

Marek Cieślak

Received: 22.11.2012

Accepted: 05.12.2012

Published: 31.12.2012

Rola sygnalizacji purynergicznej i cytokin w indukcji procesów zapalnych w udarze niedokrwiennym mózgu

Role of purinergic signalling and cytokines in the ischaemic stroke

Oddział Neurologiczny, Wojewódzki Szpital Zespolony w Toruniu

Adres do korespondencji: Dr n. med. Marek Cieślak, Oddział Neurologiczny, Wojewódzki Szpital Zespolony w Toruniu,

ul. św. Józefa 53-59, 87-100 Toruń, tel.: 602 497 650, e-mail: marcies@autograf.pl

Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Wyniki badań opublikowanych w ostatnich latach wskazują, że indukcja stanów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym może stanowić podstawę patofizjologiczną wielu chorób, w tym udaru niedokrwiennego mózgu. Istotną rolę w tych procesach przypisuje się sygnalizacji purynergicznej i cytokinom. Receptory purynergiczne P1 i P2 oraz enzymy uczestniczące w degradacji nukleotydów są szeroko rozpowszechnione na komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Puryny i pirymidyny wykazują dwojakie działanie w udarze niedokrwiennym mózgu: pozytywne (neuroprotektoryjne) nukleotydów oraz negatywne (prozapalne i proapoptotyczne) nukleotydów. W przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu udowodniono udział w indukcji procesów zapalnych trzech cytokin: czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α), interleukiny 1 (IL-1) i interleukiny 6 (IL-6). Cytokiny prozapalne wywołują procesy zapalne i prozakrzepowe, przez co zwiększają obszar zawału, a w konsekwencji stopień deficytu neurologicznego. Cytokiny i ATP sprzyjają migracji leukocytów do miejsca niedokrwienia mózgu, natomiast adenozyina działa przeciwnie. Leukocyty, przylegając do śródbłonna, upośledzają przepływ mózgowy krwi, w wyniku czego nasilają uszkodzenie tkanki nerwowej. Na uwalnianie cytokin prozapalnych, głównie interleukiny 1 β , wpływa aktywacja receptora P2X₇. Przypuszcza się, że w procesach zapalnych ośrodkowego układu nerwowego mogą uczestniczyć także receptory: P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂. Wydaje się, że degradacja nukleotydów z powstaniem adenozyiny może być skutecznym sposobem obniżenia stężenia w przestrzeni pozakomórkowej nukleotydów, jak również cytokin prozapalnych i wygaszania procesów zapalnych. Inną metodą osłabienia intensywności procesów zapalnych jest zastosowanie antagonistów receptora P2X₇ oraz inhibitora receptora IL-1 (IL-1Ra). Obecnie prowadzone są badania zarówno nad potencjalnymi antagonistami receptora P2X₇, jak i inhibitorem receptora IL-1 (IL-1Ra).

Słowa kluczowe: nukleotydy, nukleozydy, cytokiny, receptory purynergiczne, udar niedokrwienny mózgu

Summary

Inflammation plays an important role in the aetiology of various diseases of the central nervous system including the stroke. Accumulating evidence indicates that inflammation in the central nervous system is controlled by purinergic signalling. The mediators of purinergic signalling are extracellular nucleotides (e.g. ATP, ADP, UTP and UDP) and adenosine that act via activation of P2 and P1 purinergic receptors, respectively. The activation of P2 and P1 receptors is regulated by the enzymes ectonucleotidases that hydrolyse either extracellular nucleotides or adenosine. This review focuses on the role of purinergic signalling in the ischaemic stroke. We and others have demonstrated the presence of nucleotides and adenosine in the cerebrospinal fluid. We have also shown that the concentration of ATP and other nucleotides is increased in cerebrospinal fluid of patients with ischaemic stroke. Evidence suggests that the activation of P2 and P1 recep-

tors have an opposite role in the ischaemic stroke, i.e. while the nucleoside adenosine exert neuroprotective effects, nucleotides generally promote the proinflammatory and apoptotic responses. P2X₇, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁ and P2Y₁₂ are proposed to be involved in the central nervous system inflammation as they are expressed in the brain and their activation is known to control the key inflammatory processes such as release of inflammatory mediators (e.g. cytokines, NO), migration of leukocytes, phagocytosis, apoptosis and thrombosis. The activation of P2 receptors can also increase the release of excitatory neurotransmitters that further exacerbate the inflammatory response. Three cytokines whose release is controlled by P2 receptors have a major role in the ischaemic stroke, namely tumour necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6). By promoting inflammation and thrombosis, these proinflammatory cytokines contribute to the increase in lesion size and thus functional impairment of the affected tissue. Cytokines as well as extracellular nucleotides are involved in leukocyte migration to lesions. By their adherence to endothelium, leukocytes impair cerebral blood circulation and thus exacerbate damage to the brain. The hydrolysis of nucleotides to adenosine by the ectonucleotidases leads to deactivation of proinflammatory responses. Similar effect can also be obtained with P2X₇ and IL-1 receptor antagonists that are presently under clinical development and investigation.

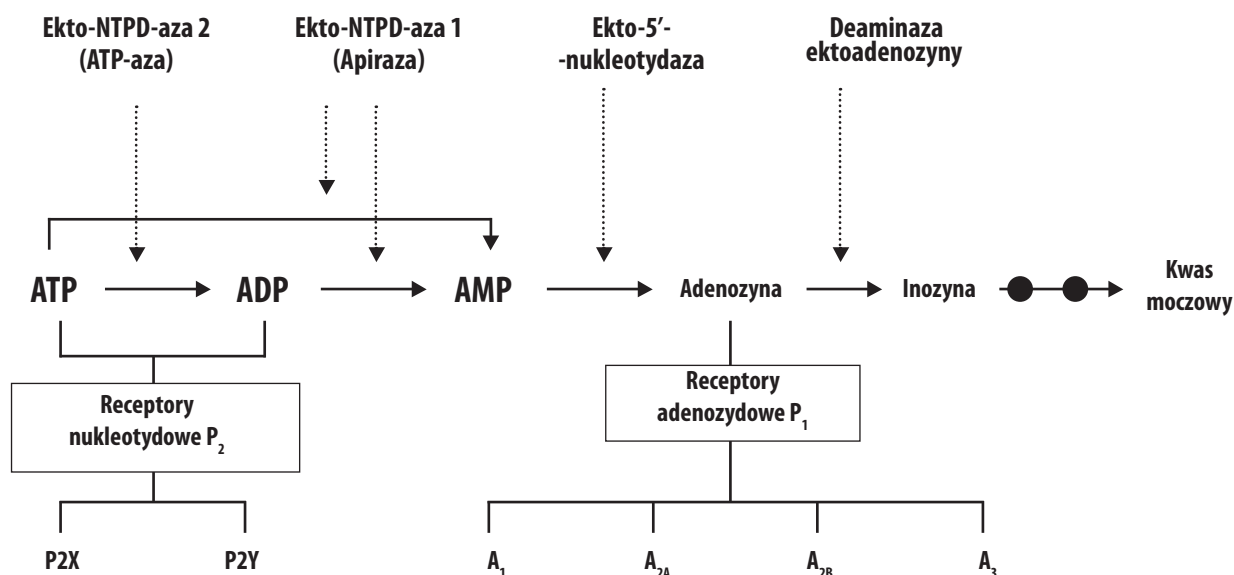
Key words: nucleotides, nucleosides, cytokines, purinergic receptors, ischaemic stroke

ROLA NUKLEOTYDÓW I ADENOZYNY W UDARZE NIEDOKRWIENNYM MÓZGU

Ektonukleotydy i ektonukleozydy w przestrzeni pozakomórkowej mózgu biorą udział w neurotransmisji, modulacji sygnałów czuciowych, w tym generowaniu i odbiorze bodźców bólowych, oraz w indukcji apoptozy i nekrozy. W układzie krwionośnym puryny i pirymidyny uczestniczą w hemostazie i regulacji ciśnienia krwi. Uwalniany z komórek ATP wykazuje działanie prozapalne i proapoptotyczne. Adenozyne i guanozyna na drodze odmiennych mechanizmów odgrywają ważną rolę w procesie neuroprotekcji⁽¹⁻³⁾. Z kolei znajdujący się poza komórką adenozydodifosforan (adenosine diphosphate, ADP) pełni istotną funkcję w powstawaniu zakrzepu^(4,5). Pojawiający się we krwi w wyniku uszkodzenia śródbłonka ADP jest podstawową i specyficzną cząsteczką sygnałową informującą organizm o przerwaniu ciągłości komórek

śródbłonka^(4,5). Jego źródłem są komórki śródbłonka, płytki krwi, jak również katalityczna hydroliza ATP z udziałem NTPD-azy 2. Adenozydodifosforan obecny we krwi aktywuje agregację, a uwolniony z płytek krwi podczas tworzenia czopu płytkowego nasila (amplifikuje) hemostazę⁽⁶⁻⁹⁾. Jego udział w procesie hemostazy odbywa się przez aktywację trzech receptorów płytkowych: P2Y₁, P2Y₁₂ i P2X₁⁽¹⁰⁾.

Adenozyntrifosforan (*adenosine-5'-triphosphate*, ATP) jest inhibitorem kompetencyjnym receptorów P2Y₁ i P2Y₁₂, dlatego na hemostazę działa antagonistycznie w stosunku do ADP. Do zahamowania amplifikacji agregacji konieczne jest stężenie ekto-ATP 50 μM. Wysokie stężenie ekto-ATP i ektoadenozyne jest w stanie nie tylko wstrzymać hemostazę, lecz także spowodować degradację czopa płytkowego utworzonego w czasie pierwotnej agregacji płytek krwi. Ektoadenozyne wstrzymuje agregację płytek krwi przez aktywację receptorów A_{2A}, a proces ten odbywa się z udziałem białek G.



Rys. 1. Metabolizm ektonukleotydy i ektonukleozydy adeninowych oraz typy receptorów purynerycznych

Ektopuryny i ektopirymidyny uwalniane podczas niedokrwienia mózgu wykazują dwojakie działanie – pozytywne nukleozydów (adenozyna i guanozyna), czyli neuroprotekcję, oraz negatywne nukleotydów (ATP), tj. prozapalne i proapoptotyczne⁽¹¹⁻¹³⁾. Nukleotydy przez aktywację receptorów P2X powodują wzrost metabolizmu komórkowego i obniżenie ładunku energetycznego komórek^(11,12,14,15). Dla utrzymania homeostazy naczyń krwionośnych korzystne jest więc zmniejszenie stężenia nukleotydów w ognisku niedotlenienia, co można osiągnąć w dwojaki sposób: w wyniku enzymatycznej degradacji poprzez ekto- i egzoenzymy lub rozcieńczenia i dyfuzji tych związków poza obszar zawału. W ognisku zawału przepływ krwi jest niewielki lub całkowicie zahamowany, dlatego ruch cząsteczek do innych części mózgu, w tym do płynu mózgowo-rdzeniowego, może odbywać się drogą dyfuzji. W PMR możliwe jest zmniejszenie stężenia puryn z udziałem ektonukleotydaz – ekto-NTPD-az lub kinaz adenylanowych. Badania przeprowadzone w Zakładzie Biochemii UMK w Toruniu wykazały u chorych z udarem niedokrwinnym mózgu obecność w płynie mózgowo-rdzeniowym nukleotydów – pochodnych adeniny (ATP, ADP, AMP), guaniny (GTP i GDP), pirymidyny (UTP i UDP) i nukleozyd nukleozydu – adenozyyny⁽¹⁶⁾. Potwierdziły one wyniki uprzednio opublikowanych badań⁽¹⁷⁻²⁰⁾. Ponadto wykazały, że stężenie ATP w PMR w udarze niedokrwinnym mózgu jest podwyższone, niezależnie od etiologii i wielkości ogniska zawałowego, jak również że przekraczające normę stężenia ADP, ATP i GDP w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych były czynnikiem ryzyka zgonu⁽¹⁶⁾. Można przypuszczać, że nie dyfuzja tych związków, ale transport celowy może być głównym mechanizmem przenikania puryn i pirymidyn do PMR⁽¹⁶⁾. We wcześniejszych badaniach inni autorzy stwierdzili obecność w płynie mózgowo-rdzeniowym tylko produktów degradacji nukleotydów adeninowych^(21,22).

Podczas niedotlenienia mózgu dochodzi do wzrostu uwalniania neuroprzekaźników zarówno pobudzających (glutaminian i asparaginan), jak i hamujących (GABA, glicyna)⁽²³⁻²⁵⁾. Pozbawione dopływu tlenu astrocyty wykazują słabszą aktywność wychwytu glutaminianów z przestrzeni synaptycznej⁽²³⁾. Następnym nadmiernego pobudzenia receptorów glutaminergicznych, metabotropowych (mGluR) oraz jonotropowych, w tym także NMDA (*N-methyl-D-aspartate*), jest niekontrolowana depolaryzacja neuronów i przedłużający się czas ich aktywacji^(24,25). Proces ten, określany terminem ekscytotoksyczności, prowadzi do śmierci neuronów^(22,26-28). W sytuacjach stresowych w obszarach niedokrwienia mózgu stężenie adenozyyny poza komórką rośnie stokrotnie^(1,5,29). Nukleozydy oznacza się przez analizę mikropróbek mózgu (*microdialysates, microperches*) metodą chromatografii. W ochronie neuronów uczestniczą pre- i postsynaptyczne receptory A₁. Ich aktywacja powoduje hamowanie wydzielania przez neurony glutaminianu, asparaginianu, a także acetylocholiny, noradrenaliny, dopaminy, serotoniny i kwasu γ -aminomasłowego (GABA)^(24,25,28). Zmniejszenie produkcji neuroprzekaźników, zwłaszcza aminokwasów pobudzających, skutkuje ograniczeniem aktywności metabolicznej komórek i spadkiem zużycia tlenu. W przestrzeni

pozasynaptycznej adenozyyna, aktywując receptory A₂, stymuluje w astrocytach proces glukoneogenezy, a także rozszerza naczynia. Efektem jest wzrost dopływu krwi do mózgu, co w zawałe mózgu możliwe jest jedynie w obszarze penumbry.

Nie ma przekonujących dowodów potwierdzających istotną rolę nukleotydów guaninowych (GTP, GDP i GMP) w ochronie niedotlenionego mózgu⁽³⁰⁾. Wiadomo jednakże, że GTP jest magazynowany razem z ATP w pęcherzykach synaptycznych i uwalniany do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie ulega konwersji do guanozyny. Badania *in vitro* wykazały, że obecność tego nukleozydu chroni komórki nerwowe w sytuacji niedotlenienia i braku glukozy⁽²⁾. Guanozyna, nasilając wychwyty zwrotne glutaminianów podczas niedokrwienia mózgu, zapobiega neurotoksyczności i działa antyapoptotycznie^(2,13).

Niewiele jest dostępnych informacji dotyczących udziału pirymidyn w udarze niedokrwinnym mózgu, aczkolwiek w nielicznych badaniach dowiedziono, że hodowle astrocytów pozbawione tlenu i glukozy są zdolne do wydzielania poza komórkę nie tylko ATP, lecz także UTP i guanozyny. W hodowlach tych stwierdzono także dwukrotne zwiększenie mRNA P2Y₂, co sugeruje, że UTP może działać protekcyjne na neurony w wyniku aktywacji tego receptora⁽³¹⁾.

ROLA CYTOKIN W INDUKCJI PROCESÓW ZAPALNYCH W PRZEBIEGU UDARU NIEDOKRWIENNEGO MÓZGU

Z doświadczeń prowadzonych na zwierzętach wynika, że cytokiny indukują procesy zapalne w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Wykazano, że w obszarze okołozawałowym TNF- α i IL-1 są wytwarzane przez komórki mikrogleju, makrofagi dooponowe (*intrathecal*) i migrujące makrofagi (pochodzące z monocytów krwi), a IL-6 wydzielana jest przez komórki mikrogleju oraz komórki nerwowe⁽³²⁻³⁵⁾. W eksperymentalnym zawałe mózgu u zwierząt podwyższone stężenie TNF- α i IL-1 obserwuje się w pierwszych godzinach niedokrwienia. Najwyższe stężenie związki te osiągają w przestrzeni międzykomórkowej już po 12 godzinach i pozostają na podwyższonym poziomie jeszcze przez kilka dni⁽³³⁻³⁵⁾. Nieliczne badania przeprowadzone na szczurach dotyczące IL-6 wykazały, że mRNA interleukiny 6 (IL-6) wyraźnie wzrasta już po 3 godzinach od początku zawału mózgu i utrzymuje się przez kolejne 24 godziny^(32,34).

Jak dotąd u ludzi udowodniono udział trzech cytokin w indukcji procesów zapalnych w przebiegu udaru niedokrwinnego mózgu: czynnika martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor α* , TNF- α), IL-1 (forma IL-1 α i IL-1 β) oraz IL-6^(32,36). Wysokie stężenie tych cytokin stwierdzono w obszarze zawału mózgu oraz we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym⁽³⁷⁻³⁹⁾. Polscy badacze już w 2001 roku zwrócili uwagę na znaczenie cytokin prozapalnych w udarze mózgu⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Inni naukowcy wykazali, że ich stężenie w przestrzeni międzykomórkowej w przebiegu niedokrwienia mózgu wzrasta wielokrotnie (40-60-krotnie)⁽³²⁻³⁴⁾. Ponadto w niedokrwieniu mózgu dowiedziono spadku stężenia cytokiny antyzapalnej – interleukiny 10 (IL-10), syntetyzowanej przez leukocyty i makrofagi monocytów krwi. Wzrost

jej ekspresji stwierdzono u zwierząt z ogniskowym niedokrwieniem mózgu^(43,44). Od pierwszych godzin zawału mózgu cytokiny prozapalne indukują procesy zapalne, które powiększają obszar uszkodzenia mózgu i w konsekwencji stopień deficytu neurologicznego. Zmiany te mają wpływ na rozmiar kalectwa w następstwie zawału mózgu i na rokowanie dotyczące przeżycia. Przed manifestacją objawów zapalenia TNF- α i IL-1 β są jako pierwsze uwalniane poza komórki, a następnie wywołują syntezę kolejnych cytokin prozapalnych, przykładowo IL-6, chemokin, jak również cytokin antyzapalnych, np. IL-10⁽³⁶⁾. Wśród cytokin prozapalnych szczególną rolę odgrywa IL-1 β , która uczestniczy w aktywacji syntezy IL-2 oraz indukuje ekspresję jej receptora.

Cytokiny, obecne na każdym etapie udaru mózgu, wykazują również działanie prozakrzepowe. Wzrost stężenia TNF- α pobudza ekspresję czynnika tkankowego (*tissue factor*) i cząsteczek adhezyjnych dla leukocytów, uwalnianie IL-1, tlenu azotu, czynnika VIII (czynnika von Willebrand), czynnika aktywującego płytki krwi i endoteliny. Ponadto TNF- α hamuje układ trombomodulina – białko C – białko S (*thrombomodulin – protein C – protein S system*), obniża stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu (*tissue plasminogen activator*) i uwalnianie inhibitora 1 aktywatora plazminogenu (*plasminogen activator inhibitor 1*)⁽⁴⁵⁾. Działanie IL-6 jest złożone i nie do końca poznane. Jej synteza może być wywołana przez różne cząsteczki, takie jak: IL-1, TNF- α , transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor* β) i prostaglandyny (PGs), oraz przez wiele innych mediatorów, np. β -amyloid, interferon γ (IFN- γ), IL-4. Istnieją doniesienia zarówno o neuroprotektynym działaniu IL-6, prawdopodobnie wskutek aktywacji receptorów adenozynowych A₁, jak i o udziale tej cytokiny w procesie neurodegeneracji i śmierci neuronów⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Tarkowski i wsp.⁽⁵⁰⁾ wykazali u chorych z udarem niedokrwinnym mózgu obecność TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym nawet po trzech miesiącach od zachorowania. Zaremba i wsp.⁽⁴¹⁾ stwierdzili wzrost stężenia TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym w pierwszych 24 godzinach po udarze mózgu, dowiedli również korelacji tego stężenia z ciężkością zawału. Z najnowszych badań z zastosowaniem rezonansu magnetycznego (MRI) wynika, że w pierwszych 6 godzinach niedokrwienia mózgu istnieje korelacja między stężeniem IL-6 w płynie mózgowo-rdzeniowym a wielkością zawału w 24. godzinie choroby⁽⁵¹⁾.

Analiza stężenia cytokin we krwi nie przynosi tak jednoznacznych rezultatów jak w przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego, co dodatkowo komplikuje istnienie sprzecznych doniesień na ten temat. Ponadto stężenie cytokin we krwi obwodowej może, ale nie musi, odzwierciedlać uwalnianie cytokin w OUN. Kontrowersje dotyczą zwłaszcza TNF- α (*tumor necrosis factor* α). Kes i wsp. nie stwierdzili wzrostu jego stężenia we krwi w udarze mózgu⁽⁴³⁾. Również Montaner i wsp.⁽⁵²⁾ nie wykazali istotnego wzrostu TNF- α w surowicy krwi w udarze mózgu w pierwszych 24 godzinach, chociaż odnotowali korelację jego stężenia ze zmianami perfuzji w badaniu MR *perfusion-weighted imaging*. U większości chorych z udarem mózgu Tarkowski i wsp.⁽⁵⁰⁾ stwierdzili podwyższone stężenie IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym, co obserwowali także inni badacze nawet

w niewielkich zawałach mózgu⁽⁵³⁾. Chociaż rola IL-1 β w udarze eksperymentalnym u zwierząt nie budzi wątpliwości, to nie wykazano istotnego wzrostu jej stężenia u ludzi z zawałem mózgu⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Badania we wczesnej fazie udaru potwierdziły korelację wzrostu stężenia IL-6 we krwi z ciężkością udaru i wielkością obszaru zawału^(54,57).

W rozwoju procesów zapalnych OUN ważną funkcję pełnią reaktywne limfocyty T migrujące przez śródbłonek do strefy niedokrwienia⁽⁵⁸⁾. Szczególną rolę w tym procesie odgrywa IL-1 β , która pobudza wytwarzanie IFN- γ i IL-6 przez limfocyty, makrofagi i komórki śródbłonka oraz zwiększa adhezję limfocytów T do komórek śródbłonka. Cytokiny prozapalne aktywują leukocyty, a także indukują ekspresję cząsteczek, takich jak: selektyna E, cząsteczki adhezji międzykomórkowej (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) i cząsteczki adhezji naczyniowej 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1). Białka adhezyjne, znajdujące się na powierzchni komórek śródbłonka (np. VCAM-1), uczestniczą w przenikaniu limfocytów T do OUN, gdyż wiąże się z nimi zlokalizowana na powierzchni limfocytów integryna $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4). Leukocyty gromadzą się w regionie niedokrwienia nasilają uszkodzenie mózgu, ponieważ, przylegając do śródbłonka, upośledzają przepływ krwi w naczyniach⁽⁴⁰⁾. W obszarze niedokrwienia aktywowane leukocyty uwalniają kolejne cytokiny o działaniu neurotoksycznym, enzymy proteolityczne, związki obkurczające naczynia i indukują w komórkach śródbłonka ekspresję czynników prozakrzepowych. Procesy te nasilają miejscowe niedokrwienie mózgu^(58,59). Cytokiny prozapalne wydzielane w przebiegu niedokrwienia mózgu powodują uszkodzenie bariery krew-mózg, czego skutkiem jest ekspozycja niektórych antygenów ośrodkowego układu nerwowego na działanie obwodowego układu immunologicznego, który rozpoznaje te antygeny (np. białko S-100) jako obce i wywołuje we krwi obwodowej odpowiedź zapalną z udziałem cytokin produkowanych przez leukocyty^(40,58).

Wyniki niedawno opublikowanych badań Smitha i wsp.⁽⁶⁰⁾ sugerują, że już we wczesnym okresie udaru niedokrwinnego mózgu dochodzi do wzrostu w surowicy krwi stężenia IL-1, IL-6 i białka C-reaktywnego (*C-reactive protein*, CRP). Wysokie stężenie CRP i IL-6 we krwi koreluje z rozległością obszaru uszkodzenia mózgu i objawami neurologicznymi^(60,61). Ponieważ IL-1 jest silnie zaangażowana w patofizjologię niedokrwienia mózgu, Smith i wsp.⁽⁶⁰⁾ przeprowadzili badania z obwodowym podaniem inhibitora receptora IL-1 (IL-1Ra) w eksperymentalnym udarze niedokrwinnym mózgu. Zastosowanie IL-1Ra spowodowało znaczne zmniejszenie zasięgu uszkodzenia mózgu. Obecnie prowadzone są badania (faza II) u chorych z udarem niedokrwinnym, którym podaje się dożylnie IL-1Ra⁽⁶⁰⁾. Jak dotąd nieznanym jest wpływ tego receptora na obwodową odporność zależną od leukocytów. Badania wspomnianych autorów budzą nadzieję, że w przyszłości będzie możliwe leczenie pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu z zastosowaniem inhibitora receptora interleukiny 1 i osiągnięcie w jego wyniku redukcji deficytu neurologicznego oraz poprawy rokowania dotyczące przeżycia.

**UDZIAŁ RECEPTORÓW NUKLEOTYDOWYCH
W INDUKCJI PROCESÓW ZAPALNYCH
ÓŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO**

Receptory P2 są obecne na większości komórek OUN, głównie astrogleju i mikrogleju⁽⁶²⁾. Enzymy – ektonukleotydazy, które hydrolizują pozakomórkowe nukleotydy, również znajdują się na komórkach OUN, takich jak astrocyty, oligodendrocyty i komórki mikrogleju. U zwierząt na powierzchni neuronów kontaktujących się z płynem mózgowo-rdzeniowym (*cerebrospinal fluid-contacting neurons*, CFCN) oraz na komórkach spłotu naczyniówkowego komór bocznych stwierdzono obecność receptorów P2X₂, P2X₇ i P2Y₂^(63,64). Sugeruje to, że ATP, aktywując receptory P2X i P2Y, może uczestniczyć w procesach zapalnych⁽⁶⁵⁾. W płynie mózgowo-rdzeniowym wykazano aktywność niektórych enzymów biorących udział w przemianie ektonukleotydów i ektonukleozydów^(64,66). U zwierząt zaobserwowano aktywność egzo-NTPD-az, natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym człowieka – deaminazy adenozy (ADA)^(64,67,68). Badacze przypuszczają, że w wywołaniu procesów zapalnych mogą uczestniczyć następujące receptory purynowe: P2X₇, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂^(11,12,69-73). Od niedawna wiadomo, że znajdujący się poza komórką ATP aktywuje receptory P2, co stymuluje procesy zapalne, proliferację komórek mikrogleju i limfocytów oraz wydzielanie cytokin⁽⁶⁹⁻⁷³⁾. Gromadzenie dowodów potwierdzających ten fakt oraz ich interpretacja zajęły badaczom ostatnich kilka lat^(11,12,14,15). Pierwszym etapem było sklonowanie receptorów P2 i udowodnienie ich ekspresji na komórkach zapalnych^(69,70). W drugim etapie odkryto, że P2X₇ uczestniczy w dojrzewaniu i wydzielaniu kluczowej cytokiny prozapalnej – IL-1β. Stwierdzono również, że podczas zapalenia w przestrzeni pozakomórkowej rośnie stężenie ATP^(69,70,74). Dziś jest oczywiste, że ADP, wywołując aktywność receptorów P2X₇, uwalnia IL-1β z komórek mikrogleju^(75,76). Zarówno ATP, jak i ADP przez uaktywnienie P2Y₁₂ pobudzają mikroglej do chemotaksji, podczas gdy UDP przez aktywację P2Y₆ ułatwia fagocytozę pozostałości uszkodzonych komórek. Okazuje się również, że ATP jest nieodzowny do wytwarzania przez komórki odpornościowe Th1 cytokin oraz IFN-γ, który powoduje wydzielanie przez limfocyty i makrofagi innych związków biorących udział w procesach zapalnych⁽⁷⁷⁾.

W warunkach fizjologicznych stężenie ATP w przestrzeni pozakomórkowej jest niskie (nM), natomiast w komórce bardzo wysokie (5-10 mM)^(69,70,75). Jego uwalnianie do przestrzeni pozakomórkowej z uszkodzonych komórek bądź zapalnych OUN należy uznać za szczególnie ważny i niebezpieczny sygnał. Wzrost stężenia ATP, pochodzącego z uszkodzonych komórek w przestrzeni pozakomórkowej, a także niewydolność bądź zaburzenia hydrolizy tego nukleotydu mogą doprowadzić do znacznego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Receptor P2X₇, znany wcześniej pod nazwą P2X₂, zwany był „receptorem śmierci komórek”⁽⁷⁵⁾. Wyróżnia się spośród innych receptorów rodziny P2, bowiem w odróżnieniu od nich wymaga do aktywacji zarówno μM, jak i mM stężeń ATP^(62,78). W OUN P2X₇ jest obecny na komórkach mikrogleju, komórkach Schwanna i astrocytach, jak również na limfocytach, erytrocytach, monocytach i tkankowych makrofagach⁽⁷⁸⁻⁸²⁾. Aktywacja tego receptora, monocytów/makrofagów i komórek śródbłonna powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia potasu, co z kolei prowadzi do pobudzenia kaspazy 1 oraz uwalniania do przestrzeni pozakomórkowej cytokin prozapalnych, w tym dojrzałej formy IL-1β i TNF-α, czego skutkiem jest wewnątrzkomórkowa mobilizacja jonów Ca²⁺^(78,80,83,84). W ośrodkowym układzie nerwowym w procesie zapalnym stężenie ATP w przestrzeni pozakomórkowej znacząco rośnie i aktywuje receptor P2X₇, który następnie bierze udział w dojrzewaniu i wydzielaniu kluczowej cytokiny prozapalnej – IL-1β^(23,72,76,83,85). Wzrost jej stężenia prowadzi do rozpoczęcia syntetazy tlenu azotu, cyklooksygenazy 2 i TNF-α^(78,86). Dodatkowo stymulacja tego receptora aktywuje wydzielanie z astrocytów neurotransmiterów pobudzających (glutaminiany i asparaginiany)^(23,73,78,86). Oba te procesy blokowane są przez utlenioną formę ATP⁽⁷⁷⁾. Aktywacja P2X₇ powoduje także uruchomienie szeregu mechanizmów, w które zaangażowane są następujące enzymy: fosfolipaza D (PLD), fosfolipaza A2 (PLA2), czynnik jądrowy kappa B (*nuclear factor kappa*, NF-κB) oraz kinazy białkowe pobudzone przez mitogen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs)^(78,81). Cytokiny wytworzone w wyniku aktywacji receptora P2X₇ przyczyniają się do dalszego rozwoju stanów zapalnych. Dojrzała forma IL-1β uruchamia produkowanie IFN-γ przez limfocyty T oraz IL-6 przez makrofagi i komórki śródbłonna, a także zwiększa adhezję limfocytów do komórek śródbłonna, co jest następstwem zwiększonej ekspresji cząsteczek,

Receptor	Naturalni agoniści	Ekspresja receptorów w OUN	Funkcje i skutki aktywacji receptorów w OUN	Eksperymentalne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE)
P2X ₇	ATP (mM)	Astrocyty, komórki mikrogleju, oligodendrogleju, komórki Schwanna, leukocyty	<ul style="list-style-type: none"> • Indukuje dojrzewanie i uwalnianie IL-1β • Aktywuje proliferację i apoptozę komórek mikrogleju • Wywołuje wytwarzanie nadtlenu azotu i uwalnianie ATP przez komórki mikrogleju 	<ul style="list-style-type: none"> • Aktywacja P2X₇ powoduje powstanie plak podobnych jak u chorych z SM • U myszy pozbawionych receptorów P2X₇ oraz u myszy, którym podano antagonistę P2X₇, obniżona ciężkość przebiegu EAE
P2Y ₂	ATP, UTP	Astrocyty, neurony, komórki mikrogleju, leukocyty	<ul style="list-style-type: none"> • Wpływa na migrację komórek gleju i leukocytów • Aktywuje uwalnianie chemokin, IL-8 i MCP-1 	Nieznana
P2Y ₆	UDP	Komórki mikrogleju, leukocyty, komórki naczyń krwionośnych	<ul style="list-style-type: none"> • Wpływa na migrację leukocytów przez wytwarzanie IL-8 • Wpływa na fagocytozę mikrogleju 	Nieznana
P2Y ₁₁	ATP, ADP	Leukocyty	<ul style="list-style-type: none"> • Zaangażowany w chemotaksję i apoptozę neutrofilów • Wpływa na odpowiedź immunologiczną komórek dendrytycznych 	Nieznana

Tabela 1. Receptory P2 w procesach neurozapalnych ośrodkowego układu nerwowego. Tabela zmodyfikowana na podstawie pracy Ciesłaka i wsp.⁽¹⁰⁹⁾

takich jak selektyna E, ICAM-1, VCAM-1. W obecności cytokin prozapalnych, w tym TNF- α i IFN- γ , dochodzi do nadmiernej ekspresji VCAM-1 na komórkach śródbłonna. Białka adhezyjne znajdujące się na powierzchni tych komórek (np. VCAM-1) pełnią ważną funkcję w przenikaniu autoreaktywnych limfocytów T do ośrodkowego układu nerwowego, gdyż wiąże się z nimi znajdująca się na powierzchni limfocytów VLA-4. Migrujące do obszaru niedokrwienia mózgu leukocyty pogłębiają uszkodzenie neuronów w wyniku uwalniania kolejnych cytokin neurotoksycznych, czynników zwięzających naczyń i enzymów proteolitycznych⁽⁴⁰⁾. W migracji limfocytów do OUN czynnie uczestniczą ATP i enzymy biorące udział w ich przemianach^(87,88). W procesie tym adenozyne działa przeciwnie wobec ATP. Komórki limfoidalne i mające z nimi związek wysokie stężenie ATP oraz niskie stężenie adenozyne w połączeniu z zależnym od leukocytów hamowaniem endotelialnej 5'-nukleotyduzji ułatwiają migrację adherentnych leukocytów do OUN⁽⁸⁹⁾. W warunkach fizjologicznych enzymy związane z komórkami śródbłonna, takie jak NTPD-azy i 5'-nukleotyduza, skutecznie degradują ATP i ADP do AMP i adenozyne^(71,87,90-94). W sytuacji odwrotnej wysoka aktywność na powierzchni limfocytów: kinaz nukleotyduzji, kinazy adenozyne, deaminazy adenozyne oraz ektonukleotyduzji i prawdopodobnie NTPD-azy 1 sprzyja resyntezie nukleotyduzji i obniża stężenie pozakomórkowej adenozyne^(71,87,95). Dzięki temu możliwe jest utrzymanie mikromolarnego stężenia ATP w bliskości komórek limfoidalnych⁽⁸⁷⁾. W drugim etapie ostrego zapalenia i niedotlenienia dochodzi do wzrostu aktywności ektoenzymów, do których zalicza się NTPD-azę 1 i ekto-5'-nukleotyduzję na śródbłonna, biorących udział w degradacji nukleotyduzji^(90,94,95). Ponadto wykazano, że u zwierząt w następstwie ogniskowego niedokrwienia mózgu zwiększa się ekspresja ekto-5'-nukleotyduzji komórek glejowych⁽⁹⁵⁾. Efektem jest wzrost wewnątrznacyniowego stężenia adenozyne oraz wygaszenie procesów zapalnych przez wpływ na barierę śródbłonna, adhezję i migrację limfocytów^(3,96). Wraz ze zwiększonym wytwarzaniem pozakomórkowej adenozyne dochodzi do obniżenia wychwytu zwrotnego adenozyne do komórek spowodowanego zmniejszeniem ekspresji transporterów białkowych dla tego nukleotyduzji oraz do rozszerzenia możliwości sygnalizacyjnych ektoadenozyne na skutek zwiększenia poziomu transkrypcji jej receptora^(3,87). Rosnące stężenie pozakomórkowej adenozyne aktywuje receptory A_{2A} i A_{2B}, co skutkuje wzrostem stężenia cAMP w efektorowych komórkach zapalnych i powoduje zahamowanie uwalniania z nich czynników prozapalnych^(3,27,89,96). Stwierdzono, że inhibitory ekto-NTPD-azy mogą znacznie zredukować wydzielanie IL-2 i IFN- γ oraz w mniejszym stopniu wytwarzanie TNF- α , IL-10 i IL-5. Ich aktywność pozostawała bez wpływu na wydzielanie IL-4⁽⁹⁵⁾.

Z uwagi na szerokie spektrum procesów immunologicznych będących następstwem aktywacji receptora P2X₇ prowadzone są intensywne badania nad jego antagonistami, którzy (jak przypuszczają badacze) będą w stanie zmniejszyć nasilenie procesów zapalnych w OUN^(91,97-99).

Receptor P2Y₁₁ o wysokiej specyficzności względem ATP bierze udział w regulacji odporności wrodzonej i nabytej oraz

w modyfikacji działania komórek dendrytycznych (*dendritic cells*, DCs), które są jedynymi uznawanymi komórkami prezentującymi antygen. Dzieli się je na komórki DC-1 (pochodzenie mieloidalne), powodujące polaryzację odpowiedzi odpornościowej w kierunku limfocytów Th1, oraz komórki DC-2 (pochodzenie limfoidalne), które wywołują polaryzację odpowiedzi w kierunku limfocytów Th2. Ich podstawowymi funkcjami są pochwylenie, przeniesienie antygeny do węzłów chłonnych oraz prezentacja antygeny limfocytom Th, a także udział w polaryzacji immunologicznej. Chociaż zdolność komórek dendrytycznych do wydzielania cytokin *in vitro* jest dobrze udokumentowana, nie ma jak dotąd dostatecznych dowodów na istnienie takiego procesu *in vivo*. Receptor P2Y₁₁ jest obecny na komórkach dendrytycznych, granulocytach i limfocytach^(88,100-102). Jego aktywacja powoduje wzrost wydzielania IL-23 oraz zahamowanie produkcji IL-12 i IL-27 przez komórki dendrytyczne⁽⁸⁸⁾. Ważną funkcję w procesach zapalnych pełni IL-12, która stymuluje wytwarzanie IFN- γ przez komórki NK (*natural killer cells*), limfocyty NKT (*natural killer T cells*) i limfocyty T⁽⁸⁸⁾. Odgrywa też kluczową rolę w pobudzeniu limfocytów T i komórek NK. Indukuje odpowiedź immunologiczną typu Th1, bowiem uczestniczy w aktywacji różnicowania niedojrzałych limfocytów w pomocnicze limfocyty T (*T helper*). Interleukina IL-27 jest szczególnie ważna na początkowym etapie odpowiedzi typu Th1. Uaktywnia limfocyty T i komórki NK do wydzielania IFN- γ , proliferacji i cytotoksyczności. Z drugiej strony powstrzymuje uwalnianie IL-2, co skutkuje inhibicją odpowiedzi immunologicznej. Zatem hamowanie wydzielania IL-12 i IL-27 przez ATP lub PGE₂ w warunkach fizjologicznych może prowadzić do powstania mechanizmów polegających na ograniczeniu aktywacji limfocytów T⁽⁸⁸⁾. Hamujący wpływ ATP na powyższe procesy mógłby okazać się korzystny w niektórych stanach patologicznych związanym z pobudzeniem limfocytów T i przenikaniem ich do OUN. Interleukina IL-23 jest produkowana przez komórki dendrytyczne i aktywuje proliferację oraz cytotoksyczność limfocytów T. Jest niezbędna do powstawania limfocytów T pamięci i procesu autoimmunizacji. Dzięki temu limfocyty T pamięci są w stanie wydzielać IL-17. Jest to powód, dla którego IL-23 odgrywa ważną rolę w chorobach autoimmunologicznych, np. w autoimmunologicznym zapaleniu mózgu. Vitiello i wsp.⁽¹⁰²⁾ twierdzą, że pobudzenie receptora P2Y₁₁ przez ATP ogranicza u ludzi proliferację komórek NK, powoduje w nich wzrost cAMP, co hamuje chemotaksję i cytotoksyczność tych komórek. Ponadto ATP wykazuje hamujący wpływ na ekspresję IFN- γ i IL-2, a u ludzi proliferację limfocytów T⁽¹⁰²⁾. Możliwy jest zatem inny skutek aktywacji P2Y₁₁ i P2X₇ przez ATP, zależny od jego pozakomórkowego stężenia. Ponieważ do uaktywnienia receptora P2Y₁₁ potrzebne są niższe stężenia ATP niż w przypadku P2X₇, następstwa aktywacji tego ostatniego mogą pojawić się wówczas, gdy stężenie ATP poza komórką osiągnie wysokie miano. Interesującym spostrzeżeniem jest doniesienie Marteau i wsp.⁽¹⁰³⁾, którzy wykazali, że również ADP, pobudzając P2Y₁₁, hamuje wydzielanie z komórek dendrytycznych IL-12p70 i IL-12p40 oraz TNF- α . Okazuje się, że ATP ma wpływ na czynność komórek dendrytycznych nie tylko bezpośrednio (przez wzrost cAMP i aktywację P2Y₁₁),

lecz także pośrednio, będąc źródłem pozakomórkowego ADP, który pobudza receptory zależne od białka $G_i^{(103)}$.

Receptor $P2Y_6$ jest szeroko rozpowszechniony w mózgu, mięśniach gładkich naczyń krwionośnych, śródbłonku naczyń oraz makrofagach^(62,104). Jest sprzężony z białkiem G_q i aktywowany wyłącznie przez UDP⁽¹⁰⁴⁾. Jego pobudzenie powoduje wytwarzanie interleukiny 8 przez monocyty^(69,70,80). Dotychczas udział $P2Y_6$ stwierdzono w chorobach zapalnych płuc, jelit i nowotworach, ale nie poznano jego roli w procesach zapalnych OUN^(69,70,80).

Na limfocytach wykazano największą ekspresję receptorów $P2Y_{12}$. Chociaż nie wiadomo, jaką funkcję pełnią one w procesach zapalnych, to przypuszcza się, że klopidogrel, który jest antagonistą $P2Y_{12}$ na płytkach krwi, może również wykazywać działanie przeciwzapalne⁽¹⁰⁵⁾. Wśród receptorów $P2X$ najwyższą ekspresją na limfocytach charakteryzuje się **receptor $P2X_4$** , jednak również w jego przypadku badacze nie są pewni, jaką rolę odgrywa w procesach zapalnych⁽¹⁰⁵⁾. Sądzi się, że aktywacja $P2X_4$ zlokalizowanego na komórkach mikrogleju może wpływać na wydzielanie cytokin⁽¹⁰⁶⁾.

OMÓWIENIE

W ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu wzrost stężenia ATP poza komórką jest ważnym sygnałem ostrzegawczym, wskazującym na rozwój procesów zapalnych i działanie apoptotyczne^(73,107,108). Indukcja procesów zapalnych odbywa się przede wszystkim przez aktywację receptora $P2X_7$, w następstwie czego dochodzi do wzrostu sekrecji IL-1 β , która aktywuje inne związki, takie jak: prokaspaza 1, syntetaza tlenu azotu, cyklooksigenaza 2 i TNF- α , pobudza wytwarzanie IFN- γ i IL-6 przez limfocyty, makrofagi i komórki śródbłonka^(78,86). Adenozynotrifosforan znajdujący się poza komórką, obok działania prozapalnego i apoptotycznego, uruchamia szereg innych procesów metabolicznych, w które zaangażowane są następujące enzymy: fosfolipazy D i A2, kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (MAPKs) oraz czynnik jądrowy kappa B (NF- κ B).

Do przerwania tego niebezpiecznego mechanizmu konieczna jest przemiana ATP do adenozyne o silnym działaniu przeciwzapalnym^(75,109). W celu osiągnięcia wzrostu jej stężenia poza komórką wskazana byłaby aktywacja enzymów uczestniczących w przemianie nukleotydów, takich jak NTPD-azy i 5'-nukleotydaza, przy jednoczesnym hamowaniu aktywności deaminazy adenozyne^(90,109).

Inną metodą osłabienia działania prozapalnego ATP jest zastosowanie antagonistów receptora $P2X_7$, którzy, jak można przypuszczać, są w stanie zmniejszyć intensywność procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym. Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad potencjalnymi antagonistami receptora $P2X_7$ ^(78,91,97-99).

Kontynuacja badań jest również konieczna ze względu na niedostateczną wiedzę o skutkach aktywacji innych receptorów purynowych, zwłaszcza $P2Y_{11}$.

Uwalnianie już w pierwszych godzinach zawału mózgu cytokiny indukują procesy zapalne, wykazują również działanie prozakrzepowe. Procesy te powiększają obszar uszkodzenia

mózgu, a w konsekwencji stopień deficytu neurologicznego, oraz rokują niekorzystnie co do przeżycia. Ponadto IL-1 β aktywuje leukocyty, zwiększa ich adhezję do komórek śródbłonka, bierze udział, przez wywołanie ekspresji cząstek adhezji międzykomórkowej (ICAM-1) i adhezji naczyniowej 1 (VCAM-1), w przenikaniu limfocytów T do OUN. Sprzyja temu wysokie stężenie ATP i niskie stężenie adenozyne w przestrzeni pozakomórkowej. Leukocyty gromadzą się w regionie niedokrwienia mózgu powiększając uszkodzenie mózgu, gdyż, przylegając do śródbłonka, upośledzają przepływ mózgowy krwi. W pierwszym etapie niedokrwienia mózgu dochodzi zatem do zachwiania równowagi enzymów związanych ze śródbłonkiem i enzymów mających związek z powierzchnią limfocytów. Wysoka aktywność kinaz nukleotydów, kinazy adenozyne, a także deaminazy adenozyne oraz niska aktywność ektonukleotydazy i prawdopodobnie NTPD-azy 1 sprzyjają utrzymaniu mikromolarnego stężenia ATP (tło-ATP) w bliskości komórek limfoidalnych, co umożliwia migrację limfocytów do OUN⁽⁸⁷⁾. Pożądany jest w tej sytuacji wzrost aktywności NTPD-azy 1 i ekto-5'-nukleotydazy na śródbłonku z jednoczesnym zahamowaniem aktywności deaminazy adenozyne, co sprzyja degradacji nukleotydów, powoduje zwiększenie wewnątrznaczyniowego stężenia adenozyne i wygaszenie procesów zapalnych przez wpływ na barierę śródbłonka, adhezję i migrację limfocytów.

Nadzieję na opracowanie skutecznych działań przeciwzapalnych budzą obecnie prowadzone badania u chorych z udarem niedokrwiennym, którym podaje się dożylnie antagonistę receptora dla interleukiny 1 (IL-1Ra)⁽⁶⁰⁾.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Wardas J.: Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol. J. Pharmacol.* 2002; 54: 313-326.
2. Frizzo M., Lara D., Dahm K. i wsp.: Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 2001; 12: 879-881.
3. Stone T.W., Ceruti S., Abbraccio M.P.: Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009; 193: 535-587.
4. Jarvis G.E., Humphries R.G., Robertson M.J., Leff P.: ADP can induce aggregation of human platelets *via* both $P2Y_1$ and P_{27} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 129: 275-282.
5. Cieślak M., Komoszyński M.: Rola i potencjalne znaczenie terapeutyczne nukleotydów i nukleozydów w udarze niedokrwiennym mózgu. *Aktualn. Neurol.* 2004; 4: 126-131.
6. Gachet C., Hechler B., Léon C. i wsp.: Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb. Haemost.* 1997; 78: 271-275.
7. Gachet C.: ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 222-232.
8. Hechler B., Eckly A., Ohlmann P. i wsp.: The $P2Y_1$ receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br. J. Haematol.* 1998; 103: 858-866.
9. Storey R.F., Sanderson H.M., White A.E. i wsp.: The central role of the P_{27} receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br. J. Haematol.* 2000; 110: 925-934.

10. Gachet C.: P2Y₁₂ receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signal.* 2012; 8: 609-619.
11. Burnstock G.: Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 659-797.
12. Burnstock G., Krügel U., Abbracchio M.P., Illes P.: Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 2011; 95: 229-274.
13. Di Iorio P., Ballerini P., Traversa U. i wsp.: The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia* 2004; 46: 356-368.
14. Burnstock G.: Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 1972; 24: 509-581.
15. Burnstock G.: Purine-mediated signaling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001; 22: 182-188.
16. Cieślak M.: Badania ektopuryn i ektopirymidyn w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z udarem niedokrwiennym mózgu o różnej etiologii. Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych. Wojskowy Instytut Medycyny Lotniczej w Warszawie, Warszawa 2009.
17. Cieślak M., Mosińska J., Komoszyński M.: Changes in concentration of nucleotidic and nucleosidic agonist of P receptor in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with neurological disorders. *Eur. J. Neurol.* 2004; 11 (supl. 2): 221.
18. Czarnecka J., Cieślak M., Komoszyński M.: Application of solid phase extraction and high-performance liquid chromatography to qualitative and quantitative analysis of nucleotides and nucleosides in human cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; 822: 85-90.
19. Cieślak M., Czarnecka J., Komoszyński M.: The purine and pyrimidine nucleotides of human cerebrospinal fluid. *Eur. J. Neurol.* 2005; 12 (supl. 2): 172.
20. Cieślak M., Czarnecka J., Banach M., Komoszyński M.: ATP and ADP are present in cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Eur. J. Neurol.* 2006; 13 (supl. 2): 61.
21. Rodríguez-Núñez A., Camiña F., Lojo S. i wsp.: Concentrations of nucleotides, nucleosides, purine bases and urate in cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Acta Paediatr.* 1993; 82: 849-852.
22. Stover J., Lowitzsch K., Kempinski O.S.: Cerebrospinal fluid hypoxanthine, xanthine and uric acid levels may reflect glutamate-mediated excitotoxicity in different neurological diseases. *Neurosci. Lett.* 1997; 238: 25-28.
23. Dunan S., Anderson C.M., Keung E.C. i wsp.: P2X₇ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 2003; 23: 1320-1328.
24. Matute C., Cavaliere F.: Neuroglial interactions mediated by purinergic signalling in the pathophysiology of CNS disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2011; 22: 252-259.
25. Matute C.: Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. *J. Anat.* 2011; 219: 53-64.
26. Abbracchio M.P., Burnstock G.: Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors? *Pharmacol. Ther.* 1994; 64: 445-475.
27. Abbracchio M.P., Ceruti S.: P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 13-25.
28. Matute C., Torre I., Pérez-Cerdá F. i wsp.: P2X₇ receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci.* 2007; 27: 9525-9533.
29. Zalewska-Kaszubska J.: Rola adenozyiny w procesach neurodegeneracyjnych. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2002; 36: 329-336.
30. Rathbone M.P., Middlemiss P.J., Gysbers J.W. i wsp.: Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 1999; 59: 663-690.
31. Ballerini P., Di Iorio P., Caciagli F. i wsp.: P2Y₂ receptor up-regulation induced by guanosine or UTP in rat brain cultured astrocytes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2006; 19: 293-308.
32. Lambertsen K.L., Meldgaard M., Ladeby R., Finsen B.: A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005; 25: 119-135.
33. Clausen B.H., Lambertsen K.L., Meldgaard M., Finsen B.: A quantitative *in situ* hybridization and polymerase chain reaction study of microglial-macrophage expression of interleukin-1 β mRNA following permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 2005; 132: 879-892.
34. Clausen B.H., Lambertsen K.L., Babcock A.A. i wsp.: Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J. Neuroinflammation* 2008; 5: 46.
35. Boutin H., LeFeuvre R.A., Horai R. i wsp.: Role of IL-1 α and IL-1 β in ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 2001; 21: 5528-5534.
36. Lambertsen K.L., Biber K., Finsen B.: Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012; 32: 1677-1698.
37. Maas M., Furie K.: Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomark. Med.* 2009; 3: 363-383.
38. Sairanen T., Carpén O., Karjalainen-Lindsberg M.L. i wsp.: Evolution of cerebral tumor necrosis factor- α production during human ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32: 1750-1758.
39. Dziewulska D., Mossakowski M.J.: Cellular expression of tumor necrosis factor and its receptors in human ischemic stroke. *Clin. Neuropathol.* 2003; 22: 35-40.
40. Zaremba J., Losy J.: Cytokiny w klinicznym i doświadczalnym udarze niedokrwiennym mózgu. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2004; 38 (supl. 1): 57-62.
41. Zaremba J., Losy J.: Early TNF- α levels correlate with ischaemic stroke severity. *Acta Neurol. Scand.* 2001; 104: 288-295.
42. Zaremba J., Skrobanski P., Losy J.: Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct. *Biomed. Pharmacother.* 2001; 55: 258-263.
43. Kes V., Simundic A., Nicolac N. i wsp.: Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome. *Clin. Biochem.* 2008; 41: 1330-1334.
44. De Bilbao F., Arsenijevic D., Moll T. i wsp.: *In vivo* over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice. *J. Neurochem.* 2009; 110: 12-22.
45. Tuttolomondo A., Di Raimondo D., di Sciacca R. i wsp.: Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14: 3574-3589.
46. Biber K., Pinto-Duarte A., Wittendrop M.C.: Interleukin-6 upregulates neuronal adenosine A₁ receptors: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 2237-2250.
47. Pizzi M., Sarnico I., Boroni F. i wsp.: Prevention of neuron and oligodendrocyte degeneration by interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor/IL-6 fusion protein in organotypic hippocampal slices. *Mol. Cell. Neurosci.* 2004; 25: 301-311.
48. Nelson T.E., Netzeband J.G., Gruol D.L.: Chronic interleukin-6 exposure alters metabotropic glutamate receptor-activated calcium signalling in cerebellar Purkinje neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 20: 2387-2400.
49. Conroy S., Nguyen V., Quina L. i wsp.: Interleukin-6 produces neuronal loss in developing cerebellar granule neuron cultures. *J. Neuroimmunol.* 2004; 155: 43-54.
50. Tarkowski E., Rosengren L., Blomstrand C. i wsp.: Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 110: 492-499.

51. Beridze M., Sanikidze T., Shakarishvili R. i wsp.: Selected acute phase CSF factors in ischemic stroke: findings and prognostic value. *BMC Neurol.* 2011; 11: 41.
52. Montaner J., Rovira A., Molina C. i wsp.: Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003; 23: 1403-1407.
53. Sun Y., Lu C.J., Lin C.H., Wen L.L.: Interleukin-1 β is increased in the cerebrospinal fluid of patients with small infarcts. *Eur. J. Neurol.* 2009; 16: 858-863.
54. Fassbender K., Rossol S., Kammer T. i wsp.: Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J. Neurol. Sci.* 1994; 122: 135-139.
55. Tarkowski E., Rosengren L., Blomstrand C. i wsp.: Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995; 26: 1393-1398.
56. Emsley H.C., Smith C.J., Gavin C.M. i wsp.: Clinical outcome following acute ischaemic stroke relates to both activation and autoregulatory inhibition of cytokine production. *BMC Neurol.* 2007; 7: 5.
57. Waje-Andreassen U., Kråkenes J., Ulvestad E. i wsp.: IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2005; 111: 360-365.
58. Becker K.: Inflammation and acute stroke. *Curr. Opin. Neurol.* 1998; 11: 45-49.
59. Becker K.: Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke. *Curr. Opin. Neurol.* 2001; 14: 349-353.
60. Smith C., Emsley H.C., Udeh C. i wsp.: Interleukin-1 receptor antagonist reverses stroke-associated peripheral immune suppression. *Cytokine* 2012; 58: 384-389.
61. Ormstad H., Dalsbotten H., Lund-Sorensen A. i wsp.: Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralisation, type, and infarct volume. *J. Neurol.* 2011; 258: 677-685.
62. Weisman G., Camden J., Peterson T. i wsp.: P2 receptors for extracellular nucleotides in the central nervous system: role of P2X₁ and P2Y₁₂ receptor interactions in neuroinflammation. *Mol. Neurobiol.* 2012; 46: 96-113.
63. Stoeckel M.E., Uhl-Bronner S., Hugel S. i wsp.: Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a γ -aminobutyric acidergic system expressing the P2X₇ subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 2003; 457: 159-174.
64. Czarna J., Roszek K., Jabłoński A. i wsp.: Some aspects of purinergic signaling in the ventricular system of porcine brain. *Acta Vet. Scand.* 2011; 53: 54.
65. Johansson P.A., Burnstock G., Dziegielewska K.M. i wsp.: Expression and localization of P2 nucleotide receptor subtypes during development of the lateral ventricular choroid plexus of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 25: 3319-3331.
66. Kashyap R.S., Kainthla R.P., Mudaliar A.V. i wsp.: Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity: a complimentary tool in the early diagnosis of tuberculous meningitis. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2006; 3: 5.
67. Cruz Portela L.V., Oses J.P., Silveira A.L. i wsp.: Guanine and adenine nucleotidase activities in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 2002; 950: 74-78.
68. Schutte C.M., Ungerer J.P., du Plessis H., van der Meyden C.H.: Significance of cerebrospinal fluid adenosine deaminase isoenzymes in tuberculous (TB) meningitis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2001; 15: 236-238.
69. Di Virgilio F.: Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 1-3.
70. Di Virgilio F., Ceruti S., Bramanti P., Abbracchio M.P.: Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci.* 2009; 32: 79-87.
71. Bours M.J., Swennen E.L., Di Virgilio F. i wsp.: Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 2006; 112: 358-404.
72. Honda S., Sasaki Y., Ohsawa K. i wsp.: Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through G_{i/o}-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* 2001; 21: 1975-1982.
73. Trautmann A.: Extracellular ATP in immune system: more than a just a danger signal. *Sci. Signal.* 2009; 2: 1-3.
74. Perregaux D., Gabel C.A.: Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 15195-15203.
75. Sperlagh B., Illes P.: Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 117-127.
76. Chakfe Y., Seguin R., Antel J. i wsp.: ADP and AMP induce interleukin-1 β release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X₇ receptor channels. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3061-3069.
77. Langston H., Ke Y., Gewirtz A. i wsp.: Secretion of IL-2 and IFN- γ but not IL-4 by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J. Immunol.* 2003; 170: 2962-2970.
78. Carroll W.A., Donnelly-Roberts D., Jarvis M.F.: Selective P2X₇ receptor antagonists for chronic inflammation and pain. *Purinergic Signal.* 2009; 5: 63-73.
79. John G.R., Simpson J.E., Woodroffe M.N. i wsp.: Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1 β signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression. *J. Neurosci.* 2001; 21: 4134-4142.
80. Gabel C.A.: P2 purinergic receptor modulation of cytokine production. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 27-38.
81. Skaper S.D., Debetto P., Giusti P.: The P2X₇ purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* 2009; 24: 337-345.
82. Grahames C.B., Michel A.D., Chessell I.P. i wsp.: Pharmacological characterization of ATP- and LLPS-induced IL-1 β release in human monocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 127: 1915-1921.
83. Lister M.F., Sharkey J., Sawatzky D.A. i wsp.: The role of purinergic P2X₇ receptor in inflammation. *J. Inflamm. (Lond.)* 2007; 4: 5.
84. Hughes J.P., Hatcher J.P., Chessell I.P.: The role of P2X₇ in pain and inflammation. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 163-169.
85. Colomar A., Marty V., Medina C. i wsp.: Maturation and release of interleukin-1 β by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X₇ receptors. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 30732-30740.
86. Narcisse L., Scemes E., Zhao Y. i wsp.: The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X₇ receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 2005; 49: 245-258.
87. Yegutkin G.G.: Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1783: 673-694.
88. Schnurr M., Toy T., Shin A. i wsp.: Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005; 105: 1582-1589.
89. Gessi S., Varani K., Merighi S. i wsp.: Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 109-116.
90. Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H.: The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2006; 2: 409-430.

91. Friedle S.A., Curet M.A., Watters J.J.: Recent patents on novel P2X₇ receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 2010; 5: 35-45.
92. Pulte E.D., Broekman M.J., Olson K.E. i wsp.: CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb. Res.* 2007; 121: 309-317.
93. Dwyer K.M., Deaglio S., Gao W. i wsp.: CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 171-180.
94. Kukulski F., Komoszyński M.: E-NTPDazy – enzymy uczestniczące w procesach sygnalizacji w centralnym układzie nerwowym. *Postępy Biol. Komórki* 2002; 3: 449-463.
95. Braun N., Lenz C., Gillardon F. i wsp.: Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.* 1997; 766: 213-226.
96. Haskó G., Pachter P., Vizi E.S., Illes P.: Adenosine receptor signaling in the brain immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26: 511-516.
97. Baxter A., Bent J., Bowers K. i wsp.: Hit-to-lead studies: the discovery of potent adamantane amide P2X₇ receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003; 13: 4047-4050.
98. Romagnoli R., Baraldi P.G., Di Virgilio F.: Recent progress in the discovery of antagonists acting at P2X₇ receptor. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2005; 15: 271-287.
99. Merriman G.H., Ma L., Shum P. i wsp.: Synthesis and SAR of novel 4,5-diarylimidazolines as potent P2X₇ receptor antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005; 15: 435-438.
100. Conigrave A.D., Fernando K.C., Gu B. i wsp.: P2Y₁₁ receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 426: 157-163.
101. Ecke D., Fischer B., Reiser G.: Diastereoselectivity of the P2Y₁₁ nucleotide receptor: mutational analysis. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 155: 1250-1255.
102. Vitiello L., Gorini S., Rosano G., la Sala A.: Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood* 2012; 120: 511-518.
103. Marteau F., Communi D., Boeynaems J.M., Suarez Gonzalez N.: Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenosine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76: 796-803.
104. Nowak J.Z., Zawilska J.B. (red.): Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. PWN, Warszawa 2004.
105. Wang L., Jacobsen S.E., Bengtsson A., Erlinge D.: P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol.* 2004; 5: 16.
106. Inoue K.: The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.* 2006; 109: 210-226.
107. Sitkovsky M.V., Ohta A.: The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol.* 2005; 26: 299-304.
108. Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-305.
109. Cieślak M., Kukulski F., Komoszyński M.: Emerging role of extracellular nucleotides and adenosine in multiple sclerosis. *Purinergic Signal.* 2011; 7: 393-402.

Szanowni Prenumeratory!

Upamiętniamy, że zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dn. 6 października 2004 roku w sprawie sposobów dopełnienia obowiązku doskonalenia zawodowego lekarzy i lekarzy dentyistów prenumerata czasopisma „AKTUALNOŚCI NEUROLOGICZNE” – indeksowanego w Index Copernicus – umożliwi doliczenie 5 punktów edukacyjnych do ewidencji doskonalenia zawodowego. Podstawą weryfikacji jest dowód opłacenia prenumeraty lub zaświadczenie wydane przez Wydawcę.