjának hatására IL-1 β termelődik. Ezek a pro-inflammációs stimulusok beindítják az IL-1 β prekursor fehérjének (pro-IL-1 β) a szintézisét, melynek a molekuláris tömege 31-kD. A maturációs folyamat során egy enzim, a caszpáz-1, széthasítja a pro-IL-1 β -t, amiből egy biológiailag aktív forma jön létre, az érett, aktív IL-1 β , melynek molekuláris tömege 17 kD. A citokin ezen aktív formája képes gyorsan kiürülni a sejtekből, egyelőre nem azonosított mechanizmus folytán (Perregaux és mtsai, 1996).

Számtalan olyan endogén és exogén anyagot írtak le, melyek csökkentik az IL-1 β kibocsátását, csökkentve a gyulladásos folyamatot is. Az adenzinnak fontos szerepe van a gyulladásgátló anyagok között. Egy sor korábbi vizsgálat kimutatta, hogy az A_{2A} receptorok által közvetített jel csökkenti a TNF- α , IL-6 és IL-8 kibocsátását (Bouma és mtsai, 1996; Zidek, 1999). Ezen receptorok befolyásolása fontos célpontként szolgálhat, ha a gyulladásos válasz csökkentését szeretnénk elérni (Okusa, 2002; Victor-Vega és mtsai, 2002; Lukashev és mtsai, 2004). Több tanulmány leírta, hogy adenzin hatására (Haskó és mtsai, 1998) IL-12, IFN γ (Haskó és mtsai, 2000; Link és mtsai, 2000; Le Moine és mtsai, 1996) és IL-10 (Sajjadi és mtsai, 1996) termelődnek. Jelen pillanatban még nem ismeretes az adenzin pontos hatása, melyet a monocitákból történő IL-1 β kibocsátásában gyakorol (Zidek, 1999). Az A₁ és A₂ receptor agonisták vizsgálatából, úgy tűnik az IL-1 β indukálja a TNF- α kibocsátását (Bouma és mtsai, 1994), valamint az A₃ receptor agonisták szerepét is vizsgálták más citokinek hatásával együtt az IL-1 termelésében (Haskó és mtsai, 1998; Sajjadi és mtsai, 1996). Az endogén nukleozid, az adenzin hatását a sejtekre legalább három G-proteinhez kötött receptor altípuson át fejti ki, melyet A₁, A_{2A}, A_{2B} és A₃ receptorokként ismerünk (Dinarello, 1991; Colotta és mtsai, 1998; Perregaux és mtsai, 1996; Bouma és mtsai, 1994; Zidek, 1999).

Az A_{2A} receptor jelen van a gyulladásban résztvevő szinte összes sejten, így a monociták és makrofágokon, valamint a T-sejteken is. Az extracelluláris ATP, más anyagokhoz hasonlóan (PGE₂, VIP= vasoactive intestinal peptide, PACAP= pituitary adenylate cyclase-activating peptide, hisztamin) immunszuppresszív hatást fejt ki számos sejtre, mint a makrofágok, dendritikus sejtek és T sejtek. Ezt a hatást az intracelluláris cAMP szint növekedésével magyarázzuk, amit az adenilcikláz enzimszint

felszaporodása válthat ki (Di Virgilio és mtsai 2001, Harris és mtsai 2002, Jutel és mtsai, 2002, Pozo, 2003).

Az A_{2A} receptor agonisták csökkentik a monociták és makrofágok által termelt TNF- α mennyiségét (Moore és mtsai, 2008). A TNF- α expressziójának csökkentésével az A_{2A} agonisták gátolják és csökkentik az endotélium gyulladás okozta károsodását (Moore és mtsai, 2008).

A makrofágok és dendriticus sejtek specializált fagociták, melyeknek a legfontosabb szerepük az apoptotikus sejtek és a károsodott molekulák eltakarítása és az infekciók elleni védekezés. A dendriticus sejtek, APC (antigen presenting cells) az egész szervezetben jelen vannak, főleg ott, ahol a kórokozónak behatolási lehetősége van. Ők az elsők, akik elfogják és feldolgozzák az antigént, majd aktiválják a specifikus limfocita-effector rendszert. Ezek az aktivált limfociták aztán együttműködnek a makrofágokkal, hogy megkönnyítsék a patogén elpusztítását. Talán az egyik legfontosabb felfedezés az APC-k immunológiáját illetően a pattern recognition receptorok (PRRs) leírása, melyeknek szerepük van olyan elemek felismerésében és feldolgozásában, melyeket „tartós ismétlődő bakteriális elemnek” (conserved repetitive microbial elements) neveztek el. Ilyenek a LPS, a CpG DNA, és a vírus RNA is. Ezekhez az elemekhez tartoznak a Toll-like receptorok (TLRs), a mannózkötő lectinek és a scavenger receptorok (Janeway és mtsai, 2002). A legújabb kutatások bizonyították, hogy az adenzin receptorok elfoglalása során keletkezett jelek kapcsolatba állnak az intracelluláris folyamatokkal, melyeket a PRR-ok aktivált. A monocitákon és makrofágokon levő adenzin receptor megkötése erősen csökkenti az IL-12 termelését, mely a LPS hatására indult be a TLR4-n keresztül. Mivel az IL-12 az egyik legerősebb gyulladáskeltő citokin, az adenzin által történő IL-12 szuppresszió az egyik központi mechanizmusa a szövetekben kialakult gyulladás gátlásának. Ezen felül az adenzin receptorok stimulációja csökkenti a TLR4 indukálta gyulladásos mediátorok felszabadulását, mint a TNF- α , MIP-1 α és a nitric oxid, valamint fokozza a gyulladásgátló IL-10 termelését. (Haskó, 1996; Sajjadi és mtsai, 1996; Mayne és mtsai, 2001; Szabó és mtsai, 1998).

A_{2A} és A₃ receptor hiányos egereken igazolták, hogy mindkét receptornak szerepe van a TLR stimulációját követő gyulladás csökkenésben. Ezen felül az is igazolódott, hogy az A_{2A} receptornak szerepe van az IFN- γ kiváltotta iNO és MHC II expressziójának a down-regulációjában. Akárcsak a neutrofileknél, bizonyos esetekben az adenzinnak az

APC-re is lehet aktiváló hatása. Ha az APC még nem érett és nem stimulálja a TLR, akkor az adenzin elősegíti a kemotaxist, ami úgy tűnik az A_3 receptoron keresztül történik és fokozódó intracelluláris kalciumszinttel és aktin visszarendeződésével társul. Ez a hatás is protektívnek fogható fel, mivel az éretlen APC-k toborzása a helyszínre, az immunválasz során egy korai stimulus ahhoz, hogy az immunsejtek megjelenjenek a helyszínen és védekezhessenek a kórokozókkal szemben. Az érett APC esetében az adenzin gátolja a TLR mediálta IL-12 termelését, csökkentve ezzel a gyulladást és a pusztítás mértékét. A dendritikus sejtek adenzin jelenlétében csökkentik kapacitásukat, hogy a T sejtek Th_1 irányba differenciálódjanak. Ez az adenzinnak egy másik szuppressziós mechanizmusa, amivel a gyulladást csökkenti, hiszen a Th_1 sejtek erősen fokozzák a makrofágok indukálta gyulladási választ. (Panther és mtsai, 2003).

Adenzin szerepe az arachidonsav felszabadulásban

Az arachidonsav (AA) a foszfolipidekből szabadul fel különböző foszfolipáz A_2 (PLA₂) enzim hatására. A gyulladásban résztvevő lipid mediátorok termelésében az arachidonsavnak központi szerepe van, mivel prekursora a leukotriéneknek, lipoxinoknak, thromboxánoknak és prosztaglandinoknak, de közvetett módon a PAF (vérlemezkék aktiváló faktora) termelésében is részt vesz. Az arachidonsav számtalan jelátvivő elemet szabályoz, ide tartoznak a foszfolipáz C, sfingomielináz és néhány protein kináz C (PKC) isoformája is (Dennis, 1997; Leslie, 1997; Wu és mtsai, 1994; Sipka és mtsai, 2001). Humán perifériás mononukleáris sejtek (monociták és limfociták) szuszpenziójában, a monociták szinte az egyetlen arachidonsavat termelő sejtek (Sipka és mtsai, 2001), mivel a citoszolban levő PLA₂, az intracelluláris arachidonsav termelésének fő enzime hiányzik az érett T sejtekből (Gilbert és mtsai, 1996).

A gyulladás indukciójában és szabályzásában a citokineknek szintén jelentős szerepük van. Az adenzin gátolhatja pár pro-inflammációs citokin termelését és kibocsátását közvetlenül vagy adenzin receptor agonista hatására (Bouma és mtsai, 1994; Okusa, 2002; Victor-Vega és mtsai, 2002; Haskó és mtsai, 1998; Haskó és mtsai, 2000; Link és mtsai, 2000; Sajjadi és mtsai, 1996).

Fontos együttműködés létezik az IL-1 β , adenzin és az arachidonsav termelése között. Ismert, hogy az IL-1 β az arachidonsav termelésnek egyik legerősebb endogén

stimulátora (Chang és mtsai, 1986; Morri és mtsai, 1994). Másrészt az is ismert, hogy az A_1 , A_{2A} és A_3 adenosin receptorok ingerlése erősen gátolja az IL-1 β kibocsátását aktivált humán monocitákból (Sipka és mtsai, 2005).

Korábban nem írtak le arra vonatkozó adatokat, hogy az adenosin receptor altípusok milyen hatással vannak az arachidonsav termelésében és, hogy a különböző adenosin receptorok altípusainak stimulációja hogyan hatnak a humán monociták arachidonsav termelésére főleg, ha forbol észterrel és Ca^{2+} ionoforral stimulálják őket. (Sipka és mtsai, 2007)

A tüdőszövet gyulladásos történéseinek két, egymástól távol eső megnyilvánulásának az egyik szélén az ARDS (adult respiratory distress syndrome) áll, melyet egy nagyon erőteljes polimorfonukleáris aktiváció jellemez, a másik szélén pedig az asztma, ahol a gyulladás krónikus. E két folyamat patomechanizmusa nagyon távol van egymástól, de ami hasonló bennük az, hogy a szervezet nem képes a gyulladást korlátozni (Ware és mtsai, 2000). A gyulladásos válasz szerepe protektív és közélről beavatkozik az érintett szövetek helyreállításába, homeosztázisába (Haworth és mtsai, 2007). A rezolúciós fázis, a helyreállítás, egy aktív, jól irányított és komplex folyamat, mint a gyulladás kezdete és fennállása. Maga a rezolúció már a gyulladás kezdetén beindul, különböző, bioszintézissel járó folyamatok révén, melyek később ellenregulációs tulajdonsággal bíró kémiai mediátorokat termelnek és bocsátanak ki (Haworth és mtsai, 2007). Ezek a felszabaduló molekulák különböznek a csak anti-inflammációs szereppel rendelkező molekuláktól, mivel ezek a rezolúciót segítik és hozzájárulnak a szöveti katabolizmushoz, melynek eredménye a szövetrestauráció. (Serhan és mtsai, 2007(1); Serhan és mtsai, 2007(2)).

A LTB₄ a polimorfonukleáris sejtek igen erős aktivátora, egy lipid mediátor, mely a gyulladásban és a gazdaszervezet védekezési mechanizmusában játszik jelentős szerepet. A vérben levő polimorfonukleáris sejtek által de novo termelt LTB₄ szabályozza a leukociták transzmigrációját (Marleau és mtsai, 1999). A LTB₄ nemcsak a leukocitákat aktiválja és toborozza a gyulladás helyére, de fontos szerepe van a kórokozókat tartalmazó partikulák eltávolításában is, mivel az 5-LO knock-out egerek fokozott fertőzési veszélyét észlelték (Mancuso és mtsai, 2001; Haribabu és mtsai, 2000). Az arachidonsav indukált LTB₄ bioszintézist az A_{2A} receptor izgatása, valamint agonistája (CGS-21680) erősen gátolja (Grenier és mtsai, 2003).

A human polimorfonukleáris sejtek stimulációja különböző szolubilis agonistákkal és fagocita stimulátorokkal megnöveli az intracelluláris szabad Ca és a cPLA₂-mediálta arachidonsav kibocsátását. (Dennis, 2000). Az adenzin A_{2A} receptorain keresztül nagyon erős polimorfonukleáris funkciógátló hatást képes kifejteni. (Cronstein és mtsai, 1994; Flamans és mtsai, 2000).

Ismert, hogy polimorfonukleáris szuszpenzió olyan mennyiségű adenzint bocsát ki, amely képes gátolni az arachidonsav kibocsátást és az LTB₄ termelését, melyek formil-Met-Leu-Phe (FMLP) és PAF stimuláció vagy exogén stimulus hatására termelődtek (Krupp és mtsai, 1997; Surette és mtsai, 1999).

Granier és mtsai 2003-ban kimutatták, hogy az A_{2A} receptorok elfoglalása gátolja a PLD által aktivált arachidonsav és a LTB₄ szintézist.

Az adenzin a légutakban a CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) protein egyik fontos szabályozója. Az adenzin receptorok stimulációja révén a légúti felületi folyadék, ASL (airway surface liquid) mélységét és összetételét szabályozza. (Tarran és mtsai, 2002; Lazarowski és mtsai, 2004; Tarran és mtsai, 2005). Az adenzin számtalan funkciót szabályoz, többek között a szöveti gyulladás alakulását és az epitélium sejtjeinek ion transzportját (Cobb és mtsai, 2003). Újabb adatok alapján az A_{2B} adenzin receptorok stimulálása aktiválja a PLA₂-t, ami a CFTR in vivo és in vitro szabályozásában vesz részt (Hentchel-Franks és mtsai, 2004, Cobb és mtsai, 2002 (1); Cobb és mtsai, 2002 (2)).

Yao Li és mtsai (2006) szerint szoros összefüggés létezik az adenzin, az CFTR és az arachidonsav metabolitok termelése között a humán légutak sejtjeiben. Ezt az A_{2B} adenzin receptorok szabályozzák úgy a cAMP/PKA, mint az AA/cPLA₂ útvonalon. Az adenzin egy fontos „útkereszteződést” képez ebben a szabályozásban, valószínűleg összeköti a CFTR regulációt a légútban terjedő gyulladásos folyamat terjedésével. (Yao Li és mtsai, 2006).

5. CÉLKITŰZÉSEK

A pulmonális adenosin receptorok fontos szerepet játszanak a bronchiális funkciók élettani szabályozásában, de komoly szerepük van az asthma bronchiale, COPD és más főleg gyulladásos jellegű tüdőbetegség patomechanizmusában is. Az adenosin receptorok – mint általában a G-proteinhez kötött receptorok – a receptoriális szabályozásnak erősen ki vannak téve. Az asthma bronchiale és a COPD folyamataiban részvevő mononukleáris sejtek adenosin receptorai fontos szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok szabályozásában, tehát alapos elemzésük jogosnak tűnik.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen mértékben befolyásolja a krónikus metilxanthin kezelés az izolált légúti szövetek adenosin reaktivitását a kezelés folyamán? Mennyiben függenek a létrejött változások az epitélium jelenlététől? (asztmás folyamatban az epitélium károsodása, részben denudálása következik be!)
2. Megvizsgálni a xanthin-rezisztens, intracelluláris kötőhelyeknek a farmakológiai tulajdonságait és befolyásolhatóságát. Mindemellett célunk volt annak felderítése is, hogy az adenosin szimulátor hatásában van-e szerepe a xanthin-rezisztens A_3 receptorok aktivációjának.
3. Elemezni a különböző adenosin receptor altípusok szerepét a perifériás monociták IL-1 β felszabadításában.
4. Elemezni a különböző adenosin receptor altípusok aktivációjának hatását a monociták arachidonsav felszabadulására.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. Anyagok

A kísérletek során a következő vegyületeket használtuk: AA861, adenzin, koffein, capsaicin, kromolin sodium, diclofenac sodium, dipiridamol, indomethacin, methacholin chlorid, N- carboximetil- Phe- Leu, nordihidroguaiaretic sav (NDGA), foszforamidon, thiorfan, N^6 -ciclopentiladenosine (CPA), 5'-N -etilcarboxamido-adenozin (NECA), forbol 12-mirisztate 13 acetát (PMA), kalcium ionofór (A23187) (Sigma Chemicals, U.S.A), 2-*p* - [2-carboxyethyl]-amino-5'-N-ethylcarbox-amido-adenosine (CGS 21680), N^6 -(3-iodobenzyl)-5-(N-methylcarbox-amido-adenosine (IB-MECA), 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX), 3-ethyl-5-benzyl-2-methyl-4-phenylethyl-6-phenyl-1,4 - (+) dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (MRS-1191) (Research Biochemicals, Inc. U.S.A.), 4-(2-[7amino-2-(furyl)[1,2,4]triazolo [2,3,] [1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (ZM 243185) (Tocris, U.S.A.), ELISA kit for IL-1 β (Amersham, U.K.). RPMI-1640 culture medium, fetal calf serum (GIBCO BRL, UK).

6.2. Kísérleti állatok és kezelésük

Kísérleteinkben 440-590 g súlyú hím tengerimalacokat használtunk fel. Az állatokat szabványos ketrecekben helyeztük el, ahol az állatok ételt (standard tengerimalac lucerna pelletet) és folyadékot *ad libitum* fogyaszthattak. A 12 órás nappali és éjszakai ciklust az állatok részére mesterségesen biztosítottuk.

Azon kísérletek esetében, ahol nem volt szükség előkezelésre, az állatoknál a szokásos gondozáson és megfigyelésen kívül más kezelést nem alkalmaztunk. A krónikus koffeinkezelésnek kitett állatok esetén 2 kísérleti csoportot állítottunk be. Mindkét csoport állatait (kontroll és a koffeinnel kezelt) egymástól elkülönítve helyeztük el a ketrecekben. Az állatok ételt és folyadékot *ad libitum* fogyaszthattak. A tengerimalacokon két csoportban végeztünk előkezelést. Az állatok egyik csoportja 20 g/l szacharóz oldatot ivott *ad libitum*, a másik csoportnál a szacharóz oldat 600 mg/l koffeint tartalmazott (a szacharóz adása a koffein keserű ízének elfedésére szolgált). A feldolgozás előtt az állatokat egy 24 órás wash-out periódusnak vetettük alá,

amikor csak szacharózos vizet kaptak, tehát a preparátumok nem tartalmaztak koffeint olyan mennyiségben, amely a vizsgálatokat zavarta volna. A kezelés alatt különböző időközönként folyamatosan mértük a kezelt tengerimalacok szérumban koffeinszintjét.

6.3. Koffein meghatározás a szérumban

A vér koffein szintjének meghatározása HPLC módszerrel történt a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén a következő módon: 0,5 ml szérumhoz 2 ml metanol adtunk, majd összekeverés után 30°C-os hőmérsékleten inkubáció következett. Az így kapott mintát centrifugáltuk 100 g-vel 10 percig. Ezután a felülúszót eltávolítottuk és folyamatos nitrogénáramlás alatt szárítottuk. A száraz üledéket feloldottuk 0,5 ml metanolban és az oldatot tovább hígítottuk 0,5 ml bidesztillált vízzel. Ezt követően szűrtük és befecskendeztük a Milton Roy CM 4000 HPCL rendszerbe, ami Waters UV 440 detektorral (254 nm) volt felszerelve. A mintákat a Waters Spherisorb C-18 (ODS2) oszlopon (5 µM; 4,6 mm x 250mm) kromatográfiás készüléken vizsgáltuk, melynél a mobil fázis metanol: víz 50:50 arányú elegye volt. Az áramlási sebesség 1 ml/perc, a retenció idő 4,5 perc, a hőmérséklet 35°C volt.

6.4. A szövetek előkészítése

A tengerimalacokat Na-pentobarbitáttal (50 mg/kg i.p.) altattuk. A mellkas megnyitása után izoláltuk a tracheát, azt a rajta levő zsírtól, környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd longitudinális metszéssel megnyitottuk a simaizommal (pars membranacea) ellentétes oldalon levő porcokat. Amennyiben szükséges volt, a trachea lumen felületéről (mind a simaizom, mind a porc felett) az epitéliumot enyhe dörzsöléssel eltávolítottuk (fémrúdra applikált vattacsomóval). Az így kapott trachea preparátumokat 10 cm³ űrtartalmú, vertikális-kiképzésű szervfürdő rendszerbe (THSZ-02, Experimetria, Budapest) helyeztük. Tápoldatként Krebs oldatot használtunk (36°C), melynek összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; NaH₂PO₄ 1,0; MgCl₂ 1,2; NaHCO₃ 24,9 és glükóz 11,5. A tápoldatot 95%-os O₂ és 5%-os CO₂ elegyével oxigenizáltuk az ekvilibrációs periódus folyamán, ezáltal az oldat pH-ja 7,4-re állt be. Minden kísérletet

(amennyiben a kísérleti feltételek nem kívántak meg más kezelési módot) 10 μM dipiridamol jelenlétében hajtottuk végre a membránális purin transzport gátlása céljából. Ezáltal igyekeztünk elkerülni az intracelluláris adenzin zavaró hatását. A szöveteket 10 mN-os előfeszítés mellett függesztettük fel és 90 perces előinkubációs periódust alkalmaztunk, amelynek során a kontraktilitási paraméterek stabilizálódtak. A vegyületek alkalmazása ebben az egyensúlyi állapotban történt. A tenzióváltozás mérése izometriás mechanoelektromos transzducer (SG-01 D, Experimetria, Budapest) segítségével történt.

Kísérleteink egy részét a Fernandes és mtsai (1989), Eglén és mtsai (1991), és Hay és mtsai (1992) által leírt módszerek módosításával coaxiális bioassay rendszerben végeztük. Ez a bioassay tartalmazta az ép epitéliumú vagy az epitélium-fosztott tengerimalac tracheát (donor preparátum) és az epitélium nélküli kontroll tracheát (szenzor). A donor tracheát hosszanti metszéssel átvágtuk és félig nyitott állapotban tartottuk, amelyhez egy speciális kisméretű polietilén távtartót használtunk. Ezzel a módszerrel elkerülhető volt az esetleges mechanikai súrlódás a szenzor trachea és a donor preparátum között. Mindemellett ez a módszer lehetővé tette a különböző anyagok intenzívebb diffúzióját a donor preparátum lumenébe.

6.5. Kísérletes protokoll

A kísérletek során a mechano-elektromos jeleket folyamatosan regisztráltuk. A koncentráció függvényében, emelkedő metakolin koncentrációkkal (0. 1- 10 μM) dózis-hatás görbét vettünk fel. Az ezt követő 40 perc alatt a szöveteket 10 percenként átmostuk, majd a preparátumokat kontraháltattuk metakolinnal (0.3 μM) és addig várakoztunk, amíg be nem állt az egyensúlyi állapot. Ebben a prekontrahált állapotban adenzinnal (ill. a megfelelő adenzin analógokkal) kumulatív dózis-hatás görbét vettünk fel. Mosás után a preparátumokat 50 percig inkubáltuk a megfelelő specifikus vegyületekkel, majd a szöveteket metakolinnal ismét kontrakcióba hoztuk. Ebben az állapotban ismételtén felvettük az adenzin koncentráció-hatás görbéjét. A második adenzin dózis-hatás görbe felvétele után papaverint adtunk a preparátumok tápoldatához és regisztráltuk a maximális relaxáció kialakulását. Az adenzin (ill. a vizsgált speciális analógok) effektusát a 100 μM papaverin által létrehozott maximális relaxáció %-ában fejeztük ki.

A kísérletekhez szükséges MAB engedélyek száma: DE MAB 45/2001 és 7/20033.

6.6. Perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) preparálása humán vérből

Boyum metodikája szerint (1968) mononukleáris sejt szuszpenziókat (átlagosan: 88-95% limfocita, 5-12% monocita) preparáltunk egészséges önkéntesek perifériás vérmintáiból. A különböző szuszpenziók megoszlási viszonyait áramlási citometriával ellenőriztük. A mononukleáris sejtek százalékos megoszlása átlagosan a következő volt: CD3⁺: 69,4%, CD19⁺: 13,5%, CD56⁺: 9,8% ill. CD14⁺: 8,3% (Coulter EPICS XL, flow cytometer, U.S.A.).

6.7. A perifériás vér mononukleáris sejtek stimulációja

Sejtkultúra edényenként 5×10^5 sejtet tartalmazó szuszpenziót RPMI-1640 mediumban tenyésztettünk, amelyet kiegészítettünk alacsony LPS tartalmú 10% foetalis borjú szérummal (plusz 80 µg/ml gentamycin és 2mM glutamine) megfelelően párasított közegben 5% CO₂ jelenlétében és 37°C-on. Minden mintát triplikátumban használtunk fel. A stimulációt 50 ng/ml PMA-val és kalcium ionoforral (A23187) történő 4 órás inkubációval váltottuk ki.

6.8. Az IL-1β felszabadulás mérése a perifériás mononukleáris sejtek stimulált szuszpenziójából

Az IL-1β koncentrációját a sejtmentes felülúszóból határoztuk meg ELISA kit segítségével (Amersham, G. B.) és az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki.

6.9. A perifériás mononukleáris sejtek kezelése adenzinnal ill. altípus-szelektív adenzin analógokkal

Az adenzint és a különböző adenzin receptor altípusokra specifikus vegyületeket 15 perccel adtuk a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióhoz a PMA+ kalcium ionofor stimuláció előtt. Szelektív adenzin A_{2B} receptor aktivátor hiányában különböző koncentrációjú NECA-t (az A₁ és A₂ receptorok nem-specifikus

agonistája) alkalmaztunk 0,3 μ M koncentrációjú DPCPX (A_1 receptor antagonist) és 0,1 μ M ZM 243185 (szelektív A_{2A} receptor antagonist) jelenlétében, amely vegyületeket 15 perccel alkalmaztunk a NECA beadása előtt. Az A_3 receptorok esetében az antagonistát (MRS 1191; 10 nM) szintén 15 perccel korábban alkalmaztuk a szelektív agonista IB-MECA applikációja előtt. A másik két agonistát, a CPA-t és a CGS 21680-at szintén 10 nM koncentrációban használtuk. Az antagonisták koncentrációit előzetes kísérletek tapasztalatai alapján határoztuk meg.

A nem stimulált minták esetében a tenyésztőoldat felülszóját használtuk, amely az aktivált minták esetében használt koncentrációjú dimetilszulfoxidot (DMSO) tartalmazott (PMA és kalcium ionofor nélkül). A plasztik felületről (sejttenyésztő edények) spontán felszabaduló IL-1 β mennyiségét minden esetben korrekcióba vettük. Az átlagos, felületi aktivitás miatt felszabaduló IL-1 β koncentrációja 12.4 ± 2.5 pg/ml volt. Meg kell jegyeznünk, hogy az oldószerként használt DMSO nem befolyásolta szignifikáns mértékben az IL-1 β produkciót.

6.10. A sejtek életképességének vizsgálata

A különböző vegyületek beadása után, az IL-1 β felszabadulás meghatározása előtt elvégeztük az ún. tripánkék exklúziós tesztet. Csak azokat a kísérletes mintákon dolgoztunk tovább, ahol a sejtek életképessége több mint 90 % volt.

6.11. Az arachidonsav felszabadulás mérése nem-stimulált és stimulált perifériás mononukleáris sejtek szuszpenziókból

6.11.1 Arachidonsav felszabadulás nem-stimulált sejteken.

A sejteket 24 szövetkultúra edénybe osztottuk szét (GIBCO, U.S.A) (0.5×10^6 cells/well; sejt/lyuk) és RPMI mediumba helyeztük (GIBCO, kiegészítve 1% foetális borjú szérummal, antibiotikumokkal és glutaminnal) 37°C-on steril 5% CO₂-ot tartalmazó közegben (ASSAB, Sweden). 0.1 μ Ci aktivitású ³H arachidonsavat (³H-AA) adtunk 0.5×10^6 sejtek 20 órán keresztül. A jelölés után a sejteket háromszor mostuk foszfát-pufferben (PBS) és ezt követően nyugalmi állapotban inkubáltuk 4 órán keresztül. Ezeket a sejteket a továbbiakban nem-stimulált kontrollnak tekintettük és

ezek sejtmentes felülúszóját használtuk $^3\text{H-AA}$ mérésekhez. Mivel a teljes radioaktivitást mértük, ezért nem volt lehetőségünk az arachidonsav és az arachidonsav metabolitok szétválasztására. A továbbiakban emiatt „arachidonsav és metabolitjai” elnevezést alkalmaztunk.

6.11.2 Arachidonsav felszabadulás stimulált perifériás mononukleáris sejteken

A 20 órán keresztül $^3\text{H-AA}$ -val inkubált sejteket 50 ng/ml PMA és 0.5 μM kalcium ionofór (A-23187) hozzáadásával aktiváltuk 37 °C-on 4 órán keresztül. A mintákat 10 percig (1200 rpm, fordulat/perc) centrifugáltuk és a szuszpenziót 5 ml TRITOSOL szcintillátorhoz adva, az aktivitást szcintillációs számlálóval mértük le (Packard 2200CA). $^3\text{H-AA}$ és a metabolitjainak a mediumba történt felszabadulását a teljes radioaktivitás mérése alapján detektáltuk. Az izotóp mérések értékeit a percenkénti bomlás mértékében fejeztük ki (dpm, decay per minute, percenkénti felbomlás) (Victor-Vega és mtsai, 2002)

6.11.3 A perifériás mononukleáris sejtek kezelése adenzinnal, CPA-val, CGS-21680-al és IB-MECA-val

A különböző koncentrációjú adenzint és adenzin altípus-szelektív agonistákat 15 perccel adtuk a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióhoz a nem-stimuláció előtt, ill. a PMA-val és a kalcium ionoforral történő aktiválás előtt. Az adenzinnal végzett kísérletekben 10 μM EHNA (ADA gátlószer) volt jelen az inkubációs médiumban, hogy kivédjük az adenzinnak az adenzin dezamináz általi bomlását. A szelektív A_{2B} adenzin receptor stimuláció elérésére NECA-t (nem-specifikus agonista A_1 és A_2 receptorokon) használtunk 0,3 μM DPCPX (A_1 receptor gátló) és 0.1 μM ZM-243185 (A_{2A} receptor gátló) jelenlétében, amelyeket a NECA beadása előtt 15 perccel alkalmaztunk. Az A_3 receptorok esetében az antagonistát (MRS 1191; 10 nM) szintén 15 perccel korábban alkalmaztuk a szelektív agonista IB-MECA applikációja előtt. A másik két agonistát, a CPA-t és a CGS 21680-at szintén 10 nM koncentrációban használtuk. Az antagonisták koncentrációit előzetes kísérletek tapasztalatai alapján határoztuk meg.

Kísérleteink egy speciális csoportjában a tenyésztőoldatot 0,2 U/ml adenzin dezaminázzal egészítettük ki, hogy a keletkező endogén adenzin zavaró hatását kiküszöböljük.

6.12. Statisztikai értékelés

Metakolinnal történő előkontrahálás után a preparátum mechanikai aktivitásában történő agonista által kiváltott relaxációt a prekontrakció %-ában fejeztük ki. 100%-os relaxációnak a papaverinnel kiváltott maximális hatást tekintettük. A dózis-hatás görbéket, amennyiben a hatások jellege ezt lehetővé tette, a non-lineáris regressziós analízis segítségével elemeztük. Az alábbi képletet alkalmaztuk: $E = E_{\max} [A]^n / ([A]^n + [EC_{50}]^n)$, ahol az E a hatást, az $E_{\max}$ a maximális hatást, az EC_{50} (a pD_2 tízes alapú negatív logaritmus), az $[A]$ félmaximális effektív koncentrációját, az nH pedig a görbe meredekségét jelenti ("midpoint slope parameter"). A számszerű eredmények közlésekor mindig a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Az EC_{50} értékeket végig a 10 alapú negatív logaritmusuk formájában jelenítettük meg (pD_2 értékek). A kísérletes csoportok közötti többszörös összehasonlításokat Newman-Keuls *post hoc* teszttel kombinált varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük. Az észlelt változások statisztikai szignifikanciáját a Student-féle kétmintás, ill. önkontrollós kísérletek esetén a páros t-próbával is vizsgáltuk (szignifikancia küszöb $P < 0,05$).

Az IL-1 β felszabadulásnak adenzin és az adenzin receptor agonisták általi változását a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióban a bazális IL-1 β produkció százalékában fejeztük ki. A pD_2 és $E_{\max}$ meghatározásokat non-lineáris regressziós módszerrel határoztuk meg.

Az arachidonsav és metabolitja felszabadulását az adenzin és analógjai hatására a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióban a bazális arachidonsav termelődés százalékában fejeztük ki. Az EC_{15} értékeket (a bazális arachidonsav produkció 15%-os csökkenéséhez szükséges agonista koncentráció) az agonista dózis-hatás görbék alapján lineáris regressziós analízissel határoztuk meg. A kísérletes csoportok közötti többszörös összehasonlításokat Newman-Keuls *post hoc* teszttel kombinált varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük. Az észlelt változások statisztikai szignifikanciáját a Student-féle kétmintás, ill. önkontrollós kísérletek esetén a páros t-próbával is vizsgáltuk (szignifikancia küszöb $P < 0,05$).

A szignifikancia feltétele a $P < 0.05$ volt (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

7. EREDMÉNYEK

7.1. A krónikus koffeinkezelés hatása az adenosin bronchiális hatásaira

7.1.1. A krónikus koffeinkezelés hatása a testsúlyra, a koffeinfelvételre és a mortalitásra

A tengerimalacok súlyának gyarapodásában a koffein nem okozott szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest. A koffein kezelt csoportnál az átlagos súlygyarapodás $2,5 \pm 0,4$, míg az oldószeres csoportnál $2,9 \pm 0,5$ g/nap volt. A kezelt állatok a 600 mg/l koffeinoldat fogyasztásával átlagosan napi $73,8 \pm 8,7$ mg/kg koffeint fogyasztottak ($n=43$). A 10 hetes kísérlet során nem találtunk különbséget a mortalitásban a kezelt és a kontroll tengerimalacok között (2,3 % ill. 2,8%).

7.1.2. Szérum koffein koncentrációk

A 3. naptól kezdve egyensúlyi állapot jött létre a szérum koffein koncentrációban, amelyik később is mind a 10 hetes kísérlet során konstans maradt ($39,1 \pm 3,9$ μM , $n=15$). Az állatoktól az extermináció előtt 24 órával a koffeint tartalmazó oldatot megvontuk. Az állatok feláldozásának időpontjában az átlagos szérum koffeinkoncentráció $3,5 \pm 0,4$ μM ($n=21$) volt. Az oldószerrel kezelt állatok széruma koffeint nem tartalmazott ($n=12$).

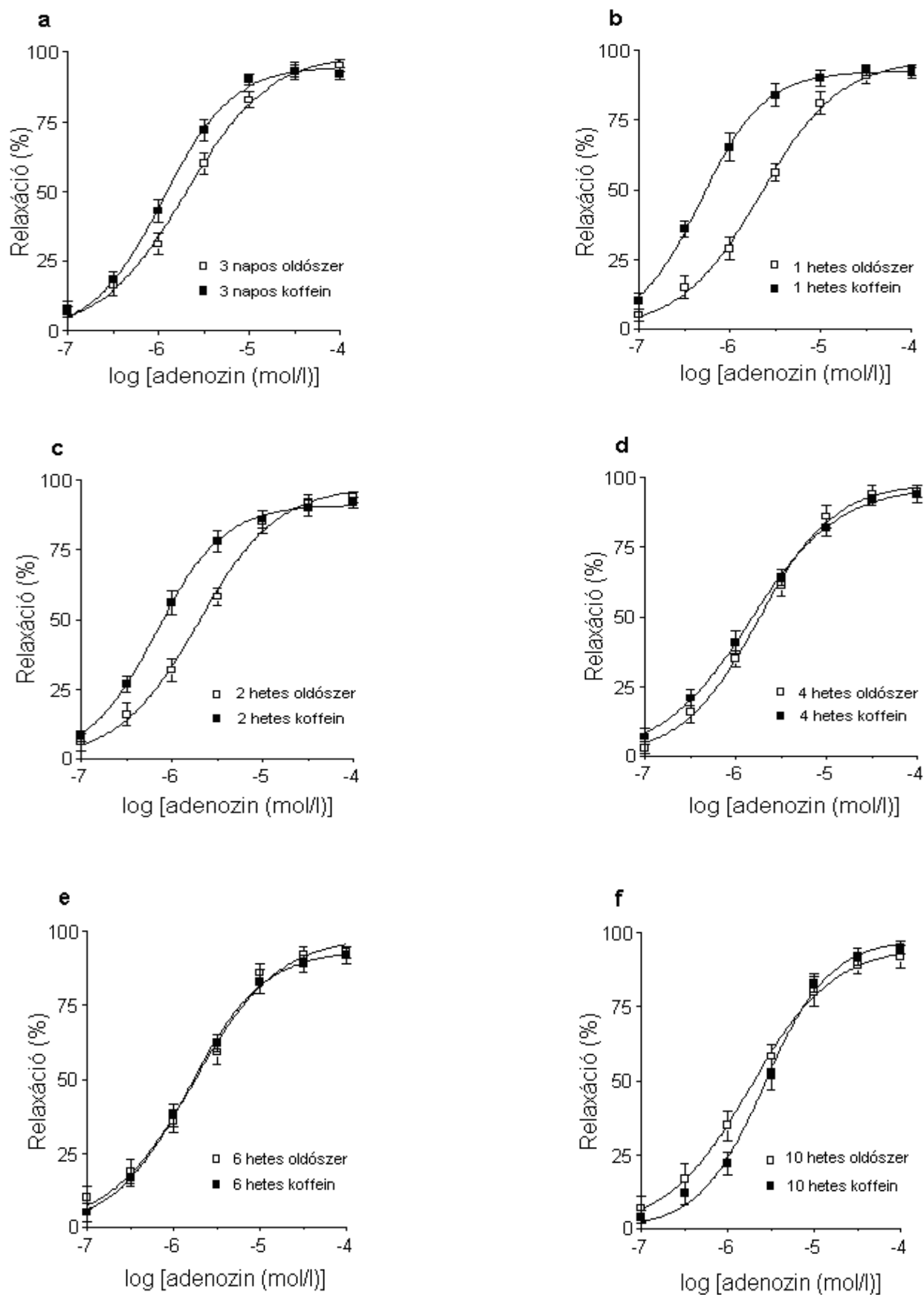
7.1.3. Az adenosin által létrehozott mechanikai válaszok változása ép epitéliummal rendelkező trachea preparátumokon tartós koffeinkezelés alatt

0,3 μM metakolinnal prekontrahált, izolált tengerimalac trachea preparátumokon az adenosin koncentrációfüggő (0,1-100 μM) relaxációt fejtett ki dipiridamol (10 μM) jelenlétében (membrán purintranszport gátló szer). Koffeinmentes oldattal való 10 hetes kezelésnél nem találtunk szignifikáns eltérést az adenosin pD_2 és E_{max} értékeinél (1.

Táblázat). 3 napos koffeinkezelés kissé balra tolta az adenosin koncentráció-hatás görbéit, de a pD_2 és E_{max} értékekben nem volt szignifikáns változás (**1a. ábra**). 1 hét után már mintegy 5-szörös balratolódás volt megfigyelhető (**1b. ábra**), de a maximális hatásban nem történt változás. Az adenosin iránti érzékenység a 2. héttől csökkenni kezdett (3-szoros balratolódás)(**1c. ábra**). Miután a koffeinkezelést folytattuk, azt figyeltük meg, hogy az adenosin indukálta relaxációban a további 2 hetes kezelést követően fokozatosan eltűnt a szenzitizáció. (**1d-1e. ábrák**). A 10 hetes koffeinkezelés után minimális, nem szignifikáns antagonistá hatás volt megfigyelhető az adenosin indukálta relaxációban a koffeinnel és az oldószerrel kezelt csoport között (**1f. ábra**).

7.1.4. Az adenosin által létrehozott mechanikai válaszok változása epitélium-fosztott trachea preparátumokon tartós koffeinkezelés során

Epitélium-fosztott trachea preparátumokon vizsgáltuk, hogy az epitélium milyen szerepet játszik a koffein kezelés során létrejövő szenzitizáció megszűnésében. 3 napos koffeinkezelésnél nem találtunk különbséget az adenosin indukálta válaszban a kontroll és a koffeinnel kezelt állatok trachea preparátumaiban (**2a. ábra**). Az első héttől kezdve már szignifikáns, 4-6-szoros balratolódás volt megfigyelhető a koffeinnel kezelt trachea simaizmok adenosinra adott válaszreakcióiban. Ez a fokozott adenosinérzékenység a 10 hetes kezelés alatt mindvégig megmaradt (**2b-2f. ábrák, 2. Táblázat**). A 2 hetes "kimosási periódus" után nem volt szignifikáns különbség a két kezelt csoportból származó szövetek válaszreakciói között, tehát a hatás reverzibilisnek bizonyult (az adatok nem láthatók).



1. ábra: Adenozin-indukált relaxáció tartós koffein kezelés során (ép epitélium)

1. Táblázat: Az adenosin koncentráció-hatás görbe farmakológiai paramétereinek változása ép epitéliummal rendelkező trachea preparátumokon tartós koffein kezelés során a koffeinnel és az oldószerrel kezelt csoportok esetében.

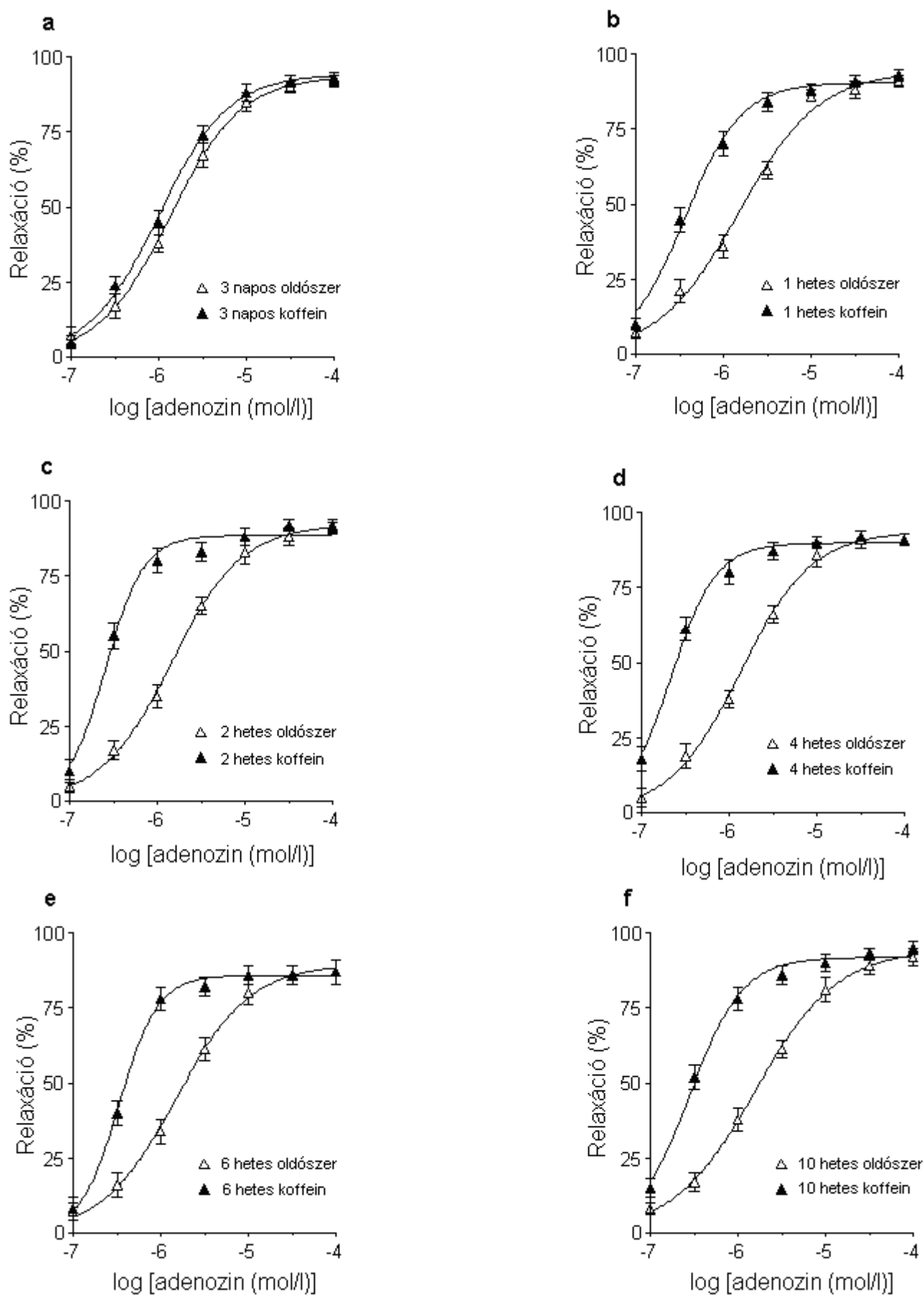
Az adatok a középértéket jelzik a standard errorral.

^a P <0. 05 összehasonlítás az oldószer-kezelt kontrollal

^b P <0. 05 az egységtől (1) való statisztikus eltérés

A statisztikai szignifikancia vizsgálatát Newman-Keuls post hoc teszttel kombinált varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük.

Paraméter	<i>Oldószeres kezelés</i>	<i>Koffeines kezelés</i>
3 napos:		
pD ₂	5,70 ± 0,08	5,94 ± 1,10
E _{max}	99 ± 2	95 ± 3
n	7	8
koncentráció arány		1,7 ± 0,8
1 hetes:		
pD ₂	5,65 ± 0,12	6,31 ± 0,08 ^a
E _{max}	97 ± 3	93 ± 2
n	7	8
koncentráció arány		4,6 ± 0,4 ^b
2 hetes:		
pD ₂	5,71 ± 0,14	6,17 ± 0,05 ^a
E _{max}	98 ± 2	91 ± 4
n	11	9
koncentráció arány		2,9 ± 0,3 ^b
4 hetes:		
pD ₂	5,77 ± 0,15	5,91 ± 0,12
E _{max}	97 ± 2	92 ± 4
n	7	8
koncentráció arány		1,4 ± 0,9
6 hetes:		
pD ₂	5,76 ± 1,08	5,83 ± 0,99
E _{max}	98 ± 2	93 ± 3
n	7	8
koncentráció arány		1,2 ± 0,8
10 hetes:		
pD ₂	5,75 ± 1,20	5,58 ± 1,10
E _{max}	96 ± 3	98 ± 2
n	7	8
koncentráció arány		-0,7 ± 0,3



2. ábra: Adenozin-indukált relaxáció tartós koffein kezelés során (epitélium-fosztás)

2. Táblázat: Az adenosin koncentráció-hatás görbe farmakológiai paramétereinek változása epitélium-fosztott trachea preparátumokon tartós koffein kezelés során a koffeinnel és az oldószerrel kezelt csoportok esetében.

Az adatok a középértéket jelzik a standard errorral.

^a P <0. 05 összehasonlítás az oldószer-kezelt kontrollal

^b P <0. 05 az egységtől (1) való statisztikus különbség szignifikanciája

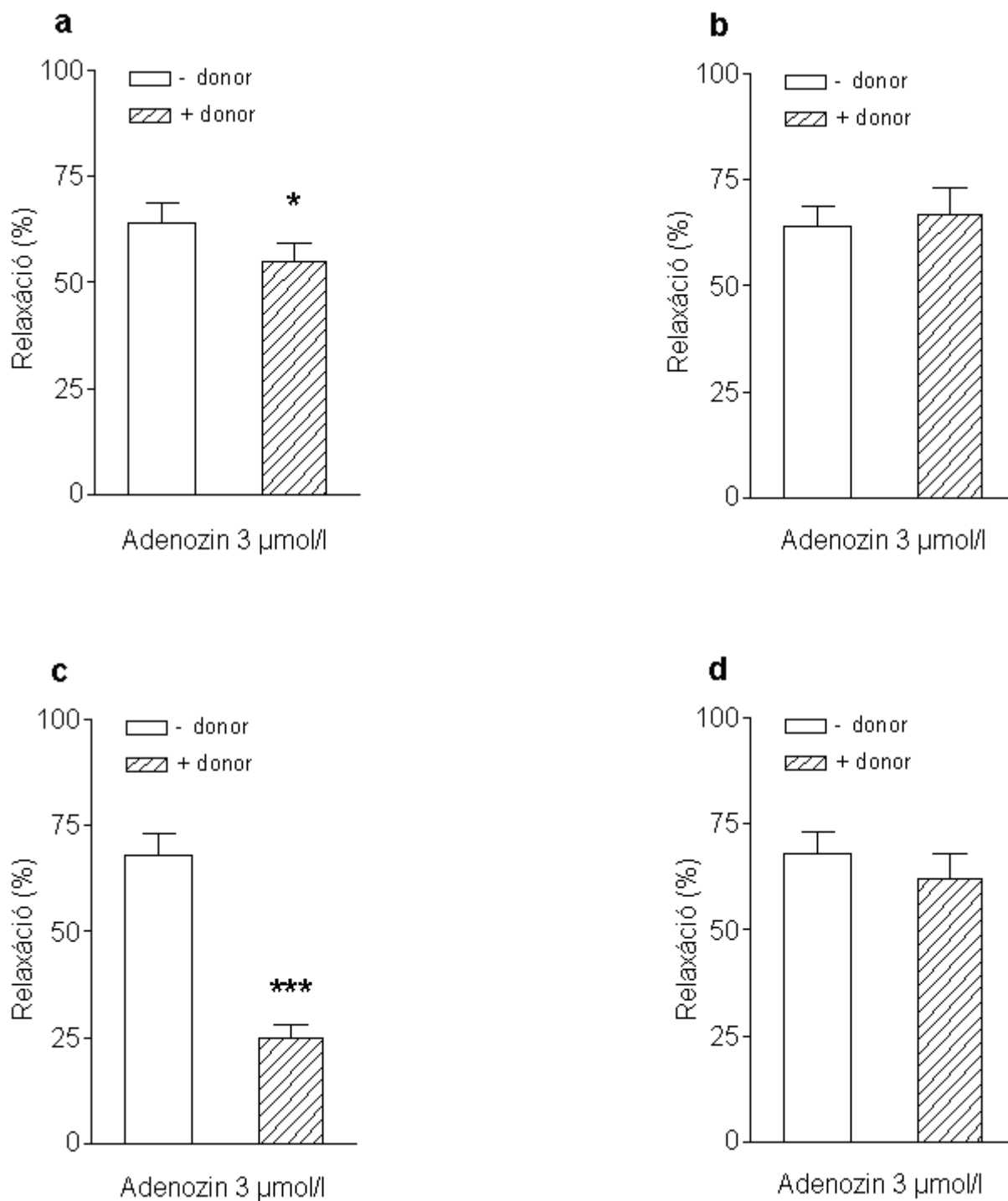
A statisztikai szignifikancia értékelését a Newman-Keuls post hoc teszttel kombinált varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük.

Paraméter	<i>Oldószeres kezelés</i>	<i>Koffeines kezelés</i>
3 napos:		
pD ₂	5,88 ± 0,18	6,01 ± 1,10
E _{max}	94 ± 2	94 ± 1
n	7	8
koncentráció arány		1,4 ± 0,4
1 hetes:		
pD ₂	5,82 ± 0,09	6,44 ± 0,18 ^a
E _{max}	95 ± 3	91 ± 2
n	10	12
koncentráció arány		4,2 ± 0,3 ^b
2 hetes:		
pD ₂	5,84 ± 0,17	6,59 ± 0,11 ^a
E _{max}	95 ± 3	89 ± 4
n	9	7
koncentráció arány		5,6 ± 0,5 ^b
4 hetes:		
pD ₂	5,86 ± 0,18	6,67 ± 0,16 ^a
E _{max}	95 ± 3	90 ± 3
n	6	7
koncentráció arány		6,5 ± 0,5 ^b
6 hetes:		
pD ₂	5,77 ± 1,01	6,48 ± 0,11 ^a
E _{max}	94 ± 3	87 ± 4
n	6	5
koncentráció arány		5,1 ± 0,4 ^b
10 hetes:		
pD ₂	5,81 ± 0,18	6,55 ± 0,09 ^a
E _{max}	95 ± 3	92 ± 2
n	14	15
koncentráció arány		5,5 ± 0,4 ^b

7.1.5. Az epitélium szerepének vizsgálata co-axiális bioassay rendszer segítségével az adenosin-indukálta válasz csökkenésében

A co-axiális bioassay rendszer segítségével (amelyet a Módszerek című fejezetben már részletesen leírtunk) megállapítható, hogy az epitéliumból származó

faktorok milyen szerepet játszanak az adenzin hatás szenzitizációjának megszűnésében. A "szenzor" preparátumokban (epitélium nélküli kontroll tracheacső) az adenzin indukálta relaxáció $64 \pm 5\%$ ($n=5$). Ha a szenzor preparátumokat co-axiálisan beillesztettük egy kontroll, ép epitéliumú tracheába (a donor hosszanti irányú felfüggesztése mellett), akkor kismértékű gátlás volt megfigyelhető az adenzin indukálta relaxációban ($55 \pm 4\%$; $n=5$; $P < 0,05$; **3a. ábra**). Nem találtunk lényeges változást az adenzin-indukálta bronchodilatátor válaszokban, ha kontroll, epitélium-fosztott tracheákat alkalmaztunk a co-axiális assay rendszerben ($64 \pm 5\%$ ill. $67 \pm 6\%$ -os relaxációk; $n=5$; **3b. ábra**). Egy másik kísérletsorozatban a teszt preparátumokat 6 hetes koffeinkezelt tengerimalac ép epitéliumú légcsővébe illesztettük. A szenzor tracheapreparátumokon (donor alkalmazása nélkül) az adenzin ($3 \mu\text{M}$) által létrehozott relaxáció $68 \pm 5\%$ volt ($n=6$), de a koffeinkezelt tracheák lumenében a szenzor sztripek purin-indukálta relaxációja erőteljesen csökkent ($25 \pm 3\%$ relaxáció; $n=6$; $P < 0,0001$; **3c. ábra**). Ha a koffein-kezelt tracheapreparátumokról az epitéliumot eltávolítottuk, akkor nem találtunk szignifikáns különbséget az adenzin válaszban a kontroll és a szenzorok között (próba preparátumok relaxációja tracheacső nélkül: $68 \pm 5\%$; $n=6$; a szenzorpreparátumok relaxációja, epitélium-fosztott, koffeinkezelt tracheacsőben: $62 \pm 6\%$; $n=6$; $P > 0,05$; **3d. ábra**).



3. ábra: Az adenosin hatása epitélium-fosztott kontroll preparátumokon tracheacső alkalmazása nélkül (szenzor: - donor) ill. tracheacső alkalmazása mellett (+ donor). Az adenosin által létrehozott relaxáció oldószeres kontroll csoportból származó, epitélium-intakt tracheák mellett (**a**), epitélium-fosztott kontroll donor preparátumnál (**b**), 6 hetes koffeinkezelt, ép epitéliumú donor tracheáknál (**c**), és 6 hetes koffeinkezelt, epitélium-fosztott donor tracheáknál (**d**).

7.1.6. Leukotrién és prosztanoid szintézis gátlás hatása az adenosin epitélium-függő relaxáns válaszára

Annak kiderítésére, hogy esetlegesen nem epitélium eredetű bronchoconstrictor faktorok felszabadulása gátolja az adenosin indukálta relaxációnak a csökkenését krónikus koffein kezelés során, elemeztük a ciklo-oxigenáz és lipoxigenáz termékek esetleges részvételét a folyamatban. A kísérleteket 6 héten keresztül koffeinnel kezelt tengerimalacokból származó ép epitéliumú légső csíkokon végeztük. 3 μM indomethacin ($n=4$) vagy 20 μM diclofenac, mint ciklo-oxigenáz gátlók jelenlétében az adenosin-indukálta relaxációban nem találtunk szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest. Ugyancsak nem volt lényeges hatás az adenosin válaszbán a 20 μM NDGA (nem specifikus lipoxigenáz gátló), ill. a 10 μM AA861 (szelektív 5-lipoxigenáz gátló) jelenlétében sem (**4. ábra**).

7.1.7. Kromolin, capsaicin előkezelés és neutrális endopeptidáz inhibitor hatása tartós koffein-kezelt tengerimalacok trachea preparátumainak adenosin által létrehozott relaxációjában.

Ebben a kísérletben a 3 μM adenosinnal létrehozott relaxáció és az adenosin kimosása után 20 μM kromolinnal (hízósejt stabilizátor, amely gátolja a hízósejtek degranulációját) 40 perces előkezelést végeztünk olyan preparátumokon, amelyek 6 hetes koffein kezelt állatokból származtak, majd metakolin-prekontrakció létrehozása után az adenosin expozíciót megismételtük. Amint az **5.a** ábrán látható, a kromolin jelenléte nem befolyásolja az adenosin hatást epitélium-intakt trachea csíkokon.

Felvetődött, hogy a tartós koffein kezelés során a kialakuló adenosin szenzitizáció megszűnésében az epitéliumból esetlegesen felszabaduló neuropeptidek lehetnek felelősek. Ebből a célból kétfélekísérletet végeztünk: (1) Zygmunt és mtsai (2002) módszerének felhasználásával in vitro 20 μM capsaicinnal végeztünk 40 perces előkezelést a capsaicin-szenzitív neuropeptidek depletálására, továbbá (2) egy másik kísérletsorozatban a capsaicint (1 μM) a metakolin-kontrakció kifejlődése és az adenosin beadása előtt közvetlenül alkalmaztuk annak eldöntésére, hogy a capsaicin hatására folyamatosan felszabaduló neuropeptidek képesek-e ellensúlyozni az adenosin bronchorelaxáns effektusát. Megállapítottuk, hogy a neuropeptidek capsaicinnal történő

kiürítése után (6 hetes koffein kezelt, epitélium-ép trachea preparátumokon) a 3 μ M adenzin hatása a kontrollhoz képest fokozódott (58 $\pm$ 5%-ról 72 $\pm$ 4%-ra, n=4; P < 0,05, **5.b** ábra). Ha a capsaicin előkezelést oldószeres kontroll preparátumokon alkalmaztuk, akkor az adenzin hatás csak kismértékben (10 $\pm$ 4%-al) fokozódott. Az adenzin hatás potenciálódása nem volt megfigyelhető az epitélium-fosztott tracheákon, sem az oldószeres kontroll, sem a koffeinkezelt állatokból származó specimenek esetében (az adatok nem láthatók).

A teljes metakolin prekontrakció után, 1 μ M capsaicint alkalmaztunk. A capsaicin további kontrakciót hozott létre az epitélium-ép, kontroll trachea preparátumokon. Capsaicin jelenlétében a 3 μ M adenzin által indukált relaxáció 34 $\pm$ 3%-al csökkent (n=5)(az adatok nem láthatók).

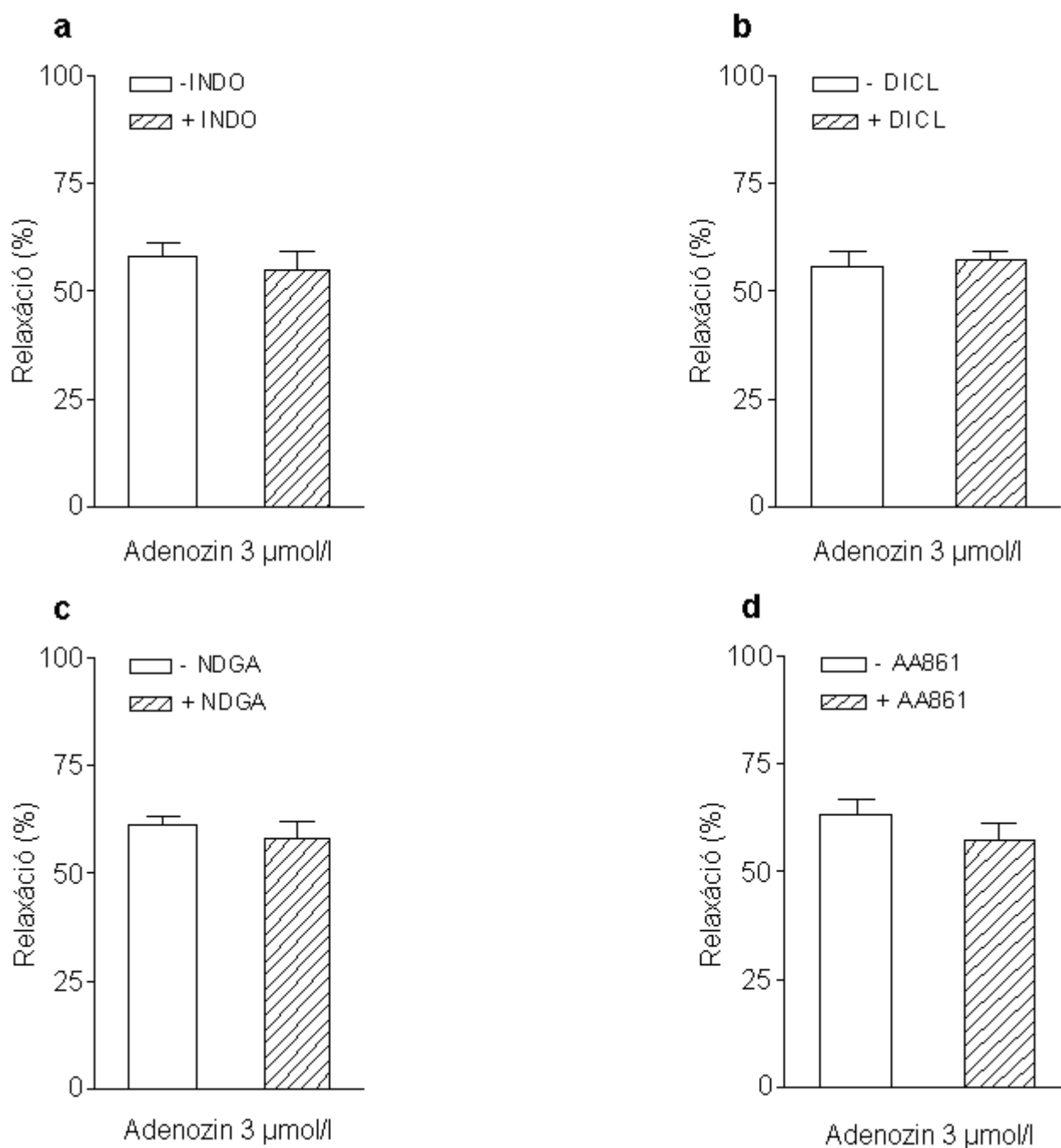
A 6 hetes koffeinkezelt állatokból nyert szöveteket 3 μ M *N*-carboxymethyl-Phe-Leu (n=6) vagy 10 μ M thiorphanal (n=5) inkubáltuk. Az epitélium ép tracheák 3 μ M *N*-carboxymethyl-Phe-Leu-al történő kezelése az adenzin-indukált relaxációt 66 $\pm$ 4%-al csökkentette (n=4, P<0.001; **5.c** ábra). A neutrális endopeptidáz egy másik inhibitora, a thiorphan, 10 μ M adagban alkalmazva hasonló hatást mutatott az adenzin- indukált relaxáció csökkenésében (43 $\pm$ 5%,n=5)(nem ábrázolt eredmény).

A neutrális endopeptidáz gátlása phosphoramidonnal (10 μ M) szintén gátló hatást gyakorolt a purin nucelozida által kifejtett relaxációra (61 $\pm$ 5%, n=4, **5.d** ábra).

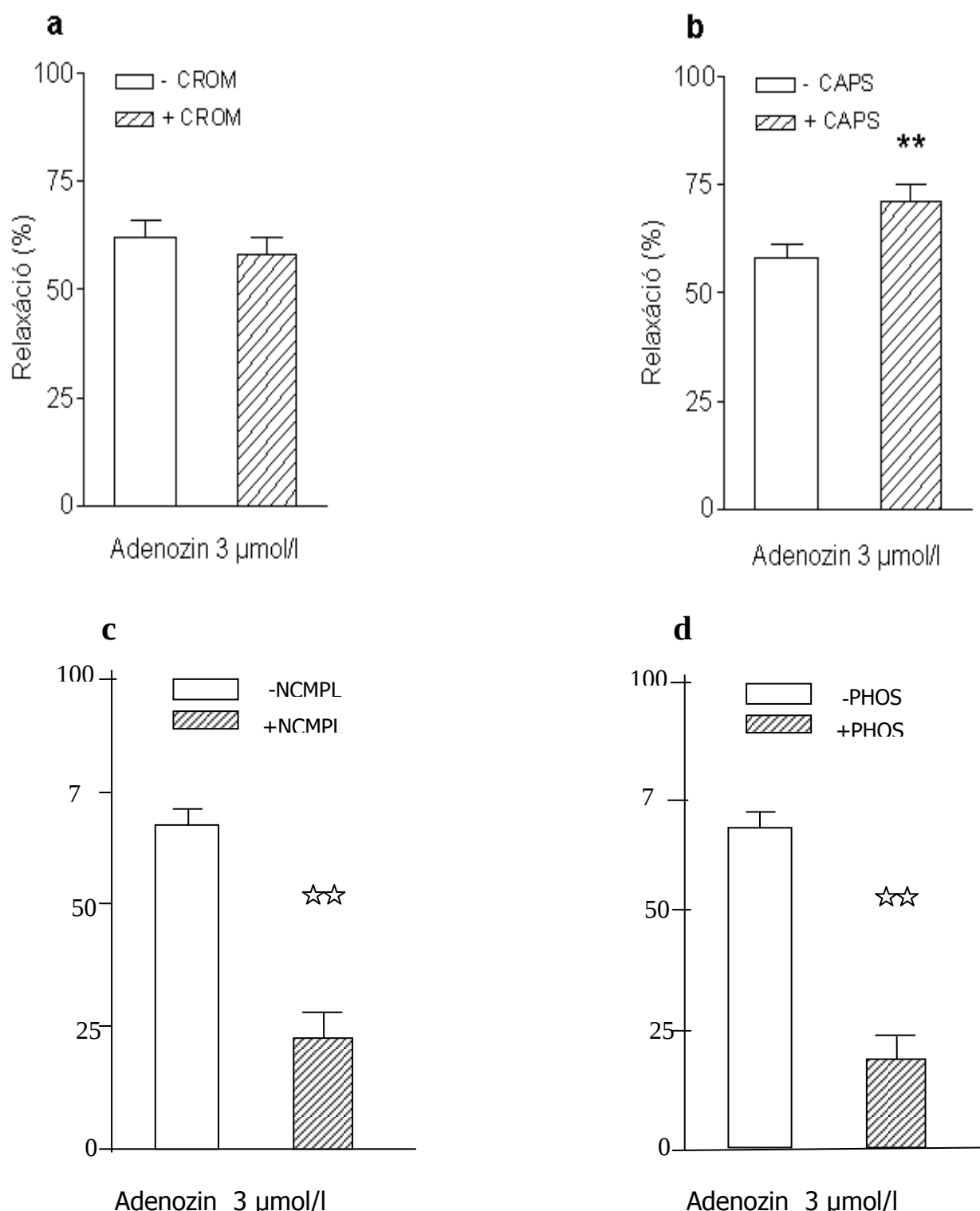
Az oldószerrel kezelt tracheacsík kontrollok kezelése *N*-carboxymethylé-Phe-Leu-al (3 μ M) vagy phosphoramidonnal (10 μ M) szignifikánsan csökkent hatást váltottak ki (24 $\pm$ 3% ill. 16 $\pm$ 4%) a metakolin prekontrakciót követő adenzin –indukált relaxáció gátlásában. (n=4, mindkét esetben, P<0.01) (az adatok nem láthatók).

7.1.8 A NOS gátlásának hatása az adenzin-indukált relaxációra.

Ép epitéliumú tracheacsíkok 6 hetes oldószeres kezelését követően, 200 μ M L-NOARG-előkezelése szignifikánsan csökkentette a 3 μ M adenzin-indukált relaxációt. Epitélium fosztott preparátumok esetén a 200 μ M L-NOARG előkezelés nem befolyásolta az adenzin hatását. 6 hetes koffeinkezelt ép epitéliumú tengerimalacok trachea preparátumán a 200 μ M L-NOARG hatására az adenzin- indukált relaxáció jelentősen fokozódott. A koffeinkezelt epitélium fosztott állatoknál az adenzin relaxáció egy enyhe fokozódást mutatott. (**3. Táblázat**)



4. ábra: 3 µM indomethacin (INDO: **a** panel), 30 µM diclofenac (DICL: **b** panel) mint ciklo-oxigenáz gátlók, ill. 20 µM NDGA (**c** panel) és 10 µM AA861 (**d** panel) mint lipoxigenáz gátlók hatása epitélium-intakt trachea preparátumokon (6 hetes koffein kezelt tengerimalacokból). Az oszlopdiagramokon az átlagot és a standard errort tüntettük fel (a kísérletek száma minden csoportban 4). A (-) a gátlószer hiányát, a (+) annak jelenlétét jelzi.



5. ábra: 20 μM cromolyn (CROM: **a.** panel), 20 μM capsaicin (CAPS *in vitro* alkalmazása és kimosás; **b.** panel), 3 μM N-carboxymethyl-Phe-Leu (NCMPL: **c.** panel) és 10 μM phosphoramidone (PHOS: **d.** panel) hatása az adenozon-indukált relaxációra ép epitéliumú 6 hetes koffeinnel előkezelt tengerimalac trachea csíkokon. A megadott értékek 4 kísérlet átlagát $\pm$ S.E.M. reprezentálják. ** $P < 0.01$ az *in vitro* kezelt és kezeletlen egyedek értékei közötti statisztikai különbséget mutatja.

3. Táblázat: A NOS gátló (200 μ M L-NOARG) hatása az adenozin-indukált relaxációra MCh-al prékontrahált tengeri malac trachea csíkokon.

Kezelés	Adenozin(3 μ M)-indukált relaxáció (%)		
	L-NOARG előtt	L-NOARG után	n
Oldószerrel kezelt (ép epitélium)	57 $\pm$ 2	43 $\pm$ 1 ^a	6
Oldószerrel kezelt (epitélium fosztott)	60 $\pm$ 2	58 $\pm$ 4	6
Koffeinnel kezelt (ép epitélium)	59 $\pm$ 3	72 $\pm$ 4 ^a	5
Koffeinnel kezelt (epitélium-fosztott)	70 $\pm$ 1	76 $\pm$ 3 ^a	5

Az értékek középértékek ($\pm$ S.E.M). a $P < 0.05$, az adenozin-indukált relaxáció különbsége L-NOARG alkalmazása előtt és után.. A statisztikai analízis szignifikanciáját páros Student t-tesztel végeztük

7.2. Xanthin-rezisztens adenozin kötőhelyek szerepének elemzése tengerimalac trachea simaizomzaton

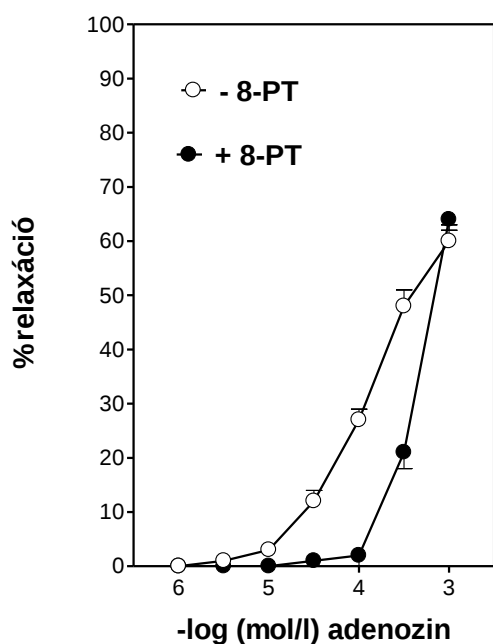
7.2.1 Xantin-érzékeny hatások vizsgálata tengerimalac tracheán

Kísérleteink első részében a xantin-érzékeny hatásokat vizsgáltuk metakolinnal prekontrahált, epitélium-fosztott trachea csíkokon. Az adenozinnal 1 μ M és 1 mM koncentráció tartományban kumulatív koncentráció-hatás görbét vettünk fel, amelyen látható az adenozin dózis-függő relaxáló hatása. 10 μ M 8-fenilteofillin, mint általános -xantin-típusú adenozin receptor antagonistája jelenlétében az adenozin dózis-hatás görbéje jobbra eltolódott, jelezve a xantin-érzékeny receptorok jelenlétét. Korábbi vizsgálatok alapján tudjuk, hogy ezek elsősorban extracelluláris A_{2B} típusú receptorok (Brown és Collis, 1982). Mindemellett az is megfigyelhető, hogy az eltolódás nem párhuzamos, ami azt jelzi, hogy nem tisztán kompetitív jellegű antagonizmusról van szó. Felvetődik tehát az a lehetőség, hogy a nagyobb adenozin koncentrációk esetében intracelluláris hatások is szerepet játszhatnak (6. ábra).

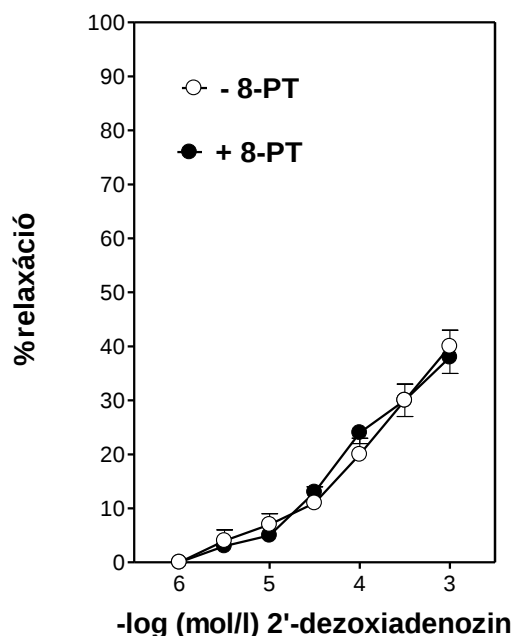
Mivel az intracelluláris hatásokat elsősorban az adenilcikláz strukturális egységét képező ún. P-kötőhelyekkel (site) hozzák összefüggésbe, ezért kísérleteket

végeztünk 2 szelektív P-site agonistával, 2'-deoxiadenozinnal (2'DA) (**7.ábra**) és adenin-9-béta-D-arabinofuranoziddal (ARA-A) (**8.ábra**). Látható, hogy a 2'-deoxiadenozin mérsékelt relaxáló hatást fejt, amelyet a 8-PT jelenléte nem befolyásol. Ez alapvetően bizonyítja, hogy a hatás xantin-rezisztens kötőhelyen fejlődik ki.

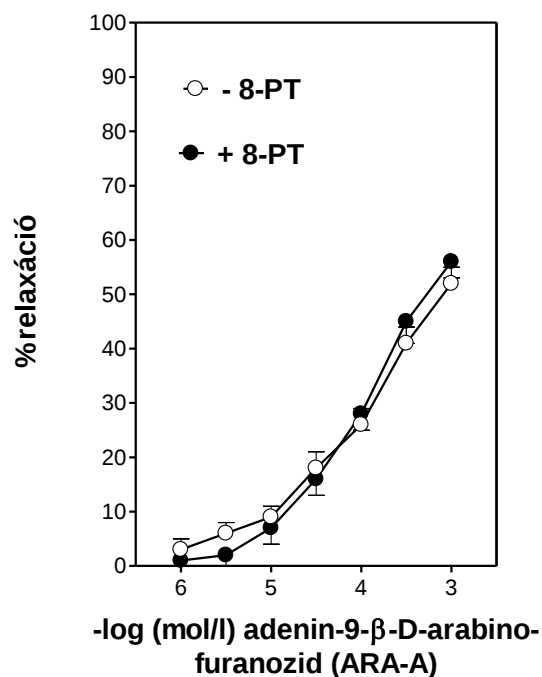
Ismeretes, hogy az intracelluláris térben az adenzin és bizonyos adenzin analógok (ilyen az általunk használt két purin vegyület is!) lebontását elsősorban az adenzin dezamináz enzim végzi, tehát mindhárom vegyület intracelluláris hatását az adenzin dezamináz (ADA) aktivitás limitálja, hiszen az enzim működése során a fenti vegyületek P-site agonista hatása megszűnik. Az adenzin dezamináz jelenleg 2 eltérő kémiai struktúrával rendelkező vegyülettel gátolható, a coformicinnel (bakteriális eredetű ADA gátló és daganatellenes szer) és az erithro-hidroxi-nonil-adeninnel (EHNA).



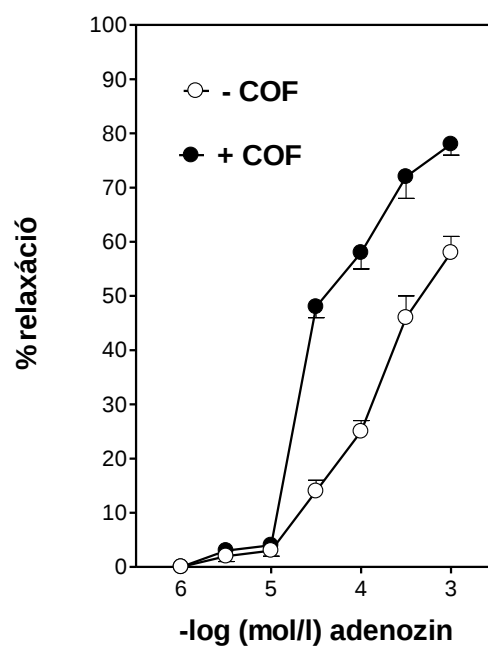
6. ábra: A 8-fenilteofillin (8-PT) antagonista hatása az adenzin által létrehozott relaxációban tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.



7. ábra: A 8-fenilteofillin (8-PT) antagonista hatása a 2'-deoxiadenozin (2'DA) által létrehozott relaxációban tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.



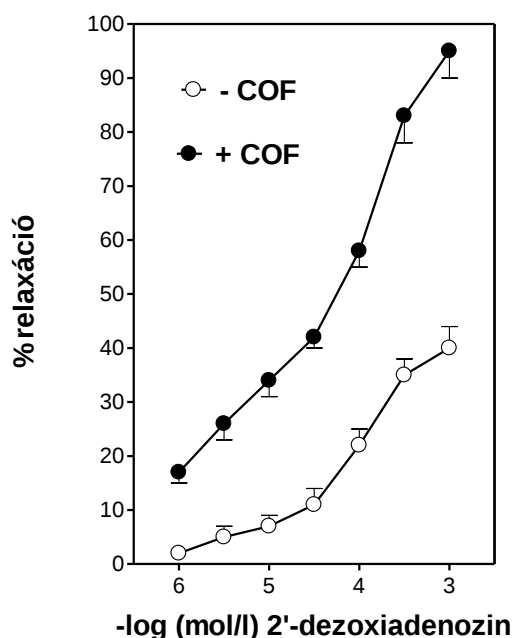
8. ábra: A 8-fenilteofillin (8-PT) antagonist hatása az adenin-9-β-D-arabinofuranozid (ARA-A) által létrehozott relaxációban tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.



9. ábra: A coformicin (COF) potenciáló hatása az adenosin által létrehozott relaxációban tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

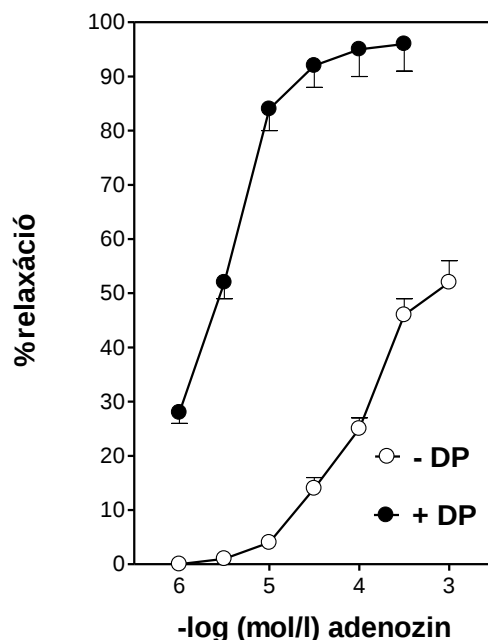
Az ábrán jól megfigyelhető, hogy a magasabb (>10 μM) adenosin koncentrációk hatását az adenosin dezamináz coformicinnel történő gátlása jelentősen potenciálja. Ennek feltehetően az a magyarázata, hogy az intracelluláris xantin-rezisztens P-kötőhelyek számára nagyobb adenosinkoncentráció áll rendelkezésre (**9 ábra**).

Hasonló eredményeket kaptunk a másik ADA gátló, az EHNA jelenlétében is (nem látható), tehát erős bizonyítékunk van arra, hogy a hatások valóban az adenosin dezamináz gátlásával és nem pedig egyéb, esetleges nem-specifikus hatásokkal hozhatók összefüggésbe.



10. ábra: A coformicin (COF) potenciáló hatása a 2'-dezoxiadenozin által létrehozott relaxációban tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

Még pregnánsabbak az eredmények a szelektív P-site agonista, a 2'-dezoxicoformicin (2'dAR) alkalmazása után. A 2'dAR mérsékelt relaxáló hatását az adenosin dezamináz gátlása jelentősen fokozta, a párhuzamos eltolás mértéke csaknem 30-szoros! (**10 ábra**) A hatások jellege hasonló az ARA-A esetében is, bár -érdekes módon- a potenciáló hatás nem annyira kifejezett (az adatok nem láthatók).

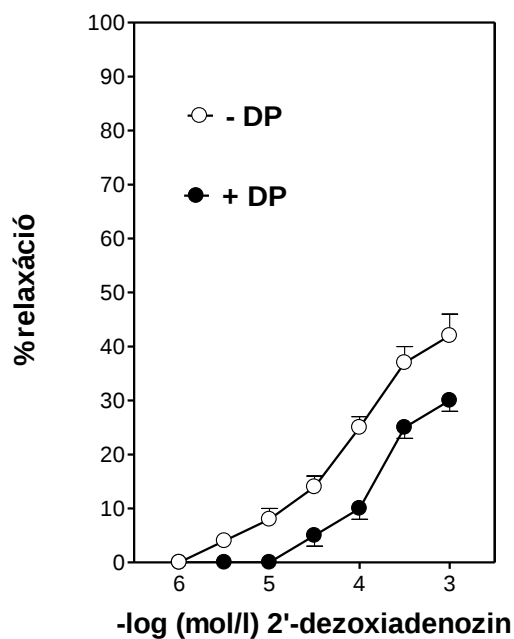


11. ábra: A dipiridamol (DP) potenciáló hatása az adenosin által létrehozott relaxációra tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

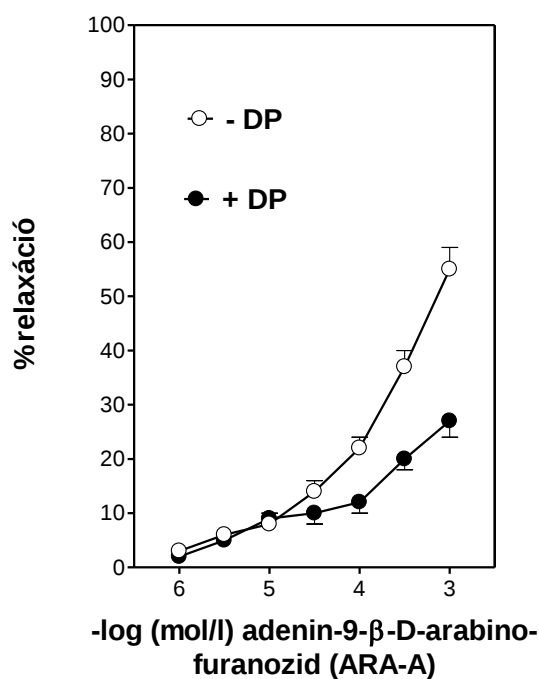
A következő kísérletsorozatunkban az extracelluláris oldal irányából próbáltunk meg bizonyítékokat keresni.

Az adenosint a sejtek speciális membranális purin transzport, facilitált diffúzió, révén gyorsan felveszik. Ez a mechanizmus-felelős elsősorban az extracelluláris adenosin hatások gyors megszűnéséért. A membranális purin transzport gátlószereként a farmakológusok jelenleg a dipiridamolt (egyébként, mint erős koronária tágító használatos a koronáriarezerv meghatározásánál, izotóptechnikai módszereknél, ill. alkalmazzák, mint trombocita dezaggregáló szert is (és az NBTI-t (nitrobenzil-tioinozin) használják.

A 11. ábrán jól látható, hogy a 10 μ M dipiridamol jelenléte az adenosin hatást drasztikus módon felerősíti (több mint 2 nagyságrenddel!). Ez arra utal, hogy az adenosin hatásában az extracelluláris receptoroknak döntő jelentősége van (természetesen ez nem zárja ki az intracelluláris hatás lehetőségét!).



12. ábra: A dipiridamol (DP) potenciáló hatása a 2'-deoxiadenozin által létrehozott relaxációra tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

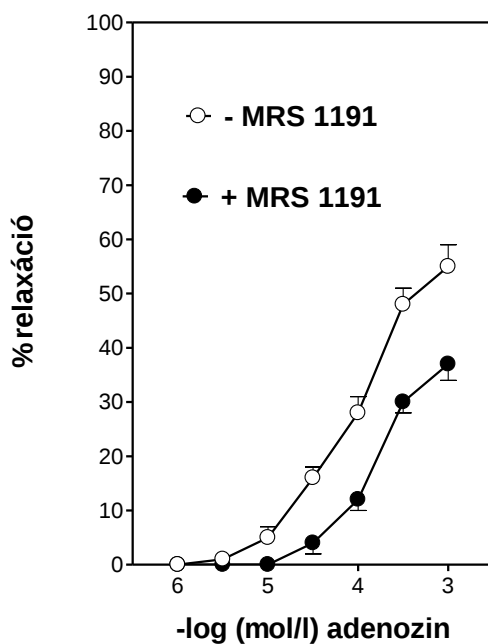


13. ábra: A dipiridamol (DP) potenciáló hatása az adenin-9-béta-D-arabinofuranozid által létrehozott relaxációra tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

Az adenzinnal ellentétben a 2'dAR és az ARA-A esetében a dipiridamol nem erősíti, hanem szignifikánsan csökkenti a P-site agonista purin analógok bronchodilatátor effektusát (12-13. ábra). Ezek az eredmények egyértelműen jelzik, hogy a membránális

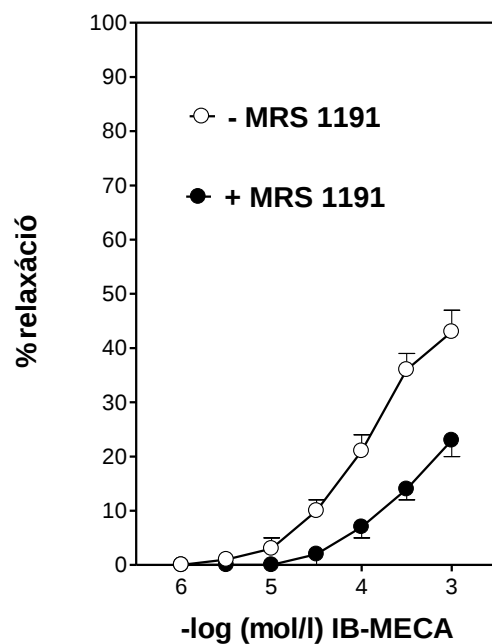
purin transzport gátlása gátolja a vegyületek felvételét az intracelluláris térbe, tehát gyengébb lesz a P-kötőhelyek aktivációja.

Utolsó kísérletsorozatunkban az extracelluláris xantin-rezisztens A_3 adenosin receptor szerepét vizsgáltuk.



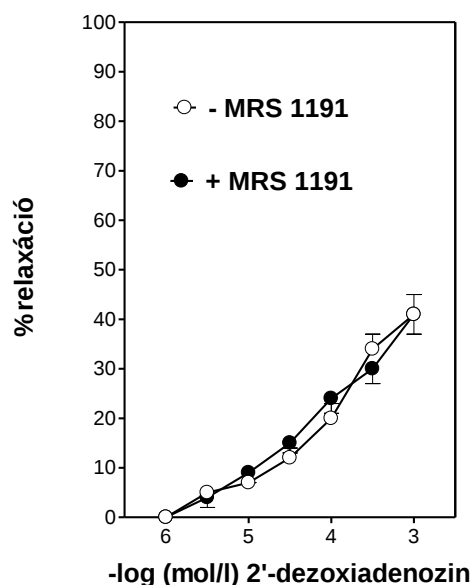
14. ábra: Az MRS 1191 gátló hatása az adenosin által létrehozott relaxációra tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

Megállapítottuk, hogy az adenosin által létrehozott bronchodilatációt 1 μ M MRS 1191 mint specifikus A_3 antagonistája jelenléte szignifikánsan csökkenti, tehát az adenosin relaxáló hatásában az A_{2B} és az intracelluláris receptorok mellett az A_3 receptoraktivációnak is jelentősége lehet (**14. ábra**).



15. ábra: Az MRS 1191 gátló hatása Az IB-MECA által létrehozott relaxációra tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

A 15. ábrán látható eredmények tovább erősítik előbbi feltevésünket. Az IB-MECA az egyik legszelektívebb A_3 receptor agonista és önmagában képes a prekontrahált bronchusizomzat elernyesztésére. Az a tény, hogy az MRS 1191 ezt a hatást antagonizálja, erős bizonyítékul szolgál annak alátámasztására, hogy az adenosin a fenti folyamatban oki szerepet játszik.



16. ábra: Az MRS 1191 hatása 2'-deoxiadenozin által létrehozott relaxációra tengerimalacokból izolált trachea preparátumokon.

Végezetül kísérleteket végeztünk annak elemzésére, hogy a már vizsgált P-site agonisták befolyásolják-e az A₃ receptorok funkcióját. Amint a **16. ábrán** látható, a 2'-deoxiadenozin által létrehozott relaxációt az MRS 1191 jelenléte nem érinti, tehát a P-site és az A₃ receptor hatások farmakológiai jól differenciálhatók.

Mindezek alapján megállapítható, hogy az adenosin bronchodilatátor hatásában nemcsak extracelluláris A_{2B} receptorok vesznek részt, hanem egyrészt intracelluláris támadáspontú P-kötőhelyek, továbbá xantin-rezisztens extracelluláris A₃ receptorok is.

Mivel az adenosin patogenetikai szerepe az asthma bronchiale roham keletkezésében egyértelműen elfogadott, ezért felvetődik, hogy csupán a xantin-érzékeny receptorokra ható teofillin mellett esetleg P-site antagonisták (amelyeket mindeddig még nem sikerült szintetizálni!) és A₃ receptor antagonisták alkalmazása tökéletesebbé tehetné az asthma bronchiale kezelésének hatékonyságát. Ennek kimondásához természetesen olyan kísérletek szükségesek, amelyek a fenti mechanizmusokat kísérletes asthma bronchialeban is megerősítik.

7.3 Adenozin hatása az interleukin-1 β felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken

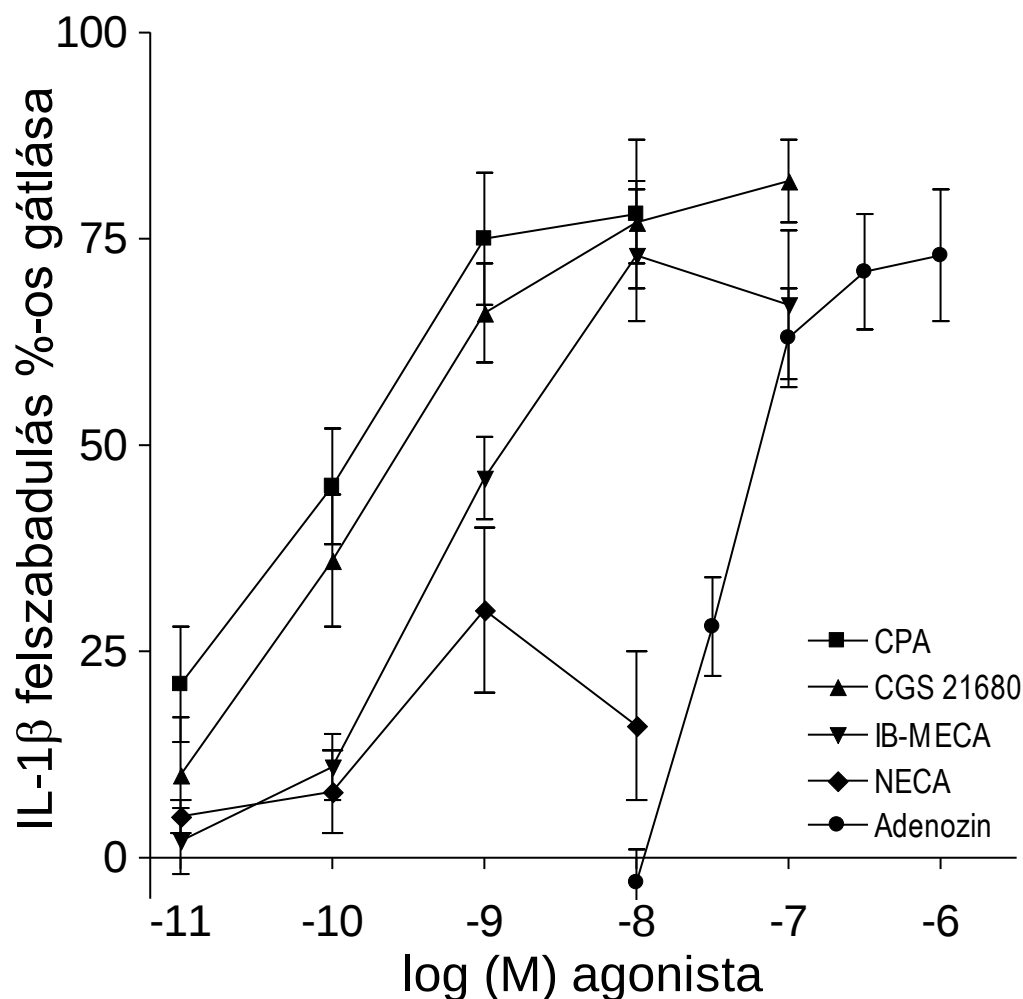
7.3.1. Adenozin és altípus-szelektív adenozin receptor aktivátorok hatása az IL-1 β felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken

Forbolészter és kalcium ionofor által aktivált perifériás mononukleáris sejtek szuszpenziókon vizsgáltuk az adenozin és az altípus specifikus adenozin receptor agonisták (CPA, CGS 21680 és IB-MECA mint az A₁, A_{2A} and A₃ receptorok szelektív aktivátorai) hatását az IL-1 β felszabadulásra. A_{2B} receptor specifikus adenozin agonista hiányában a specifikus A_{2B} adenozin receptor stimulációt úgy oldottuk meg, hogy NECA-t, egy nem-specifikus A₂ receptor agonistát alkalmaztunk, amikor is az A_{2A} receptorokat 0,1 μ M ZM 243185-el, az A₁ és az A₃ receptorokat pedig 0,3 μ M DPCPX-el és 10 nm MRS 1191-el blokkoltuk. Az adenozin és az altípus-szelektív agonistákat 10 pM-1 μ M (n = 32) koncentráció tartományban használtuk.

A perifériás mononukleáris sejtek aktiválásához PKC specifikus forbolésztert (forbol 12-mirisztát 13-acetát, PMA) és a Ca²⁺ ionofort (A23187) használtunk, ugyanis ezeknek a vegyületeknek a szignál transzdukcióra kifejtett hatása biokémiai és farmakológiai szempontból már jól definiált (Yamato K, és mtsai, 1989; Gudipaty L, és mtsai, 2003.) A PMA és az A23187 által létrehozott IL-1 β koncentráció 82.6 $\pm$ 9.2 pg/ml volt. Az IL-1 β felszabadulást mind az adenozin, mind az adenozin altípus-szelektív agonisták koncentráció-függő mértékben gátolták. Meghatároztuk a maximális hatásokat (E_{max}) és a félmaximális hatáshoz szükséges koncentrációk logaritmusait (pD₂). A számított pD₂ értékek a következők voltak: CPA=10.27, CGS 21680=9.78, IB-MECA=9.35, adenozin=7.43, NECA a gátlószerekkel együtt alkalmazva nem adott számítható értéket). A pD₂ értékek alapján az IL-1 β felszabadulás gátlásának hatáserősségi sorrendje a következő volt: CPA=CGS 21680>IB-MECA >adenozin >NECA (A₁, A_{2A} és A₃ receptor gátlószerek jelenlétében). Az adatokat az **17. ábrán** és az **4. táblázatban** tüntettük fel.

7.3.2. A különböző adenosin altípus-szelektív antagonisták hatása a specifikus adenosin receptor agonisták IL-1 β felszabadulást gátló hatásának befolyásolása aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken

Ebben a kísérletsorozatban a különböző altípus szelektív antagonistákat alkalmaztunk: DPCPX (A_1) ZM 243185 (A_{2A}) és MRS 1191 (A_3) jelenlétében tanulmányoztuk a CPA (A_1), CGS 21680 (A_{2A}) és IB-MECA (A_3) által létrehozott gátlást az IL-1 β felszabadulásra aktivált perifériás mononukleáris sejteken. Mindegyik antagonista szignifikánsan mérsékelte a megfelelő agonista által létrehozott gátlást (CPA 56.0% vs CPA + DPCPX 19.1%; CGS 21680 62.6% vs CGS 21680 + ZM 243185 18.1%; IB-MECA 66.5% vs IB-MECA+MRS 1191 19.4%; ld. **18. ábra**). A PMA+A23187-indukált IL-1 β felszabadulás által létrejövő koncentráció 87.5 ± 10.3 pg/ml ($n=12$) volt az adenosin receptor agonisták beadása előtt. Az IL-1 β koncentrációk a 0.1 μ M DPCPX, 0.1 μ M ZM 243185 ill. 10 nM MRS 1191 jelenlétében 92.4 ± 11.4 ($n=4$), 83.1 ± 9.8 ($n=4$) és 81.3 ± 12.5 pg/ml ($n=4$) volt. Ezek az értékek nem különböztek szignifikánsan a vegyületek beadása előtti koncentrációtól ($P > 0.05$).



17. ábra: Az altípus-szelektív adenoszin receptor agonisták (CPA: A_1 , CGS 21680: A_{2A} , IB-MECA: A_3 , NECA*: A_{2B} adenoszin receptor aktivátorok) hatása az IL-1 β produkcióra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken. A *NECA alkalmazása A_1 és A_{2A} adenoszin receptor antagonisták ($0.3 \mu\text{M}$ DPCPX és $0.1 \mu\text{M}$ ZM 243185). A PMA+A23187-indukált IL-1 β koncentráció $82.6 \pm 9.2 \text{ pg/ml}$ ($n=32$) volt az adenoszin receptor agonistákkal történő expozíció előtt. Az értékeket 5-7 kísérlet középértékében ($\pm$ S. E. M.) fejeztük ki.

5. **táblázat:** A különböző adenosin altípus szelektív aktivátorok hatása az IL-1 β produkcióra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken.

Kezelés	Aktivált adenosin receptor altípus	pD ₂	E _{max}	n _H
Adenosine	A ₁ /A _{2A} /A _{2B} /A ₃	7.43 $\pm$ 0.11 ^b	72 $\pm$ 8	3.5 $\pm$ 0.7
CPA	A ₁	10.27 $\pm$ 0.14 ^a	80 $\pm$ 6	0.7 $\pm$ 0.3 ^a
CGS 21680	A _{2A}	9.78 $\pm$ 0.62 ^a	82 $\pm$ 6	0.8 $\pm$ 0.3 ^a
NECA [*]	A _{2B}	-	-	-
IB-MECA	A ₃	9.35 $\pm$ 0.12 ^{ab}	70 $\pm$ 6	1.2 $\pm$ 0.2 ^a

* A NECA alkalmazása A₁ és A_{2A} adenosin receptor antagonisták (0.3 μ M DPCPX és 0.1 μ M ZM 243185).

Az értékek 5-7 kísérlet középértékét ($\pm$ S. E. M.) jelzik.

^a $P < 0.05$ az adenosinnal történő összehasonlításban

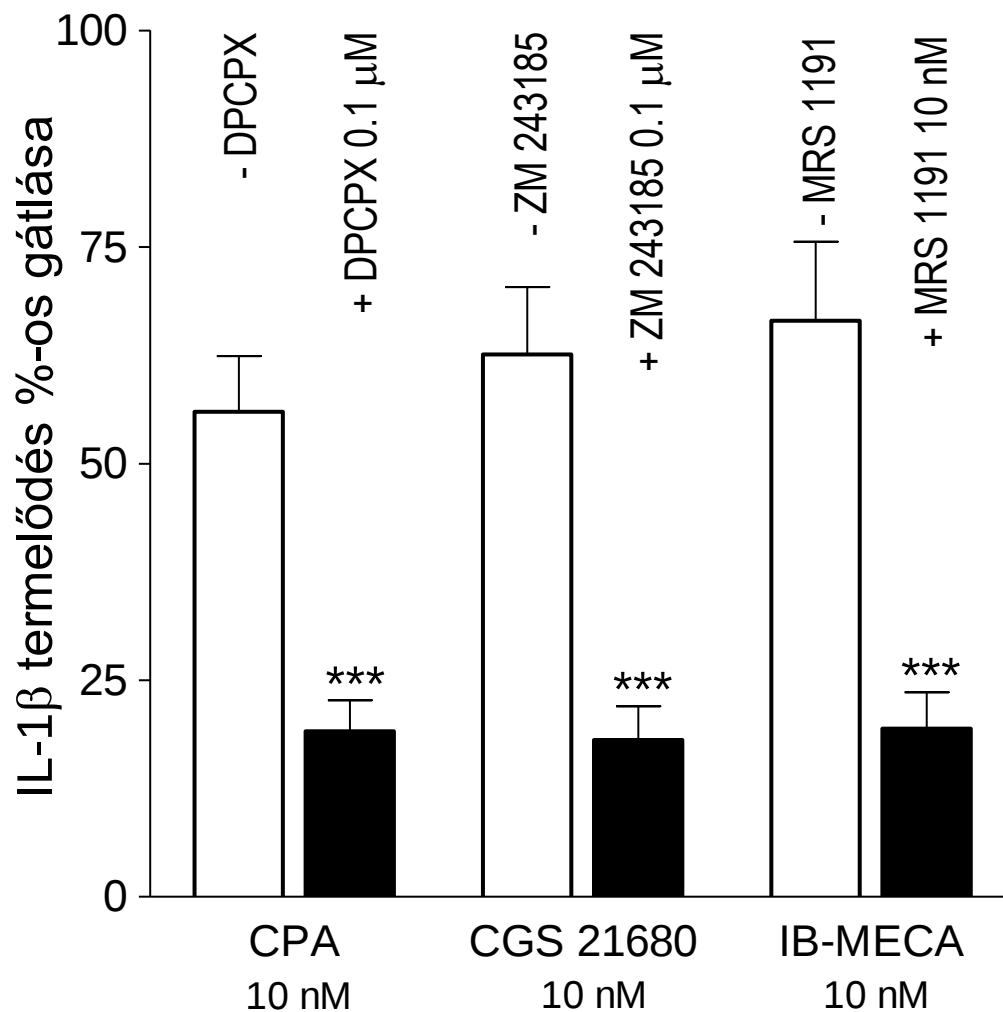
^b $P < 0.05$ a CPA hatással történő összehasonlításban

A statisztikai szignifikancia analízisét Newman-Keuls *post hoc* teszttel kombinált variancia-analízissel (ANOVA) végeztük.

pD₂ félmaximális gátláshoz tartozó agonista koncentráció logaritmusa

E_{max} maximális gátlás

n_H Hill koefficiens



18. ábra: A specifikus A_1 (DPCPX), A_{2A} (ZM 243185) és A_3 (MRS 1191) antagonisták hatása az altípus-szelektív adozin receptor agonisták által létrehozott gátlásra az IL-1 β felszabadulásban aktivált humán mononukleáris sejtekben. Az átlagos - PMA+A23187-által indukált - IL-1 β koncentráció 87.5 ± 10.3 pg/ml ($n=12$) volt az adozin receptor agonistákkal történő expozíció előtt. Az IL-1 β koncentráció 0.1 μ M DPCPX, 0.1 μ M ZM 243185 ill. 10 nM MRS 1191 jelenlétében 92.4 ± 11.4 , 83.1 ± 9.8 és 81.3 ± 12.5 pg/ml volt. Ezek az értékek nem különböztek szignifikánsan a vegyületek beadása előtti koncentrációtól ($P > 0.05$).

Az értékeket 4-4 kísérlet középértékében ($\pm$ S. E. M.) fejeztük ki.

*** $P < 0.001$

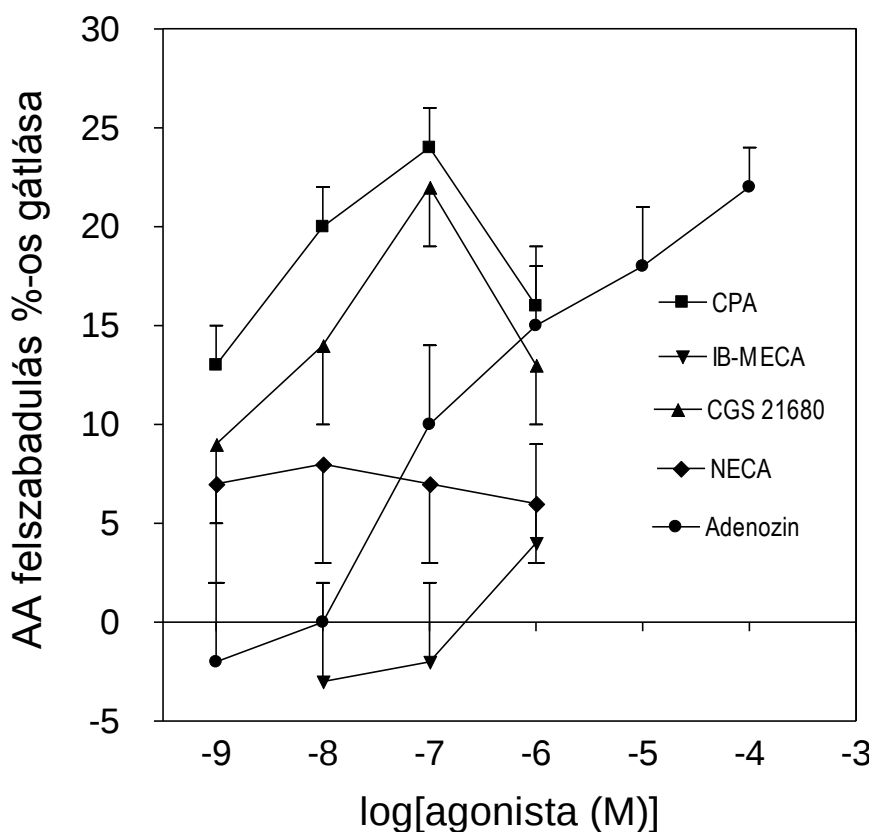
7.4. Adenozin hatása az arachidonsav felszabadulásra aktivált humán mononukleáris sejteken.

7.4.1. Az adenozin és az altípus-szelektív adenozin receptor aktivátorok hatása az arachidonsav felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken

Az adenozin és az altípus specifikus adenozin receptor agonisták (CPA, CGS 21680 és IB-MECA mint az A_1 , A_{2A} és A_3 receptorok szelektív aktivátorai) hatását az arachidonsav felszabadulásra forbolészter és kalcium ionofor által aktivált perifériás mononukleáris sejtek szuszpenziókon vizsgáltuk. A_{2B} receptor specifikus adenozin agonista hiányában a specifikus A_{2B} adenozin receptor stimulációt a következő farmakológiai módszerrel hoztuk létre: NECA-t, egy nem-specifikus A_2 receptor agonistát alkalmaztunk, amikor is az A_{2A} receptorokat $0,1 \mu\text{M}$ ZM 243185-el, az A_1 és az A_3 receptorokat pedig $0,3 \mu\text{M}$ DPCPX-el és 10 nm MRS 1191-el blokkoltuk. Az adenozin és az altípus-szelektív agonistákat 10 pM - $1 \mu\text{M}$ koncentráció tartományban használtuk.

A perifériás mononukleáris sejtek aktiválásához PKC specifikus forbolésztert (forbol 12-mirisztát 13-acetát, PMA) és a Ca^{2+} ionofort (A23187) alkalmaztunk. Az arachidonsav felszabadulást mind az adenozin, mind az altípus-szelektív agonisták koncentráció-függő módon gátolták (**19.ábra**). A gátlásban az agonisták hatáserősségi sorrendje a következő volt: CPA = CGS 21680 > adenozin > NECA = IB-MECA. A $-\log \text{EC}_{15}$ értékek (az arachidonsav kibocsátás 15%-os csökkentéséhez szükséges agonista koncentráció negatív logaritmus) a következőképpen alakultak: CPA (A_1): 8.72 ± 0.4 ; CGS 21680 (A_{2A}): 7.89 ± 0.5 ; adenozin : 6.39 ± 0.5 ; NECA+ gátlószerek (A_{2B}): nem határozható meg; IB-MECA (A_3): nem határozható meg (4. táblázat). $10 \mu\text{M}$ EHNA mint adenozin dezamináz gátló jelenlétében az adenozin hatása kismértékben potenciálódott: ($-\log \text{EC}_{15}$ értékek az ADA gátlás nélkül: 6.27 ± 0.7 , míg az ADA gátló jelenlétében 6.48 ± 0.8 ; $P > 0.05$). Megemlítendő, hogy az EHNA beadása után a maximális hatás is szignifikánsan megnőtt: $21 \pm 2 \%$ -ról $32 \pm 3 \%$ -ra ($p < 0.05$). Az adenozin ($0.1 \mu\text{M}$) által létrehozott arachidonsav felszabadulás gátlás jelentősen fokozódott a membrán purin transzportnak $1 \mu\text{M}$ NBTI-vel történt gátlása után is: kontroll körülmények között az arachidonsav felszabadulás gátlása $7 \pm 3 \%$, míg az

NBTI jelenlétében $15 \pm 4 \%$ ($P < 0.05$). 0.2 U/ml ADA mérsékelten fokozza az adenosin analógok okozta gátlást, de ezek a változások nem voltak szignifikánsak (az adatok nem láthatók). Nem volt szignifikáns változás az arachidonsav felszabadulásban adenosin és adenosin analógok hatására a nem-stimulált mononukleáris sejt szuszpenzióban (az adatokat nem tüntettük fel). Az arachidonsav felszabadulás adenosin és adenosin analógok általi gátlása aktivált mononukleáris sejteken az 1. ábrán látható.



19. ábra: Az altípus-specifikus adenosin receptor agonisták (CPA: A_1 , CGS 21680: A_{2A} , IB-MECA: A_3 , NECA*: A_{2B} adenosin receptor aktivátorok) hatása az arachidonsav produkcióra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken. A *NECA alkalmazása A_1 , A_{2A} és A_3 adenosin receptor antagonisták ($0.3 \mu\text{M}$ DPCPX, $0.1 \mu\text{M}$ ZM 243185 és 10 nM MRS 1191). A PMA+A23187-indukált arachidonsav koncentráció 2855.4 ± 239 (közéérték $\pm$ S.E.M) percenkénti bomlás (dpm) volt az adenosin receptor agonisták beadása előtt.

A megadott értékek 5-7 kísérlet átlagát ($\pm$ S. E. M.) reprezentálják.

6. **táblázat:** Altípus-specifikus adenzin receptor aktivátorok hatása az arachidonsav produkcióra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken.

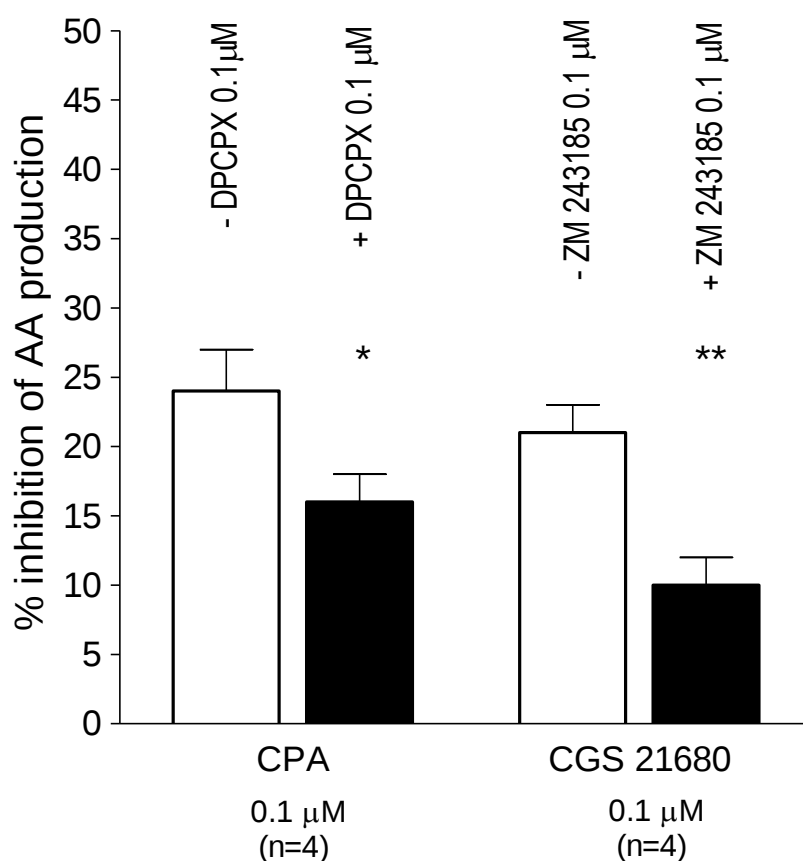
Kezelés	Adenzin receptor altípus	log EC ₁₅
Adenzin	A ₁ /A _{2A} /A _{2B} /A ₃	6.39 ± 0.5 ^a
CPA	A ₁	8.72 ± 0.4 ^b
CGS 21680	A _{2A}	7.89 ± 0.5 ^b
NECA [*]	A _{2B}	nem határozható meg
IB-MECA	A ₃	nem határozható meg

* A NECA alkalmazása A₁, A_{2A} és A₃ adenzin receptor antagonisták (0.3 µM DPCPX, 0.1 µM ZM 243185 és 10 nM MRS 1191) jelenlétében történt.
A megadott értékek 5-7 kísérlet átlagát (± S. E. M.) reprezentálják.

^a $P < 0.05$ a CPA-val összehasonlítva

^b $P < 0.05$ adenzinnal összehasonlítva

A statisztikai szignifikancia analízisét Newman-Keuls *post hoc* teszttel kombinált varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük.



20. ábra: Szelektív A_1 (DPCPX) és A_{2A} (ZM 243185) antagonisták hatása az altípus-szelektív adenosin agonisták által létrehozott arachidonsav termelődés gátlásra aktivált human perifériás mononukleáris sejteken

Az értékeket 4-4 kísérlet eredményeinek az átlagában ($\pm$ S. E. M.) fejeztük ki.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Egy másik kísérletsorozatban különböző altípus-szelektív antagonisták (DPCPX: A_1 , ZM 243185: A_{2A}) jelenlétében tanulmányoztuk a CPA (A_1) és a CGS 21680 (A_{2A}) által létrehozott gátlást az arachidonsav produkcióra aktivált human perifériás mononukleáris sejteken. Az agonisták effektusát a megfelelő antagonisták szignifikáns mértékben antagonizálták: (CPA 23.6% vs. CPA + DPCPX 17.4% $p < 0.05$; és CGS 21680 29.9 % vs. CGS 21680 + ZM 243185 7.6 % $p < 0.01$; **20. ábra**). A PMA+A23187-indukált arachidonsav felszabadulás 2855.4 ± 239 dpm (decay per minute; bomlás/perc) volt az adenosin receptor agonisták beadása előtt. A 0.1 μ M DPCPX ill. 0.1 μ M ZM 243185 jelenlétében mért arachidonsav produkció nem különbözött szignifikánsan ettől a fenti kontroll értéktől.

8. MEGBESZÉLÉS

8.1. Krónikus koffeinkezelés hatása az adenosin bronchiális hatására

A krónikus koffein kezeléssel kapcsolatos kísérleteink legfontosabb eredményeinek a következők tarthatók:

- (1) Eritélium-intakt tengerimalac trachea preparátumokon végzett kísérletek során megállapítottuk, hogy az adenosin által létrehozott relaxáció a tartós koffeinkezelés 1-2. hetében eléri maximumát, majd a 10. hétre fokozatosan csökken.
- (2) Az eritélium mechanikus eltávolítása után a fenti bifázikus hatás nem jön létre, hanem a kialakuló - adenosinnal szembeni - szenzitizáció a koffein kezelés teljes időtartama alatt fennáll.
- (3) Co-axiális bioassay rendszert használva (co-axiálisan elhelyezkedő kontroll szenzor, eritélium-fosztott trachea csík, amelyet speciálisan kiképzett trachea tubus vesz körül: donor) megállapítottuk, hogy a 6 hetes koffein kezelt tengerimalacból preparált, eritélium fosztott trachea gyűrűt donorként alkalmazva a szenzor preparátumon az adenosin hatása nem módosul, ugyanakkor, ha eritélium-ép koffein kezelt tracheákat alkalmazunk, akkor az adenosin hatása csökken.
- (4) Eritélium-intakt, koffein kezelt trachea csíkokon sem a ciklo-oxigenáz gátlása (indomethacin, diclofenac), sem a lipoxigenáz bénítása (NDGA, AA861) nem befolyásolja az adenosin által létrehozott válaszokat.
- (5) Koffein kezelt állatok eritélium-ép trachea preparátumán a neuropeptidek capsaicinnel történő kiürítése után az adenosin válasz fokozódott.

Ennek alapján kimutattunk egy olyan érdekes, nem mindennapi jelenséget, hogy az adenosin antagonistá koffeinkezelés bifázikus hatást hoz létre az adenosin érzékenységben, történetesen létrehoz egy kezdeti szenzitizációt, amelyet fokozatos megszűnés követ.

A koffein, széles körben fogyasztott pszichoaktív drog, mely nem-specifikus antagonistája az adenosin receptoroknak (Fredholm, 1982). Ez a methylxanthin leghatékonyabb antagonistá az A_{2A} receptorokon és kevésbé az A_1 és A_{2B} receptorokon, és azt is kimutatták, hogy csak gyenge gátló hatással rendelkezik az A_3 receptorokon.

(Klotz és mtsai, 1998). A tengerimalac trachea A_2 adenosin receptorokat tartalmaz (Brown és Collis, 1982; Ghai és mtsai, 1987; Collis és Hourani, 1993), de Losinski és Alexander (1995) vizsgálatai alapján ezek atípusos A_2 receptorok, ugyanis az agonista hatásprofil alapján az A_{2B} csoportba, az antagonisták hatásprofil alapján az A_{2A} csoportba sorolhatók. Figyelemre méltó az a néhány kísérleti adat, amely szerint a tengerimalac légcsőben xantinrezisztens adenosin receptorok is vannak. Ezek a receptorhelyek valószínűleg intracelluláris lokalizációjúak (Brown és Collis, 1982; Brackett és mtsai, 1991). A jelenlegi kísérleteket ezért membrán adenosin transzport gátlás mellett végeztük el annak érdekében, hogy kizárjuk az adozinnak az intracelluláris receptorokkal történő esetleges interakcióját.

A hosszantartó koffeinkezelésnek a hatása az adenosin receptorokon vitatható. A központi idegrendszerrel szőló néhány tanulmány az A_1 receptoroknak az up-regulációját figyelte meg (Shi és mtsai, 1993; 1994), míg mások ezt nem tapasztalták koffeinkezelés után (Zielke és Zielke, 1987; Georgiev, 1993; Bona és mtsai, 1995; Johansson és mtsai, 1996). Ellentmondó adatokat publikáltak az A_2 adenosin receptorok szabályozásában is krónikus koffeinkezelés alatt. Számos kísérletben nem találtak változást a koffeinkezelés során és az A_{2A} adenosin receptorok számában, ugyanakkor Johansson és mtsai (1997) leírták, hogy koffeinfogyasztás (1 g/l) emelte az adenosin receptorok számát egér agyának striátumában. Ami az A_{2B} receptorok szabályozását illeti, Fredholm (1982) nem tapasztalta, hogy 1 hetes koffeinkezelés után a központi A_{2B} receptorok számában változás állt volna be.

Viszonylag kevés irodalmi adat foglalkozik a hosszantartó koffeinkezelés hatásával a perifériás adenosin receptorokon. Varani és mtsai (1999; 2000) mutatták ki először, hogy a koffeinfogyasztás az emberi vérlemezke A_2 receptorainak az up-regulációját okozza. Zhang és Wells (1990) leírták, hogy az A_2 adenosin receptorok száma emelkedik és az A_2 receptorhatásoknak tulajdonítható biokémiai változások jönnek létre a hosszas koffeinkezelés után a patkány vérlemezkekben, de nem találtak változást a zsírsejt membránban lévő A_1 receptor indukált lipolízisben, annak ellenére, hogy szignifikáns csökkenés volt az A_1 receptorok számában. Ami a koffeines kezelés kardiovaszkuláris következményeit illeti, 2 hetes kezelés nagymértékben potenciálta a sinusritmus A_1 adenosin receptor indukálta szuppresszióját, míg a vazodilatációs és a reflex tachikardiás válaszok, melyek az A_2 receptor agonisták hatására jönnek létre, nem változtak.

Mind a mai napig nem áll rendelkezésre irodalmi adat arról, hogy hogyan hat a krónikus metilxantin kezelés a bronchiális rendszernek az adenosin érzékenységre. Ezen vizsgálatok jelentősége a következő szempontok miatt lehet fontos:

- (1) Az adenosin fontos szabályozó szerepet játszhat a légző rendszer fiziológias funkcióiban és az asthma bronchiale pathogenézisében is fontos lehet (Fozard, 2003).
- (2) A koffein, mint adenosin receptor antagonistá gyakori fogyasztása módosíthatja a hörgőrendszernek az adenosinerg szabályozását mind egészségesekben, mind asztmás egyéneknél.
- (3) A theophyllin és származékai (amelyeknek a struktúrája és farmakológiája nagyon hasonlít a koffeinére) az asztma konvencionális terápiájában régóta alkalmazott szerek. Azt is meg kell említenünk, hogy a kísérleteinkben mért plazma koffein koncentrációk nagyságrendileg megegyeztek a rendszeres kávé és más koffeint tartalmazó italok fogyasztásával járó „terápiás” szintekkel (Fredholm és mtsai, 1999).

Kísérleteinkben a nem specifikus adenosin antagonistaként folyamatosan alkalmazott koffein epitélium-intakt trachea preparátumokon konvencionális adenosin receptor válaszfokozódást eredményezett, azonban a folyamat időbeli lezajlása szokatlan mintázatot mutatott. A kezdeti szenzitizációs periódus (3. hétig) után az adenosin által indukált mechanikai válaszok paraméterei (pD_2 és E_{max} értékek) visszatértek a kontroll értékre. Meglepő módon az epitélium-fosztott készítményeken nem tapasztaltunk ilyen kétfázisú hatást, hanem az adenosinnal szembeni szenzitizáció folyamatosan jelen volt a koffeinkezelés 10 hete alatt. A co-axiális bioassay rendszer használatával végzett kísérleteink arra mutattak, hogy az epitélium fontos szerepet játszik ebben a hatásban. Feltételezzük, hogy a folyamatos koffein kezelés során valamiféle adaptív válasz alakul ki a tracheális epitéliumban, amely ellensúlyozza a purin válaszokat. Kimutattuk, hogy a tengerimalac tracheális epitélium gazdag forrása mind a bronchodilatátor (NO, PGE_2 , stb.), mind pedig a bronchoconstrictor anyagoknak (Barnes és mtsai, 1998; Folkerts és Nijkamp, 1998). Ismert, hogy a légúti epitélisejtek mind a ciklo-oxigenázt, mind a lipoxigenázt expresszálják. Wilkens és mtsai (1992) vizsgálatai szerint jelentős a $PGF_{2\alpha}$ bazális epiteliális felszabadulása. Az epiteliális leukotrién szintézis ugyancsak jelentős lehet (Barnes és mtsai, 1998). Azt is kimutatták, hogy a tengerimalac és a patkány tracheális epitélium granulái jelentős CGRP

immunoreaktivitást mutatnak. Capsaicin kezelést követően a CGRP tartalmát ezekben a granulákban jelentősen csökkentik (Tschirhart és mtsai, 1990; Baluk és mtsai, 1993, Bertrand és mtsai, 1993).

A CGRP mellett a légúti epitéliumban endotelin-szerű immunoreaktivitást is kimutattak (Barnes és mtsai, 1998). Hay és mtsai (1997) a tengerimalac trachea epitéliumból jelentős endotelin felszabadulást is kimutattak.

Mivel kísérleteinkben sem az indomethacin és a diclofenac (ciklo-oxigenáz gátlók), sem az NDGA és az AA861 (nem-szelektív és szelektív lipoxigenáz gátlók) nem befolyásolták a koffeinkezelt tracheák adenzinra adott válaszreakcióját, ezért joggal feltételezhető, hogy az adenzin hatás csökkenésében sem a prosztanoidoknak, sem a leukotriéneknek nincs szerepe. Ugyanakkor az is megállapítható a kromolinnal végzett kísérleteink alapján, hogy a koffein kezelés a hízósejtek granulumaiból sem fokozza a bronchoconstrictor hatású endogén anyagok felszabadulását.

Figyelemreméltónak tartjuk azokat az eredményeinket, amelyeket a különböző típusú capsaicin kezelésekkkel nyertünk. A capsaicinról kimutatott (Szolcsányi, 1996, Barthó és mtsai, 2004), hogy képes kiüríteni a neuropeptideket a szenzoros neuronokból, de sikerült ezt igazolni az epitéliális sejtekre is (Tschirhart és mtsai, 1990). Jelen kísérleteinkben a capsaicinnal történt előzetes in vitro kezelés (neuropeptid depléción) fokozta az adenzin hatást, míg az egyidejű in vitro capsaicin alkalmazás (egyidejű neuropeptid felszabadulás) gátolta az adenzin effektusát.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a tartós koffeinkezelés olyan adaptogén válaszokat indít el a tracheális epitéliumban, amelyek során olyan bronchoconstrictor hatású peptidek szaporodnak fel a tracheális epitéliumban, amelyek az adenzin hatására felszabadulnak, ugyanakkor az adenzon bronchiális simaizom hatását jelentősen antagonizálják.

8.2. Xanthin-rezisztens adenzin kötőhelyek szerepének elemzése tengerimalac trachea simaizomzaton

A fejezet legfontosabb eredményeinek a következők tarthatók:

- a. A metakolinnal prekontrahált tengerimalac trachea simaizomzaton az adenzin koncentráció-függő relaxációt hoz létre, amelyet a nem-specifikus A_1/A_2

adenozin receptor antagonista, 8-fenilteofillin antagonizál, de a dózis-hatás görbe eltolódása a Hill slop értékek alapján nem párhuzamos.

- b. Az intracelluláris P-site agonista 2'-deoxiadenozin ill. adenin-9-béta-D-arabinofuranozid (ARA-A) enyhe relaxáló hatást fejt ki, de ezeket az effektusokat a metilxantin nem befolyásolja (xantin-rezisztens hatás).
- c. Az adenzin trachea relaxáló hatása jelentősen fokozható coformicin ill. EHNA (intracellulárisan ható, specifikus adenzin dezamináz gátlók) jelenlétében.
- d. Nagyon erős potenciáló hatás észlelhető, ha a 2'-deoxiadenozin hatását az intracelluláris adenzin dezamináz gátlása után vizsgáljuk. Ez a potenciáló effektus különösen a 2'-deoxiadenozin esetében kifejezett.
- e. A membránális adenzin transzportot gátló dipiridamol jelenlétében az adenzin bronchiális hatása jelentősen fokozódik, jelezve az extracelluláris receptorok kifejezett funkcionális aktivitását.
- f. Az intracelluláris P-site agonista 2'-deoxiadenozin és ARA-A mérsékelt relaxáló hatásait a membrán transzport gátlása (dipiridamol) az adenzinra kifejtett hatással ellentétben nem erősíti, hanem jelentősen antagonizálja, jelezve, hogy ezek a vegyületek nem rendelkeznek extracelluláris aktivitással.
- g. Az adenzin bronchiális hatásai mérsékelhetők voltak a specifikus A₃ adenzin receptor antagonistával, MRS 1191-el. Ez az A₃ adenzin receptorok mérsékelt szerepe mellett szól (nem xantin érzékeny receptorok!).
- h. A prekontrahált trachea simaizmon a szelektív A₃ adenzin receptor agonista IB-MECA is relaxáló hatást fejtett ki. Ez MRS 1191-el antagonizálható volt. Ezen utóbbi vegyület nem módosította a 2'-deoxiadenozin relaxáló aktivitását.

Az asthma bronchiale patogenezisében az adenzin oki szerepe egyre inkább elfogadott (Barnes, 2003). A metilxantin típusú adenzin receptor antagonisták (teofillin, aminofillin, enprofillin, stb.) bronchodilatátor hatása ennek a hipotézisnek egyértelmű klinikai bizonyítéka.

A tengerimalac bronchiális simaizom relaxációjában egyértelműen az A₂ adenzin receptoroké a vezető szerep (Brown és Collis, 1982; Ghai és mtsai, 1987; Collis és Hourani, 1993). Érdekes probléma, hogy a bronchiális simaizom tartalmaz nem-xantin típusú kötőhelyeket, ill. receptorokat is, amelynek vizsgálata eléggé elhanyagolt kutatási területet képvisel. A nem-xantin típusú kötőhelyek, ill. receptorok részben feltételezett intracelluláris kötőhelyek (Brown és Collis, 1982; Ghai és mtsai,

1987; Collis és Hourani, 1993; Losinski és Alexander, 1995; Brackett és Daly, 1991) ill. membranális A₃ adenosin receptorok lehetnek.

Kísérleteinkben farmakológiai módszerekkel bizonyítékokat szolgáltatunk arra nézve, hogy a tradicionálisan elfogadott xantin-érzékeny receptorok mellett a tengerimalac bronchiális rendszerben vannak ún. nem-xantin típusú kötőhelyek ill. nem-xantin típusú A₃ adenosin receptorok. Az intracelluláris kötőhelyek feltételezett szerepére a gyanú akkor terelődött, amikor kimutattuk, hogy az extracelluláris adenosin receptoron ható antagonistá, a 8-fenilteofilin nem hoz létre párhuzamos eltolódást az adenosin koncentráció-hatás görbéjében, ahogyan ez egy kompetitív antagonistá hatás esetén várható lenne. Megállapítottuk azt is, hogy a dipiridamol mint membranális adenosin transzport gátló jelentősen fokozza a bronchiális adenosin hatást, de ugyanakkor gátolja az intracelluláris P-kötőhely agonistáknak (2'-deoxiadenozin, 9-béta-D-arabinofuranozil adenin) a hatását. Ebből kiindulva vizsgáltuk részletesebben az intracelluláris xantin-rezisztens kötőhelyek szerepét az adenosin bronchus simaizom hatásában.

Az elsőként felfedezett nem-xantin típusú kötőhely az adenilcikláz felszínére lokalizálódó, ún. P-site (Londos és Wolff, 1977). Az intracelluláris kötőhelyek közé tartozik az S-adenozil-homociszteín-hidroláz (Zimmerman és mtsai, 1980) ill. az ún. „adenosine-binding proteine” (Olsson, 1982) „adenozinkötő fehérje” is, de e kötő fehérjék purin receptor farmakológiai tulajdonságai még nem eléggé kidolgozottak ahhoz, hogy befolyásolásukból érdemi és egyértelmű következtetéseket lehessen levonni élettani és patológias szerepükre vonatkozóan. Mindenesetre a P-site-ről ismert, hogy az adenilcikláz enzim része és fontos szerepet játszik számos biológiai folyamat regulációjában, mint az adenilcikláz fiziológias gátlója. Maga az adenilcikláz a közismert hidrofób, membránhoz kötött, hat transzmembrán domain-t tartalmazó egysége mellett tartalmaz egy 35-40 kD méretű citoplazmatikus részt is (Dessauer, és mtsai 1999). Ennek a citoplazmatikus domain-nek részét képezi az ún. P-site ill. a forskolin kötőhely. Ennek a kötőhelynek a feltételezett szerepéről vannak kísérletes adataink, így pl. a pitvari miokardium elektromos és mechanikai aktivitására kifejtett adenosin hatásban szerepe lehet ezen intracelluláris elemeknek (Szentmihályi és mtsai, 1982). Marone és Casolaro (1990) komoly bizonyítékokat sorakoztattak fel amellet, hogy humán limfocitákban és polimorfonukleáris sejteken a P-site fontos szerepet játszik a sejtek cAMP anyagcseréjének szabályozásában. Ami a P-site-ra ható

vegyületeket illeti, a jelenleg ismert P-site agonisták hatáserősségi sorrendben a következők: 2',5'-didezoxadenozin-3'-tetrafoszfát > 2',5'-didezoxi-3'-ATP > 2',5'-didezoxi-3'-ADP > 2',5'-didezoxi-3'-AMP > 2'-dezozi-3'-AMP > 3'-AMP > 2'-didezoxiadenozin > adenzin. Farmakológiai kísérletekben e vegyületek többsége nem jut át a sejtmembránra, ezért ilyen célra csak korlátozott körülmények között alkalmazható. A gyakorlatban a P-kötőhelyek szelektív agonistáiként az adenzint ill. az adenzin ribóz-módosított, membrán permeábilis analógjait alkalmazzák, mint pl. a 2',5'-didezoxiadenozin, 2'-dezoziadenozin, 9-béta-D-xilofuranozil adenin, 9-béta-D-arabinofuranozil adenin (Londos és Wolff, 1977, Londos és mtsai, 1980).

Jelen kísérleteinkben a xantin-rezisztens kötőhelyek fiziológiai szerepe mellett az intracelluláris adenzin dezamináz gátlása szolgáltatta a döntő bizonyítékot. Ez az enzim membránhoz asszociált (Agarwal és mtsai, 1975), az adenzint farmakológiailag kevésbé aktív inozinná bontja. Az adenzin dezamináz egyik legismertebb, szelektív gátlószere a coformicin, amelynek jelenlétében feltételezhető, hogy az adenzin (vagy adenzin dezamináz érzékeny adenzin analógok) felszaporodnak az intracelluláris térben és aktiválják az intracelluláris kötőhelyeket. Esetünkben a coformicin az adenzin hatását szignifikánsan erősítette. A P-site-on kifejtett hatás legfőbb bizonyítéka az az eredményünk volt, miszerint a specifikus P-site agonista 2'-dezoziadenozin hatását a coformicin mintegy 50-szeresére potenciálta. Ezt az elképzelésünket tovább erősíti az a tény, hogy az EHNA mint szintén specifikus, de a coformicintól eltérő kémiai struktúrájú szer, szintén potenciálja az adenzin és a 2'-dezoziadenozin bronchiális effektusát.

A xantin-rezisztens elemek vizsgálatára további lehetőségünk volt az extracelluláris A₃ adenzin receptorok szerepének vizsgálata. Ennek a receptornak a szerepét a tengerimalac bronchiális rendszerben, tudomásunk szerint, még nem vizsgálták. Megállapítottuk, hogy az adenzin bronchodilatátor hatását az A₃ adenzin receptor antagonistá MRS 1191 mérsékli, ugyanakkor az A₃ aktivátor IB-MECA relaxáló hatást fejt ki, amelyet az MRS 1191 szintén antagonizál.

Mindezek az eredmények farmakológiai bizonyítékokat szolgáltattak arra nézve, hogy a jelenleg klinikai jelentőséggel bíró metilxantin-érzékeny receptorok mellett a tüdőben található metilxantin rezisztens intracelluláris kötőhelyek ill. extracelluláris lokalizációjú receptorok, amelyek az A₂ adenzin receptor aktivációval megegyező hatást hoznak létre. Ennek a felismerésnek a jelentősége nemcsak elméleti jellegű,

hanem esetleges innovatív következményekkel is járhatnak, hiszen a megfelelő P-site ill. A_3 adenosin receptor gátlás komoly adjuváns hatást eredményezhet egy stabil metilxantin alapú terápia mellett. Ennek megvalósítása azonban komoly előkészítést igényel, ugyanis – bár rendelkezünk hatékony A_3 adenosin receptor antagonistákkal – P-site antagonistát mind a mai napig nem sikerült előállítani.

8.3 Adenosin hatása az interleukin- 1β felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken

A jelen kísérletek elsőként igazolták az adenosin és adenosin-receptor altípusainak különböző szelektív agonistáinak közvetlen gátló hatását az IL- 1β kibocsátásában, forbol észterrel és Ca^{2+} ionoforral aktivált human monocitákon. A kísérletben felhasznált aktiváló ágensek kiválasztása két tényezőre alapult. Először, a PMA szenzitív protein kináz C enzimek részvételére az A_{2A} receptorok stimulációjában (Palmer és Stiles, 1999), másodsorban, az emelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint szerepére az IL- β szekréciójában (Lorton, 1997; Andrei és mtsai, 2004). A különböző adenosin-receptorok altípusainak részvételének tesztelésére szelektív agonistákat használtunk: CPA-t az A_1 , CGS 21680-t az A_{2A} és IB-MECA-t az A_3 receptorok stimulálására. Az A_{2A} receptorok specifikus hatásának meghatározására egy specifikus A_1/A_2 receptor stimulálót a NECA-t használtuk DPCPX és ZM 243185 jelenlétében, mint szelektív A_1 és A_{2A} receptor antagonisták, ezzel A_{2A} specifikus választ váltva ki. A NECA okozta specifikus A_3 hatás kizárására, az MR 1191-t, egy szelektív A_3 receptor inhibitor használtunk. Az A_1 , A_2 és A_3 receptorokhoz köthető specifikus változásokat a receptor-specifikus szelektív antagonistákkal teszteltük.

Vizsgálatunk eredménye világosan kimutatta, hogy az adenosin az IL- 1β aktivált monocitákból történő kibocsátásának gátlását az A_1 , A_{2A} és A_3 receptorok egyaránt mediálják, míg az A_{2B} receptor hatása elhanyagolható. Az adenosin és receptor altípusainak specifikus agonistáival végzett farmakológiai dózis/válasz görbéknek az elemzése kimutatta, hogy a Hill koefficiens (n_H) különbözik az adenosin és specifikus adenosin receptorok agonistái esetében. Az adenosin receptor szelektív agonisták dózis/válasz görbéjének meredeksége nem különbözik az 1-től (egység). Másrészt az adenosin görbe meredeksége 3, ami erős pozitív korrelációt mutat a különböző receptorok között. Az A_1 és A_3 receptorok által kiváltott IL- 1β monocitákból történő

kibocsátásának gátlása adenilcikláztól független módon jön létre, míg az A_2 receptorok szerepe az adenilcikláz és PKC enzimekkel van összefüggésben (Lorton, 1997; Merrill és mtsai, 1997; Gessi és mtsai 2000; Dickenson és Hill, 1994; Lukashev és mtsai, 2003; Khoa és mtsai, 2001; Németh és mtsai, 2003; Majumdar és Aggarwal, 2003). Az A_2 receptorok által kiváltott, egyértelműen dózis dependens IL-1 β kibocsátásának gátlása valószínű PKC-től függő foszforilációval jön létre. (Palmer és Stiles, 1999). Másrészt létezik egy specifikus kereszt hatás az adenzin és különböző pro-inflammációs citokinek, mint az IL-1 β , receptorai között. Ezek a citokinek up-regulálhatják az A_{2A} receptorok expresszióját, legalább is a PC12 sejteken (Trincavelli és mtsai, 2002). Az IL-1 β kibocsátásának gyenge gátlása, amit az A_{2B} receptor mediálhat, valószínűleg csak a receptorok alacsony adenzin affinitásának következménye (Feoktistov és Biaggioni, 1998).

Jelen vizsgálatban az IL-1 β -t szinte kizárólagosan a monociták termelték, amit perifériás mononucleáris sejtek szuszpenziójából (PBMC) nyertünk, melyet csak monociták és limfociták alkottak (Dinarello, 1991; Colotta és mtsai, 1998). A nem frakcionált perifériás mononucleáris sejtek szuszpenzió előnye a tisztított monocita preparátummal szemben, az előbbiben nem észlelt sejtkárosodás elmaradása (Sipka és mtsai, 2001). Ebből következik, hogy vizsgáltainkhoz nem frakcionált, nem károsodott sejtpreparátumokat használtunk fel.

A jelen eredmények klinikai és fiziológiai fontossága, hogy az adenzinnak és receptor specifikus analógjainak gátló hatása van az IL-1 β aktivált perifériás human monocitákból történő kibocsátására. Főleg az A_{2A} receptorok szolgálhatnak potenciális anti-inflammációs ágensként (Haskó és mtsai, 1998; Sullivan és Linden, 1998; Gomez és Sitkovsky, 2003). Figyelemre méltó az a korábbi megfigyelés, hogy az egészséges önkéntesek szérumban az átlag adenzin koncentráció 40 nM (nem közölt adat) körüli, míg septicus shockban elérheti a 0.75 μ M koncentrációt is (Sipka és mtsai, 1995). Az adenzin koncentrációja a keringésben 4 és 10 μ M közötti lehet sepsisben szenvedő betegeknél (Martin és mtsai, 2000). Ezen felül kimutatták, az adenzin koncentrációja egyes gyulladásban levő szövetekben elérheti és meg is haladhatja a 100 μ M értéket is. (Cronstein, 1994). Eredményeink alapján az adenzin képes gátolni az IL-1 kibocsátását aktivált monocitákból, a korábban említett koncentrációktól alacsonyabb értékeken is. Mivel az IL-1 az egyik legerősebb természetes kiváltója a hipertermiás reakciónak (Dinarello, 1991; Colotta és mtsai, 1998; Matuszek és Gagato, 1997), az adenzin fő

fiziológiás szerepe a hiperpirexia megakadályozása lehet az aktivált monociták és makrofágok IL-1 kibocsátásának a gátlásával (Conti és mtsai, 2004). Ehhez még hozzátehetjük, hogy az adenzinnak lehet egy általános szerepe a gyulladásos sejteknek hiperaktivitásának a moderálása. Az adenzin azon képessége, hogy az aktuális IL-1 szintet szabályozza a szervezet bizonyos részeiben fontos szerepe lehet az innate immunitásban. (Haskó és Cronstein, 2004). Ezen felül az adenzinnak szerepe van a methothrexate (MTX) gyulladásgátló hatásának kifejtésében (Cronstein és mtsai, 1993), mivel gátolja a lokális IL-1 kibocsátását (Seitz és mtsai, 1998).

Összefoglalva, a jelen vizsgálat kimutatta, hogy az adenzin és szelektív adenzin receptor agonisták gátolják *in vitro*, az IL-1 β kibocsátását aktivált human perifériás monocitákból. Továbbá kiemeltük az adenzin kiváltotta IL-1 β gátlásának a fiziológiai és klinikai fontosságát. Az a megfigyelés miszerint az A₁, A₃, és főleg az A_{2A} receptor aktivációja csökkentheti az IL-1 β kibocsátását az aktivált monocitákból további adatokat szolgáltat az endogén purin nukleozidok által kiváltott gyulladásgátló hatásamechanizmusában.

8.4. Adenzin hatása az arachidonsav felszabadulásra aktivált humán mononukleáris sejteken.

Az adenzin humán plazmaszintje 100–120 nM között van normális körülmények között (Sipka és mtsai, 1995). Korábban már leírták, hogy szeptikus shockban a betegek adenzinszintje elérheti a 750 nM-s koncentrációt (Cronstein, 1994). Egyes, gyulladás által érintett helyeken az adenzin helyi koncentrációja meghaladhatja a 100 μ M-s értékeket (Burgoyne és Morgan, 1990). A jelen eredményeink alapján kimondható, hogy az adenzin 100–120 nM-os fiziológiás koncentrációja nem válthat ki szignifikáns gátló hatást az arachidonsav kibocsátására aktivált monocitákból, melyeket PKC jelátviteli transzdukciós rendszeren vagy a megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ szint által váltottunk ki. Speciális klinikai helyzetekben mégis mikor az arachidonsavat termelő sejtek felszaporodnak bizonyos gyulladásos helyeken, az adenzin magasabb koncentrációban szabadul fel, ami szignifikánsan csökkenti a lokális arachidonsav kibocsátást.

Ez a gátlás úgy tűnik főleg az A₁ és A₂ receptorok ingerlése nyomán alakul ki, míg az A_{2B} és A₃ receptorok szerepe úgy tűnik ebben a folyamatban elhanyagolható. Az

arachidonsav aktuális szintje három intracelluláris enzim aktivitásától és együttműködésétől függ, mint: a citoszolban levő (Ca^{2+} függő) PLA_2 (c PLA_2 , IV típus), a Ca^{2+} független PLA_2 (i PLA_2 , IV típus) és a diacilglicerol (DAG) lipáz (Wu, 2004). Ki kell emelni mégis, hogy a monociták által termelt extracelluláris IL-1 egyike a „legjobb fiziológiás” aktivátora az arachidonsav termelésének és kibocsátásának (Chang és mtsai, 1986) főként a c PLA_2 aktivációja nyomán (Morri és mtsai, 1994). Azt gondoljuk, hogy a csökkent arachidonsavtermelés aktivált monocitákból, melyet adenozin és A_1 és $\text{A}_{2\text{A}}$ specifikus receptor-agonisták hatására értünk el, korrelál a csökkent IL-1 termeléssel, PMA és Ca^{2+} -ionofor által stimulált sejtekben (Sipka és mtsai, 2005). Azért bizonyos mennyiségű szekretábilis PLA_2 (II.A.típus, 14 kD) megjelenhet az aktivált thrombociták által körülvevett aktivált monociták interakciójából (Krump és Borgeat, 1999). Nem lehet kizárni, hogy az említett enzim képes bizonyos mennyiségű extracelluláris arachidonsavat termelni. Mindazonáltal, azt hisszük, hogy ahhoz, hogy a monociták folyamatosan arachidonsavat termeljenek, környezetükben szükségük van az IL-1 folyamatos jelenlétére (Morri és mtsai, 1994; Liu és Yong, 2004). Lehetséges, hogy a monocitákban a c PLA_2 aktivitása közvetlenül korrelál az IL-1 intracelluláris koncentrációjával, ami az arachidonsav kibocsátását stimulálja. Ez lehet az endogén adenozin egyik biológiai szerepe, hogy emelkedett koncentrációban, gátolja (főleg indirekt módon, az IL-1 termelésének gátlásával) az arachidonsav kibocsátását monocitákból az A_2 és A_1 receptorokon keresztül (Sipka és mtsai, 2005). Az A_2 receptor által mediatált (c PLA_2 dependens) arachidonsav kibocsátásának gátlása magas extracelluláris adenozin szint által megfigyelhető még a neutrofil granulocitáknál is (Németh és mtsai, 2003). Egy A_1 receptor-agonista hatása az arachidonsav kibocsátásnak csökkenését okozza humán monocitákban a MEK és ERK kináz rendszereken át, valamint p38 MAPK-mediált mechanizmus által (Germack és Dickenson, 2004; Evans és mtsai, 2002) a CREB részvételével (32).

Ezek a mechanizmusok szintén kapcsolatba lehetnek a c PLA_2 independens (i PLA_2 és DAG lipáz típusú) arachidonsav termelési folyamatokkal (Evans és mtsai, 2002). Legjobb meggyőződésünk szerint ez az első alkalom, hogy leírásra kerül az adenozin arachidonsav termelését gátló hatást aktivált humán monocitákból. Ki kell emelni, hogy ez a mechanizmus valószínűleg nem működik fiziológiás adenozin koncentráció esetén. Patológias körülmények között, például gyulladt szövetekben, mikor a monociták száma magas és az adenozin koncentrációja szintén, az A_1 és $\text{A}_{2\text{A}}$ receptorok aktivációja

hatékonyan gátolhatja az arachidonsav metabolitok kibocsátását monocitákból. Mégis az arachidonsav kibocsátásának gátlása a neutrofilekben is létre jöhet sokkal alacsonyabb adenzinkoncentráció esetében (kb 100 szor) (German és Credich, 1984). A jelen adatok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az adenzin erős gyulladásgátló hatását a monocitákra az IL-1 termelésének a gátlásával érheti el és ezzel csökkenti az arachidonsav metabolitok kibocsátását.(Sipka és mtsai, 2005).

9. KÖVETKEZTETÉSEK

- 9.1. Kísérleteink alapján állatkísérletes bizonyítékokat szereztünk arra vonatkozóan, hogy a tartós koffein kezelés mélyreható változásokat hoz létre a bronchiális adenzin receptorok működésében, ill. az adenzin receptorok érzékenységében. Elégge egyértelműnek látszik, hogy a hosszan tartó koffein kezelés olyan változásokat idéz elő az epiteliális sejtek szintjén, amely mélyrehatóan befolyásolja a bronchiális adenzin receptorok érzékenységét, amely az epitéliummal történő kölcsönhatás kiiktatásával jelentős up-regulációt mutat az adenzin receptorok szintjén. Az eredményeink arra utalnak, hogy ebben a folyamatban az epiteliális sejtekben vagy azok közvetlen környezetében a neuropeptidek felszaporodásának komoly jelentősége lehet. Mivel a kávé és a koffein-tartalmú energiatalkok fogyasztása világszerte elterjedt, ezért – amennyiben az állatkísérletekben nyert adatok a humán viszonyokra is extrapolálhatók – akkor az erős kávéfogyasztó ill. energiatalfogyasztó populációban hasonló adaptív jelenségekkel számolni kell. Mivel az endogén adenzin a tüdő fiziológias működésében alapvető szerepet játszik, ennek a regulációnak a megváltozása az élettani szabályozás módosulását idézheti elő, amelynek egészségre gyakorolt hatása ma még kiszámíthatatlan. Mivel ezek az eredményeink még alapvetően eredetiek, ezért érdemes ezt a megkezdett utat tovább folytatni, lehetőleg a klinikummal történő szoros kollaborációban.
- 9.2. Ami a xantin-inszenzítív adenzin kötőhelyek és receptorok szerepét illeti, sikerült kimutatnunk, hogy az adenzin, főleg magasabb koncentrációban képes ezek aktiválásával biológiai hatásokat létrehozni, azaz a bronchiális tónust befolyásolni. Figyelemreméltónak tartjuk, hogy ezek a hatások erőteljesebben jelentkeznek az adenzin dezamináz gátlása után. Mivel a gyógyszerek egy

csoportja gátolja ezt a főként intracellulárisan lokalizálódó enzimet, másrészt munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a hipoxiás körülmények szignifikánsan csökkentik az adenzin dezamináz aktivitást, ezért a tüdő oxigénhiányos állapotaiban lehet számítani e kötőhelyek aktivitásának fokozódására. Elképzelhető, hogy az asztmás vagy COPD-ben szenvedő betegek esetében ez a moduláció fokozottan jeletkezik. Ennek a jelenségnek szerepe lehet a kórélettani folyamatok magyarázatában, ugyanakkor a gyakorlati gyógyszerfejlesztés szempontjából is iránymutató lehet és a kifejlesztendő intracelluláris kötőhely modulátorok az említett gyulladásos tüdőfolyamatok farmakológiai megközelítésében is hasznosak lehetnek.

- 9.3. A perifériás mononukleáris sejtek felhasználásával kapott eredményeink a gyulladásos tüdőbetegségek patomechanizmusának jobb megértéséhez is hozzájárulhatnak. Az a tény, hogy az IL-1 β és az arachidonsav szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, továbbá az a megállapításunk, hogy az adenzin szignifikánsan – receptor altípus-függő módon – gátolja ezen inflammatorikus mediátoroknak a felszabadulását, megengedi azt a feltételezést, hogy az adenzin a szervezetben – így feltehetően a tüdőben is – koncentráció-függő gyulladásgátló hatást fejt ki. Ennek a feltételezett folyamatnak a jelentősége részben patofiziológiai, részben terápiás, hiszen az endogén adenzin koncentrációnak a gyulladásgátló hatás szempontjából optimális tartományba történő szorítása a szervezet természetes védekezőreakciójának a felerősödésével járhat.

Mindebből következik, hogy az állatkísérletekben nyert eredményeink nemcsak a patomechanizmus szempontjából lehetnek jelentősek, hanem a gyakorlati gyógyszerfejlesztés irányában is előremutatók lehetnek.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nem volt egyszerű míg szállt ebben a formájában a dolgozat. Az eddig elvezető út hosszú volt, de nagyon sokan álltak mellettem, és nekik köszönetet kell mondanom. Kinek a segítségért, kinek a példamutatásért, kinek a türelméért, kinek pedig mindenért. A téma választásánál dr. Édes István professzor úr tevékenysége, tudományos munkája

és példája késztetett arra, hogy ideje lenne hozzáfogni. Köszönöm szépen segítségét, érdeklődését, tanácsait és ösztönzését. Dr. Szentmiklósi József, a témavezetőm, akinek a nemzetközi porondon is elismert adenoazin kutatása és ebben a témában szerzett tapasztalata tette lehetővé, hogy kiválasszam, és a munkát véghezvigyük.

Köszönöm szépen a rám szánt idejét, türelmét és emberi jóságát.

A „Farmakológiai Intézet” lett „második otthonom”, minden egyes munkatársának köszönöm, de külön kiemelném Dr. Cseppentő Ágnes, Dr. Gesztelyi Rudolf, Dr. Zsuga Judit, Hauszman Éva és Pásti Lajosné nélkülözhetetlen segítségét és további sikereket kívánok tudományos munkájukban és az életben egyaránt.

Külön szeretném kiemelni Dr. Sipka Sándor professzor úrnak segítségét, útmutatását és példáját, és rengeteg konkrét segítségét, ami ösztönzően hatott rám. Az ő személyes segítése és ösztönzése nélkül szintén nem jöhetett volna létre a dolgozat.

„Első munkahelyemnek” a Tüdőgyógyászati Klinikának is sokat köszönhetek, talán mindent. Elsősorban, hogy lehetővé tette munkám elvégzését, befejezését, sőt számtalan ösztönzést, bátorítást és segítséget kaptam végig az évek során. Dr. Szilasi Mária professzor asszonynak köszönetet mondok mindazért a szakmai és emberi támogatásért, ami nélkül most nem állhatnék, itt ahol állok. Dr. Magyar Pál professzor úr nagyon sokat ösztönzött, hogy fejezzem be a munkát. Sajnos őt egy tragikus balaset elragadott az élők sorából, de így is nagyon sokat gondoltam és gondolok rá, mert végig éreztem segítő szándékát.

Végül, de nem utolsósorban családomnak szeretném megköszönni, feleségemnek, fiamnak és lányomnak, hogy munkám alatt érezhettem megértő hozzáállásukat és így velük együtt örülhetek a feladat teljesítésének.

A disszertáció anyagának kidolgozásához a következő pályázatok nyújtottak anyagi lehetőséget:

ETT 307/96, ETT 432/2000, ETT 111/2003, ETT 202/2003, OTKA T037531, ETT 586/2006 és

TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045.

A kísérletekhez szükséges MAB engedélyek száma: DE MAB 45/2001 és 7/20033.

11. IRODALOM

Agarwal, K.,C., Agarwal, R.,P., Stoeckler, J.,D., Parks, R.,E., Jr , 1975, Purine nucleoside phosphorylase. Microheterogeneity and comparison of kinetic behavior of the enzyme from several tissues and species. *Biochemistry*. 14;**14**(1):79–84

Ahmad, S. Ahmad, A. McConville, G. Schneider, B. K. Allen, C.B. Manzer, R. Mason, R.J. and White, C.V. 2005, Lung epithelial cells release ATP during ozone exposure: signaling for cell survival. *Free Radic Biol Med* **39**: 213-226.

Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A (2004) Phospholipase C and A₂ control lysosome mediated IL-1 β secretion: implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9745-9750.

Aronoff, D.M. Canetti, C. and Peters- Golden, M: 2004, Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J. Immunol.* **173**. 559-565.

Aronoff, D. M. Canetti, C. Serezani, C. H. Luo, M. and Peters- Golden, M. 2005, Cutting edge: Macrophage inhibition by cAMP: Differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J. Immunol.* **174**, 595-599.

Auchampach, J.A.; Gross, G.J., 1993, Adenosine A₁ receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs, *Am J Physiol*, , **264**, H1327-1336

Auchampach, J.A.; Kreckler, L.M.; Wan, T.C.; Maas, J.E.; van der Hoeven, D.; Gizewski, E.; Narayanan, J.; Maas, G.E., 2009, Characterization of the A_{2B} adenosine receptor from mouse, rabbit, and dog, *J Pharmacol Exp Ther*, **329**, (1), 2-13.

Balazovich, K.,J., Boxer, L.,A., 1990, Extracellular adenosine nucleotides stimulate protein kinase C activity and human neutrophil activation. *J Immunol. Jan* 15;**144** (2):631–637.

Ball, H.A., Van Scott, M.R., Robinson, C.B. 2004, Sense and antisense: therapeutic potential of oligonucleotides and interference, RNA in asthma and allergic disorders. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* **27**: 207–217.

Baluk, P., Nadel, J.A., McDonald, D.M. 1993, Calcitonin gene-related peptide in secretory granules of serous cells in the rat tracheal epithelium. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* **8**:446-453.

Baraldi, P.G.; Tabrizi, M.A.; Fruttarolo, F.; Romagnoli, R.; Preti, D., 2009, Recent improvements in the development of A(2B) adenosine receptor agonists, *Purinergic Signal*, **5**, (1), 3-19.

Barnes, P.J., Chung, K.F., Page, C.P. 1998, Inflammatory mediators of asthma: An update. *Pharmacol. Rev.* **50**:515-596.

Barnes P.J. 2003 Theophylline: New Perspectives for an Old Drug, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**: 813-818.

Barthó, L., Benkő, R., Patacchini, R., Pethő, G., Holzer,-Petsche, U., Holzer, P., Lázár, Z., Undi, S., Illényi, L., Antal, A., Horváth, O.P. 2004, Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. *Eur. J. Pharmacol.* **500**:143-157.

Belardinelli, L. Shryock, J.C. Song, Y. Wang, D. Srinivas, M., 1995, Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes, *FASEB J*, **9**, (5), 359-365.

Berne, R.M., 1963, Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow, *Am J Physiol*, **204**, 317-322.

Bertrand, C., Da Silva, A., Landry, Y., Theodorsson,E., Tshirhart, E. 1993, An epithelial-dependent contracting factor induced by calcium influx in guinea-pig trachea. *Pulm. Pharmacol.* **6**:69-76.

Blackburn, M.,R., Volmer, J.,B., Thrasher, J.,L., Zhong, H., Crosby, J.,R., Lee., J., J., Kellems, R.,E., 2000, Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation and airway obstruction. *J. Exp. Med.* **192**. 159-170.

Blackburn, M.,R., 2003, Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends.Pharmacol.Sci.* **24**. 66-70.

Blackburn, M.R. et al. 2003, Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13-adenosine amplification pathway. *J. Clin. Invest.* **112**. 332- 344.

Bohm, M. Bruckner, R. Hackbarth, I. Haubitz, B. Linhart, R. Meyer, W. Schmidt, B. Schmitz, W. Scholz, H., 1984, Adenosine inhibition of catecholamine-induced increase in force of contraction in guinea-pig atrial and ventricular heart preparations. Evidence against a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent effect, *J Pharmacol Exp Ther*, **230**, (2), 483-492.

Bona, E., Aden, U., Fredholm, B.B., Hagberg, H. 1995, The effect of long term caffeine treatment on hypoxic-ischemic brain damage in the neonate. *Pediat. Res.* **38**:312-318

Bouma, M.,G., Stad, R.,K., van den Wildenberg, F.,A., Burman, W.,A., 1994, Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated monocytes. *J Immunol* **153**: 4159-4168.

Bouma, M.,G.,van den Wildenberg, F.,A., Buurman, W.,A., 1996 Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **270**, C522-C529

Boyum, A. 1968, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J Clin Lab Invest* **97** (Suppl.): 77-108

Brackett, L. E., Daly, J. W. 1991, Relaxant effects of adenosine analogs on guinea pig trachea in vitro: xanthine-sensitive and xanthine-insensitive mechanisms. *J. Pharm. Exp. Ther.* **257**:205-13

Brown, C.M., Collis, M.G. 1982, Evidence for an A₂/R_a adenosine receptor in the guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* **76**:381-387

Brugós, L., Gesztelyi, R., Zsuga, J., Cseppentő, Á., Galajda, Z., Sipka, S., Szilasi, M., Édes, I., Szentmiklósi, A.J. **2004**. Biphasic modulation of adenosine-induced bronchial responses during chronic caffeine treatment in guinea pigs. *Eur. Resp. J.* **24**:130

Brugós, L., Gesztelyi, R., Zsuga, J., Cseppentő, Á., Benkő, I., Galajda, Z., Deák, G., Sipka, S., Röszer, T., Kovács, P., Szilasi, M., Édes, I., Szentmiklósi, A., J. **2007**. Modulation of Adenosine-Induced Responses in the guinea pig Trachea during long-term Caffeine Treatment: Possible role of Epithelium, *J Pharmacol Sci* **105**, 279-290.

Bruns, R.F.; Lu, G.H.; Pugsley, T.A., 1986, Characterization of the A₂ adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes, *Mol Pharmacol*, **9**, (4), 331-346.

Burnstock, G., 1976, Purinergic receptors, *J Theor Biol*, **62**, (2), 491-503.

Burnstock, G., 1980, Purinergic receptors in the heart, *Circ Res*, **46**, (6 Pt 2), 1175-182.

Burgoyne, R., and Morgan, A., 1990. The control of free arachidonic acid levels. *Trends Biochem Sci.* **15**: 365-366.

Chang, J., S.C. Gilman, A.J. Lewis. 1986. Interleukin 1 activates phospholipase A₂ in rabbit chondrocytes: a possible signal for IL-1 action. *J.Immunol.* **136**: 1283-1287.

Cobb, B., R., Ruiz, F., King, C., M., Fortenberry, J., Greer, H, Kovacs, T., Sorscher, E., J, Clancy, J., P., 2002, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; **282**:L12-L25

Cobb, B.,R., Fan, L., Sorscher, E.,J., Clancy, J.,P.,.2002, *Ped Pulmonol Suppl*; **24**: A165.

Cobb, B.,R., Clancy, J.,P., In: Schwiebert EM, Editor. Current topics in membranes. New-York: Academic Press; 2003.p. 150-180

Collis, M.,G., Hourani, S.,M.,O., 1993, Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**:360-366

Colotta, F, Ghezzi, P., Mantovani, A 1998, Interleukin 1 In: Cytokines. Mire-Sluis AR and Thorpe R (eds) Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto pp 1-18

Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C., Bartfai, T., 2004 Cytokines and fever. *Front Biosci* **9**: 1433-1449.

Chunn, J.,L., Young, H.,W., Banerjee, S.,K., Colasurdo, G.,N., Blackburn, M.,R., **2001**, Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol*; **167**, 4676-4685

Chang, J., S.C. Gilman, A.J. Lewis. **1986**, Interleukin 1 activates phospholipase A₂ in rabbit chondrocytes: a possible signal for IL-1 action. *J.Immunol.* **136**: 1283-1287

Cronstein, B. N., Kramer,S.,B., Weissmann, G., Hirschhorn, R., **1983**. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J. Exp. Med.***158**:1160-1177

Cronstein, B.,N., Haines., K.,A,. Kolasinski, S., Reibman, J., **1992**, Occupancy of G alpha s-linked receptors uncouples chemoattractant receptors from their stimulus-transduction mechanisms in the neutrophil. *Blood*.Aug 15; **80** (4):1052–1057.

Cronstein, B.N., Naime, D., Ostad, E., **1993**, The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J.Clin. Invest.* **92**: 2675–2682.

Cronstein, B.,N., **1994**, Adenosine an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* **76**, 5-13

Cronstein, B.,N., Van de Stouwe, M., Druska, L., Levin, R.I., Weissmann, G.,**1994**, Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms. *J. Inflamm.* **18**: 323–335

Cronstein, B.N. **2006**, Adenosine Receptors and Wound Healing, Revised. *The Scientific World JOURNAL* **6**. 984-991

Cushley M.J., Tattersfield A.E.,Holgate S.T. 1983, Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects *Br. J. Clin. Pharmacol.* **15**: 161–165.

Daly, J.W.; Butts-Lamb, P.; Padgett, W., 1983, Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines, *Cell Mol Neurobiol*, , 3, (1), 69-80.

Deckert, J.; Nothen, M.M.; Bryant, S.P.; Ren, H.; Wolf, H.K.; Stiles, G.L.; Spurr, N.K.; Propping, P., Human adenosine A1 receptor gene: systematic screening for DNA sequence variation and linkage mapping on chromosome 1q31-32.1 using a silent polymorphism in the coding region, **1995**, *Biochem Biophys Res Commun*, 214, (2), 614-621.

Dent, G. et al 1994, Theophylline suppresses human alveolar macrophage respiratory burst through phosphodiesterase inhibition. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* **10**, 565-572.

Dennis, E.A. 1997. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *TIBS* **22**:1-2.

Dennis, E. A., **2000**, Phospholipase A₂ in eicosanoid generation, *Am J Respir Crit Care Med*, **161**, S32-S35

Delgado, M., Gonzales-Rey, E. Ganea, D., **2005**, The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.* **175**, 7311-7324

de Rooij, J. Zwartkruis, F. J. Verheijen, M. C, Cool, R.H. Nijman, S.M. Wittinghofer, A. Bos, J. L. 1998, Epac is a Rap1 guanine-nucleotide exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-477

Dessauer, C., W., Tesmer, J., J., Sprang, s., R., Gilman, A., G., 1999, The interactions of adenylate cyclase with P-site inhibitors; *Trends Pharmacol Sci*, **20**(5), 205-210

Dent, G., Giembycz, M.,A., Rabe, K.,F., Wolf, B., Barnes, P.,J., Magnussen, H., **1994** Theophylline suppresses human alveolar macrophage respiratory burst through phosphodiesterase inhibition. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **10**(5):565–572.

Dickenson, J.,M and Hill, S.,J., 1994, Interactions between adenosine A₁ and histamine H₁ receptors. *Int J Biochem* **8**:959-969

Di Virgilio, F. et al. 2001, Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, **97**, 587- 600

Dinarello, CA 1991, Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**:1627-1652.

Drake, I., Routledge, P.A., Richards, R. 1994, Bronchospasm induced by intravenous adenosine, *Hum. Exp. Toxicol.* **13**: 263–265

Drury, A.,N., Szent-Györgyi, A., 1929, The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their actions upon the mammalian heart. *J. Physiol. London* **68**:213-237

Eglen, R.,M., Harris, G.,C., Taylor, M., Pfister, J.,R., Whiting, R.,L., 1991, Characterization of muscarinic receptors mediating release of epithelial derived relaxant factor (EpDRF) in guinea-pig isolated trachea. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **344**:29-35

Evans, J.H., D.J. Fergus, C.C. Leslie. 2002. Inhibition of MEK1/ERK pathway reduces arachidonic acid release independently of cPLA₂ phosphorylation and translocation. *BMC Biochem.* **3**: 30-47.

Fernandes, L.,B., Paterson, J.,W., Goldie, R.,G., 1989, Co-axial bioassay of a smooth muscle relaxant factor released from guinea-pig tracheal epithelium. *Br. J. Pharmacol.* **96**:117-124

Flamand, N. Boudreault, S. Picard, S. Austin, M. Surette, M.E. Plante, H. Krump, E. Vallee, M.J. Gilbert, C. Naccache, P. Laviolette, M. Borgeat, P. 2000 *Am J Respir Crit Care Med* **161**. S88-S94

Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, and Arock M. 2002, The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol.* **23**:151-158.

Feoktistov, I., Biaggioni, I., 1998, Pharmacological characterization of adenosine A_{2B} receptors. *Biochem Pharmacol* **55**:627-633.

Feoktistov, I., Garland, E.M., Goldstein, A.E., Zeng, D., Belardinelli, L., Wells, J.N., Biaggioni, I. 2001, Inhibition of human mast cell activation with the novel selective adenosine A_(2B) receptor antagonist 3-isobutyl-8-pyrrolidinoxanthine (IPDX) *Biochem. Pharmacol.* **62**: 1163–1173

Feoktistov, I- et al. 2002, Differential expression of adenosine receptor sin human endothelial cells: role of A2B receptor sin angiogenic factor regulation. *Circ. Res* **90**. 531-538

Feoktistov, I. et al. 2003, Mast cell- mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A_{2B} and A₃ adenosine receptors. *Circ. Res.* **92**, 485-492

Feoktistov, I. 2004, Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A_{2B}-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J. Immunol.* **172**: 7726–7733

Fernandes, L.,B., Paterson, J.,W., Goldie, R.,G., 1989, Co-axial bioassay of a smooth muscle relaxant factor released from guinea-pig tracheal epithelium. *Br. J. Pharmacol.* **96**:117-124

Folkerts, G., Nijkamp, F.,P., 1998, Airway epithelium: more than just a barrier! *Pharmacol. Rev.* **19**:334-341

Fozard, J.,R., 2003, The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? *Current Opinion Pharmacol.* **3**:264-269

Fredholm, B.,B., 1982, Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. *Acta Physiol. Scand.* **115**:283-286

Fredholm, B.B., Zhang, Y., van der Ploeg, I. 1996, Adenosine A_{2A} receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl–Met–Leu–Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Eur. J. Pharmacol.* **354**: 262–267

Fredholm, B.,B., Batting, K., Holmen, J., Nehlig, A., Zvartau, E.,E., 1999, Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* **51**:83-133

Fredholm, B.,B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., and Wasserman, W. 2000, Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**. 364-374.

Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J. 2001, International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**: 352–527

Fredholm, B.,B. Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J., 2001, International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol Rev*, **53**, (4), 527-552.

Fredholm, B.,B., Chern, Y. Franco, R. Sitkovsky, M., 2007, Aspects of the general biology of adenosine A_{2A} signaling, *Prog Neurobiol*, , **83**, (5), 263-276.

Gudipaty L, Munetz J, Verhoef PA, Dubiak GR. 2003, Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1(β) secretion by P2X₇ nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)*; **285**:C286-299

German, D.C. and N.M. Kredich. 1984,. A radioenzymatic assay for plasma adenosine. *Anal. Biochem.* **142**:536-541.

Germack R. and J.M.Dickenson. 2004, Characterization of ERK1/2 signalling pathway induced by adenosine receptor subtypes in newborn rat cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacology* **141**: 329-339.

Georgiev, V., Johansson, B., Fredholm, B.,B., 1993, Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A₁ receptor number. *Brain. Res.* **612**:271-277

Gessi, S, Varani, K.,M.,S. Ongini, E, Borea, P.,A., 2000, A_{2A}-adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br J Pharmacol* **129**:2-11.

Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Cattabriga, E., Iannotta, V., Leung, E., Baraldi, P.G., Borea, P.A. 2002, A₃ adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. *Mol. Pharmacol.* **61**: 415–424

Gilbert, J.,J., Stewart, C.A. Courtney et al. 1996. Antigen receptors on immature but not mature B and T cells are coupled to cytosolic phospholipase A₂ activation. *J. Immunol.* **156**: 2054-2061.

Ghai, G., Zimmerman, M.,B., Hopkins, M.,F., 1987, Evidence for A₁ and A₂ receptors in guinea-pig trachea. *Life Sci.* **41**:1215-1244

Gomez, G., Sitkovsky, M.,V.,. 2003, Targeting G protein-coupled A_{2a} adenosine receptors to engineer inflammation in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:410-414.

Grenier, S., Flamand, N., Pelletier, J.,Naccache, P.,H., Borgeat,P.,Bourgoin, S.,G., **2003**, Arachidonic acid activates phospholipase D in human neutrophils; essential role of endogenous leukotriene B₄ and inhibition by adenosine A_{2A} receptor engagement *Jour of Leucocyte Biology* vol. **73**. april 530-539

Haribabu, B., Verghese, M.,W., Steeber, D.,A., Sellars, D.,A., Bock, C.,B., Snyderman, R., **2000**, Targeted disruption of the leukotriene B(4) receptor in mice reveals its role in inflammation and platelet-activating factor-induced anaphylaxis *J Exp Med* **192**. 433-438

Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps. **2002**. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**:144-150.

Hannon, J.P. et al. 1995, A role for mast cells in adenosine A₃ receptor-mediated hypotension in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **115**. 945-952

Haskó, G. 1996, Adenosine receptors agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* **156**, 4634-4640

Haskó, G., Németh, Z.,H, Vizi, E.,S., Salzman, A.,L., Szabó, C., 1998, An agonist of adenosine A₃ receptor decreases interleukin-12 and interferon- γ production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol* **358**: 261-268.

Haskó, G., Kuhel, D.G., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Deitch, E.A., Mabley, J.G., Marton, A., Szabo, C. 2000, Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A_{2A} receptor-dependent and independent mechanisms *FASEB J.* **14**: 2065–2074

Haskó, G. et al. 2002, Adenosine a potential mediator of immuno-suppression in multiple organ failure. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**. 440-444

Haskó, Gy. Cronstein, N.C. 2004 Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity *TRENDS in Immunol* vol **25**; No 1 Jan, 33-39

Haworth, O., Levy, B.,D., **2007** Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. *Eur Respir J* **30**:980–992

Hay, D.,W.,P., Muccitelli, R.,M., Page,, C.,P., Spina, D. 1992, Correlation between airway epithelium-induced relaxation of rat aorta in the co-axial bioassay and cyclic nucleotide levels. *Br. J. Pharmacol.* **105**:954-958

Hay, D.,W.,P., Van Scott, M.,R., Muccitelli, R.,M., **1997**, Characterization of endothelin release from guinea-pig tracheal epithelium: Influence of proinflammatory mediators including major basic protein. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **10**:189-198

Hentchel-Franks, K., Lozano, D., Eubanks-Tarn, V.,L., Cobb, B.,R., Fan, L., Oster, R., Sorscher, E.,J., Clancy, J.,P., **2004**, *Am Respir Cell Mol Biol*, **31**:140-146

Henry, P.; Demolombe, S.; Puceat, M.; Escande, D., **1996**, Adenosine A1 stimulation activates delta-protein kinase C in rat ventricular myocytes, , *Circ Res*, **78**, (1), 161-165.

Hu, K.; Duan, D.; Li, G.R.; Nattel, S., **1996**, Protein kinase C activates ATP-sensitive K⁺ current in human and rabbit ventricular myocytes, *Circ Res*, , **78**, (3), 492-498.

Huszár, E., Vass, G., Vizi, E., Csoma, Zs., Barat, E., Molnár, V., G., Herjavec, I., Horváth, I. **2002**, Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma, *Eur Respir J* **20**:1393-1398

Jacobson, K.A.; van Galen, P.J.; Williams, M., **1992**, Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential, *J Med Chem*, , 35, (3), 407-422.

Janeway, C.A. Jr, Medzhitov, R., **2002**, Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216

Ji, X.; Kim, Y.C.; Ahern, D.G.; Linden, J.; Jacobson, K.A., **2001**, [3H]MRS 1754, a selective antagonist radioligand for A(2B) adenosine receptors, *Biochem Pharmacol*, , 61, (6), 657-663.

Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J. **1997** Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest* **100**: 2849-2857

Johansson, B., Georgiev, V., Kousmanen, T., Fredholm, B., B., 1996, Long-term treatment with some methylxanthines decreases the susceptibility to bicuculline- and pentylenetetrazol-induced seizures in mice. Relationship to c-fos expression and receptor binding. *Eur. J. Neurosci.* **8**:2447-2458

Johansson, B., Georffiev, V., Lindström, K., Fredholm, B., B., 1997,. A₁ and A_{2A} adenosine receptors and A₁ mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res.*, **762**:153-164

Joad, J.P., Kott, K.S. 1993, Effect of adenosine receptor ligands on cAMP content in human airways and peripheral lung *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**: 134–140

Jutel, M, T. Watanabe, M., Akdis, K., Blaser, C., A., **2002**, Immune regulation by histamine. *Curr. Opin, Immunol.* **14**, 735- 740

Kawasaki, H. et al. 1998, A family of c AMP-binding proteins that directly activate Rap 1, *Science*, **282**, 2275-279

Klinger, M.; Freissmuth, M.; Nanoff, C., Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins, **2002**, *Cell Signal*, *14*, (2), 99-108.

Khoa, N.,D., Montesinis, C., Reiss, A.,B., Delano, D., Awadallah, N., Cronstein, B.,N., 2001, Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A_{2A} receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol* **167**:4026-4032.

Koga, K., Takaesu, G., Yoshida, R., Nakaya, M., Kobayashi, T., et al. **2009** Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity* **30**: 372–383.

Kohno, M., Murakawa, K., Horio, T., Yokokawa, K., Yasunari, K., Fukui, T., Takeda, T. 1991, Plasma immunoreactive endothelin-1 in experimental malignant hypertension. *Hypertension*. 18:93-100

Klotz, K.,N., Hessling, J., Hegler, J., Owman, C., Kull, B., Fredholm, B.,B., Lohse, M.,J., 1998, Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes: Characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **357**:1–9

Klotz, K.N., 2000, Adenosine receptors and their ligands, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **362**, (4-5), 382-391.

Kunzelmann, K. Scheidt, K. Scharf, B. Ousingsawat, J. Schreiber, R. Wainwright, B. and McMorran, B. 2006, Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits Na⁺ transport in airway epithelia. *FASEB J* **20**: 545-546

Krump, E., Picard, S., Mancini, J., Borgeat, P., **1997** Suppression of leukotriene B₄ biosynthesis by endogenous adenosine in ligand-activated human neutrophils, *J Exp Med* **186**. 1401-1406.

Krump, E., Borgeat, P., **1999**, Adenosine. An endogenous inhibitor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Adv Exp Med Biol* **447**:107-115.

Lappas, C.M., Sullivan, G.W., Linden, J. 2005, Adenosine A_{2A} agonists in development for the treatment of inflammation *Expert. Opin. Investig. Drugs* **14**: 797–806

Lazarowski, E.,R., Tarran, R., Grubbs, B.,R., van Heusden, C.,A., Okada, S., Boucher, R.,C., 2004, *J Biol Chem*; **279**: 36855-36864

Lee, J.E.; Bokoch, G.; Liang, B.T., **2001**, A novel cardioprotective role of RhoA: new signaling mechanism for adenosine, *FASEB J*, **15**, (11), 1886-1894.

Le Moine, O., Stordeur, P., Schanane, L., Marchant, A., De Groote, D., Goldman, M., Deviere, J., 1996, Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* **156**: 4408-4414.

Lennon, P.F. 1998, Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A_{2B} receptor activation. *J. Exp. Med.* **188**, 1433-1443

Leslie, C.C. Properties and regulation of cytosolic PLA₂. 1997. *J.Biol. Chem.* **272**: 16709-16712.

Linden, J.; Taylor, H.E.; Robeva, A.S.; Tucker, A.L.; Stehle, J.H.; Rivkees, S.A.; Fink, J.S.; Reppert, S.M., 1993, Molecular cloning and functional expression of a sheep A₃ adenosine receptor with widespread tissue distribution, *Mol Pharmacol*, **44**, (3), 524-532.

Link, A.,A., Kini, T., Worth, J.,A., Mc Guire, J.,L., Crane, M.,L., Chrousos, G.,P., Wilder, R.,L., Elenkov, I.,J., 2000, Ligand activation of the adenosine A_{2A} receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* **164**:436-442.

Liu, A.,M.F., and Yong,.Y.,U., 2004. G₁₆-mediated activation of Nuclear Factor κ B by the A₁ receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signalling. *J.Biol. Chem.* **279**:53196-204.

Londos, C., Wolff, J.. **1977**, Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74** (12):5482–5486

Londos, C., Cooper, D.M.F., Wolf, J. **1980**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**. 2551-2554.)

Lorton, D., **1997**, Beta-amyloid induced IL-1 beta release from an activated human monocyte cell line is calcium- and G protein dependent. *Mech Ageing Dev* **94**:199-211.

Losinski, A. , Alexander , S.,P.,H., 1995, Adenosine receptor-mediated relaxation of guinea-pig precontracted, isolated trachea *Br.J. Pharmacol.* **116**: 2425-2428

Lukashev, D.,E., Smith, P.,T., Caldwell, C.,C., Ohta, A., Apasov, S.,G., Sitkovsky, M.,V., 2003, Analysis of A_{2a} receptor deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A_{2b}, A₁ and A₃ adenosine receptors in lymphoid organs. *Biochem Pharmacol* **65**:2082-2090.

Lukashev, D., Ohta, A., Apasov, S., Chen, Jiang-Fan, Sitkovsky, M., 2004, Physiological attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein coupled A_{2A} adenosine receptor in vivo. *J Immunol* **173**: 21-24.

Mancuso, P., Nana-Sinkam, P., Peters-Golden, M. **2001**, Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*, *Infect Immun.* **69**(4). 2011-2016

Martynyuk, A.E.; Kane, K.A.; Cobbe, S.M.; Rankin, A.C., **1996**, Nitric oxide mediates the anti-adrenergic effect of adenosine on calcium current in isolated rabbit atrioventricular nodal cells, *Pflugers Arch*, **431**, (3), 452-457

Majumdar, S., Aggarwal, B.,B., 2003, Adenosine suppresses activation of nuclear factor- κ B selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene* **22**:1206-1218.

Marleau, S., Fruteau de Lacroix, B., Sanchez, A.,B., Poubelle, P.,E., Borgeat, P., 1999, role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit, *J Immunol* **163** (6) .3449-3458

Mann, J.S. and Holgate, S.,T., 1985, Specific antagonism of adenosine-induced bronchoconstriction in asthma by oral theophylline. *Br J clin Pharmacol* **19**: 685-692

Marone, G., Casolaro, V. 1990, Basophil and mast cell releasability in allergic disorders. *In: Cellular Communications in Allergic Asthma* (S.G.O. Johansson, ed.). *AW Grafiska, Uppsala*, 45-53.

Martin, C., Leone, M., Viviani, X., Ayem, M.,L., and Guieu, R., 2000, High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med* **28**:3198-3202

Matuszek, M.,T., Gagato, I.,T., 1997, The antipyretic activity of adenosine agonists. *Gen Pharmacol* **29**:371-374.

Marquardt, H., Todaro, G.,J., Shoyab, M.,**1986** Complete amino acid sequences of bovine and human endozepines. Homology with rat diazepam binding inhibitor. *J Biol Chem.* **261**(21):9727–9731

Marquardt, D.,L., Walker, L.,L., Heinemann, S., **1994**, Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells, *J Immunol*, **152**, (9), 4508-4515.

Mayne, M., **2001**, Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Ann. Neur.* **49**, 727- 735

Merill, J., Shen, C., Schreiber, D., Coffey, D., Zakharenko, O., Fisher, R., Lahita, R., G., Salmon, J., Cronstein, B., N., 1997, Adenosine A₁ receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes. *Arthr Rheum* **40**:1308-1315.

Montesinos, M., C., Gadangi, P., Longaker, M., Sung, J., Levine, J., Nilsen, D., Reibman, J., Min Li, Chuan-Kui Jiang, Hirschhorn, R., Recht, P., A., Ostad, E., Levin, R., I., Cronstein, B., C., **1997**, Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A₂ (G α s-linked) receptors. *J. Exp. Med.* **186**. 1615-1620

Montesinos, M., C., Cronstein, B., N., 2001, Role of P₁ receptors in inflammation. In Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 151/II. Purinergic and Pyrimidinergic Signaling II. Cardiovascular, Respiratory, Immune, Metabolic and Gastrointestinal Tract Function. Abbrachio, M.P. and Williams, M., Eds. *Springer-Verlag, Berlin*. pp. 303-321.

Morri, H., Ozaki, M., Y. Watanabe. 1994, 5'-flanking region surrounding a human cytosolic phospholipase A₂ gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 6-11.

Moore, C., C., Martin, E., N., Lee, G., H., Obrig, T., Linden, J. Scheld, W., M., 2008, An A_{2A} adenosine receptor agonist, ATL313, reduces inflammation and improves survival in murine sepsis models. *BMC Infect Dis* October 20; **8**: 141

Murrison, E.M.; Goodson, S.J.; Edbrooke, M.R.; Harris, C.A., 1996, Cloning and characterisation of the human adenosine A₃ receptor gene, *FEBS Lett*, **384**, (3), 243-246.

Németh, Z., H., Leibovich, S., J., Deitch, E., A., Sperlagh, B., Virág, L., Vizi, E., S., Szabó, C., Haskó, G., 2003, Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Comm* **312**:883-888.

Newby, A., C., 1984, Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 42-44

Obiefuna, P.C., Batra, V.K., Nadeem, A., Borron, P., Wilson, C.N., Mustafa, S.J. 2005, A novel A1 adenosine receptor antagonist (L-97-1) reduces allergic responses to house dust mite in an allergic rabbit model of asthma

J.Pharmacol. Exp. Ther. **315**: 329-336

Ohta, A., Sitkovsky, M. 2001, Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage.

Nature **414**: 916–920

Olah, M.,E.; Stiles, G.,L., 1995, Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **35**, 581-606.

Olsson, R.,A., 1992, Mechanism of action of adenosine. *Coron. Art. Dis.* **3**:1116-1121

Okusa, M.,D., 2002, A_{2A} adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **282**: F10-18.

Palmer, T.,M., Gettys, T.,W., Jacobson, K.,A., Stiles, G.,L., 1994, Desensitization of the canine A2a adenosine receptor: delineation of multiple processes, *Mol Pharmacol*, **45**, (6), 1082-1094.

Palmer, T.,M., Stiles, G.,L., 1995, Adenosine receptors, *Neuropharmacology*, **34**, (7), 683-694.

Palmer, T.,M., Stiles, G.,L., 1999, Stimulation of A_{2A} adenosine receptor phosphorylation by protein kinase C activation: evidence for regulation by multiple protein kinase C isoforms. *Biochemistry* **38**: 14833-14842.

Panther, E., et al 2003, Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood*, **101**, 3985- 3990

Parsons, M., Young, L., Lee, J.,E., Jacobson, K.,A., Liang, B.,T., 2000, Distinct cardioprotective effects of adenosine mediated by differential coupling of receptor subtypes to phospholipases C and D, *FASEB J*, **14**, (10), 1423-1431.

Perregaux, D.,G., Laliberte, R.,E., Gabel, C.,A., 1996, Human monocyte interleukin-1 β posttranslational processing. Evidence of a volume-regulated response. *J Biol Chem* **271**:29830-29838.

Pierce, K.,D., Furlong, T.,J., Selbie, L.,A., Shine, J., 1992, Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain, *Biochem Biophys Res Commun*, **187**, (1), 86-93.

Poulsen, S.A., Quinn, R.,J., 1998, Adenosine receptors: new opportunities for future drugs, *Bioorg Med Chem*, **6**, (6), 619-641.

Polosa, R., 2002, Adenosine-receptor subtypes : their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease
Eur. Resp. J. **20**: 488-496

Pozo, D., 2003, VIP- and PACAP-mediated immunomodulation as prospective therapeutic tools. *Trends Mol. Med.* **9**, 211-217

Ramkumar, V., Stiles, G.L., Beaven, M.A.d Ali, H. 1993, The A3 adenosine receptor in the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* **268**. 16887-16890

Ralevic, V., Burnstock, G., 1998, Receptors for Purines and Pyrimidines
Pharmacol. Rev. **50**: 413-492

Ray, N., M. Kuwahara, Y. Takada, K. Maruyama, T. Kawaguchi, H. Tsubone, H. Ishikawa, and K. Matsuo. 2006. c-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin. *Int. Immunol.* **18**:671-677.

Reece, T.,B., Ellman, P.,I., Maxey, T.,S., Crosby, I.,K., Warren, P.,S., Chong, T.,W., LeGallo, R.,D., Linden, J., Kern, J.A., Tribble, C.G., Kron, I.L. 2005,

Adenosine A_{2A} receptor activation reduces inflammation and preserves pulmonary function in an in vivo model of lung transplantation *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **129**: 1137–1143

Rivkees, S.A.; Reppert, S.M., 1992, RFL9 encodes an A_{2b}-adenosine receptor, *Mol Endocrinol*, , 6, (10), 1598-1604

Rowe, J. et al. 1997, Inability of histamine to regulate TNF- α production by human alveolar macrophages. *Am. J.Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 218-226

Ryzhov, S., Goldstein, A.,E., Matafonov, A., Zeng, D., Biaggioni, I., Feoktistov, I., **2004**, Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A_{2B}-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J Immunol*;172, 7726-7733

Sajjadi, F.,G., Takabayashi, K., Foster, A.,C., Domingo, R.,C., Firestein, G.,S., 1996, Inhibition of TNF- α expression by adenosine. Role of A₃ adenosine receptors. *J Immunol* **156**:3435-3442.

Salmon, J.,E., Cronstein, B.,N **1990**, Fc γ receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy: A₁ receptors are stimulatory and A₂ receptors are inhibitory. *J Immunol* **145**:2235-2240

Salvatore, C.A., Jacobson, M.A., Taylor, H.,E., Linden, J., Johnson, R.,G.,1993, Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, , **90**, (21), 10365-10369.

Salvatore, C.A. et al. 2000, Disruption of the A₃ adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* **275**. 4429-4434

Serhan, C.,N., **2007**, Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* **25**:101–137

Serhan, C.N, Brain SD, Buckley CD, Gilroy, G.,W., Haslett, C,L. O'Neill, A.,J.,O., Perretti M., Rossi, A.,G., Wallace, G.,L., **2007(2)**, Resolution of inflammation: State of the Art, definitions and terms, *FASEB J*, **21**:325-332.

Shimoni, Y., Han, X., Severson, D., Giles, W.,R., 1996, Mediation by nitric oxide of the indirect effects of adenosine on calcium current in rabbit heart pacemaker cells, *Br J Pharmacol*, **119**, (7), 1463-1469.

Stehle, J.,H., Rivkees, S.,A., Lee, J.,J., Weaver, D.,R., Deeds, J.,D., Reppert, S.,M., 1992, Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype, *Mol Endocrinol*, **6**, (3), 384-393.

Stiles, G.L., 1992, Adenosine receptors, *J Biol Chem*, **267**, (10), 6451-6454.

Shryock, J.C.; Belardinelli, L., 1997, Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology, *Am J Cardiol*, **79**, (12A), 2-10.

Shi, D., Nikodijevic, C., O., Jacobson, K.,A., Daly, J.,W., 1993, Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* **13**:247-261

Shi, D., Nikodijevic, O., Jacobson, K.,A., Daly, J.,W., 1994, Effects of chronic caffeine on adenosine, dopamine and acetylcholine systems in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **328**:261-287

Sipka, S., Seres, T., Dinya, Z., Szekanecz, Z., Szentmiklósi, A.,J., Bodolay, E., Szegedi, G., **1995**, Tumour necrosis factor- α and adenosine in endotoxin shock related cardiovascular symptoms. *Mediators of Inflammation* **4**:454-455

Sipka, S., Szántó, S., Szűcs, K., Kovács, I., Kiss, E., Antal-Szalmás, P., Lakos, G., Aleksza, M., Illés, Á., Gergely, P., Szegedi, G., **2001**, Decreased arachidonic acid release in peripheral blood monocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **28**:2012-2017.

Sipka, S., Kovács, A.,I., Szántó, S., Szegedi, Gy., Brugós,L., Bruckner, G., Szentmiklósi, A.,J.,**2005**. Adenosine inhibits the release of interleukine-1 β in activated human peripheral mononuclear cells. *Cytokine* **31**: 258-263.

Sipka, S., Kovács, I., Szántó, S., Szegedi, G., Brugós,L., Bruckner, G., Szentmiklósi, A.,J. **2007**. Adenosine inhibits the release of arachidonic acid and its metabolites (AAM) in activated human peripheral mononuclear cells. *Inflamm.Res.* **56**, **468-472**.

Seitz, M., Zwicker, M., Loetscher, P., 1998, Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthr Rheum* **41**: 2032-2038.

Smith, S.,R., Denhardt, G., Terminelli, C., **2002**, A role for histamine in cytokine modulation by the adenosine A₃ receptor agonist, 2-Cl-B-MECA. *Eur J. Pharmacol.* **457**. 57-69

Sullivan, G.,W., Linden, J., 1998, Role of adenosine A_{2A} adenosine receptors in inflammation. *Drug Dev Res* **45**:103-112.

Sullivan,G.,W.,Linden,J.,Buster,B.,L., Scheld, W.,M.. **1999**, Neutrophil A_{2A} adenosine receptor inhibits inflammation in a rat model of meningitis: synergy with the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram. *J. Infect. Dis.* **180**, 1550-1560

Sun, C.X., Young, H.W., Molina, J.,G., Volmer, J.B., Schnermann, J., Blackburn, M.R. 2005, A protective role for the A₁ adenosine receptor in adenosineindependent pulmonary injury *J. Clin. Invest.* **115**: 35–43

Surette, M.,E., Krump, E., Picard, S., Borgeat, P. **1999**, Activation of leukotriene synthesis in human neutrophils by exogenous arachidonic acid: inhibition by adenosine A_{2A} receptor agonists and crucial role of autocrine activation by leukotriene B₄. *Mol Pharmacol* **56**:1055-1062

Suzuki, H., Takei, M., Nakahata, T., Fukamachi, H., 1998, Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of Fc epsilon RI. *Biochem Biophys Res Commun.* **242**: 697–702.

Sperlagh, B., et al. 2000, Ischemic-like condition releases norepinephrine and purines from different sources in superfused rat spleen strips. *J. Neuroimmunol.* **111**. 54-54

Spicuzza, L., Giuseppe, D., M., Polosa, R., 2006, Adenosine in the airways : Implications and applications *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 77-88

Szabo, C., Scott, G.,S., Virag, L., Egnaczyk, G., Salzman, A.,L., Shanley, T.,P., Hasko, G., **1998**, Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α production and collagen- induced arthritis by adenosine receptors agonists. *Br. J. Pharmacol.* **125**, 379-387

Szentmiklósi, A.,J., Németh, M., Cseppentő, Á., Szegi, J., Papp, Gy.,J.,Szekeres, L. 1982, Potentiation of the Myocardial Actions of Adenosine in the Presence of Coformycin, a Specific Inhibitor of Adenosine Deaminase *Arch.int. Pharmacodyn.* **256**: 236-252

Szolcsányi, J., 1996, Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog. Brain Res.* **113**:343-359.

Tarran, R., Loewen, M.,E., Paradiso, A.,M., Olsen, J.,C., Gray, M.,A., Argent, B.,E., Boucher, R.,C., Gabriel, S.,E., 2002, *J Gen Physiol*, **120**: 407-418

Tarran, S.,M., Button, B., Picher, M., Paradiso, A.,M., Ribeiro, C.,M., Lazarowski, E.,R., Zhang, I., Collins, P.,L., Pickles, R.,J., Fredberg, J.,J., 2005, *J Biol Chem*; **208**: 35751-35759

Thiel, M., Chouker, A.,Ohta, A., Jackson, E., Caldwell, C., Smith, P., Lukashev,D., Bittmann, I., Sitkovsky, M.V. 2005, Oxygenation inhibits the physiologicaltissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *PLoS. Biol.* **3**: 174

Thibault, N. Burelout, C., Harbour, D., Borgeat, P.,. **2002**, Occupancy of adenosine A_{2A} receptors promotes fMLP-induced cyclic AMP accumulation in human neutrophils: impact on phospholipase D activity and recruitment of small GTPases to membranes. *J. Leukoc. Biol.* **71** (2), 267-277

Tilley, S.,L., Tsai, M., Williams, C.,M., Wang, Z.,S., Erikson, C.,J., Galli, S.,J., Koller, B.,H., 2003, Identification of A₃ receptor- and mast cell-dependent and-independent components of adenosine-mediated airway responsiveness in mice. *J. Immunol.* **171**: 331–337

Tschirhart, E., Bertrand, C., Theodorsson, E., Landry, Y., 1990, Evidence for the involvement of calcitonin gene-related peptide in the epithelium-dependent contraction of guinea-pig trachea in response to capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **342**:177-181

Trincavelli, M.L.; Tuscano, D.; Marroni, M.; Falleni, A.; Gremigni, V.; Ceruti, S.; Abbracchio, M.P.; Jacobson, K.A.; Cattabeni, F.; Martini, C., 2002, A₃ adenosine receptors in human astrocytoma cells: agonist-mediated desensitization, internalization, and down-regulation, *Mol Pharmacol*, **62**, (6) 1371-1384

Varani, K., Portaluppi, F., Merighi, S., Ongini, E., Belardinelli, L., Borea, P.,A., 1999,. Caffeine alters A_{2A} adenosine receptors and their function in human platelets. *Circulation*, **99**:2499-2502

Varani, K., Portaluppi, F., Gessi, S., Merighi, S., Ongini, E., Belardinelli, L., Borea, P.,A., 2000, Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A_{2A} receptors. Functional and biochemical aspects. *Circulation* **102**:285-289

Varani, K., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., Cattabriga, E., Benini, A., Klotz, K.,N., Baraldi, P.,G., Tabrizi, M.,A., Lennan, S.,M., Leung, E., Borea, P.,A., 2005, Pharmacological characterization of novel adenosine ligands in recombinant and native human A_{2B} receptors, *Biochem Pharmacol*, **70**, (11), 1601-1612.

Victor-Vega, C., Desai, A., Montesinos, M.,C., Cronstein, B.,N., 2002, Adenosine A_{2A} receptor agonists promote more rapid wound healing than recombinant human platelet-derived growth factor (Becaplermin Gel). *Inflammation* **26**: 19-24

Visser, S.,S., Theron, A.,J., Ramafi, G., Ker, J.,A., Anderson, R., 2000, Apparent involvement of the A_(2A) subtype adenosine receptor in the antiinflammatory interactions of CGS 21680, cyclopentyladenosine, and IBMECA with human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **60**: 993–999

Vizi, E.,Huszár, E.,Csoma, Z.,Böszörményi-Nagy, G., Barát, e., Horváth, I., Herjavec, I., Kollai, M. **2002**, Plasma adenosine concentration increase during exercise: a possible contributing factor in exercise-induced bronchoconstriction in asthma.

J Allergy clin Immunol **109**: 446-448

Walsh, D.,A., et al. 1968, An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**, 3763-3765

Walker, B.,A., Jacobson, M.,A., Knight, D.,A., Salvatore, C.,A., Weir, T., Zhou, D., Bai, T.R. 1997, Adenosine A₃ receptor expression and function in eosinophils
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. **16**: 531–537

Wakai, A. et al 2001. Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and transendothelial migration via A_{2B} receptors activation. *Shock* **15**, 297-301

Ware, L.,B., Matthay, M.,A.,et al. 2000, *N. Engl J Med* **342**:1334-1349

Wilkens, J.,H., Becker, A., Wilkens, H., Emura, M., Riebe-Imre, M., Plein, K., Schober, S., Tsikas, D., Gutzki, F.,M., Frolich, J.,C., 1992, Bioassay of a tracheal smooth muscle-constricting factor released by respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **263**:L137-141

Wu, T., T. Ikezono, C.W. Agenes, J.H. Shelhamer. 1994, Characterization of the promoter for the human 85 kDa cytosolic phospholipase A₂ gene. *Nucl. Acid Res.* **22**: 5095-5098.

Wu, T., C. Han, J.,H. Shelhamer. 2004, Involvement of p38 and p42/44 MAP kinases and protein kinase C in the interferon-gamma and interleukin-1 alpha induced phosphorylation of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂ in primary human epithelial cells. *Cytokine* **25**: 11-20.

Yao Li, Wei Wang, W Parker, Clancy J.,P., 2006, *Am J Respir Cell Mol Biol* vol **34**, pp 600-608

Yamato K, el Hajjaouzi Z, Koeffler HP., 1989, Regulation of levels of IL-1 mRNA in human fibroblasts. *J Cell Physiol*; **139**:610-616.

Zablocki, J., Kalla, R., Perry, T., Palle, V., Varkhedkar, V., Xiao, D., Piscopio, A., Maa, T., Gimbel, A., Hao, J., Chu, N., Leung, K., Zeng, D. 2005, The discovery of a selective, high affinity A_(2B) adenosine receptor antagonist for the potential treatment of asthma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**: 609–612

Zhang, Y., Wells, J.,N., 1990,. Effect of chronic caffeine administration on peripheral adenosine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**:270-276

Zhong, H., Belardinelli, L., Maa, T., Zeng, D. 2005, Synergy between A_{2B} adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am.J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**: 2–8

Zielke, C.,L., Zielke, H.,R., 1987, Chronic exposure to subcutaneous implanted methylxanthines. Differential elevation of A₁ adenosine receptors in mouse cerebellar and cortical membranes. *Biochem. Pharmacol.* **36**:2533-2538

Zhou, Q.Y., Li, C., Olah, M.,E., Johnson, R.,A., Stiles, G.,L., Civelli, O.,1992, Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, (16), 7432-7436.

Zidek, Z., 1999, Adenosine-cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw* **10**:319-28.

Zimmerman, T., P., Schmitges, C., J., Wolberg, G., R D Deeprose,R.,D., Duncan,G., S., Cuatrecasas, P., Elion, G., B., ; 1980, Modulation of cyclic AMP metabolism by S-adenosylhomocysteine and S-3-deazaadenosylhomocysteine in mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **77**(10): 5639–5643.

Zygmunt, P.M., Andersson, D.A., Högestatt, E.D. 2002, Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabinol activate capsaicin-sensitive sensory nerves via a CB₁ and CB₂ cannabinoid receptor-independent mechanism. *J. Neurosci.* **22**:4720-47

Iktatószám: DEENKÉTK/69/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Brugós László

Neptun kód: BI3FZB

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

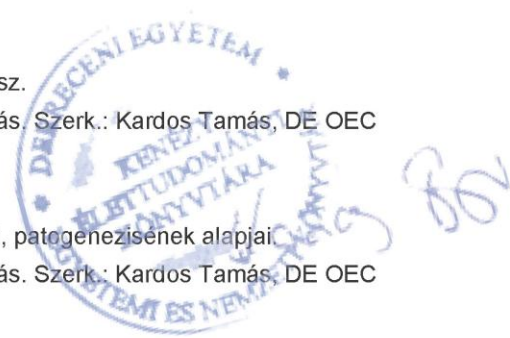
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Brugós, L.**, Gesztelyi, R., Zsuga, J., Cseppentő, Á., Benkő, I., Galajda, Z., Deák, G., Sipka, S., Rószter, T., Kovács, P., Szilasi, M., Édes, I., Szentmiklósi, J.A.: Modulation of adenosine-induced response in the guinea pig trachea during long-term caffeine treatment: Possible role of ephelium.
J. Pharmacol. Sci. 105 (3), 279-290, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.FP0070214>
IF:2.408
2. Sipka, S., Kovács, I., Szántó, S., Szegedi, G., **Brugós, L.**, Bruckner, G., Szentmiklósi, J.A.: Adenosine inhibits the release of arachidonic acid and its metabolites (AAM) in activated human peripheral mononuclear cells.
Inflamm. Res. 56 (11), 468-472, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-007-7102-6>
IF:1.504
3. Sipka, S., Kovács, I., Szántó, S., Szegedi, G., **Brugós, L.**, Bruckner, G., Szentmiklósi, J.A.: Adenosine inhibits the release of interleukin-1beta in activated human peripheral mononuclear cells.
Cytokine. 31 (4), 258-263, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2005.05.002>
IF:2.012

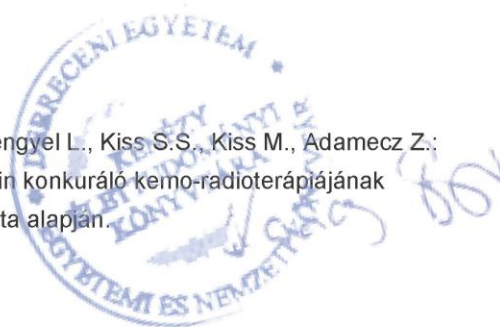


További Közlemények

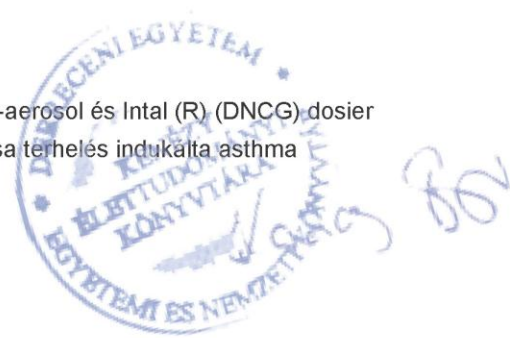
4. Szilasi M., **Brugós L.**: A légzőrendszer öregedése és betegségei.
In: Klinikum és farmakoterápia időskorban. Szerk.: Boga Bálint, Samu Antal, Vox Medica Kiadói Kft., Veszprém, 237-254, 2012.
5. **Brugós L.**: Desloratadin a szezonális allergiás rhinitis (SAR) kezelésében.
Med. Thorac. 62 (5), 43-45, 2009.
(Ismertetett dokumentum Bachert C., Virchow C. J., Plenker A : Desloratadine in the treatment of seasonal allergic rhinitis. In: Clinical drug investigation - 22 : Suppl. 2. (2009), p. 43-45 - ISSN 1173-2563)
6. Szilasi M., **Brugós L.**, Rajnavölgyi É., Sipka S.: Alternatíva-e az alternatív-komplementer gyógyítás parlagfű-allergiákban?
Allerg. Klin. Immun. 12 (4), 94-98, 2009.
7. **Brugós L.**: A mellhártya, a mediastinum és a rekesz betegségei.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 284-287, 2008.
8. **Brugós L.**: A pneumothorax.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 287-290, 2008.
9. **Brugós L.**: Inhalált anyagok okozta akut tüdőkárosodás.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 299-301, 2008.
10. **Brugós L.**: Az EKG jelentősége a pulmonológiai gyakorlatban.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 33-37, 2008.
11. **Brugós L.**: COPD (krónikus obstruktív tüdőbetegség) I. rész.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 83-97, 2008.
12. **Brugós L.**: A légúti allergiás kórképek fogalma, kritériumai, patogenezisének alapjai.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 103-108, 2008.



13. **Brugós L.**: Fertőző betegségek.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 166-186, 2008.
14. **Brugós L.**: A tüdőtályog.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 186-189, 2008.
15. **Brugós L.**: Tuberculosis.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 189-208, 2008.
16. Mikáczó A., **Brugós L.**, Szilasi M.: Mellkasi folyadékgyülem differenciál-diagnózisa során szerzett tapasztalataink.
Med. Thorac. 61 (6), 314-316, 2008.
17. Pethő Z., Szabó Z., **Brugós L.**, Nemes Z., Szöllősi Z., Sándor Z., Pápay Z., Szekanecz Z.: Mellkasi lágyrésztumor: Rheumatoid csomó? : esetismertetés.
Magyar Reumatol. 49, 172, 2008.
18. Sipka, S., **Brugós, L.**, Aleksza, M., Gyimesi, E., Szabó, Z., Csípő, I., Páll, G., Kossarova, K., Szilasi, M.: Systemic anti-inflammatory changes in subjects with ragweed-induced allergic rhinitis treated with intranasal budesonide and oral loratadine.
Allerg. Klin. Immun. 11 (1), 16-20, 2008.
19. Szilasi M., **Brugós L.**, Bácsi A., Rajnavölgyi É.: Parlagfű-érzékeny, allergiás rhinoconjunctivitisben szenvedő betegeknél alkalmazott kecsketej hatékonyságának vizsgálata.
Allerg. Klin. Immun. 11 (1), 6-11, 2008.
20. **Brugós L.**: A leukotriének szerepe az asztmás gyulladásban.
Amega. 14 (5), 21-26, 2007.
21. **Brugós L.**: Hogyan ismerjük fel a COPD-t?
Családorv. Fórum. 9, 7-11, 2006.
22. Szilasi M., Horváth Á., Dolinay T., Szántó J., **Brugós L.**, Lengyel L., Kiss S.S., Kiss M., Adamecz Z.: IIIA-B stádiumú NSCLC elsővonalbeli Taxotere-Cisplatin konkuráló kemo-radioterápiájának eredményei 42 irresekábilis daganatos beteg vizsgálata alapján.
Magyar Onkol. 50 (3), 233-236, 2006.



23. Varga I., **Brugós L.**, Farkas M., Szilasi M.: Bronchoszkópia az intenzív osztályokon.
Orv. Hetil. 145 (18), 957-961, 2004.
24. Dolinay T., Csiki Z., **Brugós L.**, Sebesi J., Szilasi M.: Asthma bronchialis betegek életminőségének vizsgálata *Helicobacter pylori* eradikációt követően.
Endoscopia. 4 (4), 69-72, 2001.
25. Szabó, Z., Szilasi, M., **Brugós, L.**, Szántó, S., Kovács, I., Széles, M., Lakos, G., Antal-Szalmás, P., Édes, I., Sipka, S.: Differences in the changes of allergen-specific IgE serum levels and the chemiluminescence of peripheral blood phagocytes in patients with allergic rhinoconjunctivitis during the ragweed season.
Immunol. Lett. 74 (3), 201-205, 2000.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478\(00\)00263-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478(00)00263-7)
IF:1.546
26. Szilasi M., **Brugós L.**, Dolinay T.: A krónikus aspecifikus légzőszervi betegségek és a levegőszennyezés kapcsolatának vizsgálata.
Med. Thorac. 53 (1), 21-26, 2000.
27. **Brugós L.**, Sipka S., Szilasi M., Szabó Z., Lakos G., Antal P., Édes I., Szegedi G.: Halolaj-kapszula adagolás hatása parlagfű okozta allergiás rhino-conjunctivitisben.
Allerg. Klin. Immun. 2 (1), 42-47, 1999.
28. Varga I., Koncz A., **Brugós L.**, Szilasi M., Szakács É.: Első tapasztalataink a légúti stent-tel.
Med. Thorac. 51 (4), 154-157, 1998.
29. **Brugós L.**, Szilasi M., Mihóczy L., Fülöp I., Faragó E.: Az antituberkulotikus kezelés során észlelt gyógyszerrezisztencia alakulása 1987 és 1993 között.
Med. Thorac. 50 (8), 425-432, 1997.
30. Csontos Z., Szilasi M., **Brugós L.**: A peak flow mérő szerepe az asthma bronchiale diagnosztikájában és terápiájában.
Med. Thorac. 48 (12), 465-472, 1995.
31. Szilasi M., **Brugós L.**, Kaló I., Mihóczy L.: Ditec (R) dosier-aerosol és Intal (R) (DNCG) dosier aerosol készítmények védőhatásának összehasonlítása terhelés indukálta asthma bronchiálisban.



32. Szilasi M., **Brugós L.**, Kaló I., Mihóczy L.: A Serevent (R) (Salmeterol) dossier aerosol klinikai és légzésfunkciós hatásának vizsgálata Berodual (R) dossier aerosol-lal összehasonlítva.
Med. Thorac. 47, 139-149, 1994.
33. Szilasi M., Csontos Z., Faragó E., **Brugós L.**: A parlagfű (Ragweed) okozta allergiás rhinitis kezelése során észlelt jellegzetességek, tapasztalatok.
Med. Thorac. 45 (10), 539-545, 1992.
34. Szilasi M., Lánszki I., Németh M., Csontos Z., **Brugós L.**: Parlagfű (Ambrosia elatior, ragweed) visszaszorítási programtervezet lépcsőzetes megvalósítása Kelet-Magyarországon.
Med. Thorac. 45 (10), 547-551, 1992.

Összesített impakt faktor: 7.47

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5.924

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.02.08



12. Rövidítések listája, a szövegben megjelenésük sorrendjében:

COPD: chronic obstructiv pulmonary disease, krónikus obstruktív tüdőbetegség

AMISTAD I: vizsgálatok rövidítései, melyek az adenozinnal foglalkoznak

AMISTAD II: vizsgálatok rövidítései, melyek az adenozinnal foglalkoznak

ADVICE: vizsgálatok rövidítései, melyek az adenozinnal foglalkoznak

ADSPECT: vizsgálatok rövidítései, melyek az adenozinnal foglalkoznak

ADELINE: vizsgálatok rövidítései, melyek az adenozinnal foglalkoznak

PROTECT: vizsgálatok rövidítései, melyek az adenozinnal foglalkoznak

TEMPEST: vizsgálatok rövidítései, melyek az adenozinnal foglalkoznak

ATP: adenosin trifoszfát

ADT: adenosin difoszfát

cAMP: ciklikus adenosin monofoszfát

IUPHAR: International Union of Pharmacology

PLC: foszfolipáz C

PKC: proteinkináz C

I_{kado} : inwardly rectifying potassium currents, befelé irányuló kálium csatorna

NOS:nitrogén monoxid szintetáz

NO: nitrogén monoxid

AV: atrio ventrikuláris

L-97-1: [3-[2-(4-aminophenyl)-ethyl]-8-benzyl-7-{2-ethyl-(2-hydroxy-ethyl)-amino}-ethyl]-1-propyl-3,7-dihydro-purine-2,6-dione: szelektív A₁ adenosin receptor antagonist

EPI-2010: egy RASON(respirable antisense oligonucleotide), vagyis belélegezhető szer, mely gátolja az A₁ adenosin receptor expresszióját

cDNS: klónozott DNS

CGS21680 : 2-p-[2-carboxyethyl]-amino-5-N-ethylcarboxamido-adenosine: A_{2A} adenosin receptor agonista

TNF- α : tumor nekrosis faktor alfa

IL-10: interleukin 10

IL-12: interleukin 12

NECA: 5-N-ethylcarboxamidoadenosin: A_{2B} adenosin receptor agonista

HMC-1: human mastcell-1: humán hízósejt

Th2: T helper 2 limfocita

IL-3: interleukin 3

IL-4: interleukin 4

IL-8: interleukin 8

IL-13: interleukin 13

IgE: immunglobulin E

CVT-5440: 8-(4-pyrazolyl)-xanthine: magas affinitású A_{2B} adenosin receptor antagonist

PDE₄: foszfodiészteráz 4

PAF: platelet activator factor, trombocit aktiváló faktor

IL-6: interleukin 6

mRNS: messenger ribonucleinsav

VCAM: vascular cell adhesion molecule, vaszkuláris adhézións molekula

LTB₄: leukotrien B₄

LPS: lipopoliszacharid

IL-1 β : interleukin 1 béta

kD: kiloDalton

IFN γ : interferon gamma

PGE₂: prosztaglandin E₂

VIP: vaso intestinal peptide

PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating peptide

IKK β : I kappa kináz β , az NF κ B-t aktiváló molekula egyik alegysége

APC: antigen presenting cell

CpG: cytosine phosphate guanine, nukleotidok szekvenciája, melyet a TLR felismer

DNA: deoxiribonuclein acid

RNA: ribonuclein acid

TLR: toll like receptors

PRR: pattern recognition receptors

MIP-1 α : macrophag inhibitory protein 1 alfa

iNO: inducible nitric oxid

MHC II: major histocompatibility class II

AA: arachidonic acid

ARDS: adult respiratory distress syndrome

5-LO: 5- lipoxygenase

fMLP: formil. Met-Leu-Phe

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

ASL: airway surface liquid

AA861: 5'LOX gátló szer

NDGA: norhidroguaiaretic sav

CPA: N6-ciclopentiladenosine

NECA: 5'-N-etilcarboxamidoadenozin

PMA: forbol 12-mirisztate 13 acetát

A23187: kalcium ionofór

CGS 21680 : 2-p- (2-carboxyethyl)-amino-5'- N-ethylcabox-amido-adenosine

IB-MECA: N6-(3-iodbenzyl)-5-(N-methylcarbox-amido-adenosine

DPCPX: 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxantin

MRS-1191: 3-ethyl-5-benzyl-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-(6)-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate

ZM 243185: A_{2A} adenosin receptor antagonist

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute rövidítésből, leucociták sejttenyésztésére kifejlesztett táptalaj,

HPLC: High Performance/Pressure Liquid Chromatography,

DMSO: dimetilszulfoxid

EHNA: erithro-hidroxi-nonil-adenin

2' DA: 2'-deoxiadenozin

ARA-A: adenin-9-béta-D-arabinofuranozid

ADA: adenosin dezamináz

8-PT: 8-phenyltheophyllin

COF: coformicin

2'dAR: 2'-deoxicoformicin

DP: dipiridamol

NBTI: nitrobenziltioinozin

CGRP: calcitonin gene related protein

MEK: mitogen-activated, extracellular signal-regulated kinase

ERK kináz: extracellular-signal-regulated kinases

MAPK: mitogen-activated protein kinase

p38: 38-kDa protein, mely gyorsan foszforilálódik a tirozin helyén, MAP (mitogen activated protein) kináz család alcsoportja

CREB: cAMP response element-binding protein

iPLA2: calcium-independent phospholipase A2

DAG: diacylglycerol

MCh: metakolin

